

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Renata Rodrigues de Souza

**EFEITO MODULATÓRIO DA *Senecio brasiliensis* (Spreng)  
Less. EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA  
PELA CARRAGENINA NA CAVIDADE PLEURAL**

Florianópolis  
2015



Renata Rodrigues de Souza

**EFEITO MODULATÓRIO DA *Senecio brasiliensis* (Spreng)  
Less. EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA  
PELA CARRAGENINA NA CAVIDADE PLEURAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Silvia Fröde.

Florianópolis

2015

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

Souza, Renata Rodrigues de  
Efeito modulatório da *Senecio brasiliensis* (Spreng)  
Less. em um modelo murino de inflamação induzida pela  
carragenina na cavidade pleural / Renata Rodrigues de  
Souza ; orientadora, Tânia Sílvia Fröde - Florianópolis, SC,  
2015.  
91 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Imunologia clínica. 3.  
Inflamação. I. Fröde, Tânia Sílvia . II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas. III. Título.

Renata Rodrigues de Souza

**EFEITO MODULATÓRIO DA *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less.  
EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO INDUZIDA  
PELA CARRAGENINA NA CAVIDADE PLEURAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Sílvia Fröde  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tânia Sílvia Fröde  
Orientadora - UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreza Fabro de Bem  
Membro titular - UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fátima Regina Mena Barreto Silva  
Membro titular - UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maique Weber Biavatti  
Membro titular - UFSC

*Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Antônio Nunes de Souza e Ana Maria Rodrigues de Souza, pela total dedicação e amor incondicional. Vocês são a minha razão de viver.*



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus principais professores, por me darem amor e o suporte necessário para que eu conseguisse tornar este sonho realidade. Vocês fizeram o possível e até o que parecia impossível, para que eu alcançasse o meu objetivo. Por estarem sempre ao meu lado, sabendo que sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, que é o meu maior e mais próximo exemplo de pesquisador, que me contagiou com seu entusiasmo pela ciência, e muitas vezes me apresentou visões diferentes sobre a pesquisa.

À minha família, por estarem sempre me apoiando e entenderem meus momentos de ausência. As idas para "casa" sempre me traziam mais energia para continuar. E em especial ao meu avô Antoninho, meu mágico, minha inspiração, que me apresentou ao mundo das formulações. Meu tão querido avô, obrigada por ter compartilhado comigo sua sabedoria, ensinado a satisfação em conseguir produzir algo que possa ajudar e cuidar da saúde das pessoas.

As minhas amigas, Camila, Juliana e Heloísa, que sempre estiveram comigo, ouvindo, incentivando, festejando e até chorando. Vocês são a minha família de Floripa.

Ao Fernando, que me aguentou em muitos momentos de preocupações e ansiedades, e me fez viver momentos tão felizes durante este período importante.

Agradeço também a todos os meus amigos aqui de Florianópolis e lá de Araranguá. Cada um sabe a importância que teve durante este período e sabe o quanto é especial para mim. Sintam-se lembrados neste momento.

À Ana Cláudia e Fernanda, por me acompanharem neste período, e me fazerem acreditar em mim mesma.



À minha orientadora, Tânia Silvia Fröde, por ter acreditado em mim e me proporcionado esta oportunidade e encaminhado neste trajeto.

Ao professor Eduardo Dalmarco, pela disponibilidade para auxiliar neste trabalho, sempre procurando soluções para tudo. Pelas correções, pelo apoio, e interesse em ajudar os alunos, obrigada!

Aos meus colegas de laboratório, todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu aprendizado acadêmico e crescimento pessoal. Pelos momentos de conforto, de ajuda e de descontração, obrigada!

Ao professor Moacir Pizzolatti e sua orientada Lizandra Bretanha, por fornecerem o material vegetal e pela parceria nas análises químicas necessárias.

Aos membros do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, por toda a ajuda durante o curso.

A CAPES e as demais agências de fomento, por darem a oportunidade de tantos estudantes como eu, alcançarem seus objetivos.

*Duvidar de tudo e crer em tudo são duas soluções igualmente convenientes que nos livram de ter que pensar.*

(Henri Poincaré)





## RESUMO

*Senecio Brasiliensis* Less (*S. brasiliensis*) popularmente conhecida como "Flor-das-almas", "Margaridinha" ou "Maria mole" é utilizada na medicina popular como um anti-inflamatório, no tratamento de úlcera gástrica e dor de estômago. Embora o gênero *Senecio* já tenha sido amplamente estudado para avaliar as atividades farmacológicas que suportam seu uso na medicina tradicional, poucos estudos têm avaliado a atividade anti-inflamatória desta espécie. Portanto, objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti-inflamatória da *S. brasiliensis*, uma espécie nativa no Brasil, usando um modelo murino de pleurisia induzida pela carragenina.

As flores secas de *S. brasiliensis* foram maceradas e extraídas com etanol obtendo-se o extrato bruto (CE). As frações acetato de etila (AcOEt), fração rica em alcalóides (AF), hexano (HEX) e diclorometano (DCM) foram obtidas a partir do CE. Senecionina (Sen), integerrimina (Int) e N-óxido senecionina foram obtidas da fração FA, e uma mistura de ácidos x,y-dicafeiolquínicos (1,4-, 3,4-, 3,5- e 4,5-: DCQs) foi obtida da fração AcOEt. No protocolo para identificar e elucidar a estrutura dos compostos foram utilizadas técnicas de eletroforese capilar, infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC/MS). Neste protocolo experimental utilizou-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Neste modelo foram estudados os efeitos da *S. brasiliensis* sobre: migração de leucócitos, atividades da mieloperoxidase (MPO) e adenosina desaminase (ADA) assim como as concentrações do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 17A (IL-17A). Todos estes parâmetros foram analisados no líquido da cavidade pleural, Além disso, foram analisados no tecido pulmonar, os efeitos dos compostos Sen, Int e DCQs, sobre a fosforilação da proteína p65 (p-p65) da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Ensaios colorimétricos foram utilizados para analisar

MPO e ADA e testes imunoenzimáticos (ELISA) para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A e a fosforilação da p65.

O CE, as frações AcOEt e AF, e/ou os compostos Sen, Int e DCQs inibiram os leucócitos ( $p < 0.05$ ), a atividade de MPO e ADA ( $p < 0.01$ ), as concentrações de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) e IL-17A ( $p < 0.01$ ), O CE, as frações AcOEt e AF, e DCQs, também diminuíram as concentrações de IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ). Os compostos isolados Sen, Int e DCQs inibiram fosforilação da p-65 (NF- $\kappa$ B) ( $p < 0.05$ ).

Este estudo demonstrou que a *S. brasiliensis* tem uma importante atividade anti-inflamatória pela inibição da migração de leucócitos ativados devido a diminuição de neutrófilos no sítio da inflamação. Este efeito pode ser atribuído a inibição de citocinas pró-inflamatórias e também da ativação da via do NF- $\kappa$ B. Os compostos Sen, Int, e DCQs pode ser, pelo menos em parte, responsáveis pela ação anti-inflamatória da *S. brasiliensis*.

**Palavras-chave:** *Senecio brasiliensis*, pleurisia, anti-inflamatório, senecionina, integerrimina, ácido dicafeiolquinico, carragenina, citocinas.

## ABSTRACT

*Senecio Brasiliensis* (Spreng) Less (*S. brasiliensis*), known as "Flor-das-almas", "Margaridinha" or "Maria mole", is used in folk medicine as an anti-inflammatory and to treat gastric ulcers and stomach pain. While the *Senecio* genus has been widely studied for its pharmacological activities to support its use in traditional medicine, few studies focus on the anti-inflammatory activities of the species. To investigate the anti-inflammatory activities of *S. brasiliensis*, a specie native to Brazil, using a murine model of pleurisy induced by carrageenan. The dried flowers of *S. brasiliensis* were macerated and subjected to ethanol (96%) extraction to obtain the crude extract (CE). The ethyl acetate (AcOEt), alkaloid (AF), hexane (HEX) and dichloromethane (DCM) fractions were obtained by extracting the CE with different solvents. Senecionine (Sen), integerrimine (Int) and senecionine N-oxide and a mixture of dicaffeoylquinic acids (1,4-, 3,4-, 3,5- and 4,5- dicaffeoylquinic acids, DCQs) were obtained from the AF and AcOEt fractions, respectively.

The physical characteristics and column chromatography were used to extract and identify the compounds. Nuclear magnetic resonance (NMR), and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), and high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) coupled with electrospray mass spectrometry (ESI-MS) (HPLC-DAD-MS/MS) and infrared (IR) spectroscopy were used to identify, elucidate and confirm the structures of the compounds. Swiss mice were used in the *in vivo* experiments. We evaluated the effect of the CE, its derived fractions (AcOEt, AF, HEX and DCM), and the isolated compounds (Sen, Int, N-oxide senecionine) and DCQs on: leukocyte migration, exudate concentrations, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities, and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 17A levels in the fluid leakage from the pleural cavity using a mouse model of pleurisy induced by carrageenan. The effects of the isolated compounds, Sen, Int, N-oxide senecionine and DCQs, were also analysed for their ability to inhibit p65 phosphorylation (p-p65) in the nuclear factor-kappa

B (NF- $\kappa$ B) pathway in the lung tissue. MPO and ADA were analysed by colorimetric assays, and the cytokines and protein p65 levels were determined using an enzyme immunoassay (EIA).

The CE, its AcOEt and AF fractions, and its compounds (Sen, Int and DCQs), significantly reduced leukocyte migration ( $P < 0.05$ ), MPO and ADA activities ( $P < 0.01$ ), and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), and IL-17A levels ( $P < 0.01$ ). The CE, the AcOEt and AF fractions, and the DCQs also decreased IL-1 $\beta$  levels ( $P < 0.01$ ). The isolated compounds, Sen, Int and the DCQs, inhibited p65 phosphorylation (NF- $\kappa$ B) ( $P < 0.05$ ). This study demonstrated that *S. brasiliensis* has important anti-inflammatory properties that are capable of inhibiting activated leukocyte migration by decreasing neutrophil migration. This effect may be attributed to the inhibition of pro-inflammatory cytokines and the reduction of the NF- $\kappa$ B pathway. The compounds Sen Int, and DCQs may be responsible for the anti-inflammatory actions of *S. brasiliensis*.

**Keywords:** *Senecio brasiliensis*, anti-inflammatory, senecionine, integerrimine, caffeyoilquinic acid, carrageenan, cytokines, NF- $\kappa$ B.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem da *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. ....28
- Figura 2 - Via do ácido araquidônico e mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES).....36
- Figura 3 - Vias de sinalização genômica e não genômica dos glicocorticóides em células T .....38
- Figura 4 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos .....41
- Figura 5 - Fluxograma da sequência de obtenção do extrato bruto, frações e compostos da *S.brasiliensis* .....47
- Figura 6 - Modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos .....54
- Figura 7 - Espectros de massa dos compostos da *S. brasiliensis*: (A) senecionina/integerrimina, (B) N-óxido senecionina e (C) ácido 4,5 dicafeiolquínico .....63
- Figura 8 - Efeito da *S. brasiliensis* sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B .....72
- Figura 9 - Resumo gráfico dos efeitos da *S. brasiliensis* sobre mediadores pró-inflamatórios .....78



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de animais utilizados no protocolo experimental.....	50
Tabela 2 - Melhores doses do extrato bruto da <i>Senecio brasiliensis</i> , suas frações e compostos .....	65
Tabela 3: Efeito do extrato bruto da <i>Senecio brasiliensis</i> , suas frações e compostos sobre a migração leucocitária e exsudação .....	66
Tabela 4: Efeito do extrato bruto da <i>Senecio brasiliensis</i> , suas frações e compostos sobre a atividade das enzimas MPO e ADA .....	69
Tabela 5: Efeito do extrato bruto da <i>Senecio brasiliensis</i> , suas frações e compostos sobre a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-17A .....	70



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 - Receptor A1 de adenosina  
A2A - Receptor A2A de adenosina  
A2B - Receptor A2B de adenosina  
A3 - Receptor A3 de adenosina  
AcOEt - fração acetato de etila  
ADA - adenosina desaminase  
AF - fração rica em alcalóides  
AINEs - anti-inflamatórios não esteroidais  
ANOVA - análise de variância  
BAFFR - fator de ativação de células B  
CD - cluster of differentiation = marcadores de diferenciação celular  
CD4+ - Proteína de superfície expressa em linfócitos T auxiliares  
CD8+ - Proteína de superfície expressa em linfócitos T citotóxicos  
CE - extrato bruto  
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais  
Cg - carragenina  
COX - ciclooxigenase  
CXCL - quimiocina ligante cisteína-X-cisteína  
CV - coeficiente de variação  
DCM - fração diclorometano  
DCQs - mistura de ácidos dicafeiolquínicos  
Dexa - dexametasona  
DMSO - dimetilsulfóxido  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica  
EB - extrato bruto  
ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
eNOS/NOS3 - óxido nítrico sintase constitutiva  
e.p.m. - erro padrão da média  
EUA - Estados Unidos da América  
GC - glicocorticoide  
G-CSF - fator estimulador de colônia de granulócitos  
GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos  
GR - receptor de glicocorticoide  
GRE - elementos responsivos aos glicocorticóides

HCl - ácido clorídrico  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
Hex - fração hexano  
HOCl - ácido hipocloroso  
ICAM-1 - molécula de adesão intracelular-1  
IFN- $\alpha$  - interferon alpha  
IFN- $\beta$  - interferon beta  
IFN- $\gamma$  - interferon gama  
I $\kappa$ B- $\alpha$  - I kappa B-alfa = Subunidade inibitoria do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B  
I $\kappa$ B- $\beta$  - I kappa B-beta = Subunidade inibitoria do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B  
I $\kappa$ B- $\gamma$  - I kappa B-gama = Subunidade inibitoria do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B  
IKK - I kappa B kinase  
IL - interleucina  
IL-1R - receptor de interleucina-1  
IL-1Ra - antagonista do receptor de IL-1  
Indo - indometacina  
iNOS/NOS2 - óxido nítrico sintase induzida  
Int - integerrimina  
i.p. - via intraperitoneal  
i.pl. - via intrapleural  
Linfócito T $\gamma\delta$  - linfócito T gama/delta  
LPS - lipopolissacarídeos  
LTB4 - leucotrieno B4  
MCP-1 - proteína quimiotática de monócito-1  
MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio  
mGR - receptor de glicocorticoide de membrana  
MPO - mieloperoxidase  
n - número  
NaCl - solução salina estéril  
NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido  
NaOH - hidróxido de sódio  
NF- $\kappa$ B - fator nuclear kappa B  
NIK - kinase indutora do NF- $\kappa$ B  
NK - células natural killer  
NMR - nuclear magnetic resonance  
nNOS/NOS1 - óxido nítrico sintase neuronal  
NO - óxido nítrico  
NO<sub>x</sub> -nitrito/nitrato

NO<sup>2-</sup> - nitrito  
NO<sup>3-</sup> - nitrato  
NOS - óxido nítrico sintase  
O<sup>2-</sup> - ânion superóxido  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PBS - solução salina tamponada  
PGD2 - prostaglandina D2  
PGE2 - prostaglandina E2  
PGF2 $\alpha$  - prostaglandina F2 alpha  
PGG2 - prostaglandina G2  
PGH2 - prostaglandina H2  
PGI2 - prostaglandina I2  
pH - potencial hidrogeniônico  
PLA2 - fosfolipase A2  
RANK - receptor ativador do fator nuclear kappa B  
RMN <sup>13</sup>C - ressonância magnética nuclear de carbonos  
RMN <sup>1</sup>H - ressonância magnética nuclear de prótons  
*S. brasiliensis* - *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less.  
SCF - fator de célula tronco  
Sen - senecionina  
SOD - superóxido dismutase  
TcR - receptor de células T  
Temp. - temperatura  
Th - linfócito T auxiliar  
TLR - receptor toll-like  
TMS - tetametilsilano  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral-alpha  
TNF-R1 - receptor de TNF- $\alpha$   
Treg - linfócito T regulador  
TXA2 - tromboxano A2  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina  
VCAM-1 - molécula de adesão vascular-1  
VCL3 - cloreto de vanádio III  
ZnSO4 - sulfato de zinco





# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	27
1.1 Plantas medicinais .....	27
1.1.1 Gênero <i>Senecio</i> e atividades farmacológicas .....	28
1.2 Processo inflamatório.....	29
1.3 Fármacos anti-inflamatórios.....	35
1.4 Modelos de inflamação .....	39
2 Objetivos.....	43
2.1 Objetivo geral .....	43
2.2 Objetivos específicos .....	43
3 Metodologia .....	45
3.1 Material vegetal .....	45
3.1.1.1 Fração rica em alcalóides e seus compostos isolados .....	45
3.2 Animais.....	49
3.2.1 Procedimento anestésico.....	51
3.2.2 Morte indolor assistida .....	51
3.3 Experimentos <i>in vivo</i> .....	51
3.3.1 Pleurisia induzida pela carragenina em camundongos .....	51
3.4 Técnicas utilizadas .....	52
3.4.1 Contagem total e diferencial de leucócitos .....	52
3.4.2 Determinação da exsudação .....	55
3.4.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	55
3.4.4 Determinação da atividade da adenosina desaminase .....	56
3.4.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico (NO <sub>x</sub> ) .....	56

3.4.6	Determinação das concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-17A.....	57
3.4.7	Quantificação da fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- $\kappa$ B).....	58
3.5	Reagentes.....	58
3.6	Análise estatística .....	59
4	Resultados.....	61
4.1	Análise fitoquímica.....	61
4.2	Efeito do extrato bruto, frações e compostos da <i>Senecio brasiliensis</i> (spreng) Less. sobre a migração de leucócitos e exsudação.....	61
4.3	Efeito do extrato bruto, frações e compostos de <i>Senecio brasiliensis</i> Less. sobre a atividade da mieloperoxidase e adenosina desaminase .....	66
4.4	Efeito do extrato bruto, frações e compostos de <i>Senecio brasiliensis</i> Less. sobre a concentração dos metabólitos do óxido nítrico (no <sub>x</sub> ) .....	68
4.5	Efeito do extrato bruto, frações e compostos de <i>Senecio brasiliensis</i> Less, sobre a concentração de TNF- $\alpha$ , il-1 $\beta$ e il-17A.....	69
4.6	Efeito dos compostos de <i>Senecio brasiliensis</i> Less, sobre a fosforilação da proteína p-65 (p-p65 nf- $\kappa$ B).....	71
5	discussão.....	73
6	Conclusão.....	77
	Referências .....	79
	ANEXO A - Comprovante de submissão do artigo “Modulatory effect of <i>Senecio brasiliensis</i> L. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity”... 91	

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas são uma importante fonte de compostos farmacologicamente ativos. A existência destes compostos garantiu a sobrevivências de cada planta há milhões de anos durante a evolução (Chen, 2011). As plantas das quais derivam estes compostos têm tido cada vez mais atenção de pesquisadores no mundo (Newman e Cragg, 2012; Petronilho *et al.*, 2012; Cragg *et al.*, 2014). A visão dos pesquisadores para a utilidade de produtos naturais, não é direcionada somente a produtos finais, e sim principalmente para fonte de novas estruturas químicas com potencial atividade farmacológica (Newman e Cragg, 2012).

Em 2005, entre todos os fármacos disponíveis, de 25 a 30% eram provenientes de produtos naturais ou de derivados destes (Calixto, 2005). No ano de 2010, de um total de 1.369 novos compostos publicados no *Journal of Natural Products*, 61,7% eram derivados de plantas (Kinghorn *et al.*, 2011). Entre 2008 e 2013, 19 fármacos baseados em produtos naturais foram aprovados para comercialização, sendo 5 classificados como produtos naturais, 10 como semi-sintéticos, e 10 como fármacos derivados de produtos naturais (Butler *et al.*, 2014). Para a pesquisa destes novos fármacos são necessárias 3 etapas: (1) isolamento e caracterização dos compostos ativos, (2) análise de modificação estrutural ou síntese análoga e (3) estudos de mecanismo de ação (Lee, 2010)

Sabendo da importância das plantas medicinais para a busca de novos tratamentos, o conhecimento sobre compostos bioativos se torna alvo de pesquisa. Existem cerca de 200.000 metabólitos secundários conhecidos relacionados às plantas, sendo a maioria isoprenoides, compostos fenólicos e alcalóides (Kinghorn *et al.*, 2011), classes estas presentes também na espécie *Senecio brasiliensis* Less.

### 1.1.1 Gênero *Senecio* e atividades farmacológicas

A *Senecio brasiliensis* Less (*S. brasiliensis*) é popularmente conhecida como "Maria-mole", "Flor-das-almas", "Margaridinha", "Tasteirinha" (Cabrera, 1957). É uma planta perene, com talos eretos, estriados, ramosos, densamente folhosos, com época de inflorescência entre outubro e novembro e nativa da América do Sul (Fernandes, 2009).

Figura 1 - Imagem da *Senecio brasiliensis*



Fonte: [www.ufrgs.br/fitoecologia/florars](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars)

O gênero *Senecio* tem varias atividades biológicas, como: antibacteriana, antioxidante, antiviral, antitumoral, analgésica, e anti-inflamatória (Cabrera, 1957; Gonzalez *et al.*, 2013; Manubolu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

A espécie é utilizada na medicina popular no tratamento de úlcera gástrica e dor de estômago (Hariprasath *et al.*, 2012). Os principais compostos já isolados da *S. brasiliensis* foram: senecionina, usaramina, retrorsina, integerrimina, integerrimina

N-óxido e senecifilina (Trigo *et al.*, 2003; Toma, Trigo, De Paula, *et al.*, 2004; Elias *et al.*, 2011). Ainda estudos demonstraram que os alcalóides pirrolizidínicos (PA) extraídos da *S. brasiliensis* aumentaram as concentrações de prostaglandina E2 (PGE2) na mucosa gástrica, promovendo citoproteção (Toma, Trigo, Bensuski De Paula, *et al.*, 2004).

Existem alguns relatos de casos mostrando que a espécie pode causar hepatotoxicidade quando consumida, o que é relacionado diretamente aos PAs. Porém o único estudo que se propõe testar sua toxicidade, mostrou não haver toxicidade nas doses testadas em ratos (Elias *et al.*, 2011).

## 1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um resultado de desequilíbrio na da homeostase celular e tecidual, sendo um mecanismo fundamental para o reparo do tecido após um dano eventual (Chovatiya e Medzhitov, 2014). Este processo envolve uma cascata de reações celulares contra a presença de substância endógenas ou exógenas reconhecidas pelo sistema imune como suposto agente lesivo. Esta cascata envolve o aumento da permeabilidade microvascular, migração de células imunes, liberação de mediadores inflamatórios, apoptose, fagocitose, e finalmente a reconstituição do tecido e de vasos sanguíneos (Chen, 2011). A resposta inflamatória pode estar relacionada a doenças de caráter agudo, tais como alergias, e manifestações crônicas, como doenças autoimunes, neurodegenerativas, entre outras (Medzhitov e Horng, 2009).

O reconhecimento dos agentes lesivos pode ocorrer por dois mecanismos: direto, pelo reconhecimento de características estruturais do patógeno, ou um mecanismo indireto, pelo reconhecimento de características funcionais da célula (Chovatiya e Medzhitov, 2014).

A ativação de fagócitos como neutrófilos, macrófagos e monócitos também é crucial para a eliminação de patógenos e restos celulares (Soehnlein e Lindbom, 2010). Os neutrófilos são

células do sistema imune inato que desempenham uma função protetora, sendo as primeiras células recrutadas para o local da lesão, inflamação ou infecção. Estas células tem a capacidade de eliminar patógenos, por mecanismos intra e extracelulares, como: fagocitose, liberação de enzimas, formação de espécies reativas de oxigênio, assim como pela formação de armadilhas extracelulares (proteínas e enzimas) que conseguem imobilizar o patógeno e facilitar a fagocitose (Mantovani *et al.*, 2011).

Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos no seu citoplasma: grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e terciários (gelatinases). Nos grânulos primários, a enzima mieloperoxidase (MPO) destaca-se como uma enzima proteolítica com ação microbicida (Monteseirin, 2009; Soehnlein e Lindbom, 2010; Hostetter, 2012).

A MPO é uma proteína com propriedades pró-inflamatórias que está presente principalmente nos neutrófilos, e em menor quantidade, nos mononucleares, a qual é usualmente extinta na maturação de monócitos para macrófagos (Haegens *et al.*, 2009; Arnhold e Flemmig, 2010). A ativação da enzima nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) e o influxo de íons no fagossoma favorecem a ativação da MPO (Arnhold e Flemmig, 2010). Neste processo, há consumo de oxigênio e a NADPH oxidase converte o oxigênio em radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual é dismutado a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela ação da enzima superóxido desmutase (SOD) (Arnhold e Flemmig, 2010). Neste momento, a MPO é liberada no fagossoma e catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCl) a partir do  $H_2O_2$  e de íons cloreto (Arnhold e Flemmig, 2010). No entanto, a ativação contínua do sistema MPO-  $H_2O_2$ -HOCl pode promover lesão tecidual, uma vez que o HOCl é capaz de iniciar reações oxidativas de lipídeos e no ácido desóxirribonucleico (DNA) (Malle *et al.*, 2007).

Durante a eliminação do patógeno, a MPO liberada pelos neutrófilos pode se ligar a receptores de manose de macrófagos (MNR) promovendo o aumento da produção de citocinas e quimioquinas (Nussbaum *et al.*, 2013). Esta ativação de macrófagos pela MPO, no sítio de acúmulo de neutrófilos, pode

induzir mais recrutamento de leucócitos e contribuir para a perpetuação da inflamação (Nussbaum *et al.*, 2013).

A MPO ainda pode ser considerada marcador de leucócitos ativados e de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (Lau e Baldus, 2006; Faith *et al.*, 2008).

Uma outra enzima envolvida na resposta inflamatória é a adenosina desaminase (ADA). A ADA atua no metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a deaminação da desoxiadenosina e adenosina em desoxinosina e inosina (Krenke e Korczynski, 2010).

Adenosina é um nucleosídeo endógeno constitutivamente presente em baixas concentrações no meio extracelular (Sachdeva e Gupta, 2013). Esta purina desempenha importante função nos sistemas: cardíaco, renal, hepático e respiratório. Seu efeito biológico depende do tipo de receptor ao qual esta se liga, os quais encontram-se acoplados a proteína G e são classificados em 4 tipos:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , e  $A_3$ . (Kumar e Sharma, 2009; Fredholm, 2014). Estes receptores estão expressos em vários tipos celulares incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, e podem atuar em vias fisiológicas ou patológicas, sendo que a afinidade da adenosina ao receptor é dependente da densidade do receptor no tecido (Antonioli *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Fredholm, 2014).

Os receptores considerados de alta afinidade ( $A_1$ ,  $A_{2A}$  e  $A_3$ ), necessitam de baixa concentração de adenosina para a ativação, enquanto o receptor de baixa afinidade  $A_{2B}$ , necessita de maiores concentrações do nucleosídeo (Hasko *et al.*, 2009).

Estudos mostraram que os receptores  $A_{2B}$ , atuam na adaptação do tecido, no aumento da tolerância à isquemia e na atenuação do processo inflamatório agudo em condições pelo qual as concentrações de adenosina estão elevada (hipóxia, isquemia ou inflamação). Estes estudos sugerem um papel protetor do receptor  $A_{2B}$ , principalmente associado com dano pulmonar agudo (Eckle *et al.*, 2008; Frick *et al.*, 2009; Schingnitz *et al.*, 2010; Eckle *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Estudos *in vivo* em camundongos demonstraram que a produção de adenosina

extracelular está relacionada com a proteção do pulmão após lesão induzida por bleomicina (Volmer *et al.*, 2006).

Portanto, considera-se que a atividade da ADA é importante na regulação das concentrações extracelulares de adenosina, sendo que a redução da adenosina disponível para o receptor  $A_{2B}$  é uma consequência das concentrações de ADA e de uma interação entre ADA e receptor  $A_{2B}$  (Antonoli, Fornai, *et al.*, 2014).

Um outro mediador da resposta inflamatória é o óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre de curta duração, liberado por células endoteliais e por macrófagos, capaz de regular o tônus dos vasos e vias aéreas (Tripathi *et al.*, 2007). Este mediador é produzido a partir de uma reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Thomas *et al.*, 2008). Esta enzima apresenta três isoformas: duas formas constitutivas, neuronal (nNOS, NOS1) e endotelial (eNOS, NOS3), e uma forma induzida (iNOS, NOS2), regulada por citocinas pró-inflamatórias (Stewart e Katial, 2012).

O envolvimento do NO na patologia de doenças inflamatórias, como a asma brônquica, artrite reumatóide, lupus eritematoso e osteoartrite, já está descrito na literatura (Nagy *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2010; Zeiger *et al.*, 2011; Stewart e Katial, 2012).

Além das enzimas descritas e do NO, as citocinas também são importantes mediadores da resposta inflamatória (Commins *et al.*, 2010). As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, e estão relacionadas a funções de crescimento, diferenciação e ativação celular, e desta forma, auxiliam na manutenção da homeostasia (Commins *et al.*, 2010). Dentre as citocinas com atividade pró-inflamatórias, destacam-se o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$ , e a IL-17A.

O TNF- $\alpha$  pode ser liberado por neutrófilos, macrófagos, células T e B, células citotóxicas do tipo Natural Killer (NK), mastócitos, células endoteliais, musculares, osteoclastos, entre outros. O TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a sua própria liberação ou a



liberação de outras citocinas, como a IL-1 $\beta$  (Bradley, 2008; Cantaert *et al.*, 2010). O TNF- $\alpha$  pode se ligar a dois receptores distintos: TNFR1 ou TNFR2 e, juntamente com complexos proteicos, tais como o fator 2 associado ao receptor de TNF- $\alpha$  (TRAF2), promovem a ativação do fator de transcrição nuclear-NF kappa B (NF- $\kappa$ B). Este fator de transcrição, por sua vez, pode ativar cascatas de sinalização que promovem diferentes respostas biológicas, tais como apoptose, sobrevivência, diferenciação, proliferação e/ou migração celular (Bradley, 2008; Naude *et al.*, 2011; Wajant e Scheurich, 2011).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina liberada por queratinócitos, fibroblastos, células sinoviais e endoteliais, neutrófilos, macrófagos, mastócitos, células de Schwann, micróglia, astrócitos, entre outras (Ren e Torres, 2009). A concentração desta citocina está aumentada em doenças como a artrite reumatoide, a glomerulonefrite, o enfisema, a doença inflamatória intestinal, a sepse e a asma (Goleva *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2008). Pode-se observar febre, mialgias, dor nas articulações, fadiga, dor de cabeça, náuseas, desconforto gastrointestinal, hipotensão, neutrofilia e trombocitose como resposta sistêmica a esta citocina: (Kasza, 2013).

Outra interleucina estudada no presente trabalho foi a IL-17A. A família da IL-17 é composta por seis membros, IL-17A a IL-17F, que apresentam 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 na literatura (Miossec e Kolls, 2012). Deste modo, a IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que contribui na patogênese de várias doenças inflamatórias, autoimunes e câncer (Cua e Tato, 2010; Miossec e Kolls, 2012). Esta citocina é liberada por células da resposta imune inata (neutrófilos, células epiteliais e NK) e adaptativa (linfócitos citotóxicos do tipo CD8+, Linfócitos T gama delta (T $\gamma\delta$ ), linfócitos T auxiliares do tipo CD4+ e linfócitos T helper 17 (TH17)) (Benghiat *et al.*, 2009; Aamodt *et al.*, 2010; Cua e Tato, 2010). 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 como o fator de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), além de quimiocinas (interleucina-8 (IL-8), quimiocina ligante do tipo cisteína-cisteína-1 (CXCL1), quimiocina ligante do tipo cisteína-X-cisteína-2 (CXCL2), quimiocina ligante do tipo cisteína-X-cisteína-5 (CXCL5), quimiocina ligante do tipo cisteína-X-cisteína-7 (CXCL7) e proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) (Benghiat *et al.*, 2009; Nembrini *et al.*, 2009; Cua e Tato, 2010; Miossec e Kolls, 2012)

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) está envolvido na regulação da cadeia leve de imunoglobulina kappa em células B e hoje compõe uma família de fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB e c-Rel) (Diamant e Dikstein, 2013), que podem ser ativados por citocinas como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ , vírus e estresse oxidativo (Lee e Yang, 2013).

O NF- $\kappa$ B é conhecido como um fator regulador da resposta inflamatória. Quando este fator é ativado, ocorre a indução da expressão de genes que regulam diversos processos biológicos, como a inflamação, a resposta ao estresse, a proliferação e a diferenciação celular, a apoptose e o reparo tecidual (Lee e Yang, 2013). Esta ativação é normalmente um processo transitório, no entanto, em certas doenças inflamatórias ou no câncer esta ativação é persistente. A atividade dos diferentes dímeros de NF- $\kappa$ B é regulada por sua interação com proteínas inibitórias (p105, p100, e I kappa B-alpha, beta, gama (I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), que mantém estes complexos no citoplasma em sua forma inativa. Quando a célula recebe um sinal para ativação do NF- $\kappa$ B, a interação entre o I $\kappa$ B e o NF- $\kappa$ B é interrompida permitindo que o NF- $\kappa$ B migre para o núcleo para ativar diferentes genes. A maioria destes sinais de ativação converge para a ativação de um complexo de alto peso molecular, que contém uma I $\kappa$ B kinase (IKK) que estimula o NF- $\kappa$ B em duas diferentes vias de sinalização, a canônica e a não canônica (Diamant e Dikstein, 2013).

Na ativação do NF- $\kappa$ B pela via canônica, os sinais são mediados por receptores do tipo toll-like (TLRs), receptor para IL-1 (IL-1R), receptor para TNF (TNFR) e receptores para antígenos. Entre as moléculas que estimulam esta via podemos citar a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e o lipopolissacarídeo (LPS). Em sequência a interação das moléculas com seus respectivos receptores, ocorre a ativação do complexo I $\kappa$ B kinase (I $\kappa$ K), que fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$ . Outra via alternativa para a ativação do NF- $\kappa$ B é a via não canônica. Nesta via os sinais são mediados por diferentes receptores, que incluem o fator de ativação de células B (BAFFR), receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), entre outros. Na sequência, ocorre a ativação da proteína quinase indutora do NF- $\kappa$ B (NIK), que fosforila e ativa a IKK1. Esta ativação induz a fosforilação da proteína p100, resultando na ubiquitinação e degradação parcial do p52 (Hoesel e Schmid, 2013).

### 1.3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

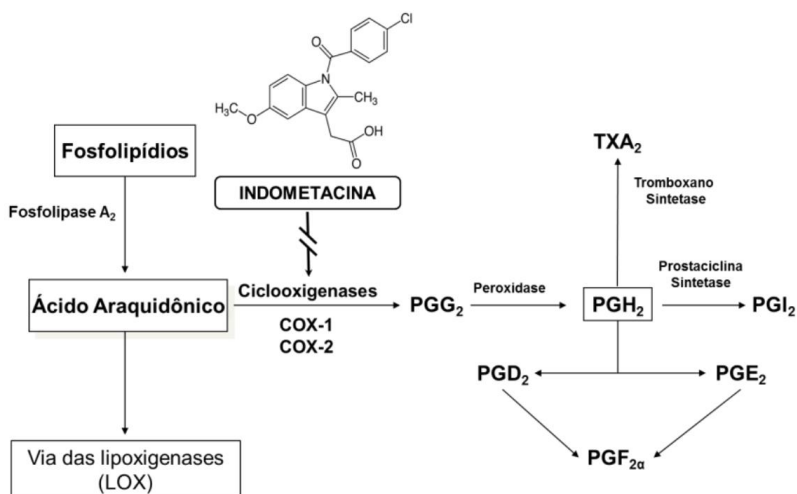
Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) representam uma classe de diversos medicamentos, e são os fármacos mais comumente utilizados em todo mundo. Esta classe de medicamentos tem efeito analgésico, anti-inflamatório e antipirético (Conaghan, 2012). A ação dos AINEs foi primeiro descrita em 1971 por Vane e Piper, quando eles demonstraram que esta classe inibia a biosíntese de prostaglandinas pela prevenção da ligação de ácido aracdônico no sítio ativo da enzima ciclooxigenase (COX), impedindo assim a síntese de eicosanóides e de prostanóides (Suleyman *et al.*, 2007; Rao e Knaus, 2008; Conaghan, 2012). Este efeito inibidor é também a principal causa da toxicidade desta classe, como a toxicidade renal, cardiovascular e gastrointestinal (Patrono e Rocca, 2009; Mcgettigan e Henry, 2011)

Os AINEs podem ser classificados ainda como inibidores seletivos da COX-2 e inibidores não-seletivos da COX-2, sendo que a diferença entre eles não está somente na ação, mas também nos efeitos adversos (Conaghan, 2012).

O AINE escolhido como fármaco de referência foi a indometacina, um derivado do ácido acético, classificada como

um inibidor não seletivo da COX-2, a qual é metabolizada no organismo pela isoenzima do citocromo P450 (CYP2C9) e em menor parte, pela carboxilesterase (Conaghan, 2012; Wyatt *et al.*, 2012) Na figura 2 está ilustrado o mecanismo de ação dos AINEs na via do ácido araquidônico.

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.

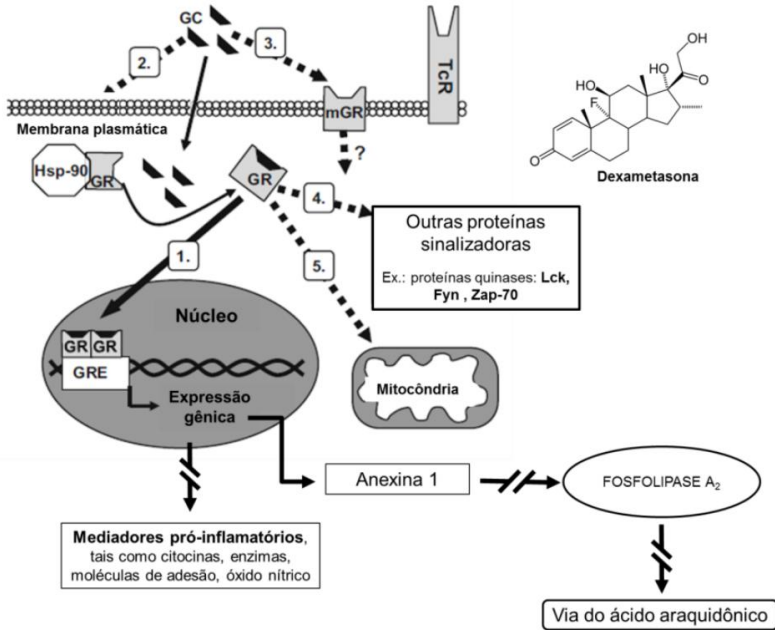
Outro grupo de fármacos utilizados como agentes anti-inflamatórios são os corticóides. No presente estudo, utilizou-se a dexametasona como fármaco de referência desta classe. A dexametasona é um glicocorticóide, e o mecanismo de ação desta classe de medicamentos pode ser classificado em não-genômico e genômico (Barnes, 2010; Flammer e Rogatsky, 2011). Os efeitos não-genômicos podem ser 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, tais como as proteínas quinases Lck, Fyn e Zap-70; e 4) translocação do receptor de glicocorticoide para a mitocôndria (Boldizar *et al.*, 2010).

Em outra via, o 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 glicocorticoides na região promotora de genes alvos e assim modula a expressão gênica por meio da transrepressão ou transativação (Boldizar *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 (ICAM-1 e molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1)), NO, autacoides, entre outros. Por outro lado, a transativação gênica promove a transcrição de genes de citocinas anti-inflamatórias, tais como da IL-10 e da IL-12, do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), da anexina 1, do I $\kappa$ B- $\alpha$ , que é um inibidor do NF- $\kappa$ B, além de aumentar também a expressão gênica da proteína quinase fosfatase-1 ativada por mitógenos (MKP-1), a qual inibe a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Perretti e D'acquisto, 2009; Barnes, 2010).

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 A2, inibindo a via do ácido araquidônico, e a transrepressão gênica de mediadores pró-inflamatórios; 2) efeitos diretos na membrana; 3) sinalização por meio de um receptor de membrana (mGR); 4) interação do GR com proteínas sinalizadoras citoplasmáticas; 5) via mitocondrial. GC = glicocorticoide, GR = receptores de glicocorticoides, GRE = elementos responsivos aos glicocorticoides, TcR = receptor de células T. Seta contínua (→) = conversão; setas tracejadas (---→) = vias de sinalização não-genômica; seta interrompida (→/→) = inibição.

Fonte: Adaptado de BOLDIZAR et al., 2010.

## 1.4 MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Atualmente, discute-se no mundo todo, o uso de modelos experimentais *in vivo*. Para os pesquisadores, estes modelos podem avaliar a eficácia, a farmacodinâmica, farmacocinética, e a toxicidade de novos fármacos (Mercer *et al.*, 2015).

Diante da variedade de eventos que ocorre nas reações inflamatórias, vários são os modelos de inflamação utilizados para que se possa estudar os mecanismos imunes envolvidos e a atividade anti-inflamatória de fármacos e/ou plantas. Entre estes modelos destacam-se a pleurisia, a bolsa de ar, o edema de pata e de orelha, a artrite e o implante de esponjas embebidas de agentes irritantes, entre outros (Sedgwick e Lees, 1986).

Dentre as espécies utilizadas nos modelos *in vivo* envolvendo o sistema respiratório, temos: primatas não-humanos, cães, porcos, ratos, camundongos e humanos, sendo que os camundongos têm sido a espécie de maior escolha para o estudo nos modelos que mimetizam doenças pulmonares (Mercer *et al.*, 2015).

A partir dos diversos modelos, podem-se estudar doenças inflamatórias que envolvam a formação de edema, a migração de leucócitos e a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios. Dentre os acometimentos de vias aéreas, podemos destacar a asma brônquica, sendo ela de caráter eosinofílico ou neutrofílico. Portanto, os modelos que mimetizam a asma humana permitem a avaliação das alterações morfológicas, imunológicas, fisiológicas e de mecanismos de ação, nas vias respiratórias (Leukowich; Wills-Karp, 2008)

Para o estudo de inflamação pulmonar, podemos destacar o modelo de inflamação eosinofílica utilizando a ovoalbumina (OVA). Neste modelo Fukunaga e colaboradores (2007), utilizaram camundongos BALB/c, pelo qual o animal é sensibilizado com OVA e inicia uma resposta inflamatória alérgica imediata, e posteriormente uma tardia. Neste tipo de modelo, o lavado bronco-alveolar foi coletado um ou dois dias após a indução, possibilitando a análise de marcadores inflamatórios como a migração celular (eosinófilos e macrófagos),

assim como a dosagem de imunoglobulina E (IgE) no soro do animal (Fukunaga *et al.*, 2007).

Em um outro modelo de inflamação pulmonar para o estudo da asma, utilizam-se partículas virais, como o vírus sincicial respiratório (VSR), justificando-se que infecções virais no sistema respiratório são comuns, e podem iniciar uma reação asmática assim como exacerbar seus sintomas (Dulek e Peebles, 2011). Com a administração do VSR via intranasal em camundongos, é possível avaliar parâmetros imunológicos sistêmicos e locais, sendo que a maior desvantagem deste modelo é o seu custo (Tourdot *et al.*, 2008). Ainda utilizando o VSR, pode-se combiná-lo a OVA, permitindo demonstrar que pacientes alérgicos quando expostos a infecções virais, apresentam episódios de hiperresponsividade das vias aéreas e exacerbação da doença, com resposta inflamatória local e sistêmica (Kloepfer e Gern, 2010; Chi *et al.*, 2011)

A pleurisia é um modelo de inflamação neutrofílica de vias aéreas na cavidade pleural, e foi originalmente desenvolvido em ratos (Spector, 1956). Na década de 90 este modelo foi descrito em camundongos e utilizando a carragenina (Cg) como agente flogístico (Henriques *et al.*, 1990; Saleh *et al.*, 1996).

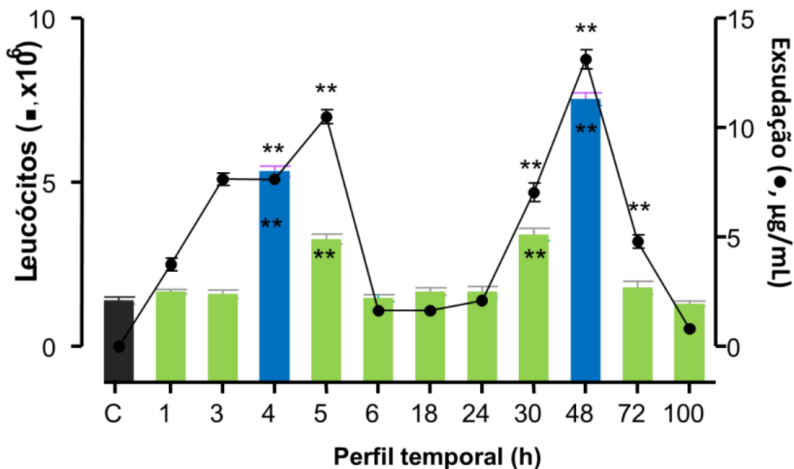
A Cg é uma substância composta por uma mistura de polissacarídeos derivados de algas *Chondrus crispus*, cujo nome popular é musgo-irlandês (Brito, 1989). O modelo da pleurisia induzida pela Cg é caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica sendo que a primeira fase ocorre 4 h e a segunda 48 h após a indução da inflamação por Cg, na cavidade pleural de camundongos. Na primeira fase ocorre a infiltração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, e formação de exsudato. Na segunda fase, observa-se também o aumento da exsudação, bem como um infiltrado de células imunes do tipo mononucleares (Saleh *et al.*, 1996) (Figura 4).

Este modelo mimetiza a asma neutrofílica que ocorre em humanos, uma vez que evidencia uma resposta do tipo bifásica que também ocorre na asma humana. Neste caso, a Cg promove sua ação pró-inflamatória pela indução de receptores celulares do tipo *Toll 4* (TLR4), sendo que em pacientes asmáticos a



expressão gênica deste receptor está também aumentada (Tsuji *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2007).

Figura 4 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos



Modelo de resposta bifásica: primeira fase (4 h) ocorre aumento da exsudação e da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos; na segunda fase (48 h) observa-se aumento da exsudação e também aumento de mononucleares. Fonte: Adaptado de SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto, frações e compostos isolados das flores da *Senecio brasiliensis* Less., administrados sistemicamente, utilizando-se, o modelo da pleurisia induzido pela carragenina, em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o efeito do extrato bruto, frações e compostos sobre a migração de leucócitos e a exsudação;
- II. Investigar o efeito do extrato bruto, frações e compostos sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e adenosina desaminase (ADA);
- III. Investigar o efeito do extrato bruto, frações e compostos sobre as concentrações de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_x$ ), fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ), interleucina 1 beta ( $\text{IL-1}\beta$ ) e interleucina 17A ( $\text{IL-17A}$ );
- IV. Investigar a ação dos compostos sobre a fosforilação da proteína p65 ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ).



## 3 METODOLOGIA

### 3.1 MATERIAL VEGETAL

As flores da espécie *Senecio brasiliensis* foram coletadas em uma propriedade rural, localizada no 3º Distrito de Jaguarão, Rio Grande do Sul, durante a época de inflorescência (Outubro 2010). O material foi identificado pelo botânico Rafael Trevisan da Universidade Federal de Santa Catarina, e uma exsicata da espécie (24592) está depositada no herbário da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### 3.1.1 Preparação do extrato bruto (CE), suas frações, e identificação e elucidação dos compostos.

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

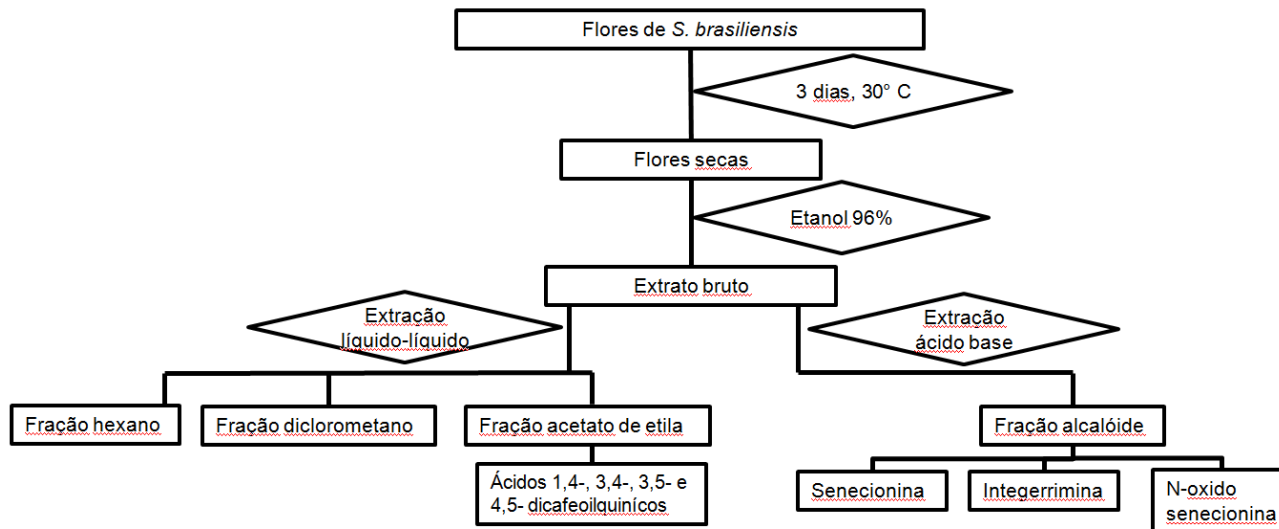
O extrato bruto das flores foi obtido a partir de 1,5 kg previamente seco em circulação de ar a 30°C durante três dias. Após esse período o material vegetal foi macerado em etanol (96%) por sete dias, o solvente resultante foi removido a pressão reduzida, rendendo aproximadamente 300 g de extrato bruto das flores (Figura 5).

##### 3.1.1.1 Fração rica em alcalóides e seus compostos isolados

O primeiro processo foi baseado numa extração ácido-base, sendo 50 g do CE dissolvidos em 100 mL de uma solução de etanol (15%, pH 2.0, ajustada com ácido hipoclorídrico). A seguir, foi realizada uma extração com acetato de etila (2 x 200 mL) ajustando o pH para 12.0 com adição de NaOH para obter a fração rica em alcalóides (AF). Para a separação dos compostos esta fração foi submetida a sílica gel (Merck) em um sistema isocrático contendo metanol, clorofórmio e hidróxido de

amônio (85:14:1), deste processo foram isolados dois compostos, que após serem analisados por HPLC-DAD-MS/MS, RMN, infravermelho e por características físicas como ponto de fusão, foram identificados como: (1) senecionina (e seu isômero, integerrimina) e (2) N-óxido senecionina.

Figura 5 - Fluxograma da sequência de obtenção do extrato bruto, frações e compostos da *S. brasiliensis*.



Fonte:

Desenvolvido

pelo

autor.





### 3.1.1.2 Frações acetato de etila, hexano e diclorometano e compostos fenólicos.

O segundo processo realizado, foi a separação líquido-líquido. Partindo-se de 50 g do CE os quais foram dissolvidos em 100 mL de uma solução de etanol (15%), que em seguida foi extraída com 200 mL de solventes de diferentes polaridades (acetato de etila, hexano e diclorometano). Este procedimento foi repetido três vezes, dando origem as frações: hexano (com menor polaridade), diclorometano (polaridade intermediária) e acetato de etila (com maior polaridade). Destas frações, apenas a acetato de etila foi submetida à separação cromatográfica, originando uma (3) mistura de ácidos dicafeoilquínicos, que foram submetidos a análise por HPLC-DAD-MS/MS.

## 3.2 ANIMAIS

Neste protocolo experimental, foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, fêmeas, com cerca de 1 mês de idade, pensando entre 18-22 g, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram acomodados no biotério do laboratório de pesquisa em imunologia (LAPI), localizado no 4º andar do bloco H, no Centro de Ciências da Saúde (CCS), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Estes animais foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem, receberam alimentação e água *ad libitum* durante todos os dias e foram mantidos sob temperatura ambiente controlada ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuros alternados a cada 12 h e umidade entre 50-60%. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo número PP00757, e os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Neste protocolo foram utilizados os seguintes grupos de animais (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos de animais utilizados no protocolo experimental.

<b>Grupos</b>	<b>Agente</b>	<b>Concentração/ Dose(s)</b>	<b>Via de administração</b>	<b>n</b>
<b>Controle negativo</b>	Salina (NaCl)	0,95 %	i.pl.	5
<b>Controle positivo</b>	Carragenina (Cg)	1 %	i.pl.	5
<b>Extrato bruto</b>	Extrato bruto	25 / 50 / 100 / 200 mg/kg	i.p.	5
	Acetato de etila	1 / 2,5 / 5 / 10 / 25 mg/kg	i.p.	5
<b>Frações</b>	Rica em alcalóides	1 / 2,5 / 5 / 10 / 25 mg/kg	i.p.	5
	Aquosa	5 / 10 / 25 mg/kg	i.p.	5
	Diclorometano	5 / 10 / 25 mg/kg	i.p.	5
	Mistura de ácidos dicafeiolquínicos	0,25 / 0,5 / 1 mg/kg	i.p.	5
<b>Compostos</b>	Senecionina	0,5 / 1 / 2 mg/kg	i.p.	5
	Integerrimina	0,5 / 1 / 2 mg/kg	i.p.	5
	N-óxido senecionina	0,5 / 1 / 2 mg/kg	i.p.	5
<b>Fármacos de referência</b>	Dexametasona	0,5 mg/kg	i.p.	5
	Indometacina	5 mg/kg	i.p.	5

i.pl. intrapleural, i.p. intraperitoneal, n= número de animais.

### 3.2.1 Procedimento anestésico

A anestesia foi induzida com pentobarbital (60 mg/kg), administrado por via intraperitoneal (i.p.) , a fim de possibilitar a administração do corante Azul de Evans (50 mg/kg) administrado por via intravenosa (i.v.), utilizando a veia gengival (De Oliveira *et al.*, 2009).

### 3.2.2 Morte indolor assistida

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

## 3.3 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 3.3.1 Pleurisia induzida pela carragenina em camundongos

A técnica da pleurisia seguiu o protocolo descrito por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). Nos dias dos experimentos, 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 (entre a 7<sup>a</sup> e a 8<sup>a</sup> vertebra) utilizando-se uma agulha 13x5 mm, adaptada com uma cânula de poliestireno. Após 4 h, os animais foram submetidos à morte indolor assistida com *overdose* de pentobarbital administrada por via i.p.. Para isso, os mesmos foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, e realizou-se uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais, a fim de expor o tórax. A seguir, o apêndice xifóide foi pinçado e a cavidade pleural exposta através de uma incisão na porção inferior do esterno. A cavidade pleural foi lavada com alíquotas de 0,5 mL (total 1 mL) de solução salina tamponada e heparinizada [pH 7,6, NaCl (130 nM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 nM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 nM) e heparina (20 UI/mL)]. As alíquotas do lavado pleural foram coletadas para a avaliação de parâmetros inflamatórios: quantificação total e diferencial de leucócitos, concentração de exsudação, atividades das enzimas MPO e ADA,

bem como a quantificação dos metabólitos do NO (NO<sub>x</sub>) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A). As amostras de tecido pulmonar foram também coletadas para posterior avaliação da fosforilação da proteína p65 (p-p65 de NF- $\kappa$ B).

Para o estudo da curva dose-resposta, diferentes grupos de animais foram tratados com diferentes doses de extrato bruto (CE: 25-200 mg/kg), fração rica em alcalóides (AF: 1-25 mg/kg), fração acetato de etila (AcOEt: 1-25 mg/kg), fração hexano (HEX: 5-25 mg/kg), fração diclorometano (DCM: 5-25 mg/kg), e fração aquosa (5-25 mg/kg), além dos compostos isolados: senecionina (Sen: 0,5-2 mg/kg), interregimina (Int: 0,5-2 mg/kg), N-óxido senecionina (0,5-2 mg/kg), e a mistura de ácidos dicafeiolquínicos (DCQ: 0,25-1 mg/kg), administrados por via i.p. 30 min antes da indução da pleurisia com Cg (1%). Conforme o protocolo experimental, para a avaliação indireta da exsudação, 10 minutos antes da administração i.p. do extrato bruto, frações e compostos isolados da *S. brasiliensis*, alguns animais receberam a injeção da solução de azul de Evans (50 mg/kg, 0,1 mL/animal, i.v.) (Saleh *et al.*, 1996).

De acordo com os resultados obtidos nos estudos das curvas dose-resposta, CE (50 mg/kg), AF (2,5 mg/kg), AcOEt (5 mg/kg), Sen (1 mg/kg), Int (1 mg/kg) e DCQ (0,5 mg/kg), ou seja a melhor dose (menor dose capaz de inibir significativamente a migração de leucócitos), foram administradas em diferentes grupos de animais para a análise de seus efeitos sobre a atividade das enzimas: MPO e ADA, concentrações de NO<sub>x</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A. Para a avaliação da fosforilação da proteína p-65, somente os compostos (DCQs, Sen e Int) foram utilizados (Figura 6).

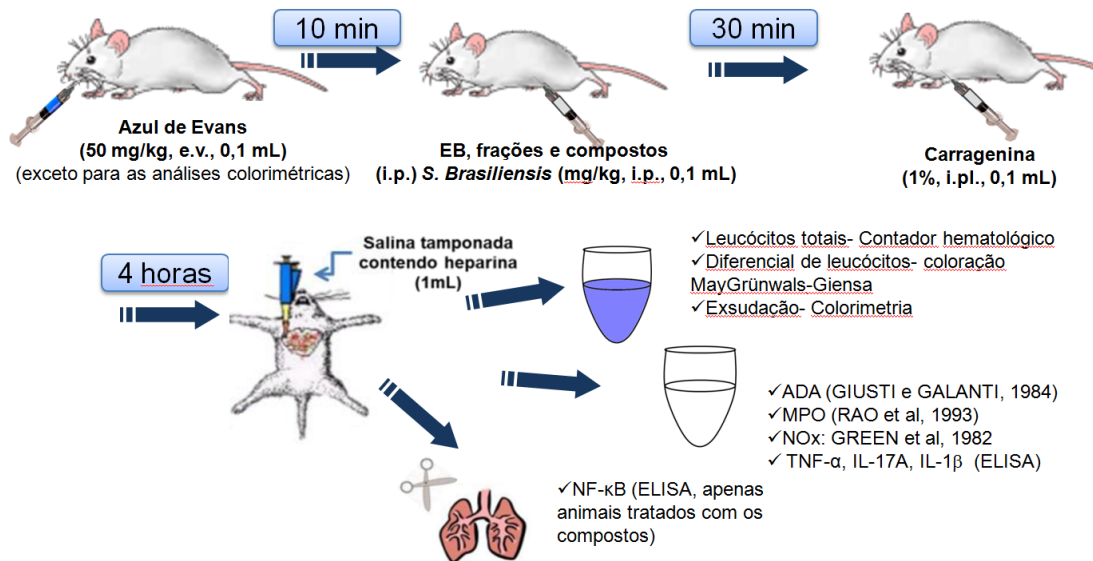
### 3.4 TÉCNICAS UTILIZADAS

#### 3.4.1 Contagem total e diferencial de leucócitos

As alíquotas de 15  $\mu$ L dos lavados da cavidade pleural foram utilizadas para a contagem de leucócitos total, utilizando-se contador hematológico veterinário automatizado ajustado para parâmetros para camundongos (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os resultados foram expressos em número de leucócitos  $\times 10^6$ /mL.

Os esfregaços celulares foram obtidos através de alíquotas de 50 µL dos lavados da cavidade pleural. Estas alíquotas foram centrifugadas em citocentrífuga (Cytopro® cytocentrifuge Wescor 7620, Logan, Utah, EUA). A seguir, as lâminas foram coradas pelo método de MayGrünwald-Giensa. A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio da objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células  $\times 10^6$  (Saleh *et al.*, 1996).

Figura 6 - Modelo experimental de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos.



ADA = adenosina desaminase, ELISA = enzimmunoensaio, IL-1 $\beta$  = interleucina 1 $\beta$ , IL-17A = interleucina 17A, iNOS = óxido nítrico sintase induzida, MPO = mieloperoxidase, NF- $\kappa$ B = fator nuclear-kappa B, NO = óxido nítrico, TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral- $\alpha$ . Fonte: Desenvolvido pelo autor.

### 3.4.2 Determinação da exsudação

Para a determinação indireta da exsudação, 200  $\mu\text{L}$  dos lavados da cavidade pleural foram reservados para a avaliação das concentrações do corante azul de Evans (Saleh *et al.*, 1996). Assim, em cada grupo experimental, os animais receberam 100  $\mu\text{L}$  do corante (50 mg/kg) através da veia gengival (De Oliveira *et al.*, 2009), 10 min antes dos tratamentos com material vegetal ou fármacos de referência. Este parâmetro foi mensurado através da densidade ótica em leitora de microplacas de enzima-imunoenensaio (ELISA) (Organon Teknica, Roseland, New Jersey, EUA), em 620 nm (Saleh *et al.*, 1996). Para a quantificação das concentrações de azul de Evans, foi realizada uma curva-padrão com concentrações conhecidas do corante (0,01-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), e a partir desta foram determinadas as concentrações das amostras. Os valores das concentrações foram expressos em  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com o auxílio da equação da reta.

### 3.4.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase

A determinação da MPO foi realizada imediatamente após a coleta do lavado da cavidade pleural, de acordo com a metodologia descrita por Rao e colaboradores (1993). Neste protocolo 100  $\mu\text{L}$  do lavado pleural foram adicionadas a 100  $\mu\text{L}$  de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB 0,5%). Esta mistura foi submetida a um ciclo de vórtex (10 seg) - banho de gelo (10 seg) por 3 vezes consecutivas, e centrifugadas a 40.000g durante 15 minutos a 4°C. A seguir, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a 180  $\mu\text{L}$  da solução reagente (0,167 mg/mL de  $\sigma$ -dianisidina 2HCl e 0,0005% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e esta mistura foi transferida para microplacas de ELISA e a reação enzimática foi incubada 15 minutos a 37 °C (banho-maria). Esta etapa foi interrompida pela adição de 15  $\mu\text{L}$  de azida sódica (1%). As amostras foram incubadas por mais 10 minutos a 37 °C (banho-maria), e transferidas para microplaca de ELISA, pela qual foi lida as densidades ótica (450 nm) em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Uma curva-padrão com atividade conhecida da MPO de neutrófilos humanos (0,7 - 140 mU/mL) foi utilizada para a quantificação dos valores desconhecidos, com auxílio da equação da reta, e os resultados foram expressos em mU/mL.

### 3.4.4 Determinação da atividade da adenosina desaminase

Para a quantificação da atividade da enzima ADA, utilizou-se uma solução padrão de sulfato de amônio com concentração conhecida, composta de:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (15 mM). Esta solução foi preparada para se obter uma curva-padrão (10 - 50 U/L). As amostras do lavado pleural (10  $\mu\text{L}$ ) contendo a enzima ADA, foram transferidas para tubos de ensaio, onde a reação foi iniciada com a adição de: solução de tampão fosfato [pH 6,5, 250  $\mu\text{L}$ , composição:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (35 mM),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (15 mM) e adenosina (0,5 mM)]. Após o período de incubação de 60 minutos a 37 °C, foi adicionado ao meio 500  $\mu\text{L}$  de solução de fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ , 1 mM) e nitroprussiato de sódio ( $\text{C}_5\text{FeN}_5\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,17 mM), seguida pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução alcalina de hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ , 11 mM) (Giusti G., 1984). A avaliação da atividade enzimática da ADA, foi avaliada pela geração de amônia promovida pela quebra da adenosina que foi adicionada ao meio. O produto da reação, a amônia, reage com o fenol e o hipoclorito, reação dependente de pH alcalino e catalisada pelo nitroprussiato de sódio, para a formação de um indofenol de coloração azul. A concentração de amônia é diretamente proporcional à concentração de indofenol gerado. A densidade ótica foi mensurada com auxílio de um leitor de ELISA (Organon – Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), utilizando o comprimento de onda de 620 nm. Os valores da atividade de ADA foram expressos em U/L, quantificados através da equação da reta.

### 3.4.5 Quantificação dos metabólitos do óxido nítrico ( $\text{NO}_x$ )

O óxido nítrico (NO) foi indiretamente quantificado, no lavado pleural, pela formação de seus metabólitos nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), utilizando-se a reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Para esta análise, no dia dos experimentos, 300  $\mu\text{L}$  de cada amostra do lavado pleural foi submetida à desproteinização. Para isso, 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 (2.000 g 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 da microplaca de ELISA. A seguir adicionou-se 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 *et al.*, 2001). Nesta reação o cloreto de vanádio converte o  $\text{NO}_3$  em  $\text{NO}_2^-$  e com a adição do reagente de Griess produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades óticas em leitor de ELISA (Organon-Tecknica, 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.

### **3.4.6 Determinação das concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-17A.**

Para análise das concentrações destas citocinas pró-inflamatórias, imediatamente após a coleta do lavado da cavidade pleural, alíquotas foram processadas para posterior quantificação das citocinas por ELISA. Neste protocolo, foram utilizados kits comerciais com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. A técnica utilizada foi ELISA do tipo sanduíche, de acordo com as instruções de cada fabricante. As curvas padrão dos ensaios foram as seguintes: TNF- $\alpha$  (5-2000 pg/mL), IL-1 $\beta$  (100-6400 pg/mL) e IL-17A (4 – 500 pg/mL). Os coeficientes de variação intra e interensaios (CV) para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A foram os seguintes: intra CV: TNF- $\alpha$  = 7,8  $\pm$  0,9%, IL-1 $\beta$  = 6,2  $\pm$  0,4% e IL-17A = 7,5  $\pm$  1,7%; inter CV: TNF- $\alpha$  = 9,6  $\pm$  2,1%, IL-1 $\beta$  = 5,1  $\pm$  0,6% e IL-17A = 9,6  $\pm$  2,1%, respectivamente. As sensibilidades dos kits foram de: TNF- $\alpha$  = 5,0 pg/mL, IL-1 $\beta$  = 1,7 pg/mL e IL-17A = 4 pg/mL. As concentrações de citocinas foram calculadas utilizando-se

curvas-padrão por medida colorimétrica em 450 nm, realizadas em um leitor de ELISA (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, USA). Todos os resultados foram expressos em pg/mL.

### **3.4.7 Quantificação da fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- $\kappa$ B)**

Para esta análise, 20 mg do tecido pulmonar dos camundongos foram coletados para a avaliação do efeito dos compostos, Sen, Int, e DCQs, sobre a fosforilação da proteína p65 (NF- $\kappa$ B). O kit comercial utilizado foi PathScan® Phospho-NF- $\kappa$ B p65 Ser536 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, EUA). A técnica utilizada foi ELISA com anticorpos monoclonais específicos de acordo com o protocolo do fabricante. A absorção das amostras foi obtida em 450 nm, em um leitor de microplacas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, USA). A metodologia para a quantificação total de proteínas utilizada foi a descrita por LOWRY e colaboradores (1951) e o conteúdo foi ajustado para 60 mg de proteína por amostra. Os resultados foram expressos em comparação com o grupo controle negativo (salina), que representa a expressão basal de fosforilação da proteína p-65.

## **3.5 REAGENTES**

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes e fármacos: dexametasona (Prodome Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil), pentobarbital (Hypnol®, Cristália, São Paulo, SP, Brasil), carragenina- $\lambda$  (grau IV), hidróxido de sódio (NaOH), mieloperoxidase de neutrófilos humanos, 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 Corporation, St. Louis, MO, EUA), indometacina (Aspen Pharma), o-dianisidina.2HCl (3,3'-dimetoxibenzidina)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®, 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 ( $\text{NH}_3\text{SO}_4$ ) (Labsynth, São Paulo, SP, Brasil), ácido clorídrico (HCl), etanol PA, acetato de etila PA, hexano PA (Synth, Diadema, SP, Brasil), MayGrünwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil), Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil), Azul de Evans ( $\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$ ) (AcrosOrganics, Geel, Antwerp, Bélgica); Dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ ) (Merck, Frankfurter, Darmstadt, Alemanha). Neste protocolo foram utilizados ainda, kits de ELISA para a quantificação de TNF- $\alpha$ , IL-17A (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA.), IL-1 $\beta$  BD (Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), e p65 - NF- $\kappa$ B (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, EUA). Agarose (Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madri, Espanha). Outros sais e reagentes de grau de pureza analítica foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m) de cinco animais por grupo e em valores em 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 determinadas por análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida pelo teste pos-hoc de Newman-Keuls ou teste T de Student quando necessário. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Toda a análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism (versão 5.0) (San Diego, Califórnia, EUA).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

As análises fitoquímicas do CE da flores de *S. brasiliensis* revelaram a presença de três compostos isolados e uma mistura de ácidos dicafeiolquínicos (Figura 7). Os compostos senecionina e integerrimina são isômeros, sólidos branco cristalino e representam 28% da fração AF. O composto N-óxido senecionina possui características morfológicas amorfas com coloração branca pálida. Estes compostos apresentaram ponto de fusão na faixa entre 167 e 170° C.

Os compostos foram confirmados pela comparação com resultados previamente publicados (Clifford *et al.*, 2005; Conradie *et al.*, 2005).

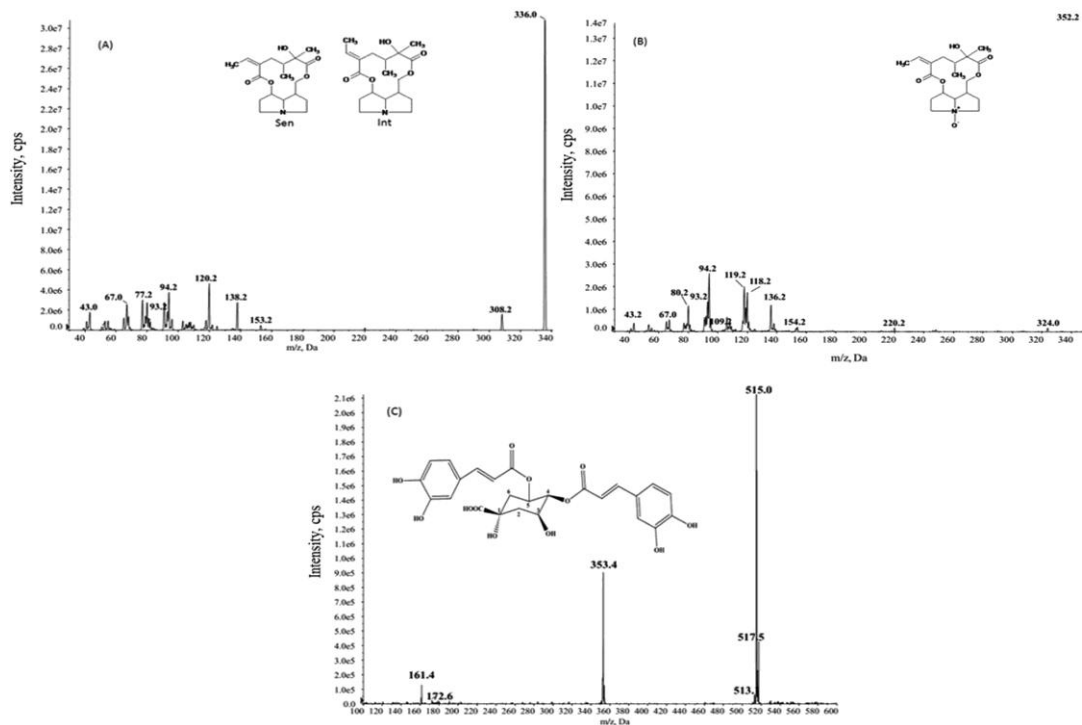
### 4.2 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS DA *SENECIO BRASILIENSIS* (SPRENG) LESS. SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO

O extrato bruto (CE) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg reduziu significativamente a migração de leucócitos, de 30,8 ± 6,3% a 33,7 ± 5,2% ( $P < 0,01$ ), as custas de neutrófilos de 35,5 ± 6,7% a 40,4 ± 5,6%, mas não a exsudação ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2). As frações, acetato de etila (AcOEt) nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg inibiu os leucócitos de 19,3 ± 5,3% a 43,24 ± 3,8% ( $P < 0,05$ ) as custas de neutrófilos de 26,9 ± 4,5% a 53,5 ± 2,8% ( $P < 0,05$ ). O mesmo foi observado para a fração rica em alcalóides (AF) pelo qual nas doses de 2,5, 5, 10 e 25 mg/kg também inibiram os leucócitos de 21,4 ± 4,6% a 47,5 ± 7,3% e os neutrófilos de 25,3 ± 4,2% a 39,9 ± 8,3% ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

No entanto, as frações: hexano (HEX) e diclorometano (DCM), não inibiram a migração de leucócitos em nenhuma das doses estudadas ( $p > 0,05$ ) (resultados não mostrados). Além disso, nenhuma das quatro frações estudadas (AF, AcOEt, HEX e DCM) foram capazes de inibir a exsudação ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

A mistura de ácidos cafeiolquínicos (DCQs) extraída da fração acetato de etila, foi capaz de inibir a migração de leucócitos nas doses de 0,5 e 1 mg/kg (% de inibição 0,5 mg/kg:  $18,8 \pm 4,2\%$  e 1 mg/kg:  $25,4 \pm 6,4$ ). Estes compostos também

Figura 7. Espectros de massa dos compostos da *S. brasiliensis*: (A) senecionina/integerrimina, (B) N-óxido senecionina e (C) ácido 4,5-dicafeoilquínico.







foram capazes de inibir a exsudação nas doses de 0,5 e 1 mg/kg (% de inibição: 0,5 mg/kg:  $18,4 \pm 2,5\%$  e 1 mg/kg:  $21,3 \pm 4,9\%$ ) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

Dos três compostos extraídos da fração AcOEt somente Sen e a Int foram capazes de reduzir de forma significativa a migração de leucócitos, principalmente de neutrófilos, ambos nas doses de 1 e 2 mg/kg (% de inibição Sen: 1 mg/kg  $24,1 \pm 3,8\%$  e 2 mg/kg  $38,7 \pm 2,6\%$ , e Int: 1 mg/kg  $23,4 \pm 5,5\%$  e 2 mg/kg  $30,9 \pm 4,6\%$ ) ( $P < 0,01$ ) (Tabela 1). Apesar disso, nenhum dos três compostos foi capaz de inibir a exsudação ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

O estudo da curva dose-resposta demonstrou que as melhores doses, ou seja, a menor dose capaz de inibir significativamente migração leucocitária, do CE, frações e compostos foram as seguintes: CE 50 mg/kg, AcOEt 5 mg/kg, AF 2,5 mg/kg, Sen 1 mg/kg, Int 1 mg/kg e DCQs 0,5 mg/kg (Tabela 2).

Os fármacos de referência (Dexa: 0,5 mg/kg e Indo: 5 mg/kg) inibiram significativamente estes parâmetros inflamatórios ( $P < 0,01$ ) (Tabela 2).

As menores doses de cada grupo capazes de inibir a migração de leucócitos, foram escolhidas como as melhores doses e utilizadas nos experimentos seguintes (Tabela 2).

Tabela 2 - Melhores doses do extrato bruto da *Senecio brasiliensis*, suas frações e compostos.

<b><i>Senecio brasiliensis</i></b>	<b>Melhor dose (mg/kg)</b>
<b>Extrato bruto (CE)</b>	50
<b>Fração acetato de etila (AcOEt)</b>	5
<b>Fração rica em alcalóides (AF)</b>	2,5
<b>Fração hexano (Hex)</b>	-
<b>Fração diclorometano (DCM)</b>	-

<b>Ácidos dicafeiolquínicos (DCQs)</b>	0,5
<b>Senecionina (Sen)</b>	1
<b>Integerrimina (Int)</b>	1

#### 4.3 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS DE *SENECIO BRASILIENSIS* LESS. SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E ADENOSINA DESAMINASE

O tratamento prévio (0,5 h) dos camundongos, com CE (50 mg/kg), frações AF (2,5 mg/kg), AcOEt (5 mg/kg), e compostos isolados Sen (1mg/kg), Int (1 mg/kg) e DCQs (0,5 mg/kg), inibiram a atividade da MPO (% de inibição: CE: 34,47±4,07%, AcOEt: 44,68±2,56%, AF: 24,06±0,81%, DCQs: 26,30±1,42%), Sen: 43,81±4,27% e Int: 32,39±4,33% ( $P < 0,01$ ) (Tabela 3).

Como já esperado, a dexametasona e a indometacina também reduziram significativamente a atividade da MPO (Tabela 3).

O CE (50 mg/kg), frações AF (2,5 mg/kg), AcOEt (5 mg/kg), e compostos Sen (1 mg/kg), Int (1 mg/kg) e DCQs (0,5 mg/kg) também inibiram a atividade da ADA (% de inibição: CE: 70,12±3,94%, AcOEt: 72,94±3,56%, AF: 56,83±0,68%, DCQs: 57,24±0,47%, Sen: 58,87±7,41% e Int 60,07±7,19%) ( $P < 0,01$ ) (Tabela 2). Como já esperado, a dexametasona e a indometacina também reduziram significativamente a atividade da ADA (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do extrato bruto da *Senecio brasiliensis*, suas frações e compostos sobre a migração leucocitária e exsudação.

<b>Grupos</b>	<b>Doses</b>	<b>Leucócitos</b> <b>(x10<sup>6</sup>/mL)</b>	<b>Neutrófilos</b> <b>(x10<sup>6</sup>/mL)</b>	<b>Exsudação</b> <b>(µg/mL)</b>
	(mg/kg)	(% de inibição)	(% de inibição)	(% de inibição)

<b>Sal</b>	0,95% <sup>a</sup>	1,39 ± 0,06	0,36 ± 0,04	1,04 ± 0,17
<b>Cg</b>	1% <sup>a</sup>	5,87 ± 0,35	5,13 ± 0,39	7,51 ± 0,36
	25 <sup>b</sup>	5,92 ± 0,24	5,02 ± 0,26	6,27 ± 0,23
	50 <sup>b</sup>	3,89 ± 0,31 (33,7 ± 5,2%)**	3,06 ± 0,29 (40,4 ± 5,6%)**	6,96 ± 0,38
<b>CE</b>	100 <sup>b</sup>	3,97 ± 0,43 (32,5 ± 7,3%)**	3,29 ± 0,37 (35,9 ± 7,3%)**	6,32 ± 0,25
	200 <sup>b</sup>	4,06 ± 0,37 (30,8 ± 6,3%)**	3,31 ± 0,34 (35,5 ± 6,7%)**	6,68 ± 0,42
	1 <sup>b</sup>	5,35 ± 0,15	4,59 ± 0,15	6,92 ± 0,29
	2,5 <sup>b</sup>	5,28 ± 0,25	4,24 ± 0,25	6,22 ± 0,27
<b>AcOEt</b>	5 <sup>b</sup>	4,74 ± 0,31 (19,3 ± 5,3%)*	3,75 ± 0,23 (26,9 ± 4,5%)**	6,21 ± 0,51
	10 <sup>b</sup>	4,54 ± 0,14 (22,6 ± 2,4%)**	3,57 ± 0,10 (30,4 ± 2,0%)**	7,24 ± 0,33
	25 <sup>b</sup>	3,33 ± 0,23 (43,24 ± 3,8%)**	2,39 ± 0,14 (53,5 ± 2,8%)**	7,52 ± 0,37
	1 <sup>b</sup>	5,74 ± 0,28	5,74 ± 0,28	7,97 ± 0,40
	2,5 <sup>b</sup>	4,62 ± 0,27 (21,4 ± 4,6%)**	4,62 ± 0,27 (25,3 ± 4,2%)**	7,42 ± 0,26
<b>AF</b>	5 <sup>b</sup>	4,14 ± 0,32 (29,5 ± 5,5%)**	4,14 ± 0,32 (19,3 ± 6,3%)**	7,40 ± 0,30
	10 <sup>b</sup>	3,43 ± 0,13 (41,6 ± 2,2%)**	3,43 ± 0,32 (33,2 ± 2,6%)**	6,60 ± 0,33
	25 <sup>b</sup>	3,08 ± 0,43 (47,5 ± 7,3%)**	3,08 ± 0,43 (39,9 ± 8,3%)**	6,37 ± 0,25
	0,25 <sup>b</sup>	5,96 ± 0,22	5,13 ± 0,20	6,83 ± 0,32
<b>DCQs</b>	0,5 <sup>b</sup>	4,38 ± 0,38	3,64 ± 0,30	6,13 ± 0,19

		(25,4 ± 6,4%)**	(29,1 ± 5,9%)**	(18,4 ± 2,5%)*
	1 <sup>b</sup>	4,77 ± 0,25 (18,8 ± 4,2%)**	3,88 ± 0,17 (24,3 ± 3,3%)**	5,91 ± 0,37 (21,3 ± 4,9%)**
	0,5 <sup>b</sup>	5,22 ± 0,11	4,40 ± 0,08	7,68 ± 0,21
<b>Int</b>	1 <sup>b</sup>	4,50 ± 0,32 (23,4 ± 5,5%)**	3,81 ± 0,28 (25,7 ± 5,5%)**	7,04 ± 0,21
	2 <sup>b</sup>	4,06 ± 0,27 (30,9 ± 4,6%)**	3,46 ± 0,23 (32,6 ± 4,4%)**	6,98 ± 0,32
	0,5 <sup>b</sup>	5,50 ± 0,43	4,60 ± 0,34	7,40 ± 0,27
<b>Sen</b>	1 <sup>b</sup>	4,46 ± 0,22 (24,1 ± 3,8%)**	3,73 ± 0,19 (27,3 ± 3,7%)**	7,38 ± 0,33
	2 <sup>b</sup>	3,60 ± 0,15 (38,7 ± 2,6%)**	3,10 ± 0,15 (39,6 ± 3,0%)**	7,07 ± 0,45
<b>Dexa</b>	0,5 <sup>b</sup>	1,56 ± 0,20 (69,5 ± 0,2%)**	1,12 ± 0,21 (74,6 ± 0,3%)**	3,92 ± 0,50 (47,7 ± 6,6%)**
<b>Indo</b>	5 <sup>o</sup>	1,85 ± 0,32 (63,8 ± 0,3%)**	1,54 ± 0,25 (64,9 ± 3,3%)**	4,63 ± 0,45 (38,3 ± 6,0%)**

Extrato bruto (CE), fração rica em alcalóides (AF), fração acetato de etila (AcOEt), Senecionina (Sen), Integerrimina (Int), mistura de ácidos cafeiolquínicos (DCQs), Dexametasona (Dexa), Indometacina (Indo), Salina (Sal), Carragenina (Cg). a = administração por via intrapleural, b = administração por via intraperitoneal. \*P < 0,05 \*\* P < 0,01.

#### 4.4 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS DE *SENECIO BRASILIENSIS* LESS. SOBRE A CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO<sub>x</sub>)

As flores da *S. brasiliensis*, não foram capazes de reduzir a concentração dos metabólitos do óxido nítrico ( $p > 0,05$ ). Os fármacos de referência, dexametasona e indometacina, reduziram a concentração destes metabólitos ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4: Efeito do extrato bruto da *Senecio brasiliensis*, suas frações e compostos sobre a atividade das enzimas MPO e ADA

Grupos	MPO (mU/mL) (% de inibição)	ADA(U/L) (% de inibição)
Sal <sup>a</sup>	81,71±0,47	0,69±0,23
Cg <sup>a</sup>	168,8±13,63	6,04±0,94
CE <sup>b</sup>	110,6±6,87 (34,47±4,07)**	1,80±0,24 (70,12±3,94)**
AcOEt <sup>b</sup>	93,38±4,33 (44,68±2,56)**	1,63±0,21 (72,94±3,56)**
AF <sup>b</sup>	128,2±1,37 (24,06±0,81)**	2,61±0,04 (56,83±0,68)**
DCQs <sup>b</sup>	124,4±2,4 (26,30±1,42)**	2,58±0,03 (57,24±0,47)**
Sen <sup>b</sup>	94,84±7,21(43,81±4,27)**	2,48±0,45 (58,87±7,41)**
Int <sup>b</sup>	114,1±7,31(32,39±4,33)**	2,41±0,44 (60,07±7,19)**
Dexa <sup>b</sup>	110,7±7,22 (34,41±4,28)**	2,815±0,18 (53,40±2,98)**
Indo <sup>b</sup>	59,61±6,4 (64,68±3,79)**	2,330±0,25(67,72±7,96)**

Extrato bruto (CE), fração rica em alcalóides (AF), fração acetato de etila (AcOEt), Senecionina (Sen), Integerrimina (Int), mistura de ácidos cafeoilquínicos (DCQs), Dexametasona (Dexa), Indometacina (Indo), Salina (Sal), Carragenina (Cg). a = administração por via intrapleural, b= administração por via intraperitoneal. \*\* P < 0,01.

#### 4.5 EFEITO DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS DE *SENECIO BRASILIENSIS* LESS, SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE TNF-A, IL-1B E IL-17A

Os animais tratados previamente com CE (50 mg/kg), frações AcOEt (5 mg/kg), AF (2,5 mg/kg), e compostos isolados: Sen (1 mg/kg), Int (1 mg/kg) e DCQs (0,5 mg/kg), reduziram significativamente as concentrações de TNF- $\alpha$  (% de inibição CE: 32,01±6,06%; AcOEt: 45,11±4,73%; AF: 28,58±3,49%, Sen: 16,42±3,52%; Int: 15,39±5,87%; e DCQs: 36,36±3,23%) (P <

0,05) (Tabela 4). Nas mesmas condições experimentais, foi observado que CE (50 mg/kg), frações AF (2,5 mg/kg), AcOEt (5 mg/kg), e os compostos Sen (1 mg/kg), Int (1 mg/kg) e DCQs (0,5 mg/kg), foram capazes de diminuir a concentração de IL-1 $\beta$  (% de inibição: CE: 40,97 $\pm$ 4,74% , AcOEt: 51,32 $\pm$ 3,55%, AF: 41,62 $\pm$ 8,37%, e DCQs: 50,03 $\pm$ 4,91%, ( $P < 0,05$ ). Já os dois compostos, Sen e Int, não foram capazes de reduzir as concentrações desta citocina ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4). Nas mesmas condições experimentais a IL-17A, também teve sua concentração reduzida (CE: 34,82 $\pm$ 4,15%, AcOEt: 23,46 $\pm$ 6,77%; AF: 24,88 $\pm$ ,51%, Sen: 39,55 $\pm$ 5,76%; Int: 31,99 $\pm$ 1,54%, e DCQs: 25,04 $\pm$ 6,02%) ( $P < 0,01$ ) (Tabela 4).

Dexametasona e a indometacina também reduziram significativamente as concentrações destas três citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A e (Tabela 4) ( $P < 0,01$ ).

Tabela 5: Efeito do extrato bruto da *Senecio brasiliensis*, suas frações e compostos sobre a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A.

Grupos	TNF- $\alpha$ (pg/mL) (% de inibição)	IL-1 $\beta$ (pg/mL) (% de inibição)	IL-17A(pg/mL) (% de inibição)
Sal <sup>a</sup>	53,71 $\pm$ 9,85	158,5 $\pm$ 8,88	37,78 $\pm$ 2,27
Cg <sup>a</sup>	2584 $\pm$ 142,5	927,5 $\pm$ 85,9	606,6 $\pm$ 40,50
CE <sup>b</sup>	1757 $\pm$ 156,7 (32,01 $\pm$ 6,06)**	547,5 $\pm$ 43,97 (40,97 $\pm$ 4,74)**	395,4 $\pm$ 25,16 (34,82 $\pm$ 4,15)**
AcOEt <sup>b</sup>	1418 $\pm$ 122,1 (45,11 $\pm$ 4,73)**	451,5 $\pm$ 32,9 (51,32 $\pm$ 3,55)**	455,7 $\pm$ 9,17 (24,88 $\pm$ 1,51)**
AF <sup>b</sup>	1846 $\pm$ 90,18 (28,58 $\pm$ 3,49)**	541,5 $\pm$ 77,67 (41,62 $\pm$ 8,37)**	464,3 $\pm$ 41,09 (23,46 $\pm$ 6,77)**
DCQs <sup>d</sup>	1645 $\pm$ 83,47 (36,36 $\pm$ 3,23)**	463,5 $\pm$ 45,51 (50,03 $\pm$ 4,91)**	443,2 $\pm$ 31,96 (25,04 $\pm$ 6,02)**
Sen <sup>b</sup>	2073 $\pm$ 96,19 (16,42 $\pm$ 3,52)**	920,1 $\pm$ 140,6	366,7 $\pm$ 34,94 (39,55 $\pm$ 5,76)**
Int <sup>b</sup>	2186 $\pm$ 151,8 (15,39 $\pm$ 5,87)*	902,8 $\pm$ 104,8	412,6 $\pm$ 9,36 (31,99 $\pm$ 1,54)**
Dexa <sup>b</sup>	1441 $\pm$ 117,4 (44,22 $\pm$ 4,54)**	462,8 $\pm$ 42,39 (50,10 $\pm$ 4,57)**	136,1 $\pm$ 6,7(77,56 $\pm$ 1,11)**

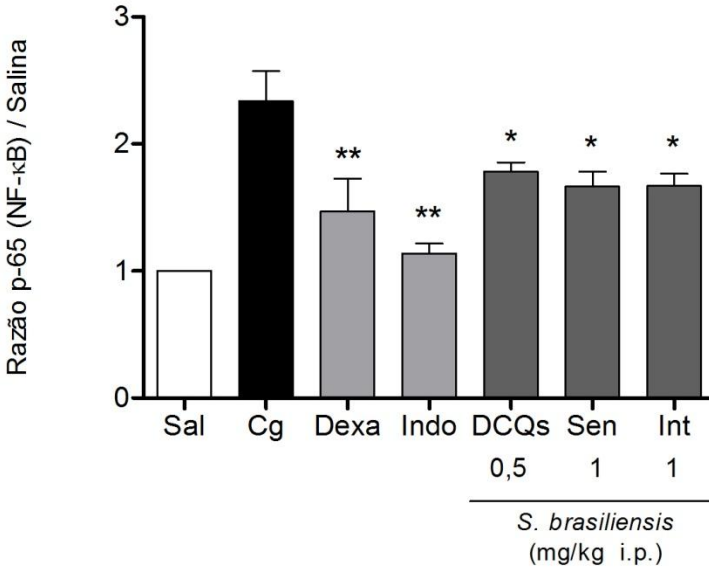
<b>Indo<sup>b</sup></b>	966,9±87 (62,58±4,3,67)**	641,8±61,62 (30,81±6,64)**	88,89±7,74(85,35±1,28)**
-------------------------	------------------------------	-------------------------------	--------------------------

Extrato bruto (CE), fração rica em alcalóides (AF), fração acetato de etila (AcOEt), Senecionina (Sen), Integerrimina (Int), istura de ácidos cafeiolquínicos (DCQs), Dexametasona (Dexa), Indometacina (Indo), Salina (Sal), Carragenina (Cg). a = administração por via intrapleurar, b= administração por via intraperitoneal. \*P < 0,05 \*\* P < 0,01.

#### 4.6 EFEITO DOS COMPOSTOS DE *SENECIO BRASILIENSIS* LESS, SOBRE A FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA P-65 (P-P65 NF-KB)

Nossos experimentos mostraram que os compostos DCQs (0,5 mg/kg), Sen (1 mg/kg) e Int (1 mg/kg) foram capazes de reduzir significativamente a fosforilação da subunidade p65 NF-κB (% de inibição: DCQs: 23,59 ± 3,2%, Sen: 28,58 ± 5,0%, e Int: 28,36 ± 4,1%) ( $P < 0,05$ ) (Figura 8).

Figura 8 - Efeito da *S. brasiliensis* sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B



Sal=animais tratados somente com salina por via intrapleural, Cg=animais tratados somente com Cg por via intrapleural; compostos DCQs: 0,5 mg/kg, Sen: 1 mg/kg, Int: 1 mg/kg, de *Senecio brasiliensis*, Dexametasona (Dexa: 0,5 mg/kg), Indometacina (Indo: 5 mg/kg), administrados por via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes da indução da inflamação pela carragenina (Cg) (1%) administrada por via intrapleural (i.pl.) sobre a fosforilação da proteína p65 (p-p65-NF- $\kappa$ B). \*P < 0,05 \*\* P < 0,01



## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito anti-inflamatório do extrato bruto (CE), das frações acetato de etila (AcOEt), fração rica em alcalóides (AF), hexano (HEX) e diclorometano (DCM) e dos compostos isolados: senecionina (Sen), Integerrimina (Int), N-óxido senecionina e uma mistura de ácidos dicafeiolquínicos (DCQs), obtidos a partir das flores da *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less, utilizando-se o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

Os resultados deste estudo demonstraram que o material vegetal utilizado foi capaz de inibir a migração de leucócitos, e esta inibição ocorreu, as custas da diminuição da migração de neutrófilos. Este efeito parece estar associado com a diminuição da atividade das enzimas MPO e ADA, assim como inibição das citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A. Estudos prévios *in vivo* e *in vitro*, já demonstravam que as plantas da família *Asteraceae*, apresentam atividade anti-inflamatória (Goulart *et al.*, 2007; Ekenas *et al.*, 2008; Capelari-Oliveira *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2013).

Dentre as frações estudadas, a fração AF apresentou melhor efeito anti-inflamatório, uma vez que em uma dose de 2,5 mg/kg, a fração já foi capaz de inibir significativamente a migração de leucócitos, em comparação com a dose de 5 mg/kg para a fração AcOEt. As frações HEX e DCM não conseguiram inibir a migração leucocitária, por isso não foram utilizadas para a análise dos outros marcadores inflamatórios.

Observando o efeito dos compostos, concluímos que a DCQs foi capaz de inibir significativamente a migração leucocitária, em uma dose menor que as da Sen e a Int (0,5 mg/kg; 1 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente). O alcalóide, N-óxido senecionina, não teve atividade sobre a migração leucocitária, não sendo, portanto utilizado para as análises posteriores.

Nas análises seguintes, foram escolhidas duas enzimas, a MPO que está relacionada com a ativação de neutrófilos, e a ADA que inicialmente foi associada somente com mononucleares. Estudos tem demonstrado a participação da ADA na resposta inflamatória pelo qual apresenta um caráter celular do tipo neutrofílico (Frode e Medeiros, 2001; Antonioli, Csoka, *et al.*, 2014).

Tanto o CE quanto as frações AcOEt e AF e os compostos Sen, Int e DCQs, foram capazes de inibir a atividade da MPO, a principal enzima pró-inflamatória presente no citoplasma das células e considerada um marcador de neutrófilos ativados, tendo papel fundamental nas doenças inflamatórias agudas (Van Der Veen *et al.*, 2009).

A *S. brasiliensis* também foi capaz de inibir a ADA, porém com perfil diferente entre os grupos. Entre as frações estudadas, a fração AcOEt demonstrou melhor resultado do percentual de inibição da MPO (AcOEt: 44,68% e AF: 24,06%), sendo que a mesma relação ocorreu com a inibição da ADA (AcOEt: 72,94% e AF: 56,93%). Porém quando avaliamos os compostos, o que mais inibiu a enzima MPO foi a Sen, e o que mais inibiu a ADA foi a Int, sendo que para esta última enzima os resultados de inibição foram semelhantes. De forma geral, observou-se que a planta foi capaz de inibir as duas enzimas, o que leva a conclusão que ela não somente inibe o influxo de neutrófilos como também a ativação destas células.

Fröde e colaboradores (2001) demonstraram que as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , estão envolvidos na resposta inflamatória induzida pela carragenina, no modelo da pleurisia, em camundongos. O agente flogístico carragenina é capaz de ativar os receptores do tipo Toll 4 e vias intracelulares, incluindo a transcrição de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Tsuji *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2007). Ambas as citocinas pró-inflamatórias exercem papel fundamental na migração de leucócitos (Frode *et al.*, 2001). O extrato bruto, as frações AcOEt e AF e o composto DCQs, foram capazes de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Outra citocina estudada foi a IL-17A, a qual é reconhecida por ser um importante marcador pró-inflamatório. Esta citocina está envolvida em muitas doenças imunes, como a asma, pela indução da inflamação que causa nos pulmões e a regulação da expressão de outros mediadores inflamatórios que atuam no recrutamento e na ativação de neutrófilos (Park e Lee, 2010). Modelos animais sugerem que as células T helper 17 (Th17), principais responsáveis pela liberação desta citocina, promovem uma inflamação do tipo neutrofílica, e em conjunto com as células Th2, desencadeiam importante hiperresponsividade das vias aéreas (Cosmi *et al.*, 2011). Nossos resultados, demonstraram que a *S. brasiliensis*, foi capaz de reduzir a concentração desta citocina, confirmando portanto, o seu potencial anti-inflamatório.

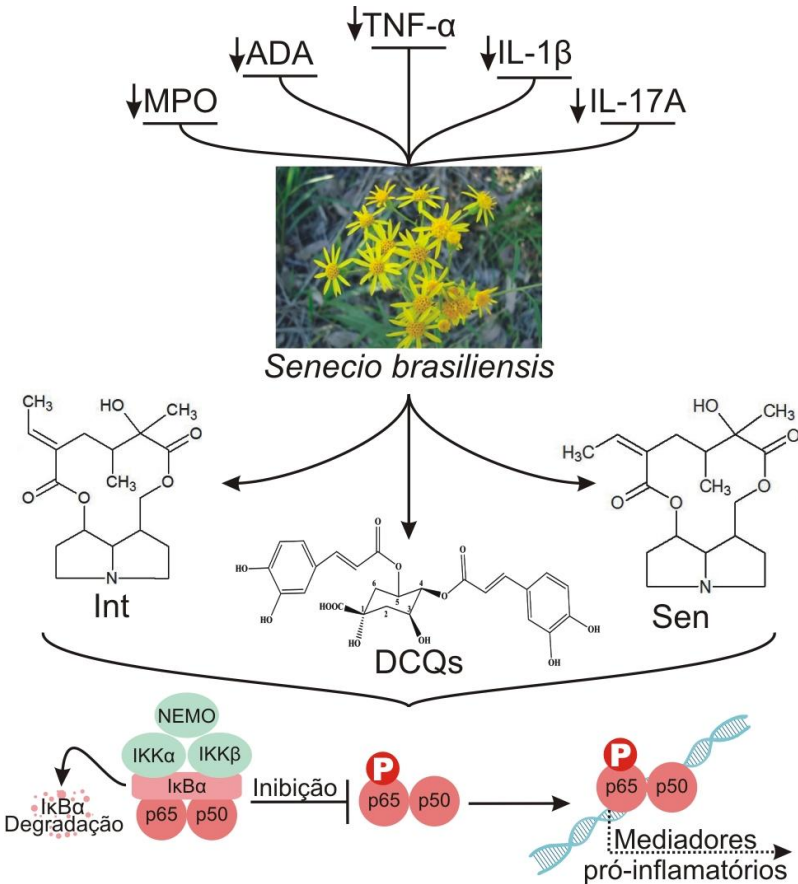
Em nossos experimentos, os compostos, DCQs, Sen e Int, demonstraram efeito inibitório na fosforilação da subunidade p65, demonstrando que a planta atua também na via do NF- $\kappa$ B. Como já citado anteriormente, a Cg é capaz de induzir a ativação de receptores TLR4, que ativa a via canônica do NF- $\kappa$ B (Bhattacharyya *et al.*, 2008). A fosforilação do inibidor da proteína inibitória da via do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) e a sua posterior degradação proteossomal, libera os dímeros de NF- $\kappa$ B, p50 e p65, que são translocados para o núcleo. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que atua a nível nuclear, induzindo a produção de mediadores inflamatório, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Oeckinghaus *et al.*, 2011).



## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. possui importantes propriedades anti-inflamatórias, devido a sua capacidade em inibir a migração de células e produção de mediadores pró-inflamatórios na cavidade pleural de camundongos. Estas propriedades parecem estar relacionadas com a inibição da atividade das enzimas MPO e ADA, bem como das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17A). Ademais, a inibição da via do NF- $\kappa$ B pelos compostos corroborou com a inibição da migração de leucócitos e citocinas pró-inflamatórias promovidos pela *S. brasiliensis*. Por fim, os compostos Sen, Int e DCQs parecem ser os principais responsáveis por este efeito anti-inflamatório (Figura 9)

Figura 9 - Resumo gráfico dos efeitos da *S. brasiliensis* sobre mediadores pró-inflamatórios



ADA: adenosina desaminase, DCQs: mistura de ácidos dicafeioilquinícos, IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta, IL-17A: interleucina 17A, Int: integerrimina, I $\kappa$ B $\alpha$ : proteína inibitória da via do NF- $\kappa$ B, IKK $\alpha$ : proteína kappa quinase alpha, IKK $\beta$ : proteína kappa quinase beta, MPO: mieloperoxidase, NEMO: NF- $\kappa$ B *Essential modifier*, P: fosforilação, Sen: senecionina.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

## REFERÊNCIAS

- AAMODT, K. et al. Midrapidity antiproton-to-proton ratio in pp collisions at  $\sqrt{s}=0.9$  and 7 TeV measured by the ALICE experiment. **Phys Rev Lett**, v. 105, n. 7, p. 072002, Aug 13 2010.
- ANTONIOLI, L. et al. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 12, p. 842-57, Dec 2013.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051-68, Aug 2014.
- ANTONIOLI, L. et al. Role of the A(2B) receptor-adenosine deaminase complex in colonic dysmotility associated with bowel inflammation in rats. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 5, p. 1314-29, Mar 2014.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Arch Biochem Biophys**, v. 500, n. 1, p. 92-106, Aug 1 2010.
- BARNES, P. J. Inhaled corticosteroids in COPD: a controversy. **Respiration**, v. 80, n. 2, p. 89-95, 2010.
- BENGHIAT, F. S. et al. Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity. **Transplant Rev (Orlando)**, v. 23, n. 1, p. 11-8, Jan 2009.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFkappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. **J Biol Chem**, v. 283, n. 16, p. 10550-8, Apr 18 2008.
- BOLDIZSAR, F. et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. **Immunobiology**, v. 215, n. 7, p. 521-6, Jul 2010.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149-60, Jan 2008.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v. 31, n. 11, p. 1612-61, Oct 8 2014.

CABRERA, A. L. El genero Senecio (Compositae) en Brasil, Paraguay y Uruguay. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 15, 1957 1957.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 131-4, Aug 22 2005.

CANTAERT, T. et al. Type I IFN and TNFalpha cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 5, p. 219, 2010.

CAPELARI-OLIVEIRA, P. et al. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica"). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 393-398, May 17 2011.

CHEN, J. F.; ELTZSCHIG, H. K.; FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 4, p. 265-86, Apr 2013.

CHEN, S. Natural products triggering biological targets--a review of the anti-inflammatory phytochemicals targeting the arachidonic acid pathway in allergy asthma and rheumatoid arthritis. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 3, p. 288-301, Mar 1 2011.

CHI, X. Y. et al. Effect of glucocorticoid in mice of asthma induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 29, n. 2, p. 176-80, Jun 2011.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 281-8, Apr 24 2014.



- CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821-3832, May 18 2005.
- COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S53-72, Feb 2010.
- CONAGHAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 6, p. 1491-502, Jun 2012.
- CONRADIE, J.; STEWART, M. J.; STEENKAMP, V. GC/MS identification of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional remedies given to two sets of twins. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 141-144, Mar 2005.
- COSMI, L. et al. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. **Allergy**, v. 66, n. 8, p. 989-998, Aug 2011.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **J Nat Prod**, v. 77, n. 3, p. 703-23, Mar 28 2014.
- CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 7, p. 479-89, Jul 2010.
- DE OLIVEIRA, D. T.; SOUZA-SILVA, E.; TONUSSI, C. R. Technical Report: Gingival Vein Puncture: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 109-113, 2009.
- DIAMANT, G.; DIKSTEIN, R. Transcriptional control by NF-kappaB: elongation in focus. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 9, p. 937-45, Sep 2013.
- DULEK, D. E.; PEEBLES, R. S., JR. Viruses and asthma. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 11, p. 1080-90, Nov 2011.

ECKLE, T. et al. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 10, p. 3301-15, Oct 2008.

ECKLE, T. et al. Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 774-82, May 2012.

EKENAS, C. et al. Screening for anti-inflammatory activity of 12 Arnica (Asteraceae) species assessed by inhibition of NF-kappaB and release of human neutrophil elastase. **Planta Medica**, v. 74, n. 15, p. 1789-94, Dec 2008.

ELIAS, F. et al. Haematological and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from *Senecio brasiliensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2313-9, Sep 2011.

FAITH, M. et al. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clin Chim Acta**, v. 396, n. 1-2, p. 23-5, Oct 2008.

FERNANDES, A. C., RITTER, M. R. A família *Asteraceae* no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Bioscience**, v. 7, n. 4, p. 395-439, 2009.

FLAMMER, J. R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. **Mol Endocrinol**, v. 25, n. 7, p. 1075-86, Jul 2011.

FREDHOLM, B. B. Adenosine--a physiological or pathophysiological agent? **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 3, p. 201-6, Mar 2014.

FRICK, J. S. et al. Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. **J Immunol**, v. 182, n. 8, p. 4957-64, Apr 15 2009.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy.

**Mediators Inflamm**, v. 10, n. 4, p. 223-7, Aug 2001.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, Feb 7 2001.

FUKUNAGA, J. et al. Comparative study to elucidate the mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 14, p. 1852-61, Dec 20 2007.

GIUSTI G., G. B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: BERGMEYER, H.-U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. 3. Weinheim: Verlag Chemie, v.4, 1984. p.315-323.

GOLEVA, E. et al. Corticosteroid-resistant asthma is associated with classical antimicrobial activation of airway macrophages. **J Allergy Clin Immunol**, v. 122, n. 3, p. 550-9 e3, Sep 2008.

GONZALEZ, C. P. et al. Anti-inflammatory activity and composition of *Senecio salignus* Kunth. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 814693, 2013.

GOULART, S. et al. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 346-353, Sep 5 2007.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

HAEGENS, A. et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine

production. **J Immunol**, v. 182, n. 12, p. 7990-6, Jun 15 2009.

HARIPRASATH, L.; RAMAN, J.; NANJIAN, R. Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 145-50, Mar 6 2012.

HASKO, G. et al. A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends Immunol**, v. 30, n. 6, p. 263-70, Jun 2009.

HENRIQUES, M. G. et al. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 99, n. 1, p. 164-8, Jan 1990.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer**, v. 12, p. 86, 2013.

HOSTETTER, S. J. Neutrophil function in small animals. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 42, n. 1, p. 157-71, Jan 2012.

KASZA, A. IL-1 and EGF regulate expression of genes important in inflammation and cancer. **Cytokine**, v. 62, n. 1, p. 22-33, Apr 2013.

KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **J Nat Prod**, v. 74, n. 6, p. 1539-55, Jun 24 2011.

KLOEPFER, K. M.; GERN, J. E. Virus/allergen interactions and exacerbations of asthma. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 553-63, vii, Nov 2010.

KRENKE, R.; KORCZYNSKI, P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. **Curr Opin Pulm Med**, v. 16, n. 4, p. 367-75, Jul 2010.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic

- potential. **Eur J Pharmacol**, v. 616, n. 1-3, p. 7-15, Aug 15 2009.
- LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacol Ther**, v. 111, n. 1, p. 16-26, Jul 2006.
- LEE, I. T.; YANG, C. M. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 791231, 2013.
- LEE, K. H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **J Nat Prod**, v. 73, n. 3, p. 500-16, Mar 26 2010.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.
- MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 6, p. 838-54, Nov 2007.
- MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, Aug 2011.
- MANUBOLU, M. et al. Activity-guided isolation and identification of anti-staphylococcal components from *Senecio tenuifolius* Burm. F. leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 3, p. 191-5, Mar 2013.
- MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. **PLoS Med**, v. 8, n. 9, p. e1001098, Sep 2011.
- MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 692-703, Oct 2009.

MERCER, P. F. et al. Translational models of lung disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 128, n. 4, p. 235-56, Feb 1 2015.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J. K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 10, p. 763-76, Oct 2012.

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

MONTESEIRIN, J. Neutrophils and asthma. **J Investig Allergol Clin Immunol**, v. 19, n. 5, p. 340-54, 2009.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunol Lett**, v. 111, n. 1, p. 1-5, Jul 31 2007.

NAGY, G. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v. 12, n. 3, p. 210, 2010.

NAUDE, P. J. et al. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. **FEBS J**, v. 278, n. 6, p. 888-98, Apr 2011.

NEMBRINI, C.; MARSLAND, B. J.; KOPF, M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 5, p. 986-94; quiz 995-6, May 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-35, Mar 23 2012.

NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 6, p. 692-713, Feb 20 2013.

- OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 695-708, Aug 2011.
- OLIVEIRA, S. H. et al. Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF-alpha and IL-1beta released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36-46, Feb 2008.
- PARK, S. J.; LEE, Y. C. Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma. **Respiratory Research**, v. 11, Jun 16 2010.
- PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future. **Pharmacol Res**, v. 59, n. 5, p. 285-9, May 2009.
- PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 1, p. 62-70, Jan 2009.
- PETRONILHO, S. et al. 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, Nov 2012.
- RAO, P.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **J Pharm Pharm Sci**, v. 11, n. 2, p. 81s-110s, 2008.
- RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723-41, Dec 1993.
- REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 57-64, Apr 2009.

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

SACHDEVA, S.; GUPTA, M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. **Saudi Pharm J**, v. 21, n. 3, p. 245-53, Jul 2013.

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, n. 3, p. 811-9, Jun 1996.

SCHINGNITZ, U. et al. Signaling through the A2B adenosine receptor dampens endotoxin-induced acute lung injury. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5271-9, May 1 2010.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v. 18, n. 3-4, p. 439-46, Jun 1986.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 6, p. 427-39, Jun 2010.

SPECTOR, W. G. The Mediation of Altered Capillary Permeability in Acute Inflammation. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 367-380, 1956.

STEWART, L.; KATIAL, R. K. Exhaled nitric oxide. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 32, n. 3, p. 347-62, Aug 2012.

SULEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGOZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacol Rep**, v. 59, n. 3, p. 247-58, May-Jun 2007.

THOMAS, D. D. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 1, p. 18-31, Jul 1 2008.



TOMA, W. et al. Modulation of gastrin and epidermal growth factor by pyrrolizidine alkaloids obtained from *Senecio brasiliensis* in acute and chronic induced gastric ulcers. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 82, n. 5, p. 319-25, May 2004.

TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Seneciobrasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 345-51, Dec 2004.

TOURDOT, S. et al. Respiratory syncytial virus infection provokes airway remodelling in allergen-exposed mice in absence of prior allergen sensitization. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 6, p. 1016-24, Jun 2008.

TRIGO, J. R. et al. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1011-1022, 2003.

TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 443-52, Dec 2007.

TSUJI, R. F. et al. Suppression of allergic reaction by lambda-carrageenan: toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 33, n. 2, p. 249-58, Feb 2003.

VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899-937, Nov 2009.

VOLMER, J. B.; THOMPSON, L. F.; BLACKBURN, M. R. Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-

induced lung injury. **J Immunol**, v. 176, n. 7, p. 4449-58, Apr 1 2006.

WAJANT, H.; SCHEURICH, P. TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. **FEBS J**, v. 278, n. 6, p. 862-76, Apr 2011.


WANG, D.; HUANG, L.; CHEN, S. Senecio scandens Buch.-Ham.: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 1-23, Aug 26 2013.

WYATT, J. E.; PETTIT, W. L.; HARIRFOROOSH, S. Pharmacogenetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Pharmacogenomics J**, v. 12, n. 6, p. 462-7, Dec 2012.

ZEIGER, R. S. et al. Association of exhaled nitric oxide to asthma burden in asthmatics on inhaled corticosteroids. **J Asthma**, v. 48, n. 1, p. 8-17, Feb 2011.

# ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “MODULATORY EFFECT OF SENECIO BRASILIENSIS L. IN A MURINE MODEL OF INFLAMMATION INDUCED BY CARRAGEENAN INTO THE PLEURAL CAVITY”

Journal of  
**ETHNOPHARMACOLOGY**

Contact us:  Help ?

My EES Hub\* available for consolidated users... [more](#)

home | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: [salleh@ccs.ufsc.br](#)  
Switch To: [Author](#) | Go to: [My EES Hub](#)

Version: [EES 2015.1](#)

**Submissions Being Processed for Author Tania Silvia Frode, PhD**

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

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">Send E-mail</a>	JEP-D-15-00196	Modulatory effect of Senecio brasiliensis (Spreng) Less. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity.	22/01/2015	27/01/2015	Under Review

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

[<< Author Main Menu](#)