

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL AUGUSTO GASPARIN BUENO MENDES

**AÇÃO ANTI-INFLAMATORIA CUTÂNEA DE UMA PLANTA
NATIVA BRASILEIRA: *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax**

CURITIBA

2015

DANIEL AUGUSTO GASPARIN BUENO MENDES

**AÇÃO ANTI-INFLAMATORIA CUTÂNEA DE UMA PLANTA
NATIVA BRASILEIRA: *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela de Almeida Cabrini


Co-orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

CURITIBA

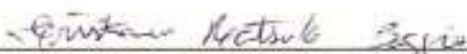
2015

1 **ATA DO JULGAMENTO DA 35ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

2 Ao vigésimo quinto dia do mês de fevereiro do ano de dois mil e quinze, às treze horas
3 e trinta minutos, no Auditório do Departamento de Farmacologia, Anexo I, do Setor de
4 Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão
5 Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de
6 autoria do pós-graduando DANIEL AUGUSTO GASPARI BUENO MENDES,
7 intitulada **“Ação anti-inflamatória cutânea de uma planta nativa brasileira: *Sapium***
8 ***glandulatum (Vell.) Pax*”,** sob orientação da Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini e
9 banca composta por: Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente – Farmacologia –
10 UFPR), Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Edvaldo da Silva
11 Trindade (Biologia Celular - UFPR), Prof. Dr. Emerson Luiz Botelho Lourenço (Ciência
12 Animal - UNIPAR) e Prof. Dr. Giovani Marino Favero (Biologia Geral – UEPG). A Banca
13 Examinadora iniciou os trabalhos e o candidato teve quarenta e cinco minutos para expor
14 oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguido durante quinze minutos por cada um dos
15 membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No
16 final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: aprovado.
17 Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas que serão conferidas
18 por sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão,
19 da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pela Presidente e pelos demais
20 membros da Comissão Examinadora, em Curitiba, 25 de fevereiro de 2015.




Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente – Farmacologia – UFPR)



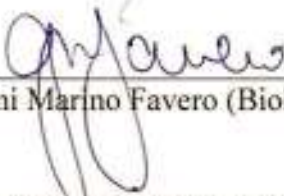
Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade (Biologia Celular – UFPR)



Prof. Dr. Emerson Luiz Botelho Lourenço (Ciência Animal – UNIPAR)



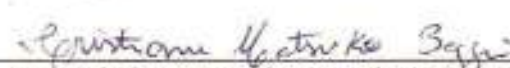
Prof. Dr. Giovani Marino Favero (Biologia Geral – UEPG)

PARECER

A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada "Ação anti-inflamatória cutânea de uma planta nativa brasileira: *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax", de autoria do pós-graduando DANIEL AUGUSTO GASPARIN BUENO MENDES, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini e banca composta por: Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente – Farmacologia – UFPR), Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade (Biologia Celular - UFPR), Prof. Dr. Emerson Luiz Botelho Lourenço (Ciência Animal - UNIPAR) e Prof. Dr. Giovani Marino Favero (Biologia Geral – UEPG), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi aprovado. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 25 de fevereiro de 2015.



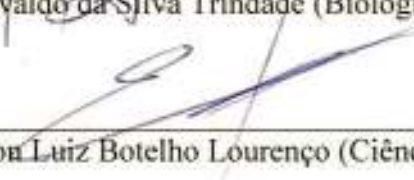
Prof.^a Dr.^a Daniela de Almeida Cabrini (Presidente – Farmacologia – UFPR)



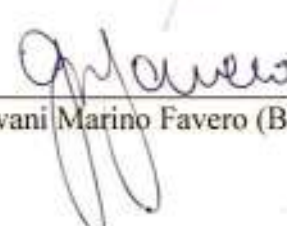
Dr.^a Cristiane Hatsuko Baggio (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade (Biologia Celular – UFPR)



Prof. Dr. Emerson Luiz Botelho Lourenço (Ciência Animal – UNIPAR)



Prof. Dr. Giovani Marino Favero (Biologia Geral – UEPG)

Dedico este trabalho à minha família;

Em especial

À minha mãe Consuelo Bueno, fonte de minha inspiração, força e garra;

Ao meu irmão Rodrigo Otávio;

A minha tia Rosemary;

Por todo apoio, dedicação, amor, por sempre acreditarem em mim e, me incentivarem à alcançar os meus objetivos como pesquisador. Sem vocês esta etapa da minha vida teria continuado a ser um simples sonho. Vocês são peças fundamentais do meu crescimento como pessoa e como profissional.

MUITO OBRIGADO

AMO VOCÊS

AGRADECIMENTOS

A Deus e meus guias, por estarem sempre ao meu lado me iluminando, protegendo e ajudando para que possa trilhar meu caminho nesta vida;

Aos meus orientadores Daniela de Almeida Cabrini e Michel Fleith Otuki. Agradeço por todo ensinamento, dedicação e aprendizado dispensados nestes anos de convivência e trabalho. Tenham certeza de que todos os conhecimentos adquiridos neste período de mestrado e doutorado foram de suma importância para a minha formação e, serão fundamentais para toda minha carreira acadêmica.

A Profa. Carolina Camargo de Oliveira pelas ideias e contribuições nos ensaios com células deste trabalho;

Prof. Errol P. Prens from Dermatology Department of Erasmus Medical Center MC for accepting me in his lab in Rotterdam/Netherlands to make the sandwich doctorate, expanding my scientific knowledge;

Aos membros da banca examinadora Dra. Cristiane Hatsuko Baggio, Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, Prof. Dr. Emerson Luiz Botelho Lourenço e Prof. Dr. Giovanni Marino Favero pela leitura e colaboração para a finalização deste trabalho;

A minha família: meus tios Tíndio e Tere; a minha madrinha Eliane; aos meus irmãos de coração João Leonardo e Carlos Felipe; a minha cunhada Raquel e minha avó Léa (*in memoriam*) pelos incentivos, palavras de apoio e por acreditarem em mim para a conclusão deste trabalho;

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram de alguma forma durante esta trajetória. Em especial aos amigos Arthur, Cíntia, Camila, Graziela, Luise e Priscila, que foram essenciais no dia a dia;

Em especial a minha amiga Bruna Soley, que sempre estava disposta a me ajudar, independente do dia, das adversidades ou da quantidade de trabalho. Muito obrigado Bruninha!

Aos amigos que fiz durante este período Caroline Gomes, Cristiane Baggio, Emerson Botelho, Eunice André, Francislaine Lívero, Herbert Trebien, Izonete Guiloski, Janaina Zanoveli, Joice Cunha, Jonas Goulart, Larissa Galuppo, Luis Lomba, Marcela Pereira, Maria Fernanda e Paulo Dalsenter dentro do Departamento e me acompanharam durante esta jornada;

To my friends Eddy Florencia, João Carvalho and especially Cintia Bombardieri and Ricardo Leite, whom I met at the doctoral period sandwich in the Netherlands. Without you, without a doubt, everything would have been much more difficult. You have become my little Dutch family;

Aos professores do Departamento de Farmacologia pelos conhecimentos em farmacologia compartilhados;

As secretárias Ely de Fátima e Patricia Pott e a técnica Silvia sempre dispostas e prestativas para me ajudar;

As bioteristas Ana Novack, Iselen Ivanoski, Gilmara Miranda e Luana Mazepa por toda ajuda prestada;

Aos bravos camundongos utilizados neste trabalho, sem eles nada disso teria sido possível;

A agência de fomento CAPES, que financiou minha bolsa durante o período de doutorado e meu período de doutorado sanduiche na Holanda;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

As plantas medicinais representam uma fonte de estratégias terapêuticas importante para humanidade devido as suas propriedades curativas, contribuindo de forma significativa na descoberta de novos tratamentos e fármacos. Estudos etnobotânicos do gênero *Sapium*, revelam que este gênero é amplamente utilizado em vários países como remédios terapêuticos e extensamente utilizado na medicina popular para o tratamento dos mais variados tipos de doenças, inclusive doenças inflamatórias cutâneas. Despertando assim um crescente interesse no estudo das propriedades farmacológicas e na composição fitoquímica destas plantas. A espécie nativa do sul do Brasil, *Sapium glandulatum* não possui nenhum estudo relatado na literatura sobre suas propriedades biológicas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas da *S. glandulatum* (EHSg) frente a processos inflamatórios agudo e crônico da pele. Para isso, o efeito tópico do EHSg foi avaliado nos modelos de edema de orelha agudo e crônico induzidos por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), e o efeito sistêmico foi verificado nos modelos de edema de orelha induzido por TPA e edema de pata induzido por carragenina. O EHSg demonstrou atividade anti-inflamatória quando aplicado pela via tópica nos modelos agudo e crônico, inibindo a formação de edema, com forte inibição da migração leucocitária para o local inflamado, e reduzindo os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no tecido inflamado. O mesmo efeito anti-inflamatório foi demonstrado pelo tratamento pela via oral nos modelos de edema de orelha e de pata, reduzindo a formação de edema e migração celular, no entanto, não tão eficaz quanto o tratamento tópico. Avaliamos também a interação do EHSg com receptores de glicocorticóides (GR) utilizando o modelo de edema de orelha induzido por TPA e o pré-tratamento com o antagonista do GR, mifepristona, e o ensaio de ligação específica da [³H]-dexametasona. O EHSg demonstrou promover seus efeitos anti-inflamatórios, pelo menos em parte, pela via de GR, visto que a ação do extrato foi revertida na migração leucocitária pela mifepristona, e comprovada pelo ensaio de ligação específica. Ainda, ao avaliar a ação do múltiplo tratamento com EHSg no modelo de atrofia cutânea e teste de genotoxicidade, este não apresentou efeitos adversos nas orelhas dos animais e também não promoveu alterações cromossômicas nas células da medula óssea dos animais. A ação do EHSg também foi verificada em linhagens de queratinócitos epidérmicos HaCaT e macrófagos RAW 264.7, avaliando seu efeito citotóxico pelos ensaios de MTT e vermelho neutro em ambas as linhagens, e seu efeito proliferativo, no *burst* respiratório, na função fagocítica e de ativação de macrófagos. O extrato não apresentou citotoxicidade em baixas concentrações para os queratinócitos e macrófagos, porém induziu a proliferação dos macrófagos no ensaio de cristal violeta e ativação alternativa (não-clássica) destas células, alterando a morfologia normal, diminuindo a função fagocítica e a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α . Em conclusão, o EHSg é uma potente ferramenta anti-inflamatória para o tratamento de doenças de pele, e o seu mecanismo de ação pode ser, pelo menos em parte, através de via de GR.

Palavras chaves: *Sapium glandulatum*, Plantas Medicinais, Pele, Inflamação de pele, Macrófagos, Glicocorticóides.

ABSTRACT

Medicinal plants represent an important source of therapeutic strategies for humanity due to its healing properties, making a significant contribution in the discovery of new treatments and drugs. Ethnobotanical studies of *Sapium* gender reveal that many species are widely used in several countries as therapeutic drugs and widely used in folk medicine for treatment of different diseases, including skin inflammation. Thus rising an increasing interest to study the pharmacological properties and phytochemical composition of these plants. *Sapium glandulatum*, a native species of southern Brazil, has no study reported in the literature about its biological properties. So, the aim of this study was investigate the anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract of leaves of *S. glandulatum* (EHSG) against acute and chronic skin inflammation. For this, the topical effect of EHSG was evaluated in models of acute and chronic ear edema induced by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), and systemic effect was observed on TPA-induced ear edema model and paw edema induced by carrageenan. EHSG demonstrated anti-inflammatory activity when applied topically in acute and chronic models, inhibiting edema formation, with a strong inhibition of leukocyte migration and reducing levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the inflamed tissue. The same anti-inflammatory effect was demonstrated for oral treatment in ear and paw edema models by reducing edema and cellular migration, however, not as effective as topical route. We also evaluated the EHSG interaction of glucocorticoid receptors (GR) using ear edema model induced by TPA and pretreatment with GR antagonist (mifepristone), and the specific binding assay of [³H]-dexamethasone. The extract action in leukocyte migration was reversed by mifepristone, and interaction with GR was verified by specific binding assay. Even, when evaluated the effects of multiple treatment with EHSG on skin atrophy model and genotoxicity test, it showed no adverse effects on animal ears and did not promote chromosomal changes in bone marrow cells. EHSG action was also verified using the cell line of epidermal keratinocytes HaCaT and macrophages RAW 264.7, assessing their cytotoxic effect by MTT and neutral red assay in both strains, and proliferative effect in burst respiratory, phagocytic function and activation in macrophages. Extract did not show cytotoxicity at lower concentrations for keratinocytes and macrophages, but induced proliferation of macrophages in crystal violet assay and promoted alternative activation (non-classical) of these cells, altering the normal morphology, reducing phagocytic function and the release of the pro-inflammatory cytokine TNF- α . In conclusion, EHSG is a potential anti-inflammatory tool for the treatment of skin diseases, and its mechanism of action may be, at least in part, via GR pathway.

Keywords: *Sapium glandulatum*, Medicinal Plants, Skin, Skin inflammation, Macrophages, Glucocorticoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

FIGURA 01: Representação esquemática do corte transversal da pele	22
FIGURA 02: Imagem das folhas da <i>Sapium glandulatum</i> (Vell.) Pax.....	37
FIGURA 03: Atividade tópica dos diferentes extratos bruto hidroalcoólico da <i>Sapium glandulatum</i> na inflamação de orelha induzida por TPA	67
FIGURA 04: Curva dose-resposta do EHSg no modelo de edema de orelha induzido por TPA.....	68
FIGURA 05: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a atividade da enzima MPO induzida por TPA	69
FIGURA 06: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a atividade da enzima MPO <i>in vitro</i>	70
FIGURA 07: Histologia de cortes transversais das orelhas dos animais induzidos por TPA.....	71
FIGURA 08: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a migração celular induzida por TPA.....	71
FIGURA 09: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzida por TPA.....	72
FIGURA 10: Efeito das frações SGFA e SGFD sobre o edema de orelha e a atividade da enzima MPO induzidos por TPA	74
FIGURA 11: Efeito da administração oral do EHSg e da dexametasona sobre o edema de orelha e a atividade da enzima MPO induzido por TPA	76
FIGURA 12: Efeito da administração oral do EHSg e da dexametasona sobre o edema de pata e a atividade da enzima MPO induzido pela administração de carragenina	78

FIGURA 13: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre o edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de TPA	80
FIGURA 14: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a atividade da enzima MPO e NAG induzidas pela múltipla aplicação de TPA	81
FIGURA 15: Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzida pela múltipla aplicação de TPA.....	82
FIGURA 16: Efeito na reversão causada pela mifepristona na formação de edema induzido por TPA e tratados com EHSg ou dexametasona.....	84
FIGURA 17: Efeito na reversão causada pela mifepristona na atividade da enzima MPO induzida por TPA e tratados com EHSg ou dexametasona	85
FIGURA 18: Efeito EHSg sobre o ensaio de ligação específica da [3 H]-dexametasona ao receptor de glicocorticóides	86
FIGURA 19: Efeito da múltipla aplicação tópica do EHSg sobre o peso, níveis de glicemia e espessura da orelha dos animais	88
FIGURA 20: Efeito da múltipla aplicação tópica do EHSg sobre aspectos macroscópicos do timo, baço, das adrenais e dos linfonodos auriculares dos animais.....	89
FIGURA 21: Efeito da múltipla aplicação tópica do EHSg sobre o peso do timo, baço, das adrenais e dos linfonodos auriculares dos animais	90
FIGURA 22: Efeito da múltipla aplicação tópica do EHSg sobre o dano ao DNA	91
FIGURA 23: Efeito EHSg sobre o ensaio de viabilidade celular de queratinócitos epidérmicos HaCaT e macrófagos RAW 264.7	92
FIGURA 24: Efeito EHSg sobre o ensaio de proliferação celular em macrófagos RAW 264.7	93
FIGURA 25: Efeito do EHSg sobre a morfologia de linhagem de macrófagos RAW 264.7	94

FIGURA 26: Efeito do EHSg sobre o <i>burst</i> respiratório de linhagem de macrófagos RAW 264.7	96
FIGURA 27: Efeito do EHSg sobre a atividade fagocítica da linhagem de macrófagos RAW 264.7	97
FIGURA 28: Efeito do EHSg sobre a ativação celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7	100
FIGURA 29: Efeito do EHSg sobre a liberação de citocinas TNF- α e IL-6 pela linhagem macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Flavonoides isolados a partir de espécies <i>Sapium</i>	39
TABELA 2: Terpenoides isolados a partir de espécies <i>Sapium</i>	39
TABELA 3: Vários compostos isolados a partir de espécies <i>Sapium</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
ABTS	2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico)
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Células apresentadoras de antígenos
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CXCL1/KC	Quimiocinas derivadas de queratinócitos
DAF-FM	Sonda diacetate (4-amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetate)
DAPI	4',6 – diamidino diamidino diamidino-2- fenil-indol
DCF-DA	Sonda (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)
dH ₂ O	Água destilada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EH50%	Extrato bruto hidroalcoólico 50% das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
EH70%	Extrato bruto hidroalcoólico 70% das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
EH90%	Extrato bruto hidroalcoólico 90% das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
EHSG	Extrato bruto hidroalcoólico 90% das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
FIC	Ensaio quelante do íon ferroso
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
GR	Receptor de glicocorticóide
GREs	Elementos responsivos de glicocorticóides
GSH	Glutathiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2-hidroxietilpiiperazina-1
HOCl	ácido hipocloroso

HTBA	Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LMPA	Agarose de baixo ponto de fusão
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Thiazolyl blue tetrazoliumbromide
NaCl	Cloreto de Sódio
NAG	n-acetil- β -D glucosaminidase
NF- κ B	Fator nuclear-kappa B
NIQFAR	Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PAF	Fator de ativação plaquetária
PASI	Área de Psoríase e Índice de Severidade
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG 400	Polietilenoglicol 400
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benzeno
PPO	2,5-Difeniloxazol
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SGFA	Fração Acetato de Etila das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>

SGFD	Fração Diclometano das folhas de <i>Sapium glandulatum</i>
SOD	Superóxido dismutase
SPVS	Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TMB	Tetrametilbenzidina.HCl
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular
VN	Vermelho neutro
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
±	Mais ou menos
cm	Centímetro
DO	Densidade óptica
g	Gramas
g/l	Gramas/Litro
h	Horas
i.pl.	Via intraplantar
kDa	Kilodalton
kg	Quilograma
m	Metro
M	Molar
M	Molar
m ²	Metro quadrado
mA	Miliamper
mg	Miligramma
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
p/v	Peso/Volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
s.c.	Via subcutânea
UV	Radiação ultravioleta
V	Volts
v.o.	Via oral
xg	Força centrífuga relativa (RCF)
Δ	Delta/Variação

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Pele e Processo inflamatório cutâneo	22
1.2. Plantas Medicinais.....	34
1.3. <i>Sapium glandulatum</i> (Vell.) Pax	36
2. JUSTIFICATIVA.....	44
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo geral.....	46
3.2. Objetivos específicos.....	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Material botânico	48
4.2. Obtenção do Extrato.....	48
4.3. Drogas e Reagentes.....	49
4.4. Ensaio com animais.....	49
4.4.1. Animais	49
4.4.2. Avaliação do edema de orelha	50
4.4.3. Dermatite de contato irritativa aguda induzida por TPA	51
4.4.4. Dermatite de contato irritativa induzida pela múltipla aplicação de TPA.....	52
4.4.5. Avaliação do edema de pata induzido pela aplicação de carragenina.....	52
4.4.6. Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)	53
4.4.7. Ensaio da atividade enzimática da n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG) ...	54
4.4.8. Avaliação histológica	55
4.4.9. Ensaio de ligação de receptores de glicocorticóide.....	55
4.4.10. Avaliação do efeito do múltiplo tratamento tópico com glicocorticoide sobre a atrofia cutânea e peso dos órgãos linfóides	56
4.4.11. Ensaio cometa alcalino (Alcaline Comet Assay)	57
4.4.12. Quantificação de citocinas em modelos animais.....	58
4.5. Ensaio em células.....	59
4.5.1. Cultivo celular	59
4.5.2. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Thiazolyl blue tetrazoliumbromide (MTT)	59

4.5.3. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de vermelho neutro	60
4.5.4. Determinação de proliferação celular pelo ensaio de cristal violeta.....	61
4.5.5. Avaliação da citomarcção para morfológica de macrófagos	61
4.5.6. Ensaio de burst respiratório em macrófagos	62
4.5.7. Avaliação da função fagocítica de macrófagos	63
4.5.8. Avaliação de ativação de macrófagos	64
4.5.9. Quantificação de citocinas em cultivo celular	64
4.6. Análise estatística	65
5. RESULTADOS	67
5.1. Efeito anti-inflamatório tópico da planta <i>Sapium glandulatum</i> sobre modelo de edema de orelha em camundongos	67
5.2. Efeito anti-inflamatório oral do EHSg sobre modelos de edema de orelha e pata em camundongos	75
5.3. Efeito anti-inflamatório tópico do EHSg no edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de TPA	79
5.4. Avaliação do efeito do tipo glicocorticóide do EHSg e sobre a atrofia cutânea e órgãos linfóides.....	83
5.5. Avaliação do efeito do EHSg sobre linhagens de queratinócitos epidermicos HaCaT e sobre macrófagos RAW 264.7.	92
6. DISCUSSÃO	103
7. CONCLUSÃO	125
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
9. ANEXOS.....	148

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. PELE E PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO

A pele é um órgão complexo de revestimento do organismo que recobre aproximadamente 2 m² da superfície corpórea, representando 15% do peso total do corpo humano, isolando os componentes orgânicos do meio exterior e sendo indispensável à vida (SAMPAIO *et al.*, 2000). É composta, essencialmente, de três grandes camadas com estruturas, propriedades e funções distintas. Na superfície está a epiderme, formada por células epiteliais estratificadas e disposta acima da derme. A derme é a camada do tecido conectivo, e por sua vez, está fixada sobre a hipoderme, que é composta predominantemente por tecido adiposo (FREINKEL e WOODLEY, 2001). A pele tem origem através de precursores ectodérmicos que compõem a epiderme (queratinócitos e melanócitos) e mesodérmicos que compõem a derme (fibroblastos, leucócitos e vasos) (SPELLBERG, 2000).

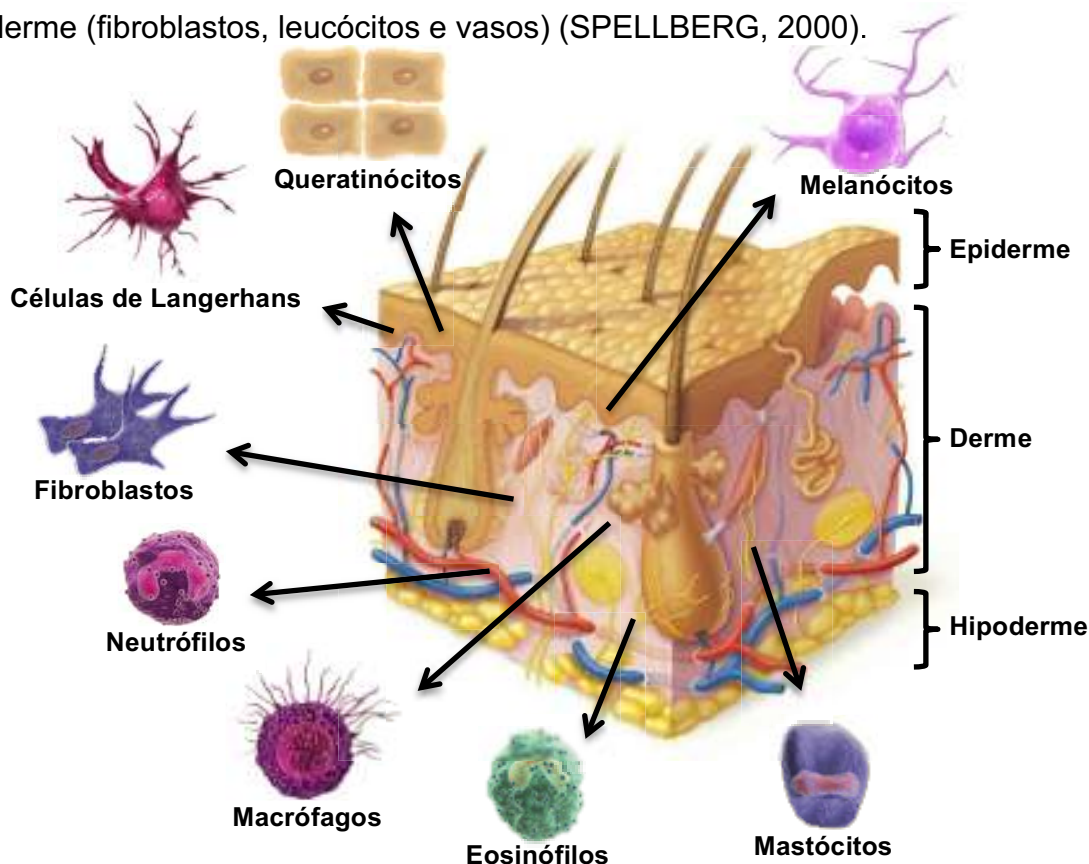


FIGURA 01: Representação esquemática do corte transversal da pele. Demonstração das três camadas: epiderme, derme e hipoderme e os principais tipos celulares presentes em cada camada. Fonte:

https://classconnection.s3.amazonaws.com/279/flashcards/1914279/jpg/skin_anatomy1349126253055.jpg (Acessado em Dezembro, 2014). Imagem adaptada

A epiderme é a camada externa da pele, que é constituída por um tecido multiestratificado do tipo pavimentoso, que através de uma diferenciação progressiva (queratinização e cornificação) é constantemente renovada (CANDI *et al.*, 2005). É subdividida em cinco camadas: camada córnea (mais externa), camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal (em contato com a derme), cada uma com funções distintas (NORRIS, 2004). A primeira camada ou estrato córneo atua como uma grande barreira à penetração de organismos externos e toxinas, além de prevenir a perda de água. Na camada lúcida e granulosa, inicia-se o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose, diferenciando-se em corneócitos. Na camada espinhosa, os queratinócitos presentes são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização) e, por fim, a camada ou estrato basal, é a mais profunda e responsável pela proliferação celular, sendo resistente ao processo apoptótico. Sendo assim, a epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares com diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é formada de queratinócitos, cerca de 10-13 % de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel (FREINKEL e WOODLEY, 2001; KOSTER e ROOP, 2004).

A espessura deste epitélio pavimentoso apresenta variações topográficas ao longo do organismo (SAMPAIO *et al.*, 2000; CANDI *et al.*, 2005). Na pele espessa, podem ser distinguidas as cinco camadas da epiderme, enquanto que na pele delgada (mais fina), o estrato lúcido encontra-se ausente (ROSS *et al.*, 1993).

A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. A epiderme tem a capacidade de auto-renovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular ativamente mitótica na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, quando se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção a superfície (FUCHS e RAGHAVAN, 2002; CANDI *et al.*, 2005).

Na fase de proliferação celular da camada basal, durante o desenvolvimento do processo inflamatório, os queratinócitos possuem um papel fundamental. Ocorre uma considerável mudança na morfologia e função destas células, que migram até a camada superficial da região lesada, liberando inúmeras proteínas e enzimas que

facilitam a migração e outras funções celulares, reconstituindo, assim, a epiderme lesada e a membrana basal. Por último, ocorre a formação do tecido de granulação e reconstituição da matriz dérmica, fibroplasia pelos fibroblastos e angiogênese pelas células endoteliais. Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais interagem com células ao redor, especificamente através de integrinas, para a cicatrização da lesão (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

Na epiderme, ainda encontram-se outros tipos de células e estruturas, tais como: os melanócitos (responsáveis pela pigmentação da pele), linfócitos T, células de Langerhans e Merkel, funcionando como parte do sistema imune e sensorial respectivamente (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; MITCHELL F, 2004; MAKRANTONAKI *et al.*, 2007; PROKSCH *et al.*, 2008).

Os melanócitos são células produtoras de melanina que participam no processo de pigmentação da pele e na proteção desta contra a radiação ultravioleta (UV). Apresentam formato arredondado, com longos prolongamentos dendríticos que se estendem através das duas camadas inferiores da pele (camada basal e espinhosa); no entanto, estão localizadas na camada basal da epiderme, onde formam uma unidade com os queratinócitos, cuja proporção é de 1:5, a qual é mantida através da regulação da divisão dos melanócitos (FITZPATRICK *et al.*, 1979; HAASS e HERLYN, 2005). Os melanócitos são responsáveis pela síntese de melanina, na forma de melanossomas, que são transferidos para os queratinócitos das camadas superiores através da passagem pelos seus prolongamentos dendríticos. Além da pele, também é possível encontrar melanócitos no epitélio de mucosas, bulbocapilar, sistema nervoso central, retina e no aparelho ocular (SAMPAIO *et al.*, 2000).

As células de Langerhans estão localizadas nas camadas suprabasais da epiderme da pele e das mucosas, onde desempenham um importante papel na reposta imune cutânea (CHAN, 2004). Estas células são migratórias, e possuem vários receptores de membrana envolvidos no processo imunológico, por exemplo: complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, imunoglobulina G (IgG) e fator do complemento C3. Assim, essas células são responsáveis pelo reconhecimento, captação, processamento e apresentação de antígenos solúveis e haptenos aos linfócitos T. Após a estimulação local das células T, é criado um ambiente muito mais complexo de citocinas na epiderme, que passam pela derme e culminam na ativação e recrutamento de leucócitos do compartimento vascular, com

o objetivo de restabelecer a homeostasia do órgão. Em certas doenças inflamatórias cutâneas, como na dermatite de contato e em processos alérgicos, verifica-se que as células de Langerhans tornam-se mais abundantes (HAAKE *et al.*, 2001; NORRIS, 2004).

As células de Merckel são células epidérmicas modificadas localizadas no estrato basal. Esse tipo celular está frequentemente próximo ou em contato com nervos não-mielinizados, onde formam sinapses com terminações nervosas periféricas (NORRIS, 2004). Assim, as células de Merckel atuam como mecanorreceptores, e também contribuem no desenvolvimento do plexo nervoso na porção superior da derme (HAAKE *et al.*, 2001).

A derme é formada por tecido conjuntivo rico em mucopolissacarídeos, fibras colágenas, elásticas e reticulares, que conferem elasticidade, força tensil e resistência mecânica à pele. Sua espessura é variável ao longo do organismo, superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior e, é nela que estão alojadas as estruturas anexas da pele como glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Sua interação com a epiderme ocorre através da junção dermoepidérmica, garantindo assim as trocas de elementos nutritivos e metabólicos entre essas camadas (HAAKE *et al.*, 2001). Além disso, ainda coordena o tráfego de leucócitos de e para a epiderme (SPELLBERG, 2000). Possui uma camada mais superficial e frouxa, a camada papilar, e uma camada mais profunda e mais densa, a reticular (GARTNER e HIATT, 1999). Essas camadas possuem matrizes extracelulares diferentes. Na derme papilar, as fibras de colágeno são pouco organizadas e finas e consistem principalmente de colágeno dos tipos III. Existem ainda fibras elásticas que, junto às fibras de colágeno, se organizam de forma bastante frouxa. Entretanto, na derme reticular, a matriz é mais densa, com fibras mais grossas e melhor organizadas, onde são encontradas principalmente fibras de colágeno do tipo I, sendo as fibras elásticas mais espessas e agrupadas ao colágeno em redes firmemente entrelaçadas (CHAN, 2004; SORRELL e CAPLAN, 2004).

Sendo assim, a constituição da derme envolve polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, elásticas e reticulares), receptores sensoriais (ex., corpúsculos de Meissner e corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos linfáticos e sanguíneos, que permitem

a ocorrência de infiltração de células migratórias importantes no processo de resposta de defesa inata ou imune e de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, dentre outros (RYAN, 2004). As inervações vegetativas presentes na derme inervam glândulas sudoríparas, músculo pilo-erector e vasos sanguíneos, auxiliando no controle da temperatura corporal. A inervação sensitiva, por sua vez, conduz estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o sistema nervoso central (GOODWIN e WHEAT, 2004).

O principal tipo celular encontrado na derme são os fibroblastos, os quais são capazes de migrar através do tecido e são responsáveis pela síntese e degradação de proteínas de tecido conectivo fibroso e não fibroso. Além disso, também são capazes de sintetizar simultaneamente de mais de um tipo de proteína (por exemplo, colágeno e elastina) (FREINKEL e WOODLEY, 2001). O colágeno e outras diferentes macromoléculas sintetizadas entram na constituição da matriz celular (HAAKE *et al.*, 2001). Durante o processo inflamatório, há um aumento da proliferação e da atividade dos fibroblastos, devido a ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-1 α (IL-1 α) e interleucina-1 β (IL-1 β), liberados principalmente pelos queratinócitos (FREINKEL e WOODLEY, 2001).

A camada mais profunda da pele, a hipoderme ou tecido subcutâneo, possui espessura variável, composta exclusivamente por tecido adiposo e tecido conjuntivo frouxo. Relaciona-se, em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo-se a junção dermo-hipodérmica com a fáscia muscular. Funcionalmente, além de depósito de reserva nutritiva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos, e facilita a motilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (SAMPAIO *et al.*, 2000).

Portanto, a pele proporciona uma interface de suporte da vida entre o corpo e o meio ambiente. Para além da sua função de barreira mecânica bem caracterizado, que limita a perda de água e evita a entrada de substâncias ambientais potencialmente nocivas e microrganismos, a pele constitui uma barreira ativa que proporciona a primeira linha de defesa imunológica contra infecções (NESTLE *et al.*, 2009). O sistema de defesa da pele é assim composto: (1) a barreira da pele, (2) a imunidade inata e (3) imunidade adquirida (TURVEY e BROIDE, 2010). Em geral, estas defesas estão alinhadas cronológica, funcional, e filogeneticamente nesta ordem. Qualquer alteração em uma destas defesas específicas pode resultar em defeitos na defesa seguinte, uma vez que cada uma

apresenta funções exclusivas na proteção do organismo contra agentes infecciosos específicos de lesões internas ou externas. A inflamação é definida como uma série de respostas protetoras e regenerativas do corpo. Desta forma, doenças inflamatórias da pele são originalmente resultado dessas respostas protetoras e regeneradoras da pele contra infecções e/ou lesões (DAINICHI *et al.*, 2014).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda pronta e efetivamente frente a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta e extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea. E, nesse contexto, a pele demonstra ser muito mais do que simplesmente uma barreira física passiva entre o meio externo e interno, mas sim, indubitavelmente, também uma extensão do sistema imunológico (WILLIAMS e KUPPER, 1996; HAAKE *et al.*, 2001).

No entanto, uma vez o processo inflamatório instalado, vários mediadores pró-inflamatórios solúveis são liberados, tais como: neuropeptídeos (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, etc.), metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos, prostaglandinas, etc.), monoaminas (histamina, serotonina, etc.) e citocinas (interleucinas, interferons, etc.). Estes mediadores, por sua vez, através de seus receptores, produzem vários segundos mensageiros que ativam diversas proteínas quinases como a proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Estas proteínas podem ativar fatores nucleares, como o fator nuclear-kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de diversas proteínas (citocinas, enzimas, etc.), modulando, mantendo e amplificando a resposta inflamatória (BUCKLE e HEDGECOCK, 1997; PUIGNERO e QUERALT, 1997; BHAGWAT *et al.*, 1999).

Os queratinócitos presentes na epiderme possuem grande quantidade de IL-1 α pré-formada em seu interior e, quando estimulados/danificados, são capazes de desencadear o início da cascata inflamatória, exteriorizando a IL-1 α contida em seu interior (SPELLBERG, 2000), sendo a IL-1 α considerada um sinal de perigo quando os queratinócitos sofrem algum tipo de injúria (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001). Os queratinócitos adjacentes respondem ao estímulo da IL-1 α liberada e produzem mais IL-1 α , assim como IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-6, amplificando o

sinal inicial. Além disso, os queratinócitos também produzem quimiocinas, como a IL-8, favorecendo o recrutamento de granulócitos, além da secreção do fator de crescimento de colônia de macrófagos e granulócitos (M-CSF, GM-CSF), IL-7 e IL-15. Estes fatores induzem a ativação de leucócitos e auxiliam na sua sobrevivência nas respostas às quimiocinas (SPELLBERG, 2000). As citocinas secretadas se difundem através da membrana basal até chegarem à derme e, nesta camada, os fibroblastos, estimulados pelas citocinas dos queratinócitos, iniciam a produção de IL-1, IL-6, TNF- α e quimiocinas próprias. Com todo o evento de liberação de citocinas pelos queratinócitos e fibroblastos da pele, devido a um estímulo nocivo, as células endoteliais microvasculares da derme são ativadas, fornecendo um reforço na defesa do órgão (SPELLBERG, 2000).

Os vasos sanguíneos, e em menor grau, os vasos linfáticos, contribuem essencialmente para o processo inflamatório e são os grandes responsáveis pelos sinais cardinais da inflamação: a dilatação dos vasos sanguíneos, com o aumento do fluxo, são a base do rubor e calor; o excesso de exsudato causada pelo vasos sanguíneos hiperpermeáveis excedem a capacidade de drenagem de fluido pelos vasos linfáticos, resultando no tumor. Finalmente, a dor e perda de função são processos subsequentes após a ativação vascular e influxo de leucócitos (HUGGENBERGER e DETMAR, 2011). A ativação do endotélio por mediadores inflamatórios, tais como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), TNF- α , IL-6, IL-1 β , dentre outros, leva à regulação positiva de moléculas de adesão tais como E-selectina, molécula de adesão intercelular (ICAM-1 ou CD54) e molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1), que permitem a interação com leucócitos (JACKSON *et al.*, 1997). Com a chegada dos neutrófilos ao local da inflamação têm-se uma resposta mais reforçada, pois esses já iniciam fagocitose de componentes inflamatórios iniciais e antígenos, além da liberação de mais quimiocinas (SPELLBERG, 2000). Em doenças inflamatórias crônicas, a vascularização permanece ativada, ampliada e hiperpermeável, sustentando o acúmulo de líquidos (edema) e células. Quantidades consideráveis de proteínas plasmáticas provenientes do extravasamento do sangue para o tecido ocorrem durante a inflamação (FENG *et al.*, 1999).

As plaquetas contribuem ao processo inflamatório e são responsáveis pela formação de coágulos e liberação de fatores quimiotáticos que atraem outras plaquetas, leucócitos e fibroblastos para o local lesionado (FREINKEL e WOODLEY,

2001). Estes fatores, tais como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de ativação plaquetária (PAF), entre outros fatores de crescimento, são fundamentais para o maior estímulo da quimiotaxia de leucócitos ao local da lesão (BRIGATI *et al.*, 2002; COUSSENS e WERB, 2002).

Os leucócitos, e em especial os neutrófilos e macrófagos, dão continuidade a fase inflamatória (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Os neutrófilos são atraídos poucos minutos após a lesão, e contribuem para a defesa contra micro-organismos, na realização da fagocitose e liberação de proteinases e espécies reativas de oxigênio (ROS) (BRIGATI *et al.*, 2002; COUSSENS e WERB, 2002). Através do processo de fagocitose, os neutrófilos são capazes de debelar bactérias e remover os restos celulares (FREINKEL e WOODLEY, 2001). Além disso, são uma importante fonte de citocinas e quimiocinas, as quais são necessárias para o recrutamento, ativação e diferenciação celular (BRIGATI *et al.*, 2002; COUSSENS e WERB, 2002), sendo então responsáveis pelo controle da resposta inflamatória (MUELLER, 2006). Os macrófagos, por sua vez, são células mononucleares que constituem cerca de 1-10% das células do sistema imunológico, predominantes na maioria dos processos inflamatórios crônicos, originando-se a partir de monócitos sanguíneos induzidos à migração pelo o endotélio, pelas quimiocinas ou outros agentes quimiotáticos. Estão envolvidos diretamente no sistema imune através do processo de fagocitose, como células apresentadoras de antígenos (APC) quando induzido por interferon- γ (IFN- γ), e por expressarem o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Em geral, são considerados células pró-inflamatórias devido a produção de citocinas, tais como: TNF- α , IL-1, IL-6, além de óxido nítrico (NO). Também produzem enzimas proteolíticas, fosfatase ácida, colagenase e elastase que, em conjunto, formam uma potente atividade para a degradação do tecido conjuntivo. Os macrófagos são capazes de segregar derivados do ácido araquidônico, leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

A inflamação, portanto, é uma resposta inicialmente protetora que tem como objetivo eliminar ou neutralizar o agente lesivo. E essa finalidade é concluída de modo satisfatório quando os mecanismos anti-inflamatórios endógenos são por fim ativados, protegendo os tecidos de danos maiores e promovendo a restauração de sua estrutura e função (LAWRENCE e GILROY, 2007).

A resolução da resposta inflamatória, a fim de manter a homeostasia, pode ocorrer através de vários mecanismos. Primeiro, a presença contínua de fagócitos começam a eliminar os invasores, por exemplo, diminuindo a apresentação de antígenos e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Segundo, a produção local e liberação de substâncias supressoras, como IL-10 e o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) por fibroblastos, macrófagos e linfócitos começam a finalizar o processo inflamatório. O TGF- β apresenta efeitos diversos como: inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias sobre as células apresentadoras de antígenos, supressão da secreção de citocinas inflamatórias e fatores de sobrevivência das células inflamatórias. Também estimula a proliferação de fibroblastos, com consequente produção de matriz e colágeno para reparar os danos teciduais causados pela inflamação (SPELLBERG, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001). Finalmente, são desenvolvidas defesas alternativas se o agente inicial não for eliminado dentro de alguns dias. A inflamação prolongada conduz à formação de abscessos e cicatrizes. Sob estímulo das citocinas IL-4 e IL-10, numa inflamação prolongada, os macrófagos começam a se aglutinar em células gigantes e inicia-se uma resposta granulomatosa com o recrutamento de fibroblastos, culminando em fibrose cicatricial do tecido danificado (MAKRANTONAKI *et al.*, 2007).

Em condições normais, a resposta inflamatória inata tem início poucos minutos depois do estímulo e se resolve em poucas horas. No entanto, com a persistência do processo inflamatório durante semanas, meses ou até mesmo anos, este processo pode se cronificar, desencadeando o que é chamado de doenças inflamatórias crônicas (LAWRENCE e GILROY, 2007).

Doenças inflamatórias crônicas não infecciosas da pele, tais como eczema (até 20% da população em determinados grupos de idade) e psoríase (2-4%) são muito comuns. São condições crônicas não curáveis que frequentemente mostram um curso recidivante. As doenças inflamatórias da pele têm considerável impacto socioeconômico e podem prejudicar significativamente a qualidade de vida dos pacientes. O prurido, por exemplo, que ainda carece de uma terapia eficaz, é o sintoma mais preocupante para o paciente com eczema e também é um problema considerável para muitos portadores de psoríase. Ainda, a presença das lesões cutâneas, em particular, quando a condição inflamatória se apresenta nas partes visíveis do corpo, incluindo a perda de cabelo, cicatrizes, eritema e lesões

escamosas, contribuem para a baixa estima dos pacientes (WITTMANN *et al.*, 2014).

Apesar dos avanços na terapêutica das inflamações cutâneas, ainda há necessidade de compreender melhor a imunopatogênese destas doenças. As opções de tratamento podem ser limitadas devido à ineficácia dos medicamentos existentes em subgrupos de pacientes, ou por estes não responderem ao tratamento de forma eficaz ou contra indicados devido aos efeitos colaterais. Muitas das opções disponíveis de tratamento tópico são de aplicação demorada, consideradas desagradáveis (em particular, se uma formulação for “gordurosa”) ou complicadas ao paciente (por exemplo, se diferentes produtos tópicos devem ser aplicados para diferentes locais do corpo ou para diferentes estágios da doença). Como consequência, a adesão ao tratamento tópico é, para um número substancial de pacientes, muito pobre, e geralmente seria mais indicado a terapia sistêmica (REICH *et al.*, 2014).

Por exemplo, pacientes com dermatite atópica requerem tratamento tópico com emolientes e terapias anti-inflamatórias baseados em glicocorticóides tópicos ou inibidores da calcineurina. No entanto, quando se tornam refratários ao tratamento tópico, as opções de tratamento sistêmico são obrigatórias. Este tipo de terapia é amplamente utilizada e incluem glicocorticóides, ciclosporina A, azatioprina e micofenolato de mofetila. Infelizmente, as respostas a este tipo de tratamento sistêmico são muitas vezes de curta duração e a maioria dos pacientes com dermatite atópica exibe uma resposta clínica limitada. Além disso, essas modalidades de tratamento estão associadas a efeitos colaterais significativos, tais como supressão do eixo hipotalâmico pituitário-adrenal, diabetes, osteoporose, toxicidade renal ou hepática ou mielossupressão. Por estas razões, ainda há uma necessidade de novas opções de tratamento tópico e sistêmico (SCHAKEL *et al.*, 2014).

Outro exemplo são pacientes com placas psoriáticas leves, os quais podem ser tratados topicamente com sucesso através da utilização de glicocorticóides, emolientes, derivados do alcatrão de carvão ou análogos da vitamina D (CHANG *et al.*, 2011). Para estágios da doença moderada a grave, os tratamentos sistêmicos são empregados, inicialmente, com terapias orais, tais como o metotrexato, a ciclosporina, e sulfassalazina (MYERS *et al.*, 2006; WEGER, 2010; CHANG *et al.*, 2011). Agentes biológicos anti-TNF- α (etanercept, adalimumabe e infliximabe, por

exemplo) são bem sucedidos no tratamento de psoríase, com eficácia de 75% na redução dos sintomas comparados com o seu próprio *baseline* (Avaliados pelo PASI - Área de Psoríase e Índice de Severidade) (GOTTLIEB *et al.*, 2008; WEGER, 2010). Apesar da eficácia comprovada destes agentes biológicos anti-TNF- α , nem todos os pacientes respondem adequadamente ao tratamento. Novos alvos biológicos estão sendo avaliados na clínica, com um recente foco na segmentação células T auxiliares Th17, responsáveis pela produção de IL-17 e serem mantidas pela IL-23, considerado como o eixo principal no desenvolvimento da psoríase (KORN *et al.*, 2009). Brodalumab, ixekizumab, e secukinumab são anticorpos antagonistas que têm como alvo a IL-17. Assim como o briakinumab, o ustekinumab são exemplos de inibidores da subunidade IL-12/IL-23p40 (GORDON *et al.*, 2012; LEONARDI *et al.*, 2012).

Em vista disso, vemos que a terapia mais utilizada para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas baseia-se ainda no uso de glicocorticóides, devido aos seus efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios (CALOU *et al.*, 2008; LAM *et al.*, 2008). Os glicocorticóides se ligam aos receptores de glicocorticóides (GR) e promovem como efeito a inibição da expressão de uma série de genes inflamatórios, como os genes responsáveis pela produção de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão. Isso se deve a inibição de fatores de transcrição como o NF- κ B e a AP-1, sendo que estes fatores regulam a expressão gênica de diversos componentes inflamatórios (FRY *et al.*, 2007). Eles também agem restringindo a expansão clonal de linfócitos T helper, por inibirem a transcrição do gene responsável pela IL-2 e também interferem na transcrição de outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, etc.) (FOX, 2006).

Assim, os glicocorticóides ainda continuam sendo a primeira escolha terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias da pele de caráter crônico (CHI *et al.*, 2003; SCHOEPE *et al.*, 2011). Contudo, o uso contínuo de glicocorticóides pode ocasionar diversos efeitos colaterais severos, os quais muitas vezes podem ser irreversíveis, como a atrofia cutânea, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, dentre outros (SCHOEPE *et al.*, 2006; SCHOEPE *et al.*, 2011).

Outras terapias para essas doenças incluem o uso de imunomoduladores macro-lactâmicos, como o tacrolimus e o pimecrolimus, que inibem seletivamente a ativação das células T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-3, IL-4, IL-5 e

IFN- γ). A terapia tópica com esses agentes imunomoduladores já se mostrou efetiva em diversas condições dermatológica (SKINNER, 2005).

Como citado acima, no tratamento para psoríase, os tratamentos para doenças crônicas utilizando anti-citocinas representam um grande avanço no tratamento de doenças inflamatórias graves nos últimos anos. O alvo desses fármacos são as moléculas de superfície das células T (ex.: Efalizumab e Alefacept) ou a inibição direta da citocina (anti-TNF- α , anti-IL-1, anti-IL-6), sendo efetivos no tratamento de doenças inflamatórias da pele como a psoríase, dermatite atópica e dermatite de contato (SIMMONS, 2006; WERTH, 2006; TAN *et al.*, 2007). A recente adição de produtos biológicos anti-citocinas ao portfólio terapêutico tem aumentado bastante o espectro de tratamentos disponíveis. Novos medicamentos que interferem diretamente com citocinas ou com sua sinalização deram novas esperanças a regulação e expressão mediadora entre a pele saudável e inflamada (WITTMANN *et al.*, 2014). No entanto, uma das principais desvantagens destas terapias biológicas é que elas devem ser administradas por via subcutânea ou intravenosa, além do custo muito elevado por paciente, variando entre 15.000 – 30.000 dólares anuais, e com o passar do tempo, o paciente começa a desenvolver resistência a utilização desses tratamentos, com a produção de anticorpos contra esses agentes biológicos (LIU *et al.*, 2012). Terapêuticas que têm como alvo um mediador específico na pele, em especial quando aplicados topicamente, podem reduzir os efeitos colaterais sistêmicos em relação aos imunossupressores amplamente utilizados, como os glicocorticóides, a ciclosporina A, metotrexato, e mais recentemente, os agentes biológicos anti-citocinas (WITTMANN *et al.*, 2014).

Em síntese, torna-se claro os avanços no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as doenças inflamatórias cutâneas ao longo destes anos. A elucidação cada vez mais aprofundada dos tipos celulares, mediadores inflamatórios e mecanismos envolvidos nestas patologias contribuem significativamente para o descoberta de novos alvos terapêuticos e novos compostos biologicamente ativos e cada vez mais específicos para a doença, diminuindo os efeitos colaterais e aumentando a eficácia dos tratamentos. Entretanto, como discutido anteriormente, o desenvolvimento destas novas estratégias ainda é um processo caro, demorado e apresentando algumas desvantagens.

Neste contexto, as plantas são fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos e serem consideradas uma via promissora para a descoberta de novas drogas, devido ao fácil acesso e ao custo relativamente baixo (BALUNAS e KINGHORN, 2005).

1.2. PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais desempenham um papel importante para humanidade devido as suas propriedades curativas, contribuindo de forma significativa na descoberta de novas drogas e como inspiração na síntese de novos compostos. Isso se deve ao fato das plantas medicinais possuírem uma grande diversidade de componentes e estruturas químicas, uma vez que apresentam estruturas privilegiadas selecionadas por mecanismos evolutivos ao longo de um período de milhões de anos (CALIXTO, 2005; MISHRA e TIWARI, 2011; CRAGG e NEWMAN, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO*), cerca de 70% a 90% da população de países em desenvolvimento utiliza e depende de plantas medicinais como instrumento na assistência farmacêutica no que se refere à Atenção Primária à Saúde. Em alguns países desenvolvidos como Canadá, França, Itália e Alemanha, o uso de produtos oriundos da medicina tradicional pela população (70% - 90%) como forma complementar, alternativa ou não convencional, torna-se cada vez mais comum (WHO, 2011).

Desta forma, plantas e extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de novos fármacos, de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais, chamados medicamentos fitoterápicos (SIMÕES e SCHENKEL, 2002). Segundo NEWMAN (2012), entre o período de 1981 a 2010 foi introduzido, no mundo todo, 1.355 novos fármacos, sendo que 50% destes foram obtidos ou baseados em produtos naturais. Estes dados realçam ainda mais o importante papel que os produtos naturais e estruturas derivadas ou relacionadas a eles têm desempenhado e continuarão a desempenhar no desenvolvimento do arsenal terapêutico.

Assim, mesmo com a evidente utilização de produtos fitoterápicos pela população, poucas plantas ainda têm sido estudadas cientificamente para a confirmação de sua qualidade, segurança e eficácia. Além disso, para o desenvolvimento de uma nova droga sintética são necessários vários anos de pesquisa e milhões de dólares de investimentos, enquanto que os fitoterápicos exigem menos esforços e parecem ser perfeitamente viáveis a sua utilização em países subdesenvolvidos (CALIXTO, 2005).

No Brasil, em um levantamento realizado em 2011, havia 382 medicamentos fitoterápicos, sendo destes 357 fitoterápicos simples e 25 em associação. Esses fitoterápicos são produzidos a partir de 98 diferentes espécies vegetais. As espécies vegetais com mais registro são em sua maioria estrangeiras, como castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum*), com 22 registros e ginkgo (*Ginkgo biloba*), com 20 registros. Entre as brasileiras, as mais registradas são o guaco (*Mikania glomerata*), com 20 registros, maracujá (*Passiflora incarnata*), com 16 registros e espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), com 14 registros (PERFEITO, 2012). O mercado brasileiro de medicamentos fitoterápicos apresenta-se com poucas espécies vegetais nativas, sendo predominante a utilização de plantas européias e asiáticas. Isso se deve ao lento e pobre desenvolvimento desta área no Brasil, com poucas pesquisas clínicas e investimentos na área de pesquisas e comprovação da eficácia destes medicamentos (SCHULZ *et al.*, 2002). Existem apenas 78 empresas produtoras de fitoterápicos no Brasil, na maior parte, concentradas nas Regiões Sul e Sudeste do país (PERFEITO, 2012).

As plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, divulgadas pelos próprios usuários ou comerciantes. Na maioria das vezes essas plantas são, inclusive, utilizadas para fins medicinais diferentes daqueles comprovadamente empregados ou etnobotanicamente indicados. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil são ainda incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005; PERFEITO, 2012).

Os efeitos adversos comumente relatados com o uso de plantas medicinais como medicamento são relacionados à toxicidade previsível, sobredose e ação sinérgica (interação com drogas convencionais). Por outro lado, a maioria dos efeitos colaterais relatados por drogas de plantas é extrínseca a preparação e são relacionados a vários problemas de manufatura como identificação errônea das plantas, falta de padronização, falha da boa prática da manufatura, contaminação, substituição e adulteração de plantas, preparação ou dosagem incorreta. Muitos fatores podem contribuir para a eficácia, segurança e qualidade dos fitomedicamentos, como uso da planta fresca, temperatura, exposição à luz, disponibilidade de água e nutrientes, período e tempo da coleta, método da coleta, secagem, empacotamento, estocagem e transporte do material bruto, idade e parte da planta coletada, contaminação por microrganismos, presença de metais pesados e pesticidas, entre outros (CALIXTO, 2000).

Com o objetivo de contribuir na busca de medicamentos substitutivos nacionais, com menor custo, porém com qualidade, desenvolvemos estudos em nosso laboratório utilizando plantas medicinais que apresentam um papel potencial na atividade anti-inflamatória cutânea. Sendo assim, buscamos demonstrar a eficácia anti-inflamatória do extrato das folhas de uma planta nativa da região sudeste e sul, *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax, caracterizando os efeitos e elucidando os possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, além de avaliar a sua segurança como possível medicamento.

1.3. SAPIUM GLANDULATUM (VELL.) PAX

A espécie *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax é conhecida popularmente como leiteiro, pau-de-leite ou figueirinha e pertence a família Euphorbiaceae. Esta família possui cerca de 300 gêneros e aproximadamente 6000 espécies distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais. Os maiores centros de dispersão são encontrados nas Américas e na África. No Brasil, ocorrem cerca de 70 gêneros e 1000 espécies, representando uma das principais famílias da flora brasileira, encontrada em florestas ombrófila mista do planalto do sul, estendendo-se desde o sul de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, contendo plantas de hábito

bastante variado, como ervas, sub-arbustos, árvores e também trepadeiras (SOUZA e LORENZI, 2005).

Em geral, sua altura atinge cerca de 10-18 m e 30-35 cm de diâmetro. Possui tronco cilíndrico, reto ou um pouco tortuoso e nodoso. A casca externa é cinzenta, sendo às vezes esbranquiçada, de textura curto-fibrosa. As folhas são lineares, margens paralelas e alongadas e o látex de coloração branca é abundante (SMITH *et al.*, 1988).

Uma das principais utilizações de *S. glandulatum* é na recuperação de áreas degradadas, pois é uma das plantas nativas potencialmente recomendadas, devido ao seu caráter pioneiro que propicia uma cobertura inicial do solo, além de sua rusticidade e ornitocoria intensa, facilitando a entrada de outras espécies (LORENZI, 1992).



FIGURA 02: Imagem das folhas da *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax.

Fonte: <http://www.trilhadafloresta.ufpr.br/leiteiro.html> (Acessado em Dezembro, 2014)

Estudos etnobotânicos do gênero *Sapium*, revelam que este gênero é amplamente utilizado em vários países como remédios terapêuticos (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014). As folhas das espécies *S. chihsianum*, *S. discolor*, *S. rotundifolium* e *S. sebiferum* são utilizadas no sul da China para tratar doenças de pele como eczema, dermatites, sarna e herpes. Ainda, a casca da raiz e as folhas de *S. japonicum* são usadas para o tratamento de lombalgia e dores nos joelhos, enquanto a raiz e sementes da *S. sebiferum* são relatados com potencial medicinal para o tratamento de problemas gastrointestinais, como constipação (LAI *et al.*, 2004; SHIMIZU *et al.*, 2006). Ainda, em outros países, também se faz o uso da

medicina tradicional utilizando o gênero *Sapium*. Na Bolívia, por exemplo, é relatado o uso da resina da *S. glandulosum* no tratamento da hérnia (HAJDU e HOHMANN, 2012) e no Nepal se utiliza o suco da *S. insigne* em feridas para auxiliar no processo de cicatrização (MANANDHAR e MANANDHAR, 2002). A *S. ellipticum* tem quase todas as suas estruturas utilizadas no território africano, onde as raízes são utilizadas para tosse e malária, as folhas no tratamento de doenças oculares, inchaço abdominal e tratamento de bócio e, partes do caule, se mostram eficazes contra anemia, febre, elefantíase, feridas, dores no peito e cabeça e problemas reumáticos (MWINE e VAN DAMME, 2011).

Assim, o gênero *Sapium* é extensamente utilizado na medicina popular para o tratamento dos mais variados tipos de doenças, e não é surpresa que haja um crescente interesse em se estudar as propriedades terapêuticas destas plantas, o que justifica a existência de diversos estudos sobre a atividade biológica do gênero *Sapium*. Um dos trabalhos mais recentes publicados é sobre a avaliação da atividade anti-inflamatória da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico das folhas da *S. sebiferum* (L.) Roxb. Fu e colaboradores (2013) demonstraram que a aplicação tópica das frações produzidas a partir de folhas jovens e adultas foi capaz de inibir a formação de edema induzido por TPA no modelo de edema de orelha, associando este efeito a uma atividade antioxidante, ao aumentar a atividade da glutathione (GSH) e das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) nas amostras coletadas (FU *et al.*, 2013).

Outros estudos têm ainda demonstrado a atividade antioxidante das espécies deste gênero. O extrato bruto etanólico das raízes da *S. glandulosum* apresentou uma baixa atividade antioxidante nos ensaios de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) e FIC. Entretanto, o extrato das folhas demonstrou uma boa atividade antioxidante (DA SILVA *et al.*, 2011). Assim como, as frações acetato de etila do extrato das folhas da *S. sebiferum* no trabalho de Fu e colaboradores (2013) demonstraram uma significativa atividade antioxidante nos ensaios de DPPH e 2,20-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico (ABTS), quando comparados ao controle, ácido ascórbico (FU *et al.*, 2013). Outro estudo avaliou o efeito do extrato das folhas e ramos da *S. japonicum* sobre a produção de NO por macrófagos RAW 264.7 induzidos por lipopolissacarídeos (LPS), onde demonstraram uma inibição dose-dependente, atribuindo este efeito a presença de compostos fenólicos no extrato (KIM *et al.*, 2010).

O extrato metanólico das cascas do caule de *S. sebiferum* foi capaz de inibir o crescimento de células de melanoma B16 (SHIMIZU *et al.*, 2006), assim como o extrato das folhas da *S. ellipticum* demonstrou uma boa atividade citotóxica (50%) contra linhagem de células HeLa, enquanto o extrato das cascas do caule tiveram menor inibição, de apenas 40% (SOWEMIMO *et al.*, 2009). Já o extrato das cascas da *S. cornutum* foi relatado não apresentar nenhuma citotoxicidade contra linhagens celulares de pulmão de feto MRC-5 (MESIA *et al.*, 2008). Da mesma forma, no trabalho de Kim e colaboradores (2010), o extrato da *S. japonicum* também não apresentou atividade citotóxica contra linhagens de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos HS-68 (KIM *et al.*, 2010).

Diversos compostos já foram isolados a partir das plantas deste gênero, tais como flavonoides (Tabela 1), terpenoides (Tabela 2) e outros compostos (Tabela 3), segundo revisão de Al Muqarrabun e colaboradores (2014).

Tabela 1: Flavonoides isolados a partir de espécies *Sapium*.

Composto	Grupo	Fonte
Rutin	Flavona	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (folhas)
Quercetin	Flavona	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (folhas)
Guaijaverin	Flavona	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (folhas)
Nicotiflorin	Flavona	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (folhas)
$\alpha, \beta, 3, 4, 5, 20, 40, 60$ - octahydroxydihydrochalcone	Calcona	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
Chalcononaringenin 2'-O- β -D-glucoside	Calconagluside	<i>Sapium sebiferum</i> L. Roxb. (flores)

Fonte: (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014)

Tabela 2: Terpenoides isolados a partir de espécies *Sapium*.

Composto	Grupo	Fonte
16-hydroxyphorbol-16-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (folhas)
4 β -deoxy-16-hydroxyphorbol-16-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (folhas)
12-deoxyphorbol 13-benzoate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium sebiferum</i> L. Roxb. (sementes)
Sapintoxin A	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium sebiferum</i> L. Roxb. (sementes)
Sapintoxin B	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
Sapintoxin C	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium sebiferum</i> L. Roxb. (sementes)

12-(2-N-methylamino benzoyl)-4 β ,5,20-trideoxyphorbol-13-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
12-(2-methylamino benzoyl)-4-deoxy phorbalddehyde-13-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
Sapinsignoid A	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Sapinsignoid B	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Sapinsignoid C	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Sapinsignoid D	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
α -sapi-nine	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
12-(2-N-methylamino benzoyl)-4 α ,5,20-trideoxy phorbol-13-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
12-(2-N-methylamino benzoyl)-4 α ,20-dideoxy-5-hydroxyphorbol-13-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
12-(20 -N-methylaminobenzoyl)-4 α -deoxy-5,20-dihydroxyphorbol-13-acetate	Diterpeno - Éster de forbol	<i>Sapium indicum</i> L. (frutos)
Sapinsignoid E	Diterpenolabdano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Sapinsignoid F	Diterpenolabdano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Ent-labda-8(17),13E-diene-3 α ,15-diol	Diterpenolabdano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Sapinsignoid G	Diterpenolabdano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Ent-17-hydroxy-16 α -kauran-3-one	Diterpenocaurano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
Ent-16 β ,17-isopropylidene -dioxykauran-3-one	Diterpenocaurano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
17-nor-8 β ,13 β -kauran-3-one,13-(hydroxymethyl)	Diterpenocaurano	<i>Sapium rigidifolium</i> Huft (partes aéreas)
3-oxo-17-norkaurane-18- δ -13-carboxylic acid,	Diterpenocaurano	<i>Sapium rigidifolium</i> Huft (partes aéreas)
Kauranoicacid	Diterpenocaurano	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil.
Lecheronol A	Diterpenopimarano	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
Lecheronol B	Diterpenopimarano	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
Rigidol	Diterpeno	<i>Sapium rigidifolium</i> Huft (planta inteira)
Lupeol	Triterpeno	<i>Sapium baccatum</i> (folhas)
Epi-lupeol	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
Betulin	Triterpeno	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)
Taraxerol	Triterpeno	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)
Taraxerone	Triterpeno	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)
Aleuritolicacid	Triterpeno	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)
3-acetoxy-aleuritolic acid	Triterpeno	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)
3 α -hydroxyolean-12-ene	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
3 β -hydroxyolean-12-ene	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)

2 α ,3 β ,23-trihydroxyolean-12-E-28-oic acid	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
3 α -hydroxyurs-12-ene	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
Cycloartanol	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
3-O-acetylcycloart-23-en-25-ol	Triterpeno	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. ExHookfil. (galhos e folhas)
3-O- β -lauroyl-cycloart-(23E)-en-25-ol	Triterpeno	<i>Sapium haematospermum</i> Muell (planta inteira)
β -sitosterol	Esteróide	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)
Stigmasterol	Esteróide	<i>Sapium baccatum</i> Roxb. (folhas)

Fonte: (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014)

Tabela 3: Vários compostos isolados a partir de espécies *Sapium*.

Composto	Grupo	Fonte
(-)-bukittinggine	Alcalóide	<i>Sapium baccatum</i> (Roxb.) (folhas)
Gallic acid	Ácidofenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
Methyl gallate	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
1-O-galloyl- β -D-glucoside	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
1,3-di-O-galloyl- β -D-glucoside	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucoside	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
1,3,4,6-tetra-O-galloyl- β -D-glucoside	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
Brevifolin carboxylic acid	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
4-dehydrochebulic acid-1,6-dimethyl ester	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
Corilagin	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
Fraxin	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
3-O-caffeoyl quinic acid	Ésterfenólico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (folhas)
1-naphtalenepentanoic acid	Ácidocarboxílico	<i>Sapium insigne</i> (Royle) Benth. Ex Hook fil. (galhos e folhas)
Phenylalanine-N-benzoyl-2-(benzoylamino)-3-phenyl propyl ester	Amida	<i>Sapium rigidifolium</i> Huft (partesaéreas)
Benzenepropanamide, N-[1-[(acetyloxy)methyl]-2-phenylethyl]- α -(benzoyl amino)	Amida	<i>Sapium rigidifolium</i> Huft (partesaéreas)

Fonte: (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014)

São muitos os compostos fitoquímicos pertencentes aos grupos dos carotenoides, flavonoides, terpenoides e alcaloides que apresentam um grande potencial para uso terapêutico, devido as propriedades anti-inflamatórias,

imunomoduladores e antioxidantes destes compostos (MISHRA e TIWARI, 2011; CRAGG e NEWMAN, 2013). Por todas essas atividades descritas do gênero *Sapium* e compostos já identificados e isolados, e por ser uma planta nativa da região sudeste e sul do Brasil, desperta-se o interesse pelo estudo da espécie *S. glandulatum*. Ressaltando que esta espécie ainda não possui nenhum estudo de atividade biológica reportado. Desta forma, mostra-se uma possível fonte para a busca de novos compostos com atividade terapêutica no o tratamento de problemas cutâneos.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

O uso de plantas como ferramentas terapêuticas é relatado a milhares de anos pelos povos mais antigos. O conhecimento acerca dos efeitos das plantas no benefício para o tratamento de doenças era adquirido pela forma primitiva de experimentação, pela tentativa e principalmente pela observação, formando um grande conhecimento popular ao longo dos anos que foi transmitido de gerações em gerações, formando o que conhecemos hoje como ciência etnobotânica. Com os avanços tecnológicos, principalmente na área da pesquisa farmacológica, as plantas medicinais ganharam um grande destaque na caracterização das ações terapêuticas indicadas pelo conhecimento popular, bem como a busca e identificação de novos princípios ativos derivados de extratos vegetais.

No Brasil, o uso de plantas medicinais sempre foi significativo, fazendo parte do repertório de medicamentos no cotidiano da população. Isso é decorrente principalmente da ampla e diversificada flora que possuímos, com uma extensa variedade de espécies botânicas. No entanto, ainda são poucas as espécies que possuem estudos sobre seus efeitos farmacológicos e da sua composição fitoquímica, como por exemplo, as espécies do gênero *Sapium*. Se levarmos em consideração os usos medicinais descritos na literatura sobre este gênero, temos evidências claras de que se trata de um gênero em potencial no tratamento de diversos tipos de doenças, inclusive pelos estudos fitoquímicos já realizados, os quais demonstram que estas plantas possuem princípios ativos com ações medicinais promissoras. A espécie nativa do sul do Brasil, *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax é um deste exemplos, devido esta espécie não possuir até o presente momento, nenhuma informação descrita na literatura sobre sua atividade biológica.

A hipótese deste trabalho foi baseada nas evidências descritas sobre os estudos dos efeitos farmacológicos e estudos fitoquímicos do gênero *Sapium*, considerando que os extratos das folhas da *Sapium glandulatum* apresentam uma atividade anti-inflamatória cutânea em modelos animais. Desta forma, podemos contribuir na busca de novos medicamentos para o tratamento de afecções da pele, com substitutivos nacionais ou adjuvantes, talvez de menor custo, porém com qualidade, comprovação da ação farmacológica e segurança.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade anti-inflamatória do extrato bruto e frações da planta nativa *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anti-inflamatório tópico e sistêmico dos extratos brutos e frações obtidos das folhas da *S. Glandulatum*, em modelos de edema de orelha agudo e crônico induzidos por TPA, e no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Verificar o efeito do EHSg sobre a infiltração leucocitária nos animais submetidos nos modelos agudo de edema de orelha e pata, e no modelo crônico de edema de orelha, através de atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e da n-acetil- β -D glucosaminidase (NAG), e por análise histológica;
- Analisar o possível envolvimento de receptores de glicocorticóides como via de ação na atividade anti-inflamatória do EHSg;
- Investigar possíveis efeitos adversos provenientes pela múltipla aplicação do EHSg sobre a atrofia da pele e em órgãos linfóides;
- Avaliar os efeitos *in vitro* do EHSg sobre linhagens celulares de queratinócitos e macrófagos.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

As folhas da *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. foram coletadas na Reserva Natural do Rio Cachoeira, protegida pela Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS), no município de Antonina, Estado do Paraná, Brasil, em janeiro de 2009, no período da manhã. A espécie foi identificada pela Dra. Kátia Christina Zuffellato-Ribas (Universidade Federal do Paraná, Curitiba) e um exemplar encontra-se catalogado sob o número CFC 9204 no Herbário da Engenharia Florestal da UFPR da Universidade Federal do Paraná.

4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO

A obtenção dos extratos bruto hidroalcoólicos das folhas de *Sapium glandulatum* (EHS 50%, 70% e 90%), assim como as frações Acetato de Etila (SGFA) e Diclorometano (SGFD) foram realizadas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí-SC. Para a preparação do extrato, as folhas foram secas em estufa de secagem a 37 °C, posteriormente trituradas e submetidas à extração com etanol 50%, 70% e 90%. Para tanto, 20 g do material vegetal foi colocado em contato com o líquido extrator na proporção 1:20 (p/v) e extraído sob agitação (330 rpm) a temperatura ambiente durante 4 h. Então, o produto foi filtrado em papel filtro e submetido a evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Após a eliminação do solvente, o extrato concentrado foi liofilizado e armazenado em frascos de cor âmbar, sendo conservado em temperatura média de 5 °C até a utilização.

4.3. DROGAS E REAGENTES

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados:

Etanol absoluto, polietilenoglicol 400, peróxido de hidrogênio, acetato de sódio, Tween 20, cloreto de sódio, hematoxilina, eosina, xilol, molibdato de sódio, glicerol, glicina, metanol, fosfato de sódio, cloreto férrico, sacarose, dextrana, ácido clorídrico, ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietil)piiperazina-1 (HEPES), Triton X-100, ácido fosfomolibdico, Tris-HCl, ácido fosfotúngstico, biebrihscarlet, fucsina ácida e azul de anilina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Acetona, fenol, dimetilformamida, citrato de sódio, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tolueno, carvão ativado, formaldeído, ácido acético glacial, Entellan e parafina (Merck Biosciences, Alemanha). Dexametasona, 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), mifepristona, hexadeciltrimetilamônio (HTAB), tetrametilbenzidina (TMB), p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), aprotinina, albumina de soro bovino (BSA), Ditiotreitól (DTT), 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)benzeno (POPOP), 2,5-Difeniloxazol (PPO), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), gelatina, bálsamo do Canadá e cloreto de benzetônio, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co., USA). Soro fetal bovino (SFB), tripsina (Cultilab, Campinas, Brasil) e estreptomicina/penicilina (Gibco, Life Technologies Corporation, USA). [³H]-dexametasona (Amersham, Buckinghamshire, UK). PE Hamster Anti-Mouse CD54, *Mouse Inflammation Kit* - BD™ Cytometric Bead Array (CBA), AlexaFlour® 546 – Phalloidin (BD Biosciences, USA). Ready-Set-Go®, 88-7013, 88-7064 e 88-7324 (eBioscience, Inc., San Diego, USA)

4.4. ENSAIOS COM ANIMAIS

4.4.1. ANIMAIS

Todos os procedimentos foram realizados em camundongos adultos fêmeas da variedade Swiss, pesando entre 25 a 35 g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em um dos grupos. Comida e água foram fornecidas *ad libitum* e os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h com temperatura controlada (22 ± 2 °C). Os animais foram mantidos na sala de experimento durante

pelo menos 24 h antes da realização dos experimentos, para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná, sob o protocolo número 390.

4.4.2. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA

O modelo de edema de orelha é um modelo animal de inflamação simples e prático, utilizado com frequência e de maneira satisfatória na avaliação da atividade anti-inflamatória de compostos, especialmente para a realização de estudos do processo inflamatório de doenças cutâneas como dermatites e psoríase. Dentre as vantagens desse modelo, destaca-se a economia da substância a ser testada, uma vez que pequenas quantidades são suficientes para aplicação por via tópica. Além disso, o modelo fornece resultados rápidos e facilmente reproduzíveis (GABOR, 2000).

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura (μm) da orelha dos camundongos (Δ Espessura da orelha = espessura final – espessura inicial). A espessura da orelha foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (MT-045B, Shangai Metal Great Tools Co., Ltd., Shangai, China), o qual foi aplicado na região próxima à extremidade medial da orelha, antes e 6 h após a indução do processo inflamatório no modelo agudo e diariamente no modelo crônico. O agente flogístico, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e dexametasona (utilizada como fármaco de referência) foram diluídos em 20 μL acetona, enquanto o EH50%, EH70%, EH90%, EHSG, a SGFA, a SGFD foram diluídos no veículo (20 μL - 90% de acetona e 10% de água), e aplicados na orelha direita de cada camundongo. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram conduzidos sempre por um único experimentador.

4.4.3. DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA AGUDA INDUZIDA POR TPA

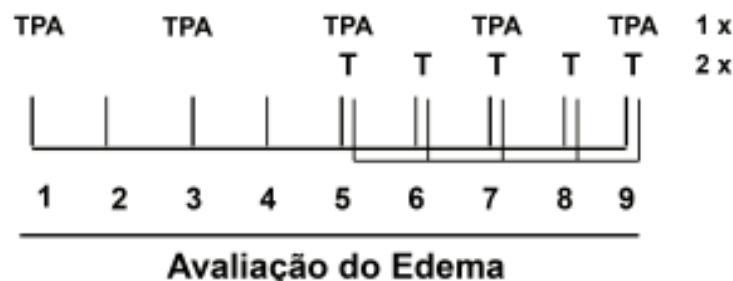
O TPA é um éster de forbol que, quando aplicado sobre a pele, é capaz de desencadear uma resposta inflamatória rápida e intensa, provocando aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente formação de edema e intenso infiltrado leucocitário (GABOR, 2000). Assim, o processo inflamatório cutâneo agudo foi induzido pela aplicação de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha direita dos camundongos. O EH50%, EH70% e EH90% (0,6 mg/orelha), o EHSG (0,03 - 1 mg/orelha), SGFA (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha), SGFD (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha), assim como o fármaco de referência dexametasona (0,1 mg/orelha), foram aplicados logo em seguida aos agentes flogísticos nos grupos experimentais. A espessura da orelha foi verificada antes (basal) e 6 h após a indução do processo inflamatório. Após 6 ou 24 h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e biópsias da pele das orelhas (biópsias de 6 mm) foram coletadas e submetidas à quantificação dos níveis de citocinas e avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) ou análise histológica, respectivamente.

Para avaliar o possível envolvimento dos receptores de glicocorticóides na atividade anti-inflamatória do EHSG, os animais foram pré-tratados com um antagonista de GR, mifepristona (RU486) (50 mg/kg), pela via subcutânea (s.c.), dissolvida em polietilenoglicol 400 (PEG 400), 15 min antes da aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha), em seguida os procedimentos foram seguidos como descrito acima.

A fim de verificar o possível efeito do extrato quando administrado por via oral sobre o edema de orelha induzido por TPA, os animais foram tratados por via oral com o EHSG (1; 10 e 100 mg/kg) ou com dexametasona (3 mg/kg) 1 hora antes da aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha dos camundongos. Os tratamentos com EHSG e dexametasona foram dissolvidos em solução de NaCl 0,9%. Após 24 h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e biópsias da pele das orelhas (biópsias de 6 mm) foram coletadas e submetidas à avaliação da atividade da enzima MPO.

4.4.4. DERMATITE DE CONTATO IRRITATIVA INDUZIDA PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

Esse é um modelo que permite avaliar a atividade anti-inflamatória do composto frente a um processo inflamatório já estabelecido. Desta forma, o processo inflamatório crônico foi induzido na orelha direita dos animais pela múltipla aplicação de TPA (2,0 µg/mL) em dias alternados durante 9 dias. O EHSO (1 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha), começaram a ser administrados a partir do 5º dia de experimento, 2 vezes ao dia (12 h/12 h), por via tópica. A diluição dos tratamentos e avaliação do edema se deu conforme descrito no Item 5.5.. No 9º dia do experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e biópsias da pele das orelhas (biópsias de 6 mm) foram coletadas, pesadas e submetidas à análises histológica e imunohistoquímica, avaliação da atividade das enzimas MPO e n-acetil-β-D glucosaminidase (NAG) ou quantificação dos níveis de citocinas. O desenvolvimento do experimento animal foi realizado conforme o esquema mostrado no esquema abaixo.



4.4.5. AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE CARRAGENINA

Esta é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste através da indução de um estímulo inflamatório local. O edema é induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de 50 µL de carragenina (300 µg/pata) na pata traseira direita dos camundongos, adaptado de Levy (1969).

Para avaliar o efeito sistêmico do extrato da *S. glandulatum*, o EHSO (1; 10 e 100 mg/kg) ou a dexametasona (3 mg/kg) foram administrados por via oral (v.o.) 1 h antes da aplicação do agente indutor. A espessura basal da pata dos animais foi

mensurada com o auxílio de um micrômetro digital, sendo esta considerada a medida basal. Para avaliação do edema, a espessura da pata foi medida 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a aplicação do estímulo inflamatório. Os resultados foram expressos a partir das diferenças entre a espessura da pata em cada hora após a aplicação de carragenina e a espessura basal. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram conduzidos sempre por um único experimentador. Após 24 h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e biópsias da pata (biópsias de 6 mm) foram coletadas e submetidas à avaliação da atividade da enzima MPO.

4.4.6. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido. Para a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase foi utilizada a metodologia de BRADLEY e colaboradores (1982) modificada por DE YOUNG e colaboradores (1989). As amostras de tecido (círculos de 6 mm de tecido) das orelha ou patas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha agudo e crônico ou edema de pata, respectivamente, foram adicionadas a 0,75 mL de solução fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizadas com auxílio de homogeneizador mecânico (MA102/MINI – Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba-SP) por 45 s a 0 °C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL de solução fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 mL) foram centrifugadas em microcentrífuga de alta velocidade refrigerada (5415 R – Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo-SP) a 11.200 xg a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de solução fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µL de PBS 0,22 M (pH 5,4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A adição de 20 µL de tetrametilbenzidina.HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%, promoveu o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37 °C por 3 min, adicionando 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (*Synergy HT Multi-Detection Microplate*

Reader) cuja leitura da absorbância foi feita a 630 nm, sendo expressa em DO/biópsia.

Para a avaliação do efeito do EHSg na inibição direta da enzima MPO (*in vitro*), foi utilizado um homogenato com alta concentração da enzima, a partir de orelhas de animais submetidos à múltipla aplicação de TPA. 20 µL de diferentes concentrações do EHSg (0,01 – 300 µg/mL) foram incubadas com 30 µL do homogenato das orelhas durante 15 min e, então o protocolo foi seguido conforme descrito acima.

4.4.7. ENSAIO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA N-ACETIL-B-D GLUCOSAMINIDASE (NAG)

A atividade da enzima n-acetil-β-D glucosaminidase (NAG) é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido e é avaliada com a utilização da metodologia de Sanchez e Moreno (1999). As amostras de tecido (círculos de 6 mm de tecido) das orelha dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela múltipla aplicação de TPA foram adicionadas a 0,75 mL de solução fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizadas por 45 s a 0 °C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75 mL de solução fosfato (anteriormente descrito). As amostras (1,5 mL) foram centrifugadas a 11.200 xg a 4 °C por 20 min. Triplicatas de 25 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 100 µL de tampão citrato 50 mM (pH 4,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de p-nitrofenil-acetamida-μ-D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido água miliQ. Em seguida a placa foi incubada a 37 °C por 1 h e a reação interrompida pela adição de 30 µL de tampão glicina 200 mM (pH 10,4) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*), cuja leitura da absorbância foi feita a 405 nm, sendo expressa em DO/biópsia.

4.4.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Amostras das orelhas foram fixadas em solução ALFAC (85% de etanol 80%, 10% de formaldeído 40% e 5% de ácido acético glacial) por 16 h e então colocadas e armazenadas em etanol 70% até o momento do uso. As amostras fixadas foram desidratadas em sequência crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e (3x) 100%) por 30 min cada, diafanizadas em etanol 100% / xilol (1:1) e em (3x) xilol 100% (30, 15 e 5 min), e então imersas em parafina a 60 °C individualmente durante 3 h e emblocadas. Os blocos foram seccionados em cortes de 5 µm utilizando um micrótomo (RM2135, Leica Biosystems, Alemanha) e esticados em lâminas contendo albumina de Meyer 1,5%. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas em 2 banhos de xilol, durante 5 min cada, etanol 100% / xilol (1:1) por 5 min, seguido por hidratação sequencial decrescente em etanol ((2x) 100%, 95%, 90%, 80% e 70%) durante 5 min cada, lavadas em água corrente por 10 min e submetidas a dois banhos de dH₂O. A coloração foi realizada com imersão dos cortes em hematoxilina de Harris durante 2 min, em seguida lavados em água corrente por 10 min, seguido de dois banhos em dH₂O, e na sequência, imersos em eosina por 2 min seguido de dois banhos em dH₂O. Os cortes foram desidratados em sequência crescente de etanol (70%, 80% e 90%) por 30 segundos cada, (3x) etanol 100% por 3 min cada, etanol 100% / xilol (1:1) por 5 min e (2x) xilol por 5 min cada. Então as lâminas montadas com bálsamo do Canadá. Para avaliar o infiltrado celular, os cortes foram fotografados em aumento de 400x e analisados cinco campos de três cortes histológicos distintos de três animais por grupo. As fotografias foram analisadas com o programa ImageJ[®] versão 1,48 (National Institutes of Health, EUA, <http://imagej.nih.gov/ij>).

4.4.9. ENSAIO DE LIGAÇÃO DE RECEPTORES DE GLICOCORTICÓIDE

A capacidade de ligação do glicocorticóide ao seu receptor foi avaliada através do ensaio de ligação específica descrito por Kalami e Hubbard (1983), com algumas modificações. Os homogenatos de fígados provenientes de diferentes ratos foram preparados em tampão gelado na proporção 1/5 (p/v) composto por 320 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 2 mM de DTT, 10 mM de PMSF, 20 mM de

molibdato de sódio e 10% de glicerol (pH 7,2). Após o período de centrifugação (60 min, 10.000 xg, 4 °C) os sobrenadantes (1 mg de proteína) foram incubados com 25 nM de [³H]-dexametasona e o EHSg (0,3 – 1000 µg/mL) ou dexametasona 10⁻⁵ M em tampão apropriado (10 mM de HEPES; 1 mM de EDTA e 20 mM de molibdato de sódio, pH 7,5) por 18 h à 0°C. O volume final da reação foi 100 µL. Após o período de incubação, ao tubo de ensaio foram adicionados 150 µL de uma suspensão formada por 2% de carvão ativado + 0,2% de dextrana (peso molecular 40 kDa). Este procedimento permite a separação do ligante radioativo livre por adsorção. Após centrifugação (10.000 xg, 5 min), 50 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de ensaio onde foi adicionado 500 µL de líquido de cintilação (58% de fluido de cintilação [6 g/l de PPO + 0,2 g/l de POPOP em tolueno], 34% de Triton X-100 e 8% de água ultrapura). Após vigorosa agitação, a radioatividade foi quantificada em um contador de cintilação líquida. A determinação da concentração proteica dos homogenatos foi feita através da absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm em cubetas de quartzo, assumindo que 1 unidade de absorbância 280 nm = 1 mg de proteína. Os resultados foram expressos como porcentagem de ligação específica da [³H]-dexametasona (FERREIRA *et al.*, 2005).

4.4.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO MÚLTIPLO TRATAMENTO TÓPICO COM GLICOCORTICOIDE SOBRE A ATROFIA CUTÂNEA E PESO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

A atrofia cutânea é um dos efeitos adversos da aplicação tópica de glicocorticóides (AHN *et al.*, 2006). Para avaliar se a aplicação tópica do EHSg promove atrofia da pele como um corticóide, os animais foram tratados por via tópica com dexametasona (0,1 mg/orelha) ou EHSg (1 mg/orelha) a cada 12 h durante 7 dias, na ausência de um estímulo inflamatório. A espessura da orelha dos animais foi avaliada no primeiro e no oitavo dia. Ao final do experimento, os animais foram pesados, realizado teste de glicemia e eutanasiados. A aplicação repetida de glicocorticóide também promove alterações sistêmicas, normalmente desencadeando efeitos supressores sobre sistemas fisiológicos (AHN *et al.*, 2006). Então, ao final do experimento foram coletadas o timo, o baço, as adrenais e os linfonodos auriculares, os quais foram pesados a fim de verificar a possível influência dos tratamentos sobre esses órgãos.

4.4.11. ENSAIO COMETA ALCALINO (ALCALINE COMET ASSAY)

Estudos de genotoxicidade são testes *in vivo* e *in vitro* utilizados para detectar o potencial das substâncias (fármacos, extratos, entre outros) ou alteração ambiental (por exemplo: estresse) em causar mutações genéticas e cromossômicas (ANVISA, 2010). O princípio desta técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não tiver dano migrará em conjunto formando um círculo. Caso ocorram danos no DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos. Os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores. Ocorrendo um dano muito intenso na célula, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando então, a figura típica de um cometa (OLIVE *et al.*, 1990).

Os animais submetidos a avaliação do efeito do múltiplo tratamento tópico com glicocorticóide e o EHSg foram utilizados para realizar o teste de genotoxicidade pelo ensaio de cometa alcalino. A eletroforese em gel de célula única foi realizada de acordo com o método modificado de Singh e colaboradores (1988). Para o grupo controle positivo da técnica, foi realizado um grupo no qual os animais receberam ciclofosfamida (50 mg/kg, por via intraperitoneal), 24 h antes da eutanásia dos animais. O fêmur da pata traseira direita de cada animal foi removido e utilizado uma agulha romba para remover a medula óssea. A medula foi lavada com PBS (pH 7,4 à 4 °C) com auxílio de uma seringa de 1 mL e separado. A suspensão foi centrifugada a 1000 rpm por 10 min e descartado o sobrenadante. Foi adicionado 100 µL de PBS (pH 7,4 à 4 °C) e o sedimento misturado com auxílio de uma micropipeta. 45 µL foi misturado com 120 µL de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (LMPA) a 37 °C e rapidamente espalhado em duas lâminas (2x por animal), pré-revestidas com 1,5% de agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram protegidas da luz e resfriadas à 4 °C durante 20 min. Após a solidificação do gel, as lâminas foram imersas em solução de lise de preparado de fresco e gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, com 10% de DMSO e 1% de Triton X-100) durante 2 h a 4 °C. Após a lise, as lâminas foram colocadas lado a lado numa unidade de eletroforese horizontal contendo tampão de eletroforese alcalina fresca e gelada (NaOH 1 mM, EDTA 300 mM, pH > 13) e deixadas na solução durante 20 min a 4 °C para o desenrolamento do DNA e conversão dos sítios lábiles alcalinos em cadeia simples. A eletroforese alcalina foi realizada utilizando o mesmo tampão

de eletroforese alcalina durante 25 min a 30 V (0,8 V/cm) e 300 mA à 4 °C. As lâminas foram então lavadas três vezes durante 5 min com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) para remover o excesso alcalino. Finalmente, após secagem à temperatura ambiente e fixados em etanol 100% durante 10 min, as lâminas foram secas e armazenadas durante a noite ou mais, então coradas com 45 mL de brometo de etídio (20 µg/mL).

O material foi avaliado de imediato com uma ampliação de 400X, utilizando-se um microscópio de fluorescência (Olympus DP72, Japan e Software Cell F) com um filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro barreira de 590 nm. Apenas núcleos individuais foram mensurados. Foram analisadas duas lâminas por amostra e 150 células por animal foram avaliadas de forma aleatória. Estas células foram avaliadas visualmente, de acordo com o tamanho da cauda, para as cinco classes seguintes: Classe 0 - sem cauda; Classe 1 - cauda mais curta do que o diâmetro da cabeça (núcleo); Classe 2 - o comprimento da cauda 1 - 2 vezes o diâmetro da cabeça; Classe 3 - comprimento da cauda mais do que duas vezes o diâmetro da cabeça; e classe 4 - cometas com cabeças mínimos, com quase todo o DNA na cauda ou com uma cauda sendo muito longa (HARTMANN e SPEIT, 1997). A pontuação total para 150 cometas, que variou de 0 (todos em bom estado) para 600 (todos maximamente danificado), foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pela classe de danos.

4.4.12. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM MODELOS ANIMAIS

Para quantificar a dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α liberadas no processo inflamatório, foram utilizadas as biópsias das orelhas dos animais submetidos ao modelo de edema de orelha agudo e crônico. As biópsias foram homogeneizadas em 2 mL de tampão específico (PBS, 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF e 0,5% de BSA) durante 45 s a 0 °C. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 3000 xg e 4 °C por 10 min. A detecção dos níveis de citocinas nas amostras foi realizada através de Kit de ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (Ready-Set-Go®, 88-7013, 88-7064 e 88-7324, eBioscience, Inc., San Diego, USA) conforme instruções do fabricante.

4.5. ENSAIOS EM CÉLULAS

4.5.1. CULTIVO CELULAR

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) e macrófagos de camundongos (RAW-264.7). As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de cultivo contendo meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 µg/mL de estreptomicina e 10 U/mL de penicilina, em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Para manutenção das células o meio foi trocado a cada 48 h. No momento em que a monocamada celular se tornava confluenta, as células HaCaT eram lavadas com PBS e incubadas durante 10 min com EDTA 0,1 mM. Em seguida as células eram incubadas com 1,5 mL de tripsina 0,25% durante 5 min à 37 °C. Após o desprendimento do monocamada celular, as células eram homogeneizadas com DMEM acrescido de 10% de SFB e a suspensão celular obtida era dividida em várias garrafas para subcultivo. No caso da linhagem de macrófagos RAW-264.7, foi usado um "Scraper" para desaderir o monocamada celular, após homogeneização das células, a suspensão celular obtida era dividida em várias garrafas para subcultivo e completado o volume com meio de cultivo DMEM novo (GEORGE *et al.*, 2010).

4.5.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE THYAZOLYL BLUE TETRAZOLIUMBROMIDE (MTT)

Este é um método no qual as redutases mitocondriais reduzem o anel tetrazólio do MTT a cristais roxos de formazan púrpura, pelas mitocôndrias das células vivas. Assim é possível avaliar a viabilidade celular pela capacidade das mitocôndrias em reduzir o anel a cristais. A solubilização dos cristais, pelo DMSO, gera uma solução colorida que pode ser quantificada. O aumento da intensidade da cor (absorbância) é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; REILLY *et al.*, 1998).

As células HaCaT ou RAW-264.7 foram semeadas em placa de 96 poços (3 x 10⁵ células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 h, o meio de

cultivo foi substituído por 200 µL de meio contendo diferentes concentrações do EHSG (3 – 1000 µg/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. Após 24 h de exposição, no grupo controle negativo (células mortas), o meio foi substituído por uma solução de Saponina 0,01 % durante 30 min. Foi então adicionado 20 µL da Solução de MTT (5 mg/mL), obtendo um volume final de 220 µL e uma concentração final de 0,45 mg/mL, então, incubados por 3 h a 37 °C e 5% de CO₂. Ao final, o volume todo da placa foi retirado invertendo-a e adicionado 100 µL de DMSO 99,9 % em cada poço, homogeneizado lentamente até a completa dissolução e então feito a leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 550 nm.

4.5.3. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE VERMELHO NEUTRO

Este método permite verificar o acúmulo do corante vermelho neutro nos lisossomos das células, mostrando a viabilidade das células em endocitar este corante. Após a lise celular por uma solução de extração, o corante diluído pode ser quantificado por medida de absorbância e assim avaliar a capacidade de fagocitose celular (BORENFREUND e PUERNER, 1985; FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

As células HaCaT ou RAW-264.7 foram semeadas em placa de 96 poços (3 x 10⁵ células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 200 µL de meio contendo diferentes concentrações do EHSG (3 – 1000 µg/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. Após 24 h de exposição, no grupo controle negativo (células mortas), o meio foi substituído por uma solução de Saponina 0,01 % por 30 min. Então adicionado 20 µL da Solução de Vermelho Neutro (1100 µg/mL), obtendo um volume final de 220 µL e uma concentração final de 100 µg/mL e incubados por 2 h a 37 °C e 5% de CO₂. Ao final, o volume todo da placa foi retirado invertendo-a e adicionado 100 µL de Solução de Extração (EtOH/Ac.COOH, 50% / 1%) em cada poço, homogeneizado lentamente até a completa dissolução e então feito a leitura da absorbância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 550 nm.

4.5.4. DETERMINAÇÃO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA

O ensaio de cristal violeta foi inicialmente utilizado na quantificação do número de células em culturas em monocamada, como uma função da absorvância do corante pelas células (GILLIES *et al.*, 1986). No entanto, este método está sendo atualmente utilizado, após modificações, em grande número de aplicações, incluindo a determinação de citotoxicidade ou morte celular produzido por elementos químicos, drogas ou toxinas de patógenos (SHAIK *et al.*, 2004), para determinar a viabilidade das células (THOMAS *et al.*, 2004) ou para determinar proliferação de células sob condições de teste diferentes (ZIVADINOVIC *et al.*, 2005).

As células RAW-264.7 foram semeadas em placa de 96 poços (3×10^5 células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 200 μ L de meio contendo diferentes concentrações do EHSG (3 – 300 μ g/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. Após 24 h de exposição, as células foram lavadas 2x com PBS, fixadas com 50 μ L de citofix e incubadas por 30 min em gelo. O fixador foi removido e adicionado 100 μ L de solução de cristal violeta (0,5% dissolvido em dH₂O contendo 20% de metanol), incubadas por 10 min a temperatura ambiente e lavadas 2x com 100 μ L de água MiliQ. Então as células e o corante foram solubilizados com 100 μ L de tampão de Sorenson (Citrato de sódio 0,1 M, dH₂O contendo 50% de etanol, pH 4.2) durante 30 min em agitação constante e lenta até a completa dissolução e então feito a leitura da absorvância em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 540 nm.

4.5.5. AVALIAÇÃO DA CITOMARCAÇÃO PARA MORFOLÓGICA DE MACRÓFAGOS

As células RAW-264.7 foram semeadas em placa de 24 poços (3×10^5 células/poço, quantidade de células no dia da leitura) contendo uma lamínula estéril no fundo. Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 500 μ L de meio contendo diferentes concentrações do EHSG (3 – 300 μ g/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2% de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. Após 24 h de exposição, as células foram lavadas 2x com PBS, incubadas em glicina (0,1 M) e

BSA (1%) em PBS, por 5 min cada, para reação de bloqueio de ligações inespecíficas. As células então foram lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton-X (0,1%) em PBS por 5 min, lavadas novamente com PBS e incubadas com probe para F-actina (AlexaFlour® 546 – Phalloidin) (Molecular Probes® - cat. A22283) por 20 min. Após incubação, as células foram lavadas com PBS, as lâminas montadas em Fluoromount-G™ conjugado com DAPI, deixadas secando por 10 min e então seladas com esmalte incolor. As imagens foram produzidas no microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 60X, imersas em água (com abertura numérica de 1,27). Para o Phalloidin foi utilizado laser 561 para excitação e filtro de intervalo ("band pass") de 570-620nm e para o DAPI foi utilizado laser 405 para excitação e filtro de intervalo ("band pass") de 425 - 475 nm. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens.

4.5.6. ENSAIO DE BURST RESPIRATÓRIO EM MACRÓFAGOS

As células RAW-264.7 foram semeadas em placa de 96 poços (3×10^5 células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 200 μ L de meio contendo diferentes concentrações do EHSG (3 – 300 μ g/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. 24 h após o tratamento, o meio foi substituído por 200 μ L de meio contendo LPS (50 ng/mL) + IFN- γ (5 ng/mL) para indução da produção de NO ou TPA (100 ng/mL) para indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), então aguardado o tempo de 12 h. Quando a indução foi realizada antes do tratamento, 24 h após as células serem semeadas, o meio foi substituído por 200 μ L de meio contendo LPS (50 ng/mL) + IFN- γ (5 ng/mL) ou TPA (100 ng/mL) para indução das células durante 12 h. Após o tempo de incubação com o indutor, o meio foi substituído por 200 μ L de meio contendo os tratamentos com EHSG ou veículo e incubados por 24 h. Em seguida, as células foram incubadas com 200 μ L de PBS contendo 1 μ M da sonda DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetate) para quantificação de NO ou da sonda DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) para quantificação de ROS durante 30 min a 37 °C e 5% de CO₂, lavadas com PBS e incubadas novamente com PBS a 37 °C e 5% de

CO₂ por 30 min. Então feito a leitura da fluorescência em leitor de microplaca (*Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader*) a 495 nm e emissão de 515 nm (NO) ou 529 nm (ROS).

4.5.7. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS

As células RAW-264.7 foram semeadas em placa de 24 poços (3 x 10⁴ células/poço, quantidade de células no dia da leitura) contendo uma lamínula estéril no fundo. Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 500 µL de meio contendo diferentes concentrações do EHSg (3; 30 e 300 µg/mL) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. 24 h após o meio de cultivo foi substituído por 500 µL de meio contendo TPA (100 ng/mL) para indução da ativação fagocítica dos macrófagos. Após 12h de indução, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com meio DMEM sem soro bovino fetal, então adicionado a proporção de 10 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) para cada macrófago, em meio sem soro e a placa foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por 30 min. Após o período de interação, a placa foi lavada com PBS (pH 7,4, a 37 °C) para remoção dos microrganismos não fagocitados. As lamínulas contendo as células aderidas foram fixadas com fluido Bouin (5 mL, ácido acético glacial, 75mL ácido pícrico e 25 mL formaldeído) por 5min à temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas 2 vezes com etanol 70%, depois 2 vezes com dH₂O e coradas com solução de Giemsa 10% em dH₂O, durante 2h e meia. O excesso de corante foi retirado e as lamínulas lavadas 2 vezes em dH₂O, desidratadas em acetona e diafanizadas em soluções acetona:xilol nas seguintes proporções: mistura a: 2 acetona:1 xilol; mistura b: 1 acetona: 1 xilol; mistura c: 1 acetona: 2 xilol. Em seguida as células foram diafanizadas duas vezes em xilol puro e montadas em lâminas de vidro com Entelan. As lâminas foram escaneadas em Scanner Zeiss Axio Imagen Z2 no aumento de 20x, câmera Cool Cob 1 – Metasystems e as imagens analisadas pelo software Metafer 4.

4.5.8. AVALIAÇÃO DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS

As células RAW-264.7 foram semeadas em placa de 6 poços (1×10^6 células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 1,5 mL de meio contendo diferentes concentrações do EHSg (3; 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. 24 h após o tratamento o meio de cultivo foi substituído por 1,5 mL de meio contendo TPA (100 ng/mL) para indução da ativação dos macrófagos. 12h após a indução as células foram soltas com auxílio de um “*Scraper*”, coletadas e centrifugadas (5 min, 1200 rpm), então adicionado $1 \mu\text{L} / 10^6$ células de anticorpo anti-CD54 (PE Hamster Anti-Mouse CD54) em 100 μL de PBS (contendo 1% de BSA) por 1 hora, no gelo e no escuro. Foi deixado um grupo sem indução, sem tratamento e sem marcação para calibração do equipamento. As células então foram centrifugadas (5 min, 1200 rpm) e ressuspensas em 500 μL de PBS. A leitura foi feita em Citômetro de Fluxo (FACScalibur), laser 488 em FL2 e os dados analisados no programa Flowing Software 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology – University of Turku, Finland).

4.5.9. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM CULTIVO CELULAR

Para avaliar o efeito do EHSg sobre a liberação das citocinas IL-6 e TNF- α pelos macrófagos RAW 264.7, as células foram semeadas em placa de 96 poços (3×10^5 células/poço, quantidade de células no dia da leitura). Após 24 h, o meio de cultivo foi substituído por 200 μL de meio contendo diferentes concentrações do EHSg (3; 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultivo contendo 0,2 % de DMSO, utilizado como veículo de dissolução do extrato. 24 h após o meio de cultivo foi substituído por 200 μL de meio contendo LPS (50 ng/mL) para indução da ativação dos macrófagos. 12 h após a indução, foi coletado 50 μL do meio de cultivo para detecção dos níveis de citocinas utilizando o “*Mouse Inflammation Kit - BD™ Cytometric Bead Array (CBA), BD Bioscience*”, conforme instruções do fabricante. A leitura foi feita em Citômetro de Fluxo (FACScalibur), laser 488 em FSC, SSC, FL1, FL2 e FL3 e os dados analisados no programa FCAP Array v3 (Soft Flow, Inc.).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm S.E.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls ou análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste comparação múltipla de Dunnett's. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 6.0c, São Diego, La Jolla California, EUA.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DA PLANTA *Sapium glandulatum* SOBRE MODELO DE EDEMA DE ORELHA EM CAMUNDONGOS

Para determinar qual o melhor forma de extração (etanol 50%, etanol 70% ou etanol 90%) de compostos ativos das folhas da *S. glandulatum*, foram realizados três extrações diferentes com os respectivos solventes e testados no modelo de edema de orelha induzido por TPA (2,5 µg/orelha) com a dose de 0,6 mg/orelha. O extrato bruto hidroalcoólico produzido com o solvente com a maior concentração etanólica (EH90%) foi o que apresentou melhor eficácia anti-inflamatória, com uma redução de $51,61 \pm 5,27\%$ quando comparado ao grupo controle ($P < 0,01$), o qual recebeu apenas o agente flogístico TPA. Assim, este foi o extrato escolhido para a continuação dos demais experimentos (FIGURA 03).

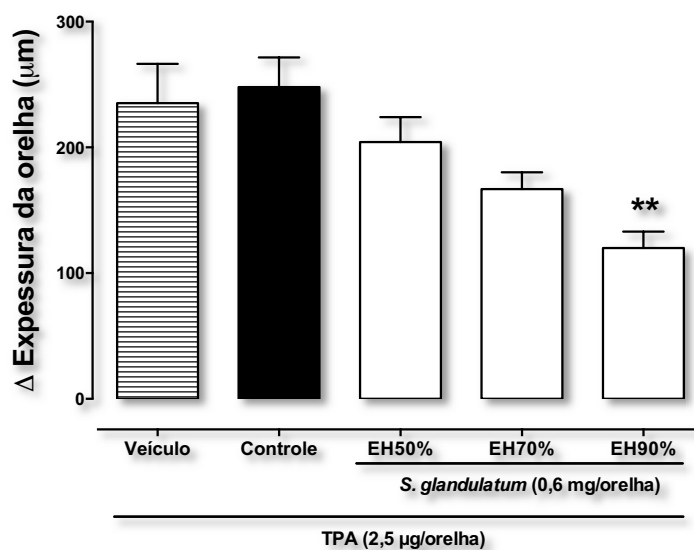


FIGURA 03. Atividade tópica dos diferentes extratos bruto hidroalcoólico da *Sapium glandulatum* na inflamação de orelha induzida por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA (2,5 µg/orelha), em seguida, receberam o tratamento tópico com o EH50%, EH70% ou EH90% (0,6 mg/orelha) ou veículo. Após 6 h da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média \pm E.P.M (n= 5) do aumento da espessura da orelha. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle.

Após observação de que o Extrato Hidroalcoólico da *Sapium glandulatum* 90% (EHSG) foi aquele que apresentou melhor atividade, este foi testado topicamente em diferentes doses (0,03 - 1 mg/orelha) no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha). Os resultados demonstraram que a aplicação do TPA na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo de $138,0 \pm 8,19$ µm na espessura das orelhas 6 h após a sua administração. A formação do edema foi inibida, de maneira dose-dependente, pela aplicação tópica do EHSG, obtendo uma dose efetiva 50% (DE₅₀) de 0,45 (0,40 – 0,51) mg/orelha, sendo a maior inibição obtida na dose de 1 mg/orelha de $67,8 \pm 1,4\%$ (P<0,001). O controle positivo utilizado, dexametasona (0,1 mg/orelha), também promoveu inibição da formação do edema, correspondente a $74,8 \pm 3,1\%$ (P<0,001) (FIGURA 04).

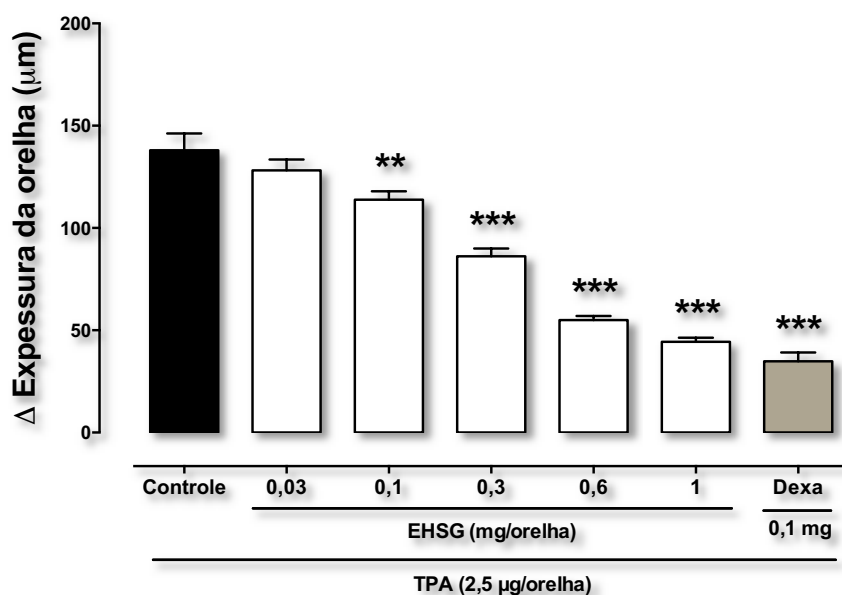


FIGURA 04. Curva dose-resposta do EHSG no modelo de edema de orelha induzido por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA (2,5 µg/orelha), em seguida, receberam o tratamento tópico com o EHSG (0,03 - 1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 h da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. As barras representam a média ± E.P.M (n= 5) do aumento da espessura da orelha. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** P<0,01e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparado ao grupo controle.

A avaliação da atividade da enzima MPO é utilizada como um marcador indireto de infiltração leucocitária no tecido inflamado. Para tal, 24 h após a indução do edema de orelha pela aplicação tópica de TPA e os respectivos tratamentos,

foram coletadas amostras de tecido (6 mm de diâmetro) para verificar a atuação do extrato sobre este parâmetro inflamatório. Observou-se que o tratamento tópico com EHSG foi capaz de inibir significativamente a atividade da enzima MPO na pele em todas as doses testadas, atingindo $76,7 \pm 0,7\%$ ($P < 0,01$) de inibição na dose de 1 mg/orelha do extrato. Já a dexametasona, utilizada como controle positivo, promoveu inibição de $65,0 \pm 2,2\%$ ($P < 0,01$), sendo ambos comparados ao grupo controle ($0,278 \pm 0,04$ DO/biópsia) (FIGURA 05).

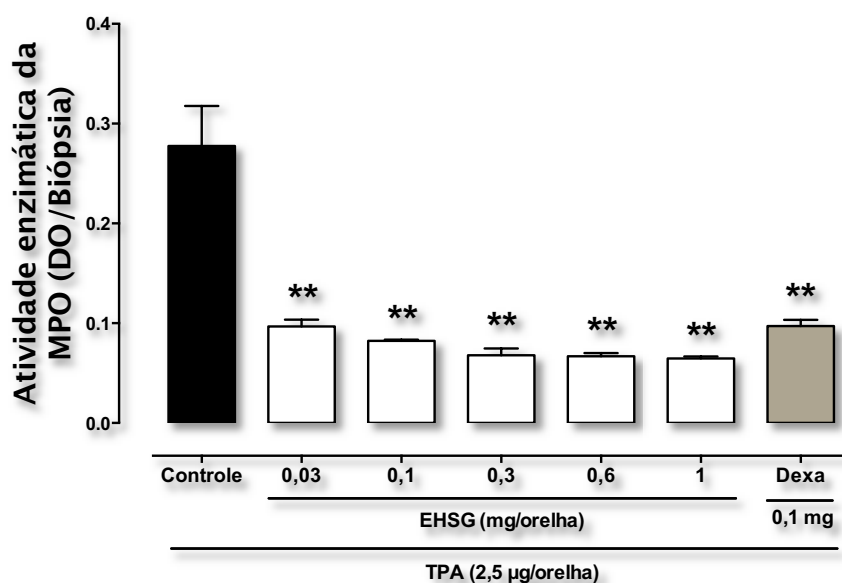


FIGURA 05. Efeito do EHSG e da dexametasona sobre a atividade da enzima MPO induzida por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA ($2,5 \mu\text{g/orelha}$), em seguida receberam o tratamento tópico com o EHSG ($0,03 - 1 \text{ mg/orelha}$) ou dexametasona ($0,1 \text{ mg/orelha}$). Após 24 h da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a avaliar a atividade da enzima MPO. As barras representam a média \pm E.P.M ($n = 4-12$) da atividade da enzima MPO. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$ foi indicativo de significância quando comparados ao grupo controle.

Uma vez que o EHSG apresentou uma boa atividade inibitória sobre a enzima MPO já em baixas doses, decidimos verificar se o EHSG não estaria inibindo diretamente a enzima. Assim, a enzima MPO foi isolada a partir da homogeneização e centrifugação de amostras de orelhas (6 mm de diâmetro), coletadas após a múltipla aplicação tópica de TPA ($2,0 \mu\text{g/orelha}$). Após o isolamento da enzima, esta foi incubada com diferentes concentrações do EHSG ($0,01 - 300 \text{ mg/mL}$). Os resultados demonstraram que o EHSG foi capaz de reduzir de maneira significativa a atividade da enzima MPO, sendo a inibição máxima observada na concentração de 300 mg/mL e correspondente a $81,9 \pm 4,1\%$ ($P < 0,001$) (FIGURA 06).

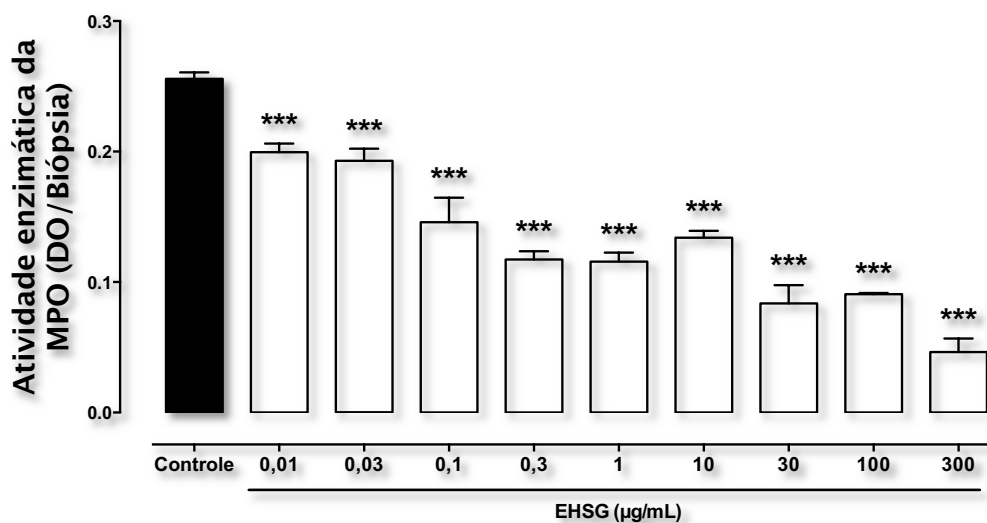


FIGURA 06. Efeito do EHSO e da dexametasona sobre a atividade da enzima MPO *in vitro*. A enzima foi obtida a partir de amostras das orelhas dos animais submetidos a múltipla aplicação de TPA (2,0 µg/orelha). Após retiradas as amostras (6 mm de diâmetro) das orelhas dos animais, estas foram homogeneizadas, centrifugadas e o sobrenadante incubado durante 15 min com diferentes concentrações do EHSO (0,01 - 300 mg/mL). Sendo a atividade enzimática quantificada através de espectrofotometria (620 nm). As barras representam a média ± E.P.M (n= 3-4) da atividade da enzima MPO. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. *** P<0,01 foi indicativo de significância quando comparados ao grupo controle.

Para confirmar se a atividade anti-inflamatória apresentada pelo extrato estaria relacionada não apenas a inibição da enzima, mas pela redução da migração de células inflamatórias para o tecido lesionado, foram realizadas análises histológicas das amostras das orelhas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha. Observou-se que a aplicação tópica de TPA promoveu aumento na espessura da orelha e na infiltração celular, culminando na formação do edema. A partir dos cortes histológicos, foi possível a visualização e a quantificação da ação do EHSO (1 mg/orelha) sobre a migração leucocitária induzida pela aplicação tópica do agente flogístico (FIGURA 07 e 08). Os resultados mostraram que o extrato foi capaz de reduzir a migração celular em $50,2 \pm 0,8\%$ ($P<0,001$). Enquanto a dexametasona (0,1 mg/orelha) promoveu inibição de $52,7 \pm 0,3\%$ ($P<0,001$), quando comparados ao grupo controle ($116,5 \pm 4,3$ células/campo) (FIGURA 08). A FIGURA 07 mostra fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas dos animais submetidos ao edema de orelha induzido por TPA, com objetiva de 40x e escala de 200 µm.

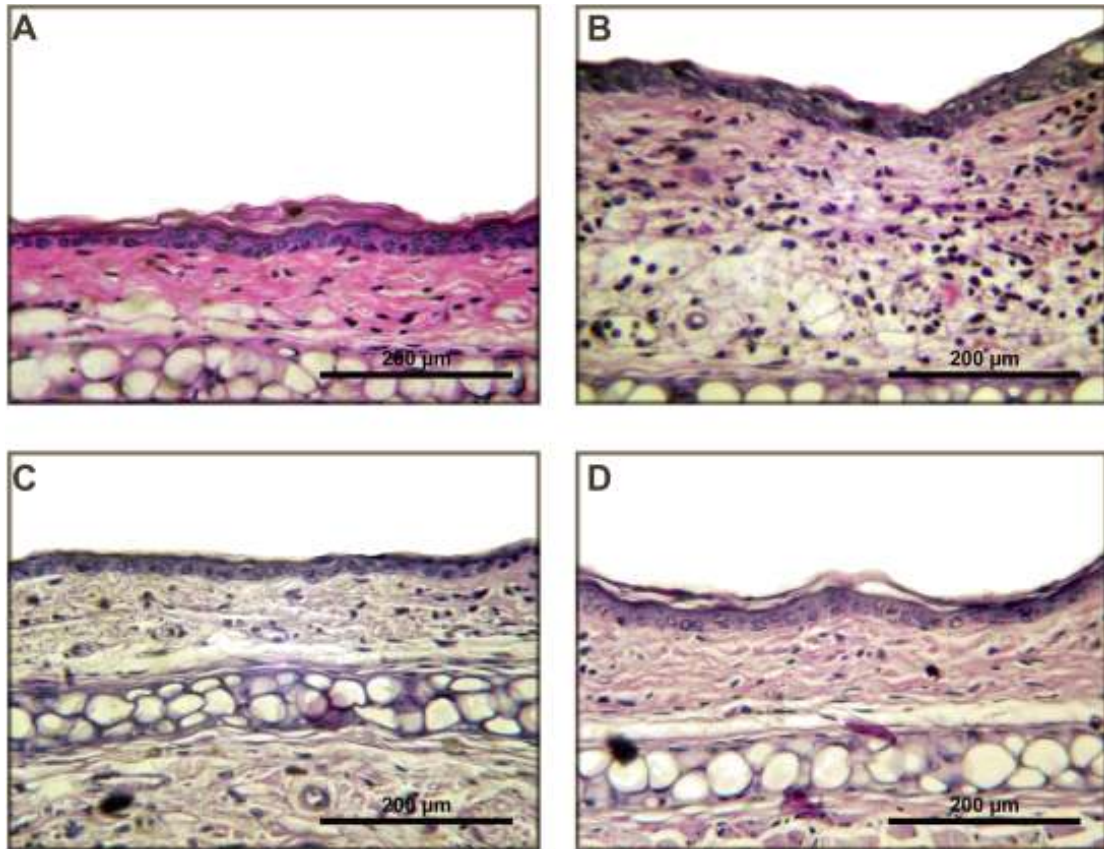


FIGURA 07. Histologia de cortes transversais das orelhas dos animais induzidos por TPA. Fotos representativas dos cortes histológicos das orelhas de camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) corados com hematoxilina – eosina (H.E), aumento de 40x e escala de 200 µm. Sendo representado o grupo veículo (A), o grupo controle (B), o grupo tratado com EHS (1 mg/orelha) (C) e dexametasona (0,1 mg/orelha) (D).

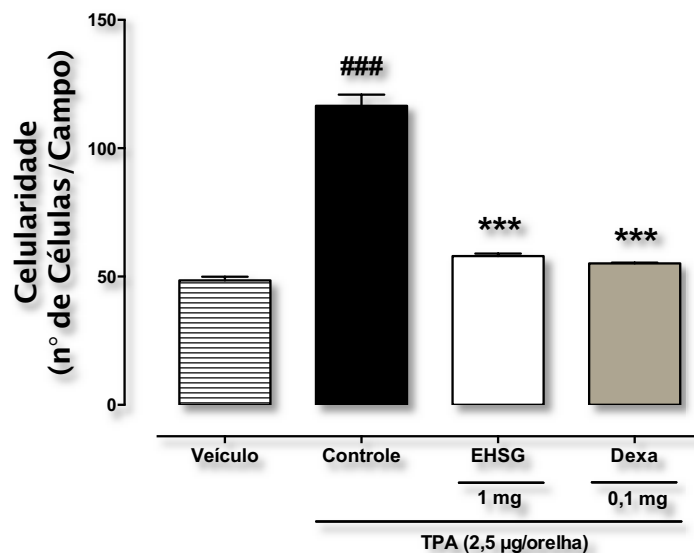


FIGURA 08. Efeito do EHS e da dexametasona sobre a migração celular induzida por TPA. A quantificação foi realizada através da contagem dos leucócitos totais com objetiva de 40x em cinco campos distintos de pelo menos quatro cortes histológicos de cada grupo. As barras representam a média ± E.P.M (n= 4-7) do número de células por campo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ### P<0,001 foi indicativo de significância quando comparados ao grupo veículo e *** P<0,001 foi indicativo de significância quando comparados ao grupo controle.

Outro parâmetro avaliado foi o efeito do EHSg sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Os animais foram submetidos ao modelo de edema de orelha induzido com TPA (2,5 μ g/orelha), em seguida tratados com o EHSg (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). O tratamento com EHSg inibiu a liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em $53,0 \pm 5,6\%$ ($P < 0,001$), $84,2 \pm 5,0\%$ ($P < 0,001$) e $82,4 \pm 5,8\%$ ($P < 0,05$), respectivamente. Enquanto a dexametasona foi capaz de inibir a liberação de IL-1 β e IL-6 em $65,2 \pm 5,8\%$ ($P < 0,001$) e $88,1 \pm 4,3\%$ ($P < 0,001$) respectivamente, quando comparados com o grupo controle (FIGURA 09).

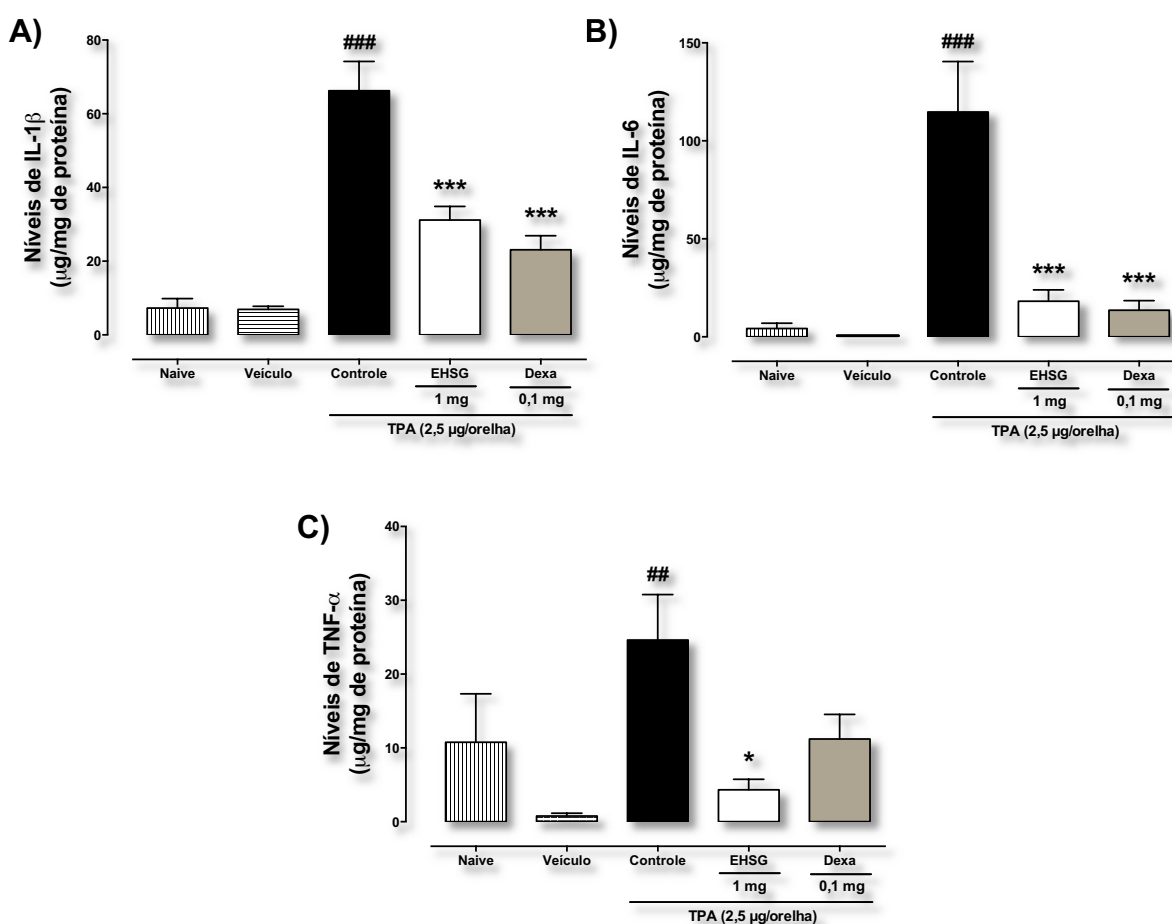


FIGURA 09. Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzida por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos animais pela administração tópica de TPA (2,5 μ g/orelha), em seguida receberam o tratamento tópico com o EHSg (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Após 6 h da aplicação do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm de diâmetro) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis das citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α por ELISA. As barras representam a média \pm EPM (n= 4-6). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ## P<0,01 e ### P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo; * P<0,05 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle.

Uma vez demonstrado que o EHSB possui atividade anti-inflamatória, verificamos se duas frações distintas obtidas a partir do extrato bruto também possuíam o mesmo efeito. O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha), e em seguida tratado topicamente com a Fração Diclorometano da *S. glandulatum* (SGFD) ou Fração Acetato de Etila da *S. glandulatum* (SGFA) (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). Os resultados demonstraram que a aplicação tópica de TPA na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo de $262,0 \pm 16,8$ µm na espessura das orelhas 6 h após a sua administração. A formação do edema foi inibida pela aplicação tópica da fração SGFA, apresentando maior inibição com a dose de 1 mg/orelha de $70,4 \pm 6,4\%$ ($P < 0,001$). A fração SGFD apresentou inibição com as três doses testadas, sendo que a dose de 0,3 mg/orelha mostrou a maior eficácia ($71,1 \pm 6,0\%$) ($P < 0,001$) (FIGURA 10A). O controle positivo utilizado, dexametasona também promoveu inibição da formação do edema, correspondente a $99,4 \pm 0,6\%$ ($P < 0,001$).

Foi realizado também a avaliação da atividade da MPO, no entanto, apenas a dose de 1 mg/orelha da fração SGFA proporcionou redução significativa na atividade enzimática igual a $41,0 \pm 6,2\%$ ($P < 0,05$) (FIGURA 10B).

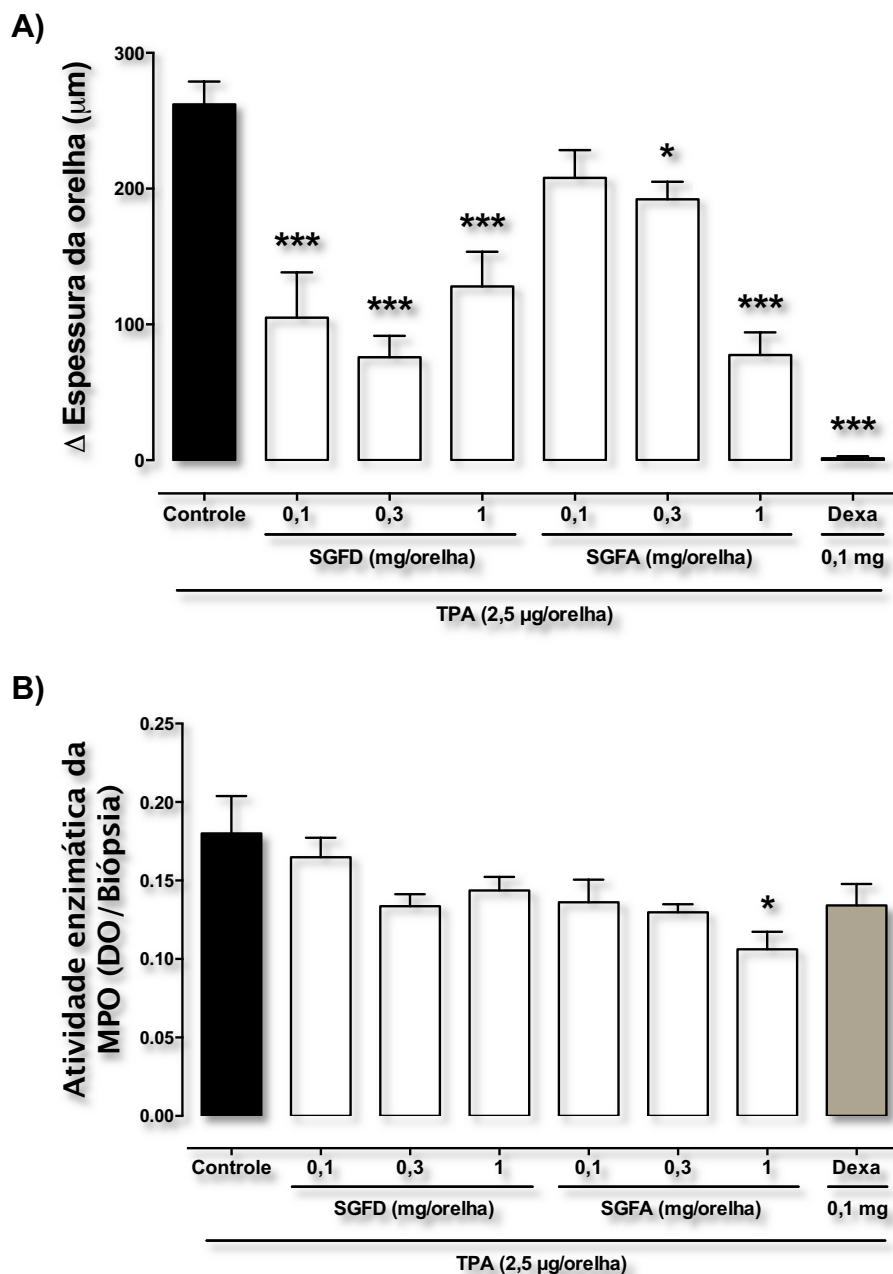


FIGURA 10. Efeito das frações SGFA e SGFD sobre o edema de orelha e a atividade da enzima MPO induzidos por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos camundongos pela administração tópica TPA (2,5 μg/orelha), os animais receberam diferentes concentrações das frações SGFA e SGFD (0,1; 0,3 e 1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). **(A)** Após 6 h da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. **(B)** Após 24 h, amostras de tecido (6 mm de diâmetro) foram retiradas e utilizadas para a avaliar a atividade da enzima MPO. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * P<0,05, e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle.

5.2. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO ORAL DO EHSO SOBRE MODELOS DE EDEMA DE ORELHA E PATA EM CAMUNDONGOS

O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de TPA, sendo que, 1 hora antes os animais receberam, por via oral, diferentes doses do EHSO (1; 10 e 100 mg/kg), assim como o controle positivo dexametasona (3 mg/kg). Os resultados demonstraram que a aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) na orelha dos camundongos foi capaz de promover um aumento significativo na espessura da orelha dos camundongos 6 h após a sua administração, como demonstrado na FIGURA 11A. Os resultados mostram que a administração do EHSO (v.o.) foi capaz de reduzir a formação do edema de maneira dose-dependente, obtendo uma DE₅₀ de 5,86 (1,423 – 24,10) mg/kg, alcançando uma inibição de 70,0 ± 3,5% na dose de 100 mg/kg (P<0,001) (FIGURA 11A). Neste mesmo modelo, foi avaliada a ação do extrato sobre a atividade da enzima MPO. Assim, a aplicação tópica de TPA gerou aumento da atividade da enzima após 24 h (FIGURA 11B). Este aumento foi reduzido pela administração oral do EHSO, chegando a reduzir em 34,0 ± 4,4% (100 mg/kg) (P<0,001) a atividade da enzima. De maneira semelhante, o grupo controle positivo, dexametasona (3 mg/kg), também foi capaz de inibir a formação do edema em 66,1 ± 7,0% (P<0,001) e a atividade da enzima MPO em 42,2 ± 6,1% (P<0,001), conforme demonstrado na FIGURA 11A e FIGURA 11B, respectivamente.

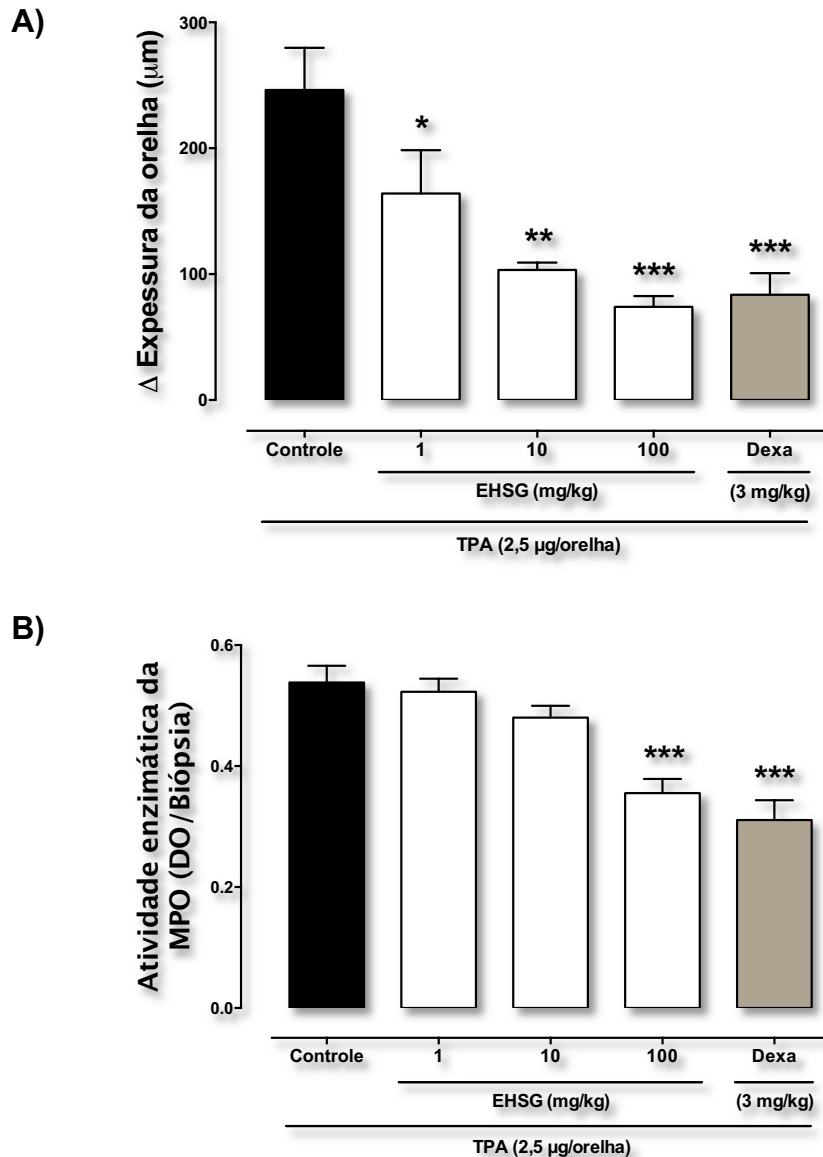


FIGURA 11. Efeito da administração oral do EHSG e da dexametasona sobre o edema de orelha e a atividade da enzima MPO induzido por TPA. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos camundongos pela administração tópica de TPA (2,5 μg /orelha), 1 hora antes, os animais receberam diferentes concentrações do EHSG (1; 10 e 100 mg/kg) ou dexametasona (3 mg/kg) pela via oral. **(A)** Após 6 h da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. **(B)** Após 24 h, amostras de tecido (6 mm de diâmetro) foram retiradas e utilizadas para a avaliar a atividade da enzima MPO. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo controle.

Também foi avaliado o efeito por via oral do EHSg sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados demonstraram que a aplicação (i.pl.) de carragenina na pata dos camundongos foi capaz de promover um aumento significativo na espessura da pata (FIGURA 12A) e na atividade da enzima MPO (FIGURA 12B) dos animais. Observou-se que, após 4 h da aplicação do agente flogístico, o edema alcança seus maiores valores (grupo controle), o que foi revertido significativamente nos grupos tratados com o EHSg, sendo a inibição do edema igual a $16,7 \pm 8,1\%$ (1 mg/kg), $33,9 \pm 5,5\%$ (10 mg/kg) e $35,0 \pm 10,2\%$ (100 mg/kg) ($P < 0,05$), enquanto o controle positivo dexametasona promoveu uma inibição do edema igual a $36,2 \pm 5,2\%$ ($P < 0,05$). Neste mesmo modelo, o EHSg foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO, sendo a maior inibição na dose de 100 mg/kg ($44,5 \pm 5,6\%$) ($P < 0,001$), enquanto a dexametasona inibiu a atividade da enzima em $67,3 \pm 3,5\%$ ($P < 0,001$).

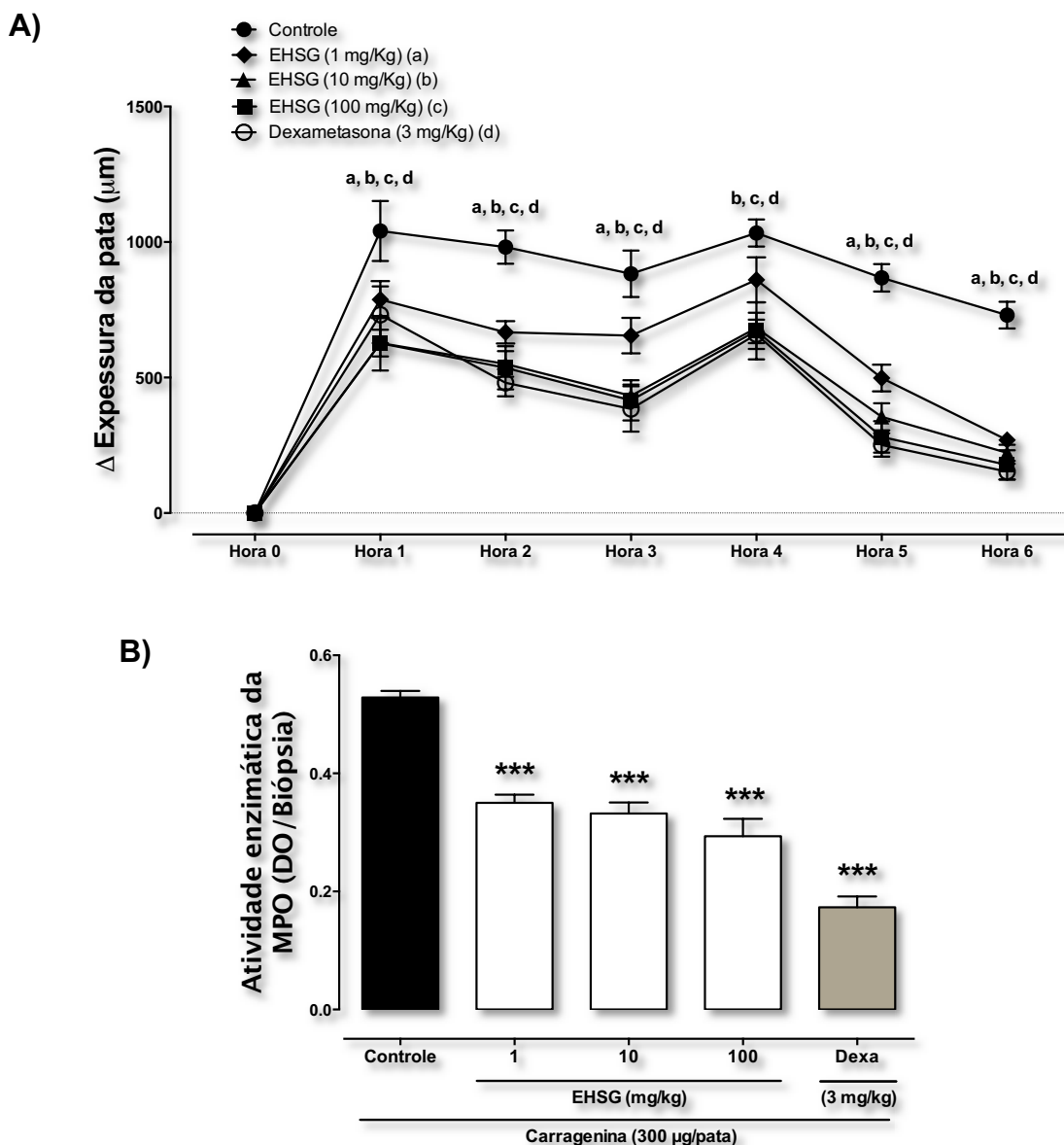


FIGURA 12. Efeito da administração oral do EHS e da dexametasona sobre o edema de pata e a atividade da enzima MPO induzido pela administração de carragenina. Os animais foram tratados com diferentes concentrações do EHS (1; 10 e 100 mg/kg) ou dexametasona (3 mg/kg), e após 1 hora, receberam a administração (i.pl.) de carragenina (300 μg/pata). **(A)** O efeito anti-edematogênico do extrato foi avaliado pela diferença entre a espessura basal da pata e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após indução do processo inflamatório. Os pontos representam a média de 4 – 6 animais e as barras verticais o E.P.M. A análise estatística foi verificada pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste comparação múltipla de Dunnett's. a, b, c, d (P<0,05) foram indicativos de significância para EHS (1 mg/kg), EHS (10 mg/kg), EHS (100 mg/kg) e dexametasona (3 mg/kg), respectivamente, quando comparados aos grupos controle. **(B)** Para a avaliação da ação do extrato sobre a atividade da enzima MPO, 24 h após a administração do agente flogístico, amostras de tecido (6 mm de diâmetro) da pata dos animais foram coletadas e utilizadas para a avaliar a atividade da enzima. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls ^{###} P<0,001 foi indicativo de significância quando comparados ao grupo controle.

5.3. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EHSO NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA MÚLTIPLA APLICAÇÃO DE TPA

Como apresentado na FIGURA 13, a múltipla aplicação tópica do TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados causou aumento na espessura da orelha dos animais no primeiro dia após a indução, sendo que esta resposta reduz no segundo dia, mas no terceiro e quinto dia o edema fica semelhante ao primeiro dia e estabiliza até o final do experimento (9º dia), representado pelo grupo controle. De forma semelhante, o grupo que recebeu o veículo como tratamento, apresentou o mesmo perfil de edema que o grupo controle. O tratamento com o EHSO (1 mg/orelha), a partir do 5º dia foi capaz de reduzir a formação do edema, sendo detectado diferença significativa a partir do 7º dia de experimento ($23,2 \pm 5,8\%$) ($P < 0,05$) e este efeito foi levemente intensificado no decorrer do experimento até o último dia (9º dia, redução de $43,1 \pm 4,4\%$) ($P < 0,001$), quando comparado com o grupo veículo (FIGURA 13A). Como esperado, os animais tratados com a droga utilizada como controle positivo, dexametasona (0,1 mg/orelha), também tiveram uma redução no edema induzido pelo TPA do 5º ao 9º dia. No último dia de experimento, amostras das orelhas (6 mm de diâmetro) foram coletadas e pesadas. O EHSO causou redução no peso das orelhas em $21,8 \pm 2,5\%$ ($P < 0,01$) e a dexametasona em $30,0 \pm 1,4\%$ ($P < 0,01$), comparando com o grupo veículo ($25,5 \pm 2,5\%$) (FIGURA 13B).

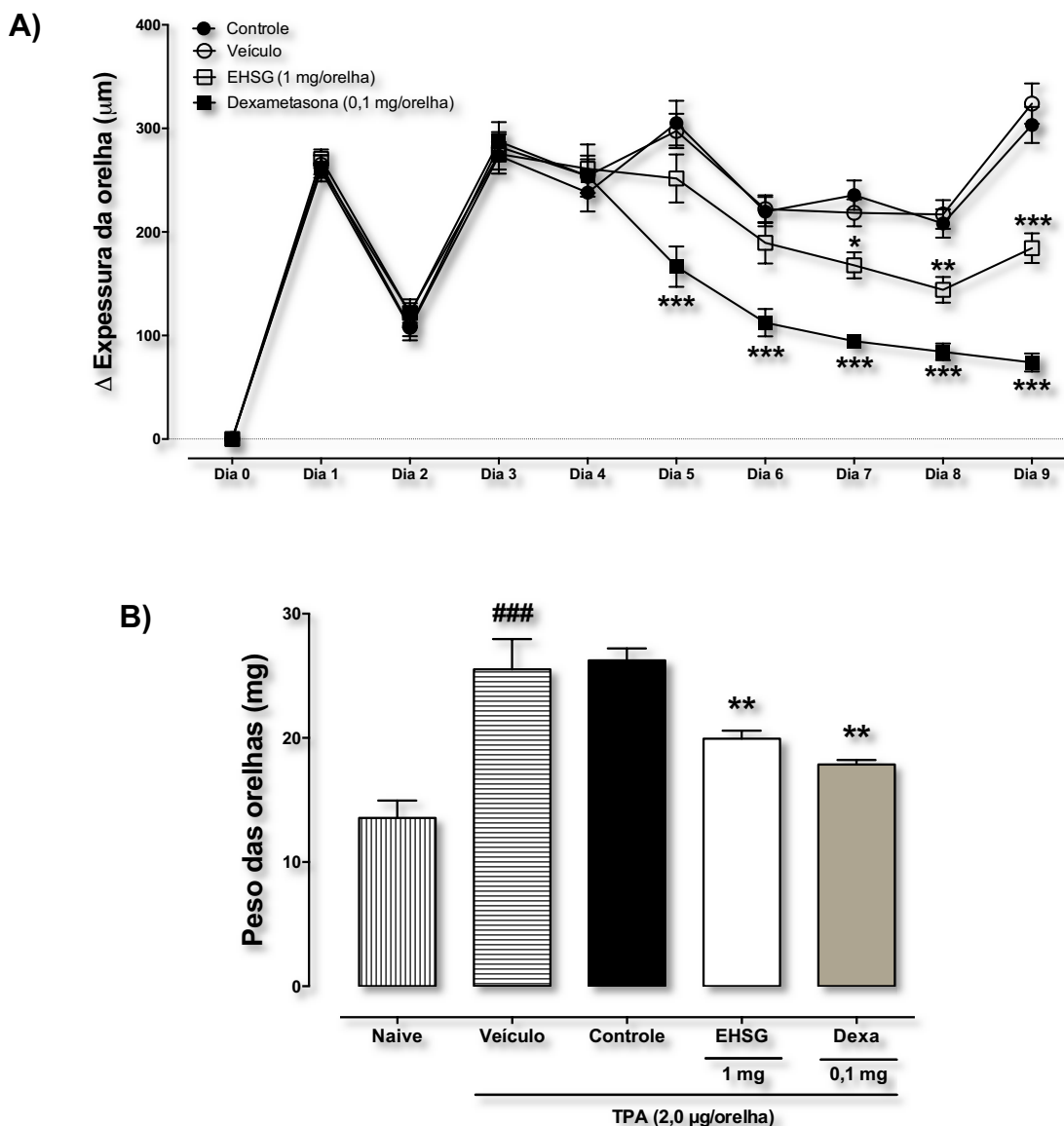


FIGURA 13. Efeito do EHS e da dexametasona sobre o edema de orelha induzido por múltiplas aplicações de TPA. (A) O edema foi induzido pela múltipla aplicação de TPA (2,0 µg/orelha) em dias alternados durante todo o experimento e os tratamentos tópicos com EHS (1 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) ou veículo foram iniciados no 5º dia de experimento até o 9º dia, duas vezes ao dia (12h / 12h). Os pontos representam a média ± E.P.M. (n= 15) do aumento da espessura da orelha. A análise estatística foi verificada pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste comparação múltipla de Dunnett's. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados aos grupos veículo. **(B)** As barras representam a média ± E.P.M (n= 5) do peso das orelhas. A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. ### P<0,001 foi indicativo de significância quando comparados ao grupo naive e **P<0,01 foi indicativo de significância quando comparados aos grupos veículo.

A determinação da atividade da MPO indica indiretamente a infiltração de leucócitos polimorfonucleares, enquanto, a determinação da atividade da NAG indica indiretamente a infiltração de leucócitos mononucleares. Quando analisado no último dia do experimento as várias aplicações de TPA promoveram um aumento significativo na atividade da MPO no grupo controle ($1,2 \pm 0,2$ DO/Biópsia) e no grupo veículo ($1,4 \pm 0,2$ DO/Biópsia), se comparados com os grupos naive ($0,1 \pm 0,02$ DO/Biópsia) (FIGURA 14A). Da mesma forma, as várias aplicações de TPA promoveram um aumento significativo na atividade da NAG no grupo controle ($1,1 \pm 0,04$ DO/Biópsia) e no grupo veículo ($1,1 \pm 0,05$ DO/Biópsia), se comparados com os grupos naive ($0,5 \pm 0,01$ DO/Biópsia) (FIGURA 14B). No grupo que recebeu TPA e depois o EHSg foi verificada diminuição no aumento da atividade da MPO de $63,4 \pm 7,4\%$ ($P < 0,01$) e da NAG de $14,5 \pm 4,0\%$ ($P < 0,05$), comparando com o grupo veículo. Além disso, no grupo tratado com dexametasona também ocorreu redução na atividade da MPO em $81,6 \pm 5,2\%$ ($P < 0,001$) e da NAG em $18,3 \pm 3,6\%$ ($P < 0,05$).

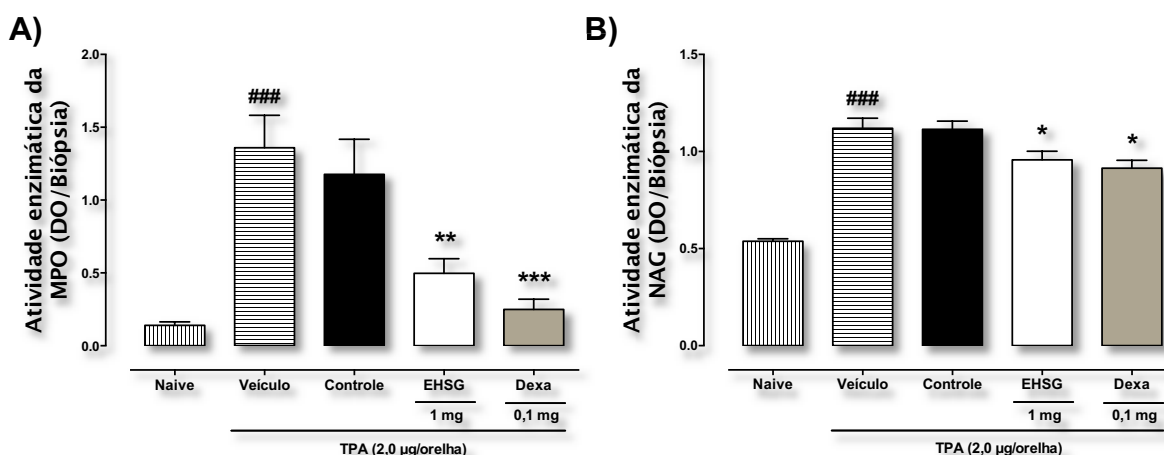


FIGURA 14. Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a atividade da enzima MPO e NAG induzidas pela múltipla aplicação de TPA. O processo inflamatório foi induzido topicamente na orelha dos animais pela múltipla aplicação de TPA ($2,0 \mu\text{g}/\text{orelha}$) em dias alternados, durante 9 dias. O tratamento tópico com o EHSg ($1 \text{ mg}/\text{orelha}$) ou dexametasona ($0,1 \text{ mg}/\text{orelha}$) iniciou no 5º de experimento, sendo aplicado 2x por dia ($12\text{h} / 12\text{h}$). No ultimo dia de experimento, amostras de tecido (6 mm de diâmetro) foram retiradas e utilizadas para a avaliar a atividade da enzima MPO e da atividade da (B) NAG. As barras representam a média \pm E.P.M ($n = 5$) da atividade da enzima (A) MPO e da atividade da (B) NAG. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparados ao grupo naive e * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo.

Avaliamos também o efeito do EHSg sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no modelo crônico. Amostras das orelhas (6 mm de diâmetro) dos animais submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pela múltipla aplicação com TPA (2,0 μ g/orelha), e tratados com o veículo, EHSg (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) foram coletadas no ultimo dia de experimento e processadas para quantificação de citocinas. O tratamento com EHSg inibiu os níveis de IL-1 β em $35,8 \pm 9,0\%$ ($P < 0,05$) e de TNF- α em $44,4 \pm 7,5\%$ ($P < 0,05$). Enquanto a dexametasona também foi capaz de inibir a quantidade de IL-1 β e TNF- α em $73,3 \pm 3,3\%$ ($P < 0,001$) e $71,0 \pm 4,4\%$ ($P < 0,01$) respectivamente, quando comparados com o grupo veículo (FIGURA 15).

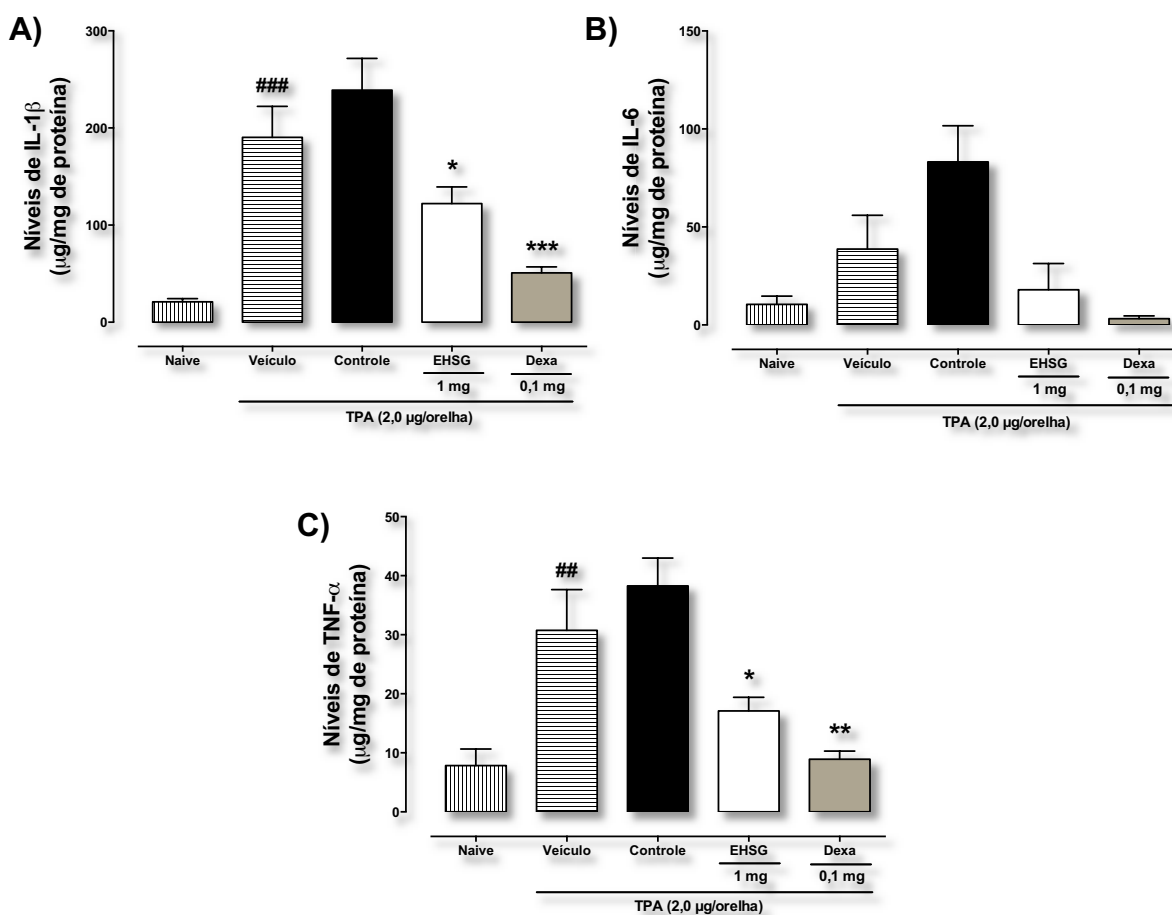


FIGURA 15. Efeito do EHSg e da dexametasona sobre a liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzida pela múltipla aplicação de TPA. O processo inflamatório foi induzido topicamente na orelha dos animais pela múltipla aplicação de TPA (2,0 μ g/orelha), os tratamentos tópicos com o veículo, EHSg (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha) foram iniciados no 5 $^{\circ}$ dia até o 9 $^{\circ}$ dia de experimento, 2x por dia (12h / 12h). No último dia de experimento, amostras de tecido (6 mm de diâmetro) foram retiradas e utilizadas para a quantificação dos níveis de citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) TNF- α por ELISA. As barras representam a média \pm EPM (n= 4-5) de cada grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ### $P < 0,01$ e #### $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo naive; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo.

5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TIPO GLICOCORTICÓIDE DO EHSO E SOBRE A ATROFIA CUTÂNEA E ÓRGÃOS LINFÓIDES

Para verificar o possível mecanismo de ação do EHSO, se este poderia estar agindo diretamente sobre receptores de glicocorticóides, os animais foram previamente tratados (s.c.) 15 min antes com o antagonista de receptores de glicocorticóides (mifepristona) ou veículo (PEG 400). Em seguida, submetidos o modelo de edema de orelha induzido por TPA (2,5 µg/orelha) e tratados com o EHSO (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). A aplicação tópica de TPA promoveu um aumento significativo na espessura das orelhas dos animais, o qual não sofreu alteração com a administração (s.c.) do veículo. Foi observado que tanto o tratamento com EHSO quanto a dexametasona reduziram a formação de edema em $43,0 \pm 4,2\%$ ($P < 0,001$) e $95,4 \pm 2,4\%$ ($P < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo controle/PEG 400 ($267,4 \pm 22,1 \mu\text{m}$). No entanto, o tratamento com mifepristona só foi capaz de alterar a ação antiedematogênica da dexametasona revertendo para $62,6 \pm 8,5\%$, quando comparado ao grupo dexametasona/PEG 400 (FIGURA 16).

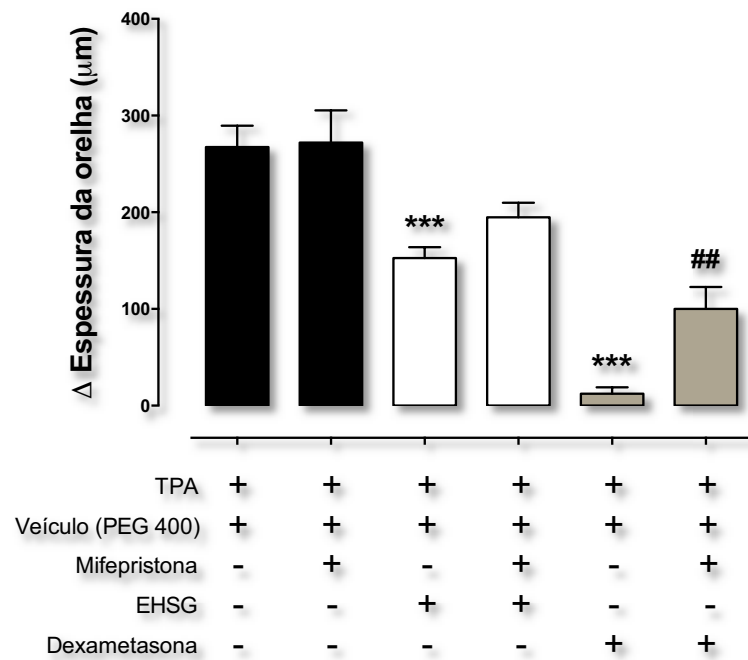


FIGURA 16. Efeito na reversão causada pela mifepristona na formação de edema induzido por TPA e tratados com EHSG ou dexametasona. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos camundongos pela administração tópica de TPA (2,5 $\mu\text{g}/\text{orelha}$), em seguida receberam o tratamento tópico com o EHSG (1 mg/orelha) ou dexametasona (0,1 mg/orelha). A mifepristona (50 mg/Kg , s.c.) foi administrada 15 min antes dos tratamentos. Veículo PEG 400 foi utilizado para a diluição da mifepristona. Após 6 h da aplicação do agente flogístico, a espessura das orelhas foi medida com o auxílio de um micrômetro. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle/PEG 400. ## $P < 0,01$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo dexametasona/PEG 400.

No entanto, quando foi avaliado a atividade da enzima MPO nos animais submetidos ao modelo de edema de orelha induzido por TPA, pré-tratados com o antagonista de receptores de glicocorticóides e tratados com o EHSO ou dexametasona, observou-se que a mifepristona foi capaz de reverter a inibição da atividade enzimática causada tanto pelo EHSO como pela dexametasona.

A atividade enzimática foi reduzida em $78,2 \pm 2,9\%$ ($P < 0,001$) e $87,8 \pm 5,0\%$ ($P < 0,001$) pelo tratamento com EHSO/PEG 400 e dexametasona/PEG 400 respectivamente, quando comparados ao grupo controle/PEG 400 ($1,7 \pm 0,2$ DO/Biópsia). Os grupos que receberam o tratamento com EHSO ou dexametasona associados com mifepristona inibiram em apenas $35,9 \pm 18,3\%$ e $56,9 \pm 12,3\%$, respectivamente (FIGURA 17).

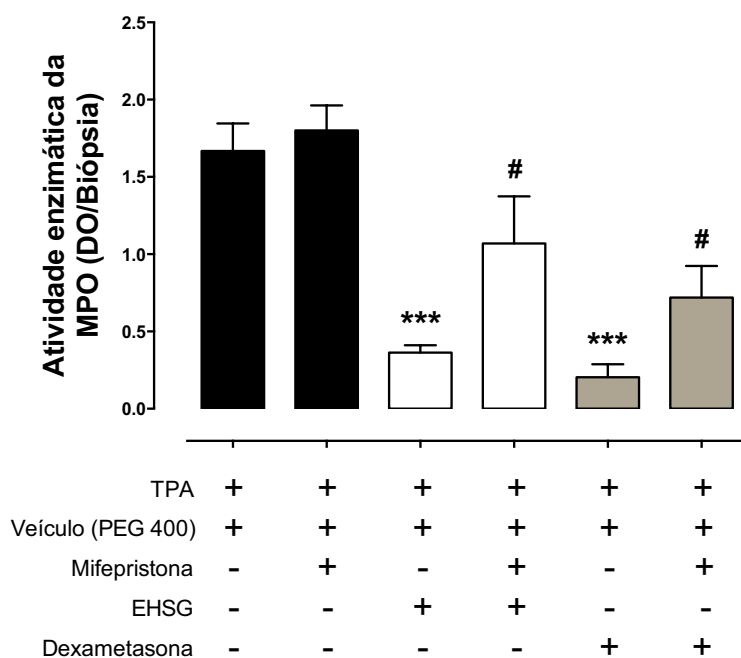


FIGURA 17. Efeito na reversão causada pela mifepristona na atividade da enzima MPO induzida por TPA e tratados com EHSO ou dexametasona. O processo inflamatório foi induzido na orelha dos camundongos pela administração tópica de TPA ($2,5 \mu\text{g}/\text{orelha}$), em seguida receberam o tratamento tópico com o EHSO ($1 \text{ mg}/\text{orelha}$) ou dexametasona ($0,1 \text{ mg}/\text{orelha}$). A mifepristona ($50 \text{ mg}/\text{Kg}$, s.c.) foi administrada 15 min antes dos tratamentos. Veículo PEG 400 foi utilizado para a diluição da mifepristona. Após 24 h, amostras de tecido (6 mm) foram retiradas e utilizadas para a avaliar a atividade da enzima MPO. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls.*** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo controle/PEG 400. # $P < 0,05$ foi indicativo de significância quando comparado ao seu grupo respectivo/PEG 400.

Para confirmar se o EHSO possui como um dos seus mecanismos de ação a interação com receptores de glicocorticóides, foi realizado o ensaio de ligação específica da [³H]-dexametasona em fígado de ratos. Os resultados demonstraram que o EHSO foi capaz de inibir a ligação da [³H]-dexametasona apenas nas maiores concentrações testadas, reduzindo em $73,9 \pm 23,5\%$ ($P < 0,05$) na concentração de $600 \mu\text{g/mL}$ e $80,8 \pm 19,7\%$ ($P < 0,05$) na de $1000 \mu\text{g/mL}$, enquanto a dexametasona, utilizada como controle, inibiu a ligação específica da [³H]-dexametasona (10^{-5} M) em $79,3 \pm 11,1\%$ ($P < 0,01$) (FIGURA 18).

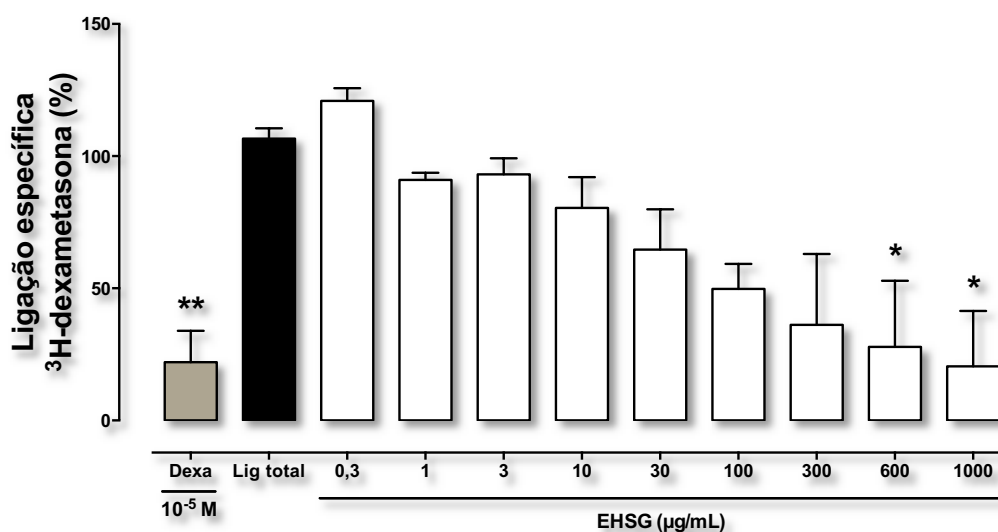


FIGURA 18. Efeito EHSO sobre o ensaio de ligação específica da [³H]-dexametasona ao receptor de glicocorticóides. O efeito do EHSO sobre a capacidade de ligação da [³H]-dexametasona ao receptor de glicocorticoide foi avaliada através do “ensaio de troca” em fígado de ratos. As barras verticais representam a média \pm EPM ($n = 3$). A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo ligação total.

Os glicocorticoides apresentam efeitos colaterais indesejáveis quando usados por via tópica, um desses efeitos é a atrofia cutânea e alteração dos órgãos linfóides quando atinge a circulação sistêmica. Com o intuito de avaliar se o EHSO apresenta algum desses efeitos, estabelecemos um protocolo experimental para verificação desses parâmetros, onde a espessura da pele das orelhas e o peso dos órgãos linfóides dos animais foram verificados após tratamento repetido com o EHSO ou dexametasona. A aplicação tópica da dexametasona durante sete dias promoveu alterações na aparência e comportamento dos animais, os quais se tornaram mais letárgicos e com os pelos eriçados, o que não foi observado com a administração de EHSO (parâmetros avaliados subjetivamente através de análise visual). Entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar o peso corporal (FIGURA 19A) e os níveis glicêmicos dos animais (FIGURA 19B). Além disso, aplicação tópica da dexametasona reduziu a espessura das orelhas em aproximadamente $50,5 \pm 12,3 \mu\text{m}$, enquanto o EHSO e o veículo não promoveram alteração significativa da espessura das orelhas (FIGURA 19C).

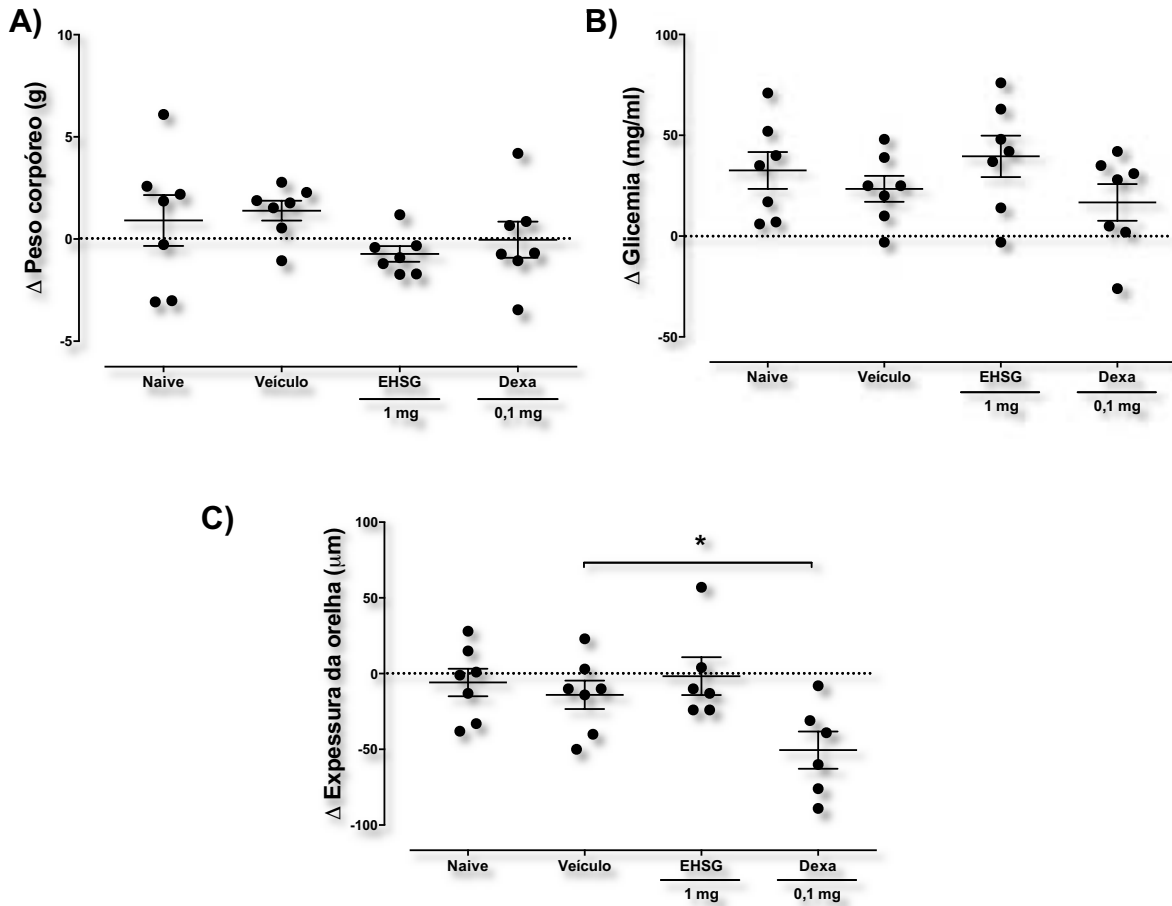


FIGURA 19. Efeito da múltipla aplicação tópica do EHS sobre o peso, níveis de glicemia e espessura da orelha dos animais. Os animais foram tratados durante 7 dias (12/12 h) com a concentração do EHS (1 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) ou veículo. Os pontos representam a medida de cada animal e as linhas horizontais a média \pm E.P.M. (A) peso, (B) níveis de glicemia (C) e espessura da orelha de cada grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo.

Além dos efeitos sobre a pele, a aplicação tópica de glicocorticoides pode promover efeitos sistêmicos. Para verificar a toxicidade sistêmica do EHSB e da dexametasona quando aplicados por via tópica, os animais submetidos ao ensaio de atrofia cutânea foram eutanasiados e o timo, o baço, as adrenais e os linfonodos auriculares foram coletados e pesados (FIGURA 20). A aplicação do EHSB promoveu a redução do peso dos órgãos em $91,5 \pm 1,0\%$ (timo), $51,0 \pm 4,9\%$ (baço), $41,0 \pm 4,4\%$ (adrenais) e $48,4 \pm 8,8\%$ (linfonodos), da mesma forma que a dexametasona $91,5 \pm 0,8\%$ (timo), $62,3 \pm 4,8\%$ (baço), $39,3 \pm 6,9\%$ (adrenais) e $70,6 \pm 5,3\%$ (linfonodos) (FIGURA 21A-D).

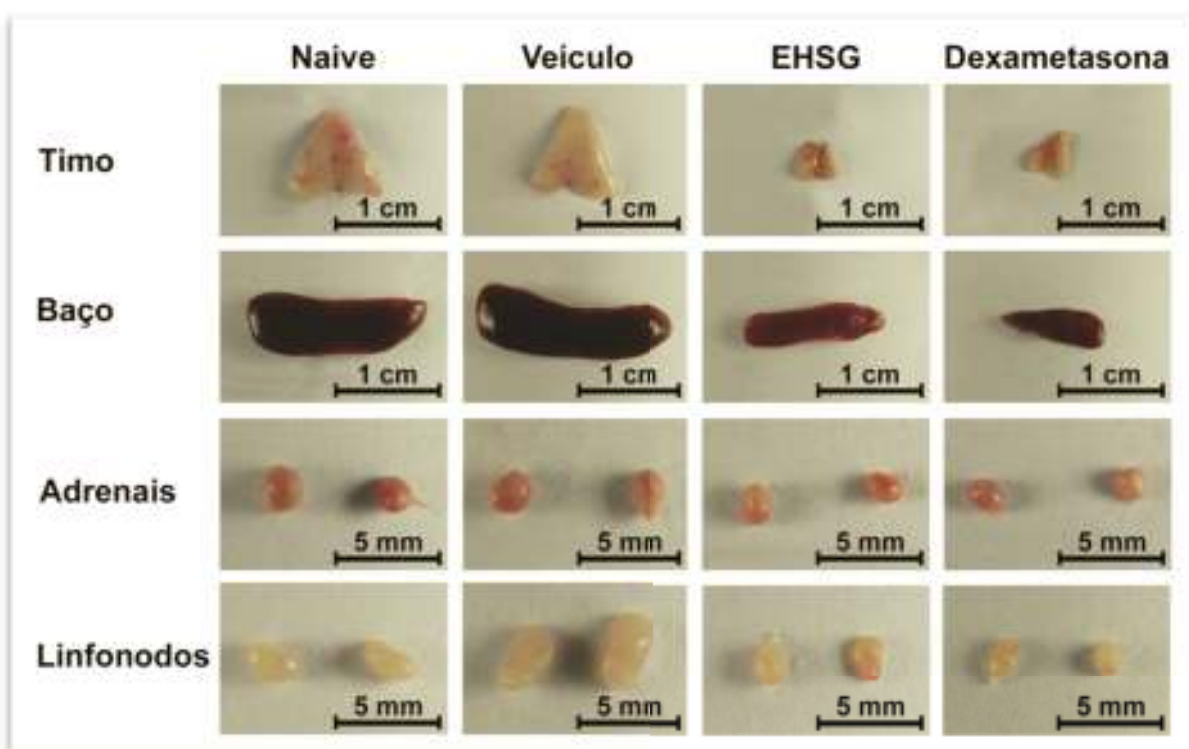


FIGURA 20. Efeito da múltipla aplicação tópica do EHSB sobre aspectos macroscópicos do timo, baço, das adrenais e dos linfonodos auriculares dos animais. Fotos representativas dos órgãos retirados e pesados dos animais que foram tratados durante 7 dias (12/12 h) com a concentração do EHSB (1 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) ou veículo.

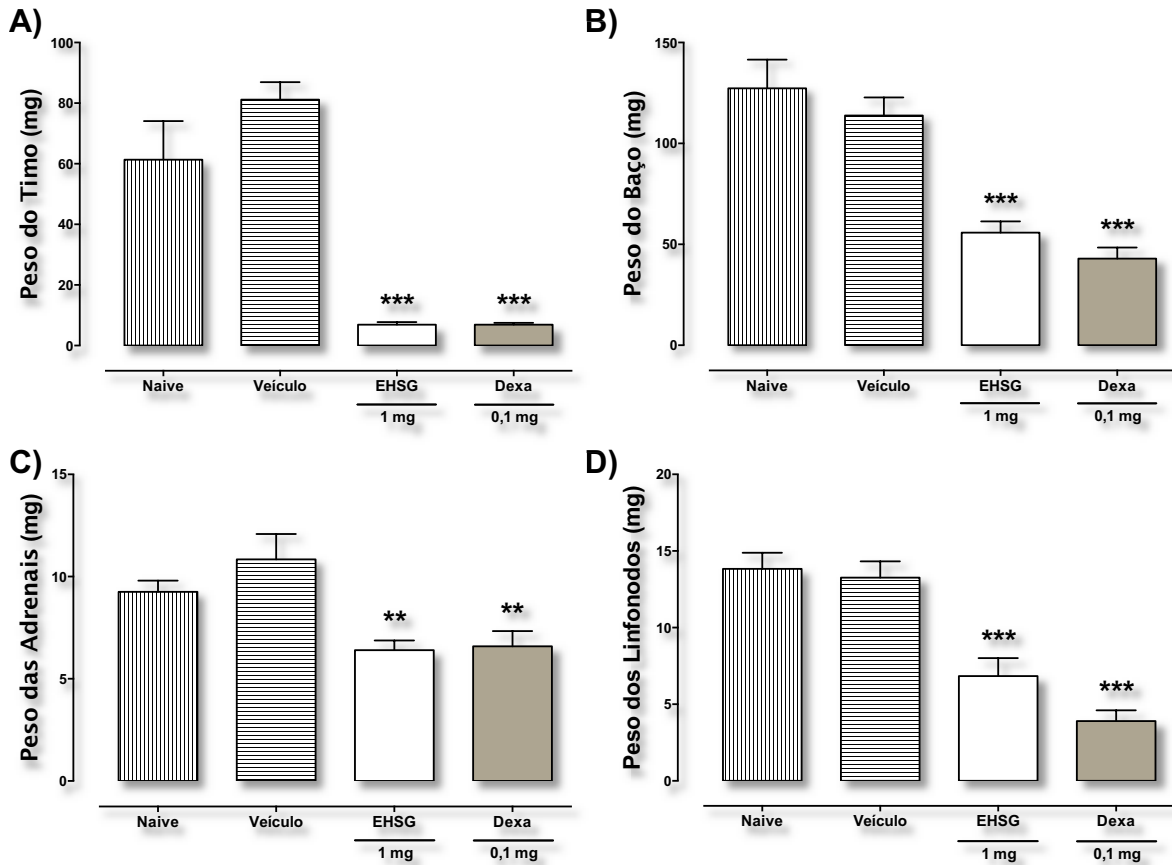


FIGURA 21. Efeito da múltipla aplicação tópica do EHS sobre o peso do timo, baço, das adrenais e dos linfonodos auriculares dos animais. Os animais foram tratados durante 7 dias (12/12 h) com a concentração do EHS (1 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) ou veículo. As barras representam a média \pm EPM (n= 5-7) do (A) peso do timo, (B) baço, (C) das glândulas adrenais e (D) dos linfonodos auriculares. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo.

Os estudos de genotoxicidade são utilizados para detectar o potencial de uma substância em causar mutações genéticas e cromossômicas. Foi utilizada a medula óssea do fêmur dos animais submetidos ao tratamento repetido com o EHSG (1 mg/orelha) e dexametasona (0,1 mg/orelha) para avaliar as alterações cromossômicas promovidas por estes tratamentos. O grupo controle positivo que recebeu ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) 24 h antes da eutanásia dos animais demonstrou aumentar o score ($354,8 \pm 15,5$) nas células da medula óssea, quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo ($182,5 \pm 10,2$). Já o grupo que recebeu o tratamento com o EHSG demonstrou não causar danos cromossômicos, inclusive diminuindo em $41,0 \pm 6,8\%$ ($P < 0,01$), quando comparado ao grupo veículo. Da mesma forma, o tratamento com dexametasona também promoveu a proteção das células em $35,1 \pm 4,5\%$ ($P < 0,01$) (FIGURA 22).

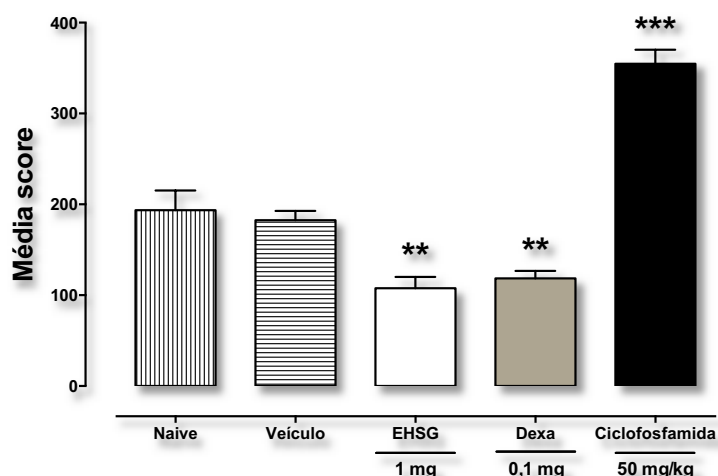


FIGURA 22. Efeito da múltipla aplicação tópica do EHSG sobre o dano ao DNA. Foram analisadas as células da medula óssea dos animais tratados durante 7 dias (12/12 h) com EHSG (1 mg/orelha), dexametasona (0,1 mg/orelha) ou veículo. O grupo ciclofosfamida (controle positivo) recebeu ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p.) 24 h antes da coleta das amostras. As barras representam a média \pm E.P.M. de 150 células analisadas por grupo. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,01$ foram indicativo de significância quando comparados ao grupo veículo.

5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EHSO SOBRE LINHAGENS DE QUERATINÓCITOS EPIDERMICOS HaCaT E SOBRE MACRÓFAGOS RAW 264.7.

Com o intuito de avaliar a ação direta do EHSO sobre a população de linhagens de queratinócitos epidérmicos HaCaT e macrófagos RAW 264.7 foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelos métodos MTT e vermelho neutro.

O tratamento com EHSO (3 – 1000 µg/mL) não evidenciou nenhuma alteração na viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCaT nas concentrações mais baixas, demonstrando-se citotóxico nas concentrações mais altas de 300 µg/mL e 1000 µg/mL (FIGURA 23A e 23B). Já na linhagem de macrófagos RAW 264.7, foi observado que apenas a concentração de 1000 µg/mL se mostrou citotóxica (FIGURA 23C e 23D). Além disso, algumas concentrações do EHSO causaram aumento na porcentagem de células viáveis (FIGURA 23D), sugerindo possível efeito sobre a proliferação dessas células.

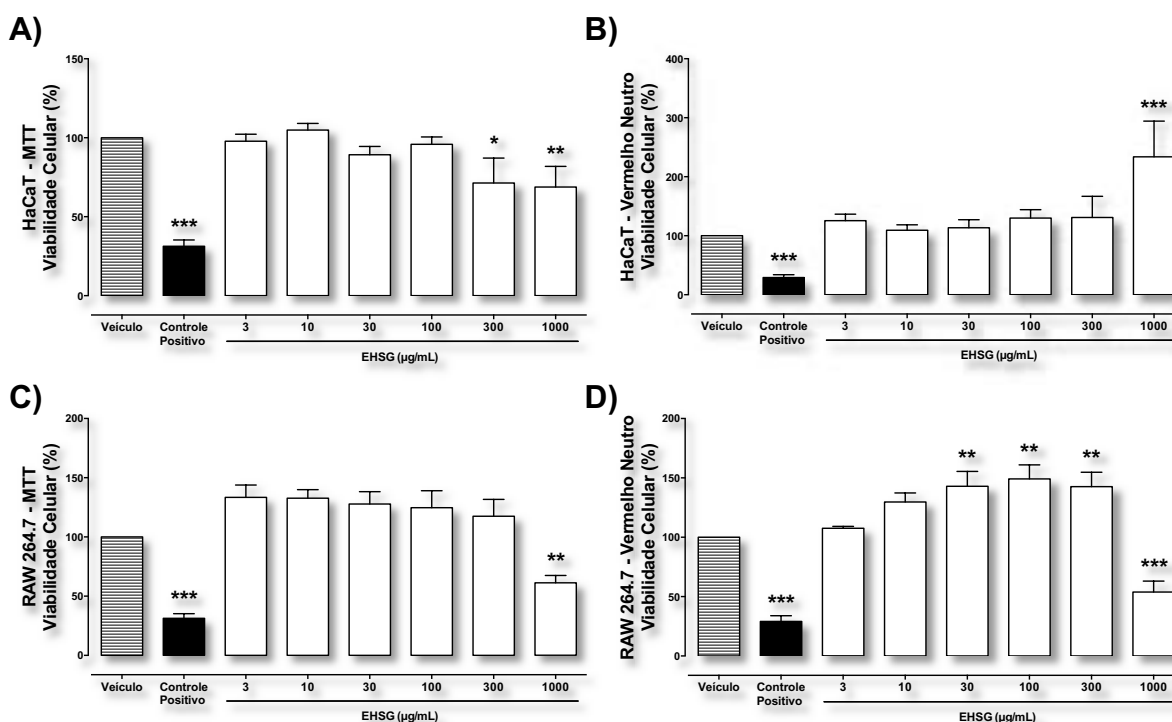


FIGURA 23. Efeito EHSO sobre o ensaio de viabilidade celular de queratinócitos epidérmicos HaCaT e macrófagos RAW 264.7. O efeito do EHSO sobre a viabilidade celular de linhagem de queratinócitos epidérmicos HaCaT (A e B) e macrófagos RAW-264.7 (C e D) foi avaliado pelos ensaios de MTT (A e C) e vermelho neutro (B e D). Os tratamentos com EHSO (3 – 1000 µg/mL) ou veículo foram realizados 24 h antes de cada ensaio. As barras verticais representam a média ± EPM de 3 experimentos. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. * P<0,05, ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo.

Para verificar a ação do EHSg sobre a proliferação de macrófagos, foi realizado o ensaio de cristal violeta. As células foram tratadas 24 h antes com o veículo (0,2% DMSO, diluído no meio de cultivo) ou o EHSg (3 – 300 µg/mL). Todas as concentrações utilizadas do EHSg promoveram aumento da proliferação celular em média 80,12% ($P < 0,001$) em comparação ao grupo que recebeu apenas o veículo (FIGURA 24).

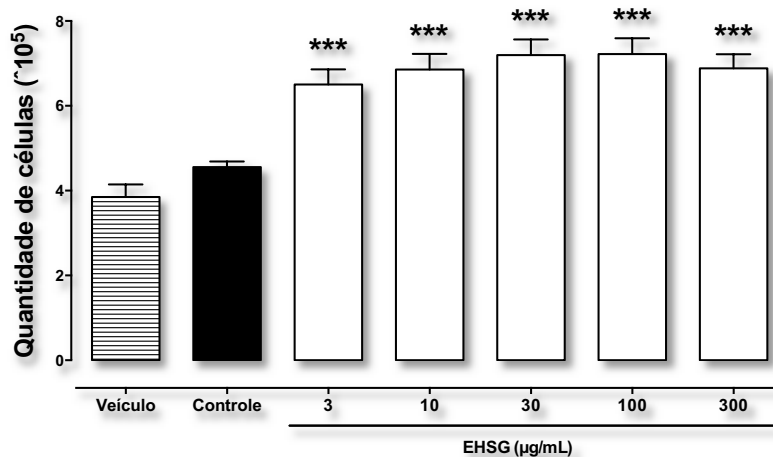


FIGURA 24. Efeito EHSg sobre o ensaio de proliferação celular em macrófagos RAW 264.7. O efeito do EHSg sobre a proliferação celular em linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi avaliado pelo ensaio de cristal violeta. Os tratamentos com EHSg (3 – 300 µg/mL) ou veículo foram realizados 24 h antes do ensaio. As barras verticais representam a média \pm EPM de 3 experimentos. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo.

Durante os ensaios de viabilidade e proliferação celular, foi observado que o tratamento com o EHSg promovia alteração na morfologia normal dos macrófagos cultivados. Para confirmar esta alteração, as células foram semeadas em lamínulas dentro de placas de 24 poços, após a aderência completa das células, foi então realizado o tratamento com o EHSg (3 – 300 µg/mL) ou veículo (0,2% DMSO, diluído no meio de cultivo). Pode-se observar que o tratamento com o EHSg altera a morfologia dos macrófagos de forma dependente da concentração. O tratamento com a concentração de 300 µg/mL causou aumento no tamanho dos macrófagos, as células parecem mais espalhadas e com mais prolongamentos, conforme a FIGURA 25.

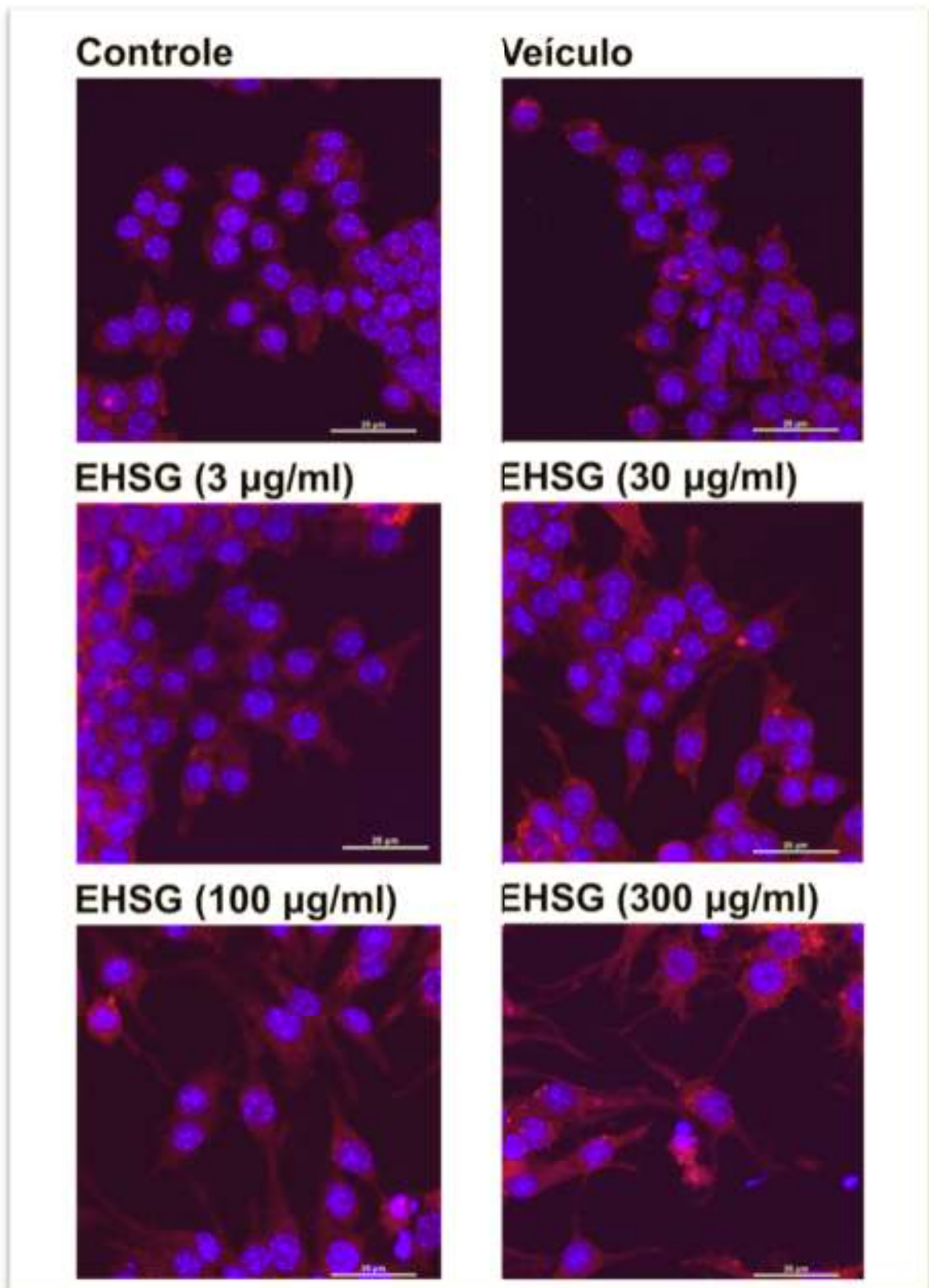


FIGURA 25. Efeito do EHSB sobre a morfologia de linhagem de macrófagos RAW 264.7. Fotos representativas do efeito do EHSB e veículo sobre a morfologia celular em linhagem de macrófagos RAW 264.7. Os tratamentos com EHSB (3 – 300 µg/mL) ou veículo foram realizados 24 h antes do ensaio e então feito citomarcção para F-actina e DAPI, e as imagens capturadas em microscópio confocal, ampliação de 600x e escala de 25 µm.

Para avaliar se o EHSG também poderia estar alterando o *burst* respiratório dos macrófagos RAW 264.7, foi quantificado a produção de NO e espécie reativas de oxigênio (ROS) nestas células. Realizou-se então um ensaio utilizando a sonda DAF-FM para quantificação de NO e a sonda DCF-DA para quantificação de ROS. Quando realizado o tratamento com EHSG (3 – 300 µg/mL) ou veículo 24 h antes da indução com LPS (50 ng/mL) + IFN-γ (5 ng/mL) para produção de NO ou TPA (100 ng/mL) para produção de ROS, observou-se que as concentrações de 3 µg/mL e 10 µg/mL do EHSG promoveram um aumento na produção de NO de $36,4 \pm 7,2\%$ e $29,4 \pm 5,1\%$, respectivamente (FIGURA 26A). Entretanto, a concentração de 300 µg/mL causou redução na produção de ROS de $28,5 \pm 3,5\%$ (FIGURA 26B), todos comparados ao grupo que recebeu apenas o veículo. Quando foi realizado o tratamento 12 h após a indução, não foi observado alteração significativa na produção de NO e ROS (FIGURA 26C e 26D).

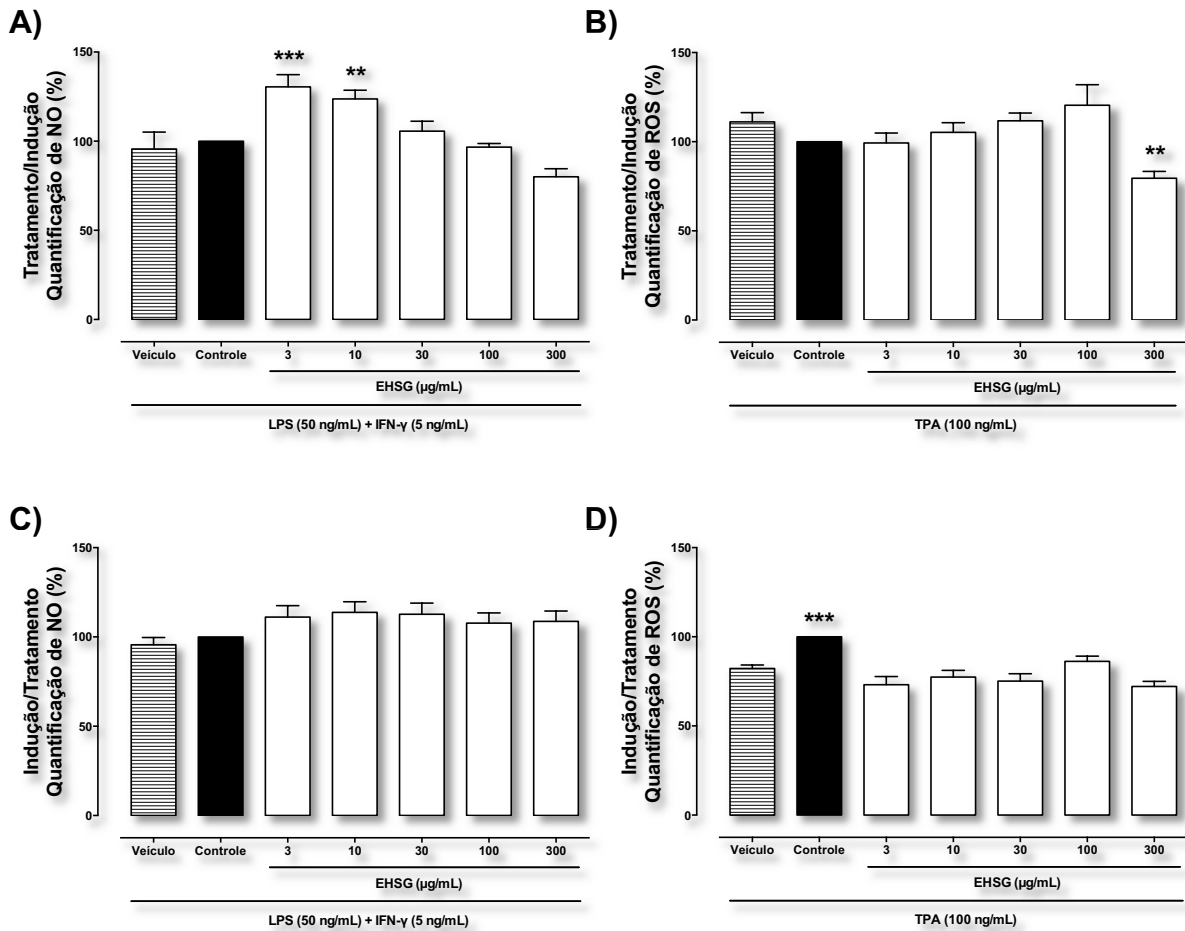
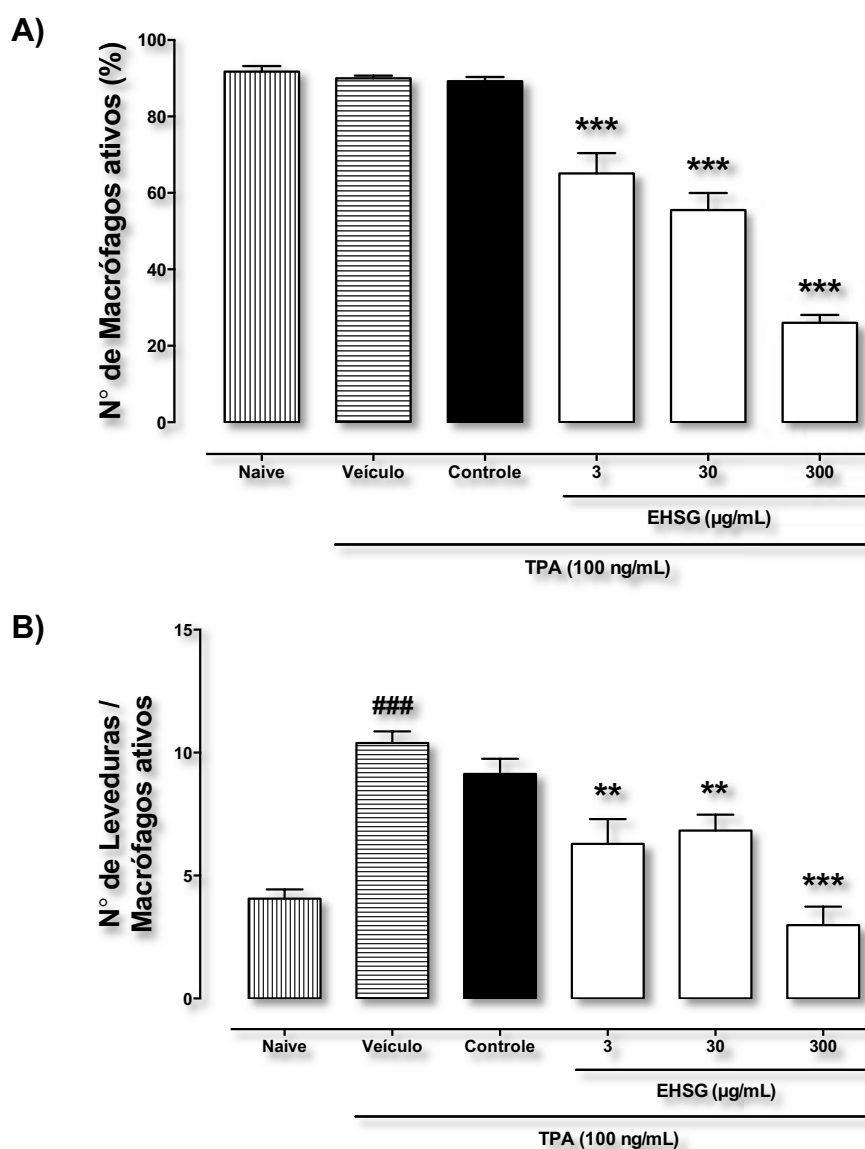


FIGURA 26. Efeito do EHSG sobre o *burst* respiratório de linhagem de macrófagos RAW 264.7. O *burst* respiratório foi avaliado pela quantificação de NO (A e C) e ROS (B e D) produzidos por macrófagos induzidos por LPS (50 ng/mL) + IFN-γ (5 ng/mL) e TPA (100 ng/mL) respectivamente, tratados com EHSG (3 – 300 μg/mL) ou veículo 24 h antes (A e B) ou 12 h após (C e D) da indução. A quantificação foi realizada leitura de fluorescência produzida pela reação utilizando a sonda DAF-FM (NO) ou DCF-DA (ROS). As barras verticais representam a média ± EPM de 3 experimentos. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** P<0,01 e *** P<0,001 foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo.

Visto que o EHSG alterou a morfologia normal da linhagem de macrófagos RAW 264.7, promovendo maior quantidade de prolongamentos, ele também poderia estar interferindo na função fagocítica dos macrófagos. Portanto, foi verificada a capacidade dos macrófagos pré-tratados com o EHSG nas concentrações de 3, 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$ ou veículo e induzidos com TPA (100 ng/mL) fagocitarem cepas de leveduras, avaliando o número de macrófagos ativos (FIGURA 27A e 27C) e a sua capacidade fagocítica (FIGURA 27B e 27C). Observou-se que o tratamento com todas as concentrações utilizadas do EHSG diminuíram o número de macrófagos ativos e o número de leveduras por macrófagos, sendo que a maior inibição foi promovida pela maior concentração (300 $\mu\text{g/mL}$), reduzindo em $71,1 \pm 2,3\%$ ($P < 0,001$) e $71,3 \pm 7,2\%$ ($P < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo.



C)

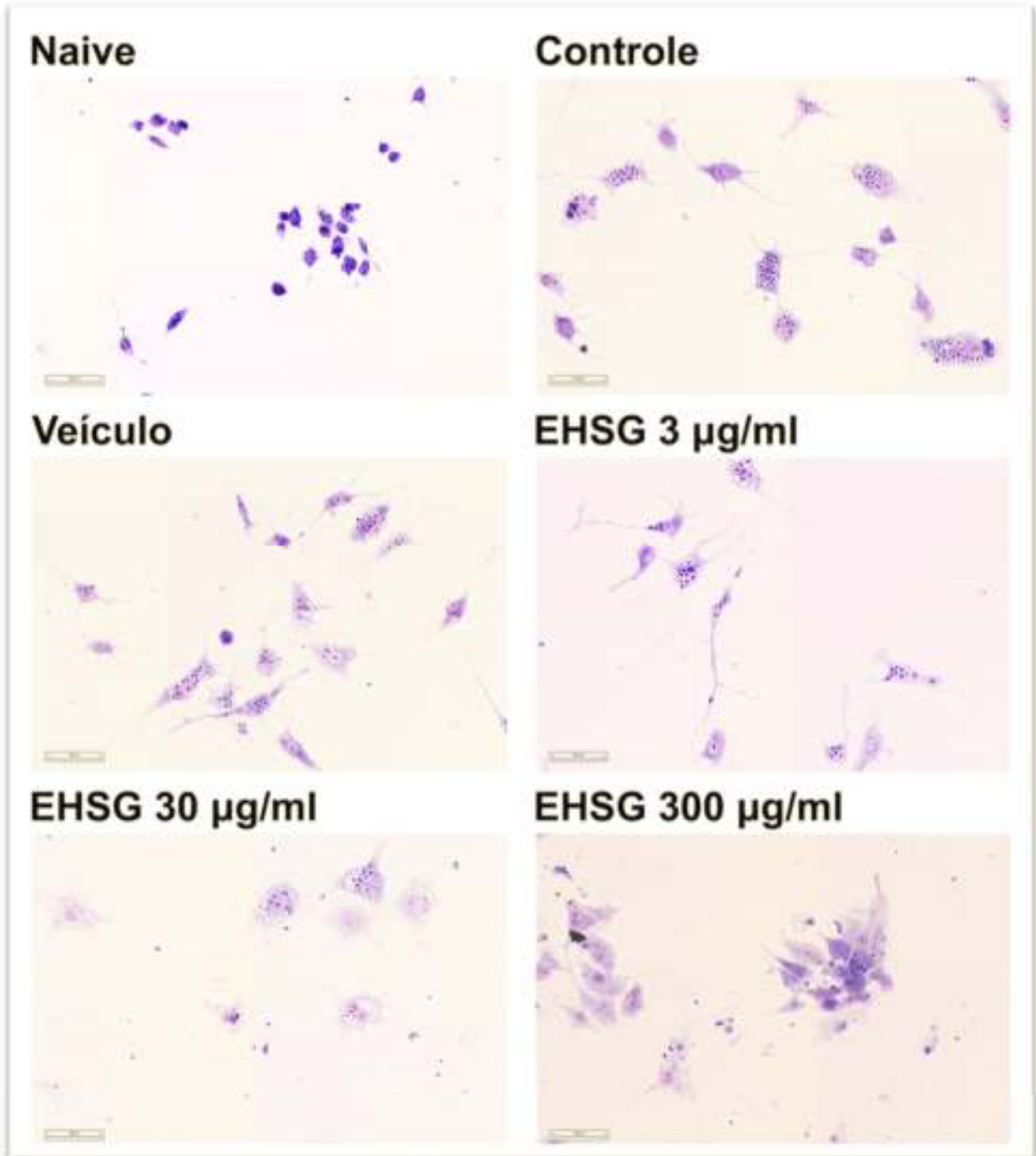


FIGURA 27. Efeito do EHS sobre a atividade fagocítica da linhagem de macrófagos RAW 264.7. Os macrófagos foram tratados com EHS (3 – 300 µg/mL) ou veículo 24 h antes da indução TPA (100 ng/mL). 12 h após a indução foram adicionadas 10 leveduras por macrófago por 2h. As células foram então fixadas e coradas com Giemsa 10%. Foram contabilizados o (A) número de macrófagos ativados a partir da análise de 100 macrófagos por lâmina e o (B) número de leveduras fagocitadas por cada macrófago ativados. As barras verticais representam a média \pm EPM de 2 experimentos em duplicata. A análise estatística entre os grupos foi verificada através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo veículo. #### $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo naive. (C) Fotos representativas do efeito do EHS e veículo sobre a atividade fagocítica de macrófagos.

Uma vez que o EHSG alterou a morfologia normal e diminuiu a função fagocítica de macrófagos, o próximo passo foi averiguar a ativação destas células. Para isso foi realizado o tratamento das células com o EHSG (3; 30 e 300 µg/mL) ou veículo e feito uma imunomarcação para CD54 (ICAM-1) na ausência (FIGURA 28A) e na presença de TPA (100 ng/mL) (FIGURA 28B). O CD54 é marcador de superfície de várias células, inclusive de macrófagos, que tem sua expressão aumentada quando as células são estimuladas por mediadores inflamatórios. Quando avaliamos os resultados do experimento sem a indução das células com TPA e comparamos os grupos que receberam o tratamento com o veículo e a concentração mais alta do EHSG (300 µg/mL), observamos que o número de células que não expressam o CD54 (CD54 Neg) passou de $14,4 \pm 0,3\%$ para $52,5 \pm 0,6\%$, respectivamente. Assim como, o número de células que expressam baixa quantidade de CD54 (CD54 Low) passou de $37,5 \pm 1,0\%$ para $28,4 \pm 0,3\%$ e, as que expressam grande quantidade de CD54 (CD54 High) passou de $48,1 \pm 1,1\%$ para $19,0 \pm 0,8\%$ pelo tratamento com EHSG.

Da mesma forma, os resultados do experimento com a indução das células com TPA mostrou que o número de células CD54 Neg passou de $45,9 \pm 3,1$ no veículo para $63,5 \pm 1,3\%$ no EHSG 300 µg/mL e, o número de células CD54 High passou de $32,7 \pm 1,0\%$ no veículo para $13,1 \pm 0,2\%$ no EHSG 300 µg/mL. Assim, os resultados obtidos mostram que o EHSG esta invertendo o perfil de ativação nos macrófagos e promovendo a inibição da sua ativação.

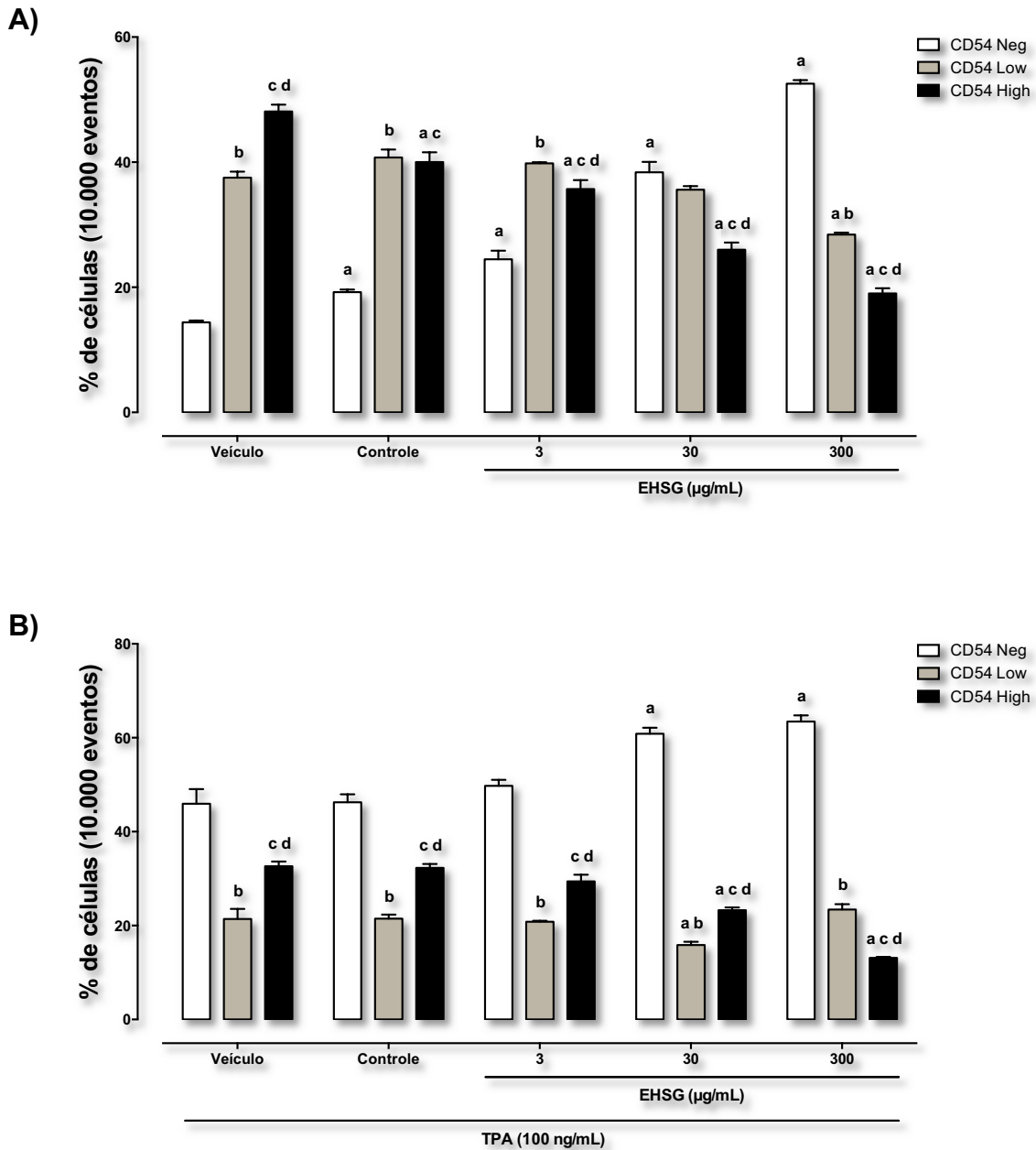


FIGURA 28. Efeito do EHS sobre a ativação celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7. (A) Efeito do EHS sobre a ativação celular de macrófagos sem indução e **(B)** induzidos por TPA (100 ng/mL). Os macrófagos foram tratados com EHS (3 – 300 µg/mL) ou veículo 24 h antes do procedimento ou da indução com TPA. As células foram imunomarcadas com anti-CD54 e analisadas por citometria de fluxo. As barras verticais representam a média ± EPM de 3 leituras em duplicata. A análise estatística foi verificada pela análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste comparação múltipla de Newman-Keuls ou Dunnett's. "a" P<0,05 indicativo de significância comparando com o respectivo veículo, "b, c, d" P<0,05 indicativo de significância comparando grupo Low com Neg, High com Neg e High com Low, respectivamente, do mesmo tratamento.

Avaliamos também o efeito do EHSO sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 produzidas pela linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. As células foram tratadas com EHSO (3; 30 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou veículo 24 h antes de receberem o estímulo por LPS (50 ng/mL). 12 h após a indução, o sobrenadante das células foi processado conforme as informações do Kit utilizado para quantificação das citocinas. O tratamento com EHSO reduziu a quantidade de TNF- α em $17,5 \pm 1,0\%$ ($P < 0,001$) com a maior concentração (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), quando comparado com o grupo veículo (FIGURA 29A). Contudo, o efeito do extrato sobre a quantidade de IL-6 não foi significativo (FIGURA 29B).

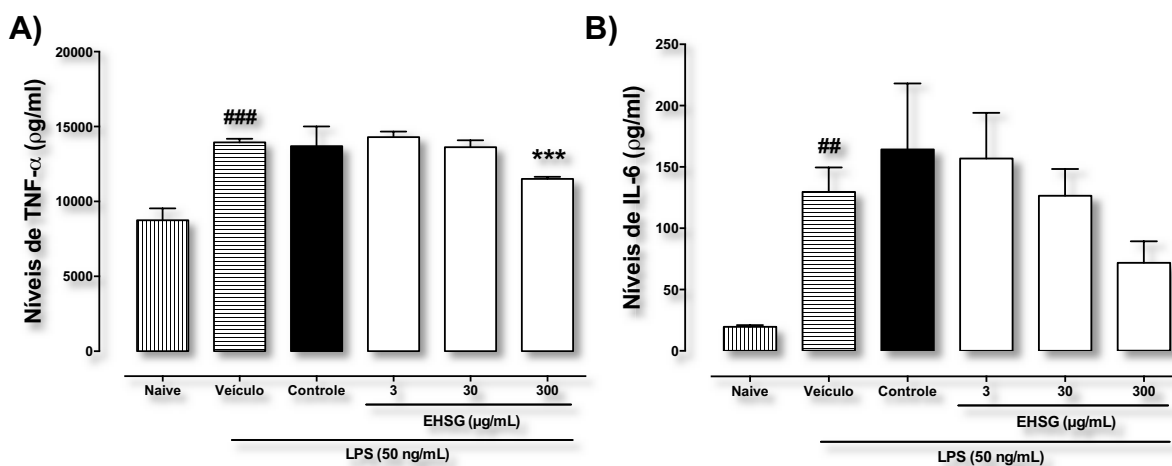


FIGURA 29. Efeito do EHSO sobre a liberação de citocinas TNF- α e IL-6 pela linhagem macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. As células foram tratadas com EHSO (3 – 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou veículo 24 h antes da indução com LPS (50 ng/mL). 12 h após a indução, o sobrenadante foi coletado e processado conforme recomendações do fabricante do Kit para dosagem das citocinas (A) TNF- α e (B) IL-6 por citometria de fluxo. As barras verticais representam a média \pm EPM de 3 leituras em duplicata. A análise estatística foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste comparação múltipla de Newman-Keuls. ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ foram indicativos de significância quando comparados ao grupo naive; *** $P < 0,001$ foi indicativo de significância quando comparado ao grupo veículo.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O gênero *Sapium* possui várias espécies que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversos males, muitos dos quais estão envolvidos os processos inflamatórios (PANTHONG *et al.*, 1998; WENIGER *et al.*, 2005). No entanto, os estudos relacionados a esta espécie ainda são escassos e é evidente que ainda é necessário um amplo trabalho para estudar e compreender melhor as atividades biológicas e as propriedades farmacológicas presentes nas espécies deste gênero. Portanto, essas lacunas no entendimento das atividades biológicas destas plantas criam uma grande oportunidade de novas pesquisas sobre a fitoquímica e farmacologia dos compostos químicos existentes dentro do gênero *Sapium*. Ainda, muitas espécies deste gênero sequer foram exploradas, proporcionando oportunidades para encontrar novos compostos bioativos, bem como, promissoras propriedades medicinais a partir de extratos. Estas pesquisas também podem levar a possibilidades de encontrar novas fontes de drogas para futuras aplicações, tais como fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014).

De acordo com a revisão bibliográfica de Al Muqarrabun (2014), há uma grande chance de descobrir novos componentes químicos de plantas do gênero *Sapium*, uma vez que apenas 6 das 23 espécies do gênero possuem estudos fitoquímicos até o momento (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014). Neste contexto, visto que a espécie nativa do sul do Brasil, *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax não apresenta nenhum estudo referente as suas propriedades farmacológicas ou fitoquímicas, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar as propriedades anti-inflamatórias desta espécie. Para isso, utilizamos o extrato hidroalcoólico das folhas e testamos sua atividade biológica em diversos modelos animais de inflamação cutânea e em células.

Inicialmente, testamos qual seria a melhor forma de extração para a produção do extrato das folhas da *S. glandulatum*. Foram utilizados três graduações etanólicas distintas (50%, 70% e 90%) para a preparação dos extratos, e estes foram testados no modelo de inflamação de orelha agudo induzido por TPA, utilizando a mesma dose de cada extrato. O TPA é um éster de forbol e um dos

principais constituintes ativos presentes no óleo de cróton, que é uma mistura de lipídios extraídos da espécie vegetal *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), frequentemente utilizado como agente flogístico, uma vez que, é capaz de promover resposta inflamatória bastante intensa, assemelhando-se a algumas doenças cutâneas (GABOR, 2000). O TPA quando aplicado topicamente induz uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da espessura da orelha, como resultado do extravasamento celular, cujo pico máximo é seis horas após a sua administração. Diversas evidências experimentais demonstram que a exposição da pele ao TPA induz uma reação inflamatória forte no tecido, semelhante à várias doenças de pele (VERMA *et al.*, 2006; HVID *et al.*, 2008). As características da resposta inflamatória induzida pela aplicação do TPA são justificadas pelo seu mecanismo, que estimula a ativação de uma ampla variedade de vias de sinalização intracelular, através da ativação direta da PKC, e em sequência quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPKs), fosfolipase A₂ (PLA₂), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX), que por sua vez ativa a síntese e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular (DE BERNARDIS *et al.*, 1994; MURAKAWA *et al.*, 2006). Alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF-κB e a AP-1, são ativados com a ativação da via da MAPK pela PKC. Esses fatores de transcrição nuclear tem a função de regular a produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (GLASS e OGAWA, 2006; PASCUAL e GLASS, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007). Nos tecidos ocorre aumento dos metabólitos do AA, o que parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após a aplicação de TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006). Os produtos do metabolismo do AA aumentam a permeabilidade vascular, resultando na formação de edema durante o processo inflamatório (BRALLEY *et al.*, 2007) e estão associados ao desencadeamento de vias inflamatórias dependentes das enzimas COX e LOX. Além disso, contribuem para o aumento da permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento plasmático e a formação do edema (IKUTA *et al.*, 2008). Vinte e quatro horas após a aplicação do TPA a infiltração celular atinge seu pico mais elevado (BRADLEY *et al.*, 1982). Nesse contexto, a administração tópica de TPA é considerado um modelo válido para a

identificação de compostos com atividade anti-inflamatória, pois é capaz de estimular parâmetros inflamatórios como a formação de edema e migração celular.

Conforme descrito na literatura, a administração tópica de TPA apresentou um aumento significativo na espessura das orelhas dos camundongos. O teste com os diferentes extratos da *S. glandulatum* mostrou que o extrato EH90% foi o mais eficaz em inibir o edema, possivelmente por ser a graduação alcoólica que melhor extrai os compostos ativos responsáveis pela sua atividade anti-edematogênica. Uma vez identificado que o extrato hidroalcoólico 90% das folhas da *S. Glandulatum* (EHSG) foi o que apresentou melhor atividade, optamos por dar continuidade ao trabalho apenas com este extrato. Por sua vez, um padrão de efeito dependente da dose ao inibir a formação de edema foi observado no tratamento tópico com o EHSG, sugerindo que o extrato apresenta uma boa atividade anti-edematogênica. A mesma resposta foi observada no grupo controle positivo, onde foi realizado a administração tópica de dexametasona (droga referência), que também foi capaz de inibir a formação do edema como esperado.

Os glicocorticóides, como a dexametasona, promovem seu efeito anti-inflamatório ao interagirem com os receptor de glicocorticóide (GR), inibindo a expressão de vários genes inflamatórios responsáveis pela produção de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão. A inibição da expressão gênica de diversos componentes inflamatórios ocorre principalmente através da inibição de fatores de transcrição como o NF- κ B e a AP-1 (FRY *et al.*, 2007). Eles também agem restringindo a expansão clonal de linfócitos T helper, por inibirem a transcrição do gene responsável pela IL-2 e também interferem na transcrição de outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, etc.) (FOX, 2006).

Na tentativa de buscar os compostos ativos presentes no extrato, testamos as duas frações obtidas a partir do extrato bruto, SGFD e SGFA. No entanto, apesar de inibirem a formação do edema, este efeito foi bem menor do que o observado com o tratamento utilizando o extrato bruto. Provavelmente o processo de fracionamento diminuiu a quantidade de compostos biologicamente ativos, ou ainda, o sinergismo dos compostos presentes no extrato seja essencial para o efeito apresentado pelo extrato bruto. Essa análise precisa ser melhor explorada química e farmacologicamente.

Tem sido relatado que as plantas do gênero *Sapium* são constituídas de vários tipos de compostos químicos, incluindo principalmente as classes de

flavonóides e terpenóides, dentre outros compostos de outras classes. No entanto, dentre estes compostos, os terpenóides tem sido os constituintes mais encontrados nas espécies estudadas atualmente deste gênero (AL MUQARRABUN *et al.*, 2014). O grupo de compostos chamados de terpenóides apresentam uma relevância biológica diversificada e têm atraído mais atenção nos últimos anos (WAGNER e ELMADFA, 2003). Mais de 40.000 compostos terpenóides já foram identificados, sendo encontrados principalmente em frutas e vegetais (THOPPIL e BISHAYEE, 2011). Em bactérias e leveduras, os compostos terpenóides são metabolitos básicos (THOPPIL e BISHAYEE, 2011). No entanto, nas plantas estes compostos são metabolitos secundários importantes, sintetizados a partir dos precursores mevalonato ou pirofosfato de isopentenilo, que servem como hormônios (ex. giberelinas e fitoesteróis), pigmentos fotossintéticos (ex. carotenoides), transportadores de elétrons (ex. ubiquitina) e constituintes estruturais nas membranas celulares (ex. fitoesteróis) (MCGARVEY e CROTEAU, 1995). Os efeitos dos compostos terpenóides têm sido referidos como sendo benéfico para o corpo humano, visto que muitos deles apresentam atividades biológicas, tais como: antioxidantes, anticancerígenas e antibióticas (WAGNER e ELMADFA, 2003; THOPPIL e BISHAYEE, 2011). O triptólido, que é um di-terpenóide extraído da *Tripterygium wilfordii*, tem sido considerado um anti-inflamatório para doenças das vias aéreas, autoimunes e como anticâncer (TAO *et al.*, 2008; ZHANG e MA, 2010; MO *et al.*, 2011). A maioria dos terpenóides encontrados apresentam potencial para induzir apoptose em células cancerígenas (THOPPIL e BISHAYEE, 2011) e seus efeitos anti-inflamatórios são exercidos através da inibição da via de sinalização do NF- κ B (DE LAS HERAS e HORTELANO, 2009).

Ainda, em um trabalho recente de Ku e Lin (2013) foi analisada a atividade anti-inflamatória de 27 compostos terpenóides diferentes como imunomoduladores da resposta Th1/Th2 em esplenócitos primários de camundongos. Eles observaram que alguns terpenóides (ex. eucaliptol, linalol, lupeol, entre outros) possuem potencial anti-inflamatório *in vitro*, com forte inclinação de ação na resposta Th2, inibindo a liberação das citocinas IL-4 e IL-5. Outros terpenóides ainda (por ex. triptólido, diosgenina, ácido betulínico e β -sitosterol) inibiram significativamente a produção das citocinas IL-2 (Th1) e IL-10 (Th2), ao mesmo tempo, o que sugere que estes compostos terpenóides têm um potencial anti-inflamatório através da inibição de respostas imunitárias de células T (KU e LIN, 2013).

Já os flavonóides, outro grupo de compostos relevantes facilmente encontrados em plantas do gênero *Sapium*, pertencem a um grupo de substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis e são encontradas em frutas, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, folhas, flores, chá e vinho (MIDDLETON, 1998). Mais de 4000 variedades de flavonóides já foram identificados (HOLLMAN e KATAN, 1997), muitos dos quais são responsáveis pelas cores atraentes de flores, frutos e folhas (DE GROOT e RAUEN, 1998). Os flavonóides ocorrem como agliconas, glicosídeos e derivados metilados, e são categorizados em flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1996). Até 50 anos atrás, as informações sobre os mecanismos de ação dos flavonóides era escasso. No entanto, há séculos é sabido que os derivados de origens vegetal possuem um amplo espectro no que se diz respeito a atividade biológica, e os flavonóides são uns dos grandes responsáveis. Há relatos na literatura que os flavonóides exercem uma grande variedade de efeitos biológicos, tais como: ação antimicrobiana, antiviral, antiaterosclerose, cardioprotetor, antiulcerogênico, citotóxica, antineoplásico, mutagênico, antidiabético, anti-inflamatória, antioxidante, antienvhecimento, antihepatotóxico, anti-hipertensivo, atividade hipolipidêmica e antiplaquetária (FORMICA e REGELSON, 1995; RATHEE *et al.*, 2009).

Vários flavonóides são reportados por possuir atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*. Apesar de não ser totalmente compreendido, vários mecanismos de ação são propostos para explicar a ação anti-inflamatória *in vivo*. O mecanismo mais importante para sua ação anti-inflamatória é a inibição de enzimas produtoras de eicosanóides, incluindo a fosfolipase A₂, ciclooxigenase e lipoxigenase, reduzindo então a concentração de prostanóides e leucotrienos (KIM *et al.*, 2004), assim como outros mediadores do processo inflamatório tais como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (TUNON *et al.*, 2009). Outros mecanismos incluem a inibição da libertação de histamina, da fosfodiesterase, e proteínas quinase de ativação da transcriptase (RATHEE *et al.*, 2009).

Assim, uma vez que, os compostos terpenóides e flavonóides são os mais comuns encontrados nos extratos vegetais das plantas do gênero *Sapium*, é possível que estes compostos estejam presentes em nosso extrato e sejam os responsáveis pela atividade anti-edematogênica apresentada pelo EHSB. Dado que, o TPA promove o processo inflamatório cutâneo através da ativação direta da PKC,

promovendo ativação da PLA₂, aumento de AA e conseqüentemente leucotrienos e prostanoídes, e como descrito anteriormente, os compostos como flavonóides são capazes de inibir esta via de sinalização durante a inflamação.

Com o objetivo de verificar se a atividade anti-inflamatória observada com a administração tópica do EHSG ocorreria também sistemicamente, foi realizada a administração oral do extrato e os animais foram submetidos ao modelo de edema de orelha por TPA e edema de pata por carragenina. Novamente o EHSG foi capaz de reduzir o processo inflamatório em ambos os modelos de inflamação.

O edema da pata induzido por carragenina é um teste utilizado para determinar a atividade anti-inflamatória sistêmica de novas drogas (PETERSSON *et al.*, 2001). A carragenina é um colóide obtido por extração a partir de certas espécies de algas vermelhas. Sua administração na pata promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores, que contribuem também à intensa migração celular para o sítio inflamatório (ZACHAROPOULOS e PHILLIPS, 1997). O desenvolvimento de edema na pata após a injeção de carragenina é descrito como um evento bifásico, em que vários mediadores operam em sequência para produzir a resposta inflamatória. Histamina, serotonina e bradicinina são os primeiros mediadores detectáveis na fase inicial da inflamação. A segunda fase, ou fase tardia, esta intimamente relacionada com a aceleração de inchaço, envolvendo a produção elevada de prostaglandinas, atribuído à indução da ciclooxigenase induzida (COX-2) e alta infiltração de neutrófilos. A inflamação local e/ou sistêmica está associada com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013). O efeito apresentado pelo EHSG neste modelo mostra novamente que os compostos devem estar interagindo de modo inibitório sobre mediadores comuns produzidos no processo inflamatório desencadeado pelos agentes flogísticos. Podemos destacar as vias da COX e prostaglandinas, a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 e a infiltração celular. Compostos do tipo flavonoides já demonstram efeito anti-inflamatório nos modelos de inflamação induzido por carragenina e TPA. Por exemplo, a quercetina, morina (flavonóis) e hesperitina (flavanona) apresentam efeito anti-inflamatório no modelo da carragenina, inibindo tanto a fase inicial como tardia da inflamação (ROTELLI *et al.*, 2003). No modelo de edema de pele induzida por TPA, isoflavonas de soja demonstraram potencial anti-inflamatório e anti-proliferativo por inibirem a COX-2, a

produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 e a ativação de NF- κ B (KHAN *et al.*, 2012).

Outro evento comum no processo inflamatório e muito claramente presente nos modelos do TPA e da carragenina é a infiltração leucocitária. Este é um importante parâmetro, pois o aumento do número de leucócitos polimorfonucleados é uma característica presente em diversas doenças inflamatórias cutâneas (ARATANI *et al.*, 1999). Na verdade, todos os eventos que acontecem anteriormente são relacionados e são responsáveis para que ocorra a migração de modo eficiente e preciso (GABOR, 2000). Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a alcançarem o tecido inflamado, liberam uma grande variedade de substâncias, como a enzima MPO, com o objetivo de eliminar o antígeno e auxiliar na manutenção da homeostase (ARATANI *et al.*, 1999). A migração dos leucócitos para o tecido inflamado envolve a expressão de moléculas de adesão, como a P-selectina, proteína responsável pelo estabelecimento de ligações dos neutrófilos com o endotélio vascular. O que, posteriormente, permite que sejam expressas proteínas capazes de estabelecer fortes ligações dos neutrófilos com o endotélio e ocorra consequentemente a diapedese dos neutrófilos em direção ao tecido inflamado, sendo estas proteínas denominadas integrinas (SANCHEZ e MORENO, 1999).

Os neutrófilos possuem em seus grânulos a enzima MPO e esta, quando liberada, tem a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é formado durante o metabolismo oxidativo, em ácido hipocloroso (HOCl), que é um oxidante altamente citotóxico (ARATANI *et al.*, 1999). A MPO também pode catalisar a formação de radicais tirosil, que uma vez formado pode causar a peroxidação lipídica, tirosilação de lipoproteína de alta densidade, e a ligação cruzada de proteínas (HEINECKE, 2002). Ainda, catalisa a formação de hipotiocianato e promove a oxidação de grupamentos fenol e anilina (GUILPAIN *et al.*, 2008). Os produtos gerados pela MPO estão diretamente relacionado à atividade de eliminação de possíveis patógenos desempenhada pelos neutrófilos, porém, altas concentrações destes produtos no tecido podem ser prejudiciais as células adjacentes (ARATANI *et al.*, 1999). As células endoteliais sofrem efeito da MPO, pois se a célula internalizar esta enzima, produzirá oxidantes intracelulares, podendo contribuir para o aumento do dano tecidual nos processos inflamatórios. Esses são alguns dos motivos pelos quais vem sendo associada à MPO a diversas situações patológicas, principalmente nas que existe um processo inflamatório mediado por

neutrófilos (GUILPAIN *et al.*, 2008). Assim a inibição da atividade de MPO decorrente da ativação em excesso de neutrófilos durante a inflamação aguda e/ou crônica pode impedir danos teciduais (KATO *et al.*, 2003).

Desta maneira, por ser encontrada principalmente nos grânulos de neutrófilos, a MPO é um importante marcador indireto da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido lesado, e a avaliação de sua atividade está diretamente relacionada à quantidade de células que migraram para o tecido inflamado (GARRIDO *et al.*, 2004). Os resultados mostraram que o TPA e a carragenina causaram aumento na atividade enzimática da MPO, indicando um aumento da migração leucocitária para o tecido inflamado após a aplicação do agente flogístico. Esse resultado já foi bem demonstrado por outros autores. De modo importante, verificamos que o EHSg inibiu o aumento na atividade da enzima MPO nos dois modelos de inflamação e quando aplicado topicamente ou por via oral. Como esperado, a eficácia do extrato foi menor pela via oral, sugerindo que provavelmente os compostos ativos sofrem metabolização importante quando administrados por via oral. Estes dados demonstram que a escolha da via de administração é de grande importância para o sucesso do tratamento, sendo que no caso do EHSg, a via tópica foi a que se apresentou mais eficaz na redução dos processos inflamatórios cutâneas em camundongos. Alguns trabalhos neste contexto, demonstram que os tratamentos tópicos de doenças dermatológicas agregam vantagens que incluem evitar o metabolismo hepático de primeira passagem, facilidade de aplicação, menor flutuação dos níveis da droga, a realização de eficácia com uma dose diária total mais baixa, a capacidade da entrega de drogas ser mais "local específico", uma melhor adesão pelo paciente, assim como evitar riscos significativos associados com a administração oral ou intravenosa (SIGMUNDSDOTTIR, 2010). Já foi demonstrado que agentes tópicos têm a capacidade para inibir a expressão de citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, fatores de transcrição como NF- κ B, NO e prostanoídes (RHEN e CIDLOWSKI, 2005; UVA *et al.*, 2012).

Mesmo assim, a atividade anti-inflamatória apresentada tanto pela administração tópica, quanto oral do extrato, pode estar associada à redução da migração de leucócitos para o tecido inflamado. Para confirmar esta redução, foi avaliado o número de células inflamatórias e o efeito da aplicação tópica do EHSg. A análise confirmou que a quantidade de células realmente foi menor nos grupos que receberam o tratamento com o extrato. No entanto, ao observar a potência do

extrato sobre a atividade da enzima MPO, é possível que, além de estar reduzindo o número de células inflamatórias presentes no tecido lesado, o extrato poderia estar inibindo diretamente a atividade da enzima MPO. Assim, foi verificada a ação *in vitro* do EHSg sobre a atividade enzimática, mostrando que o extrato foi capaz de agir diretamente sobre a atividade da enzima MPO. Já foi demonstrado *in vitro* que o ácido ferúlico, ácido gálico, ácido cafeico, curcumina e a quercetina foram capazes de inibir a formação de tirosina por um efeito direto na inibição da enzima MPO, por se ligar ao sítio de ativação da geração do radical tirosil (KATO *et al.*, 2003). Contudo, a inibição da atividade enzimática *in vitro* pelo EHSg foi menos eficaz que a redução da atividade observada nos modelos *in vivo*, sugerindo que esta redução direta da atividade da enzima parece não ser o principal mecanismo, mas pode somar ao efeito inibitório sobre a atividade leucocitária. Esse efeito pode não ser tão significativo isoladamente, mas em conjunto aos demais efeitos pode ser de grande importância quando se trata de inflamação crônica.

Como já descrito, a ativação da PKC na epiderme de camundongos induzida por TPA promove uma intensa infiltração de neutrófilos e a expressão de diversas proteínas inflamatórias, incluindo quimiocinas derivadas de queratinócitos (CXCL1/KC), TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, COX-2, prostaglandinas, entre outros, um efeito dependente da ativação do NF- κ B (WANG e SMART, 1999; CATAISSON *et al.*, 2005; CATAISSON *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2007). Assim, citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α são peças chave no processo inflamatório cutâneo induzido por TPA, visto que os queratinócitos respondem ao estímulo da IL-1 α liberada e produzem mais IL-1 α , assim como IL-1 β , TNF- α e IL-6, promovendo e amplificando o sinal inicial da inflamação. Ao atingirem a derme, estes mediadores estimulam os fibroblastos a produzirem mais destas citocinas e fatores de crescimento, que por sua vez ativam as células endoteliais para regular a expressão de diversas moléculas de adesão (E-selectina, P-selectina, ICAM-1, VCAM-1, entre outras), que promovem a infiltração celular para o local inflamado (SPELLBERG, 2000). Ainda, já foi demonstrado que a administração de TPA na pele aumenta o nível de TNF- α no local da aplicação, e que o uso de etanercept, um antagonista de TNF- α , inibe de forma significativa o edema da pele neste modelo, mas não a infiltração celular, ambos os quais são aspectos típicos de inflamação dérmica (MURAKAWA *et al.*, 2006). Por outro lado, a citocina IL-6 é uma das responsáveis por aumentar a expressão de moléculas de adesão, tais como VCAM-1 e ICAM-1 em locais

inflamados e nas células endoteliais, e induz a produção de quimiocinas, tais como CXCL 8/IL-8, CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-3 e CCL20 a partir de muitos tipos de células (KAWASHIRI *et al.*, 2009; SUZUKI *et al.*, 2010). De fato, o bloqueio da IL-6 reduz a transmigração de neutrófilos no local inflamado (RABE *et al.*, 2007; UCHIYAMA *et al.*, 2008). Foi observado que este bloqueio da IL-6 diminui rapidamente o número de neutrófilos circulantes em animais artríticos e pacientes com artrite reumatóide (MAINI *et al.*, 2006), sugerindo que a IL-6 desempenha um papel dominante na neutrofilia (MIHARA *et al.*, 2012).

Logo, a inibição da secreção e/ou produção de citocinas chaves (IL-1 β , TNF- α e IL-6) na inflamação induzida por TPA pode ser uma das vias importantes pelo qual o EHSO esta promovendo seu efeito anti-inflamatório, reduzindo tanto o edema, quanto a migração de células polimorfonucleares, uma vez que o tratamento dos animais com o EHSO foi capaz de diminuir consideravelmente os níveis das citocinas IL-1 β e IL-6 nas amostras de tecido inflamado. Em especial, o extrato demonstrou reduzir os níveis de TNF- α , igualando ao grupo que recebeu apenas o tratamento com o veículo. Portanto, é possível que a redução do edema promovida pelo tratamento com EHSO seja originado pela diminuição dos níveis de TNF- α , em conjunto com a redução da migração leucocitária provavelmente causada pela inibição da IL-6. Esses dados podem explicar, pelos em parte, a ação anti-inflamatória da *Sapium grandulatum*.

O próximo passo para continuar a verificar o efeito biológico anti-inflamatório do EHSO foi testa-lo em um modelo crônico de inflamação de pele causada pelas múltiplas aplicações de TPA, afim de verificar o efeito frente a um processo inflamatório já estabelecido e sobre outro tipo de célula inflamatória. Apesar do EHSO ser capaz de reduzir o processo inflamatório induzido pelo agente flogístico, inibindo o edema, a atividade enzimática da MPO e NAG e o níveis das citocinas IL-1 β e TNF- α , a sua atividade não foi tão eficaz como observado nos modelos agudos. O efeito sobre o edema foi significativo apenas no 7º dia, mantendo-se até o final do experimento. Quando comparado ao tratamento com dexametasona, esta foi capaz influenciar o edema já no primeiro tratamento, no 5º dia do experimento. Essa diferença se confirma ao observamos o peso das amostras das orelhas dos camundongos retiradas no ultimo dia do procedimento.

Da mesma maneira, o tratamento com EHSO demonstrou reduzir a atividade enzimática da MPO e da NAG, sendo que esta última é considerada um indicador

indireto da presença de células mononucleares no foco inflamatório (SANCHEZ e MORENO, 1999). Porém este efeito do extrato não foi tão proeminente quanto a redução causada pelo tratamento com a dexametasona. O mesmo ocorreu com as citocinas, onde os tratamentos com o EHS e a dexametasona reduziram os níveis de IL-1 β e TNF- α , e novamente a dexametasona se mostrou mais eficaz nestes parâmetros. No caso da dosagem da citocina IL-6 no modelo crônico, apesar da visível redução dos níveis da IL-6, não foi observado diferença significativa.

Em virtude do EHS reduzir todos os parâmetros analisados no modelo agudo e crônico semelhante à dexametasona, decidimos verificar se o extrato poderia estar atuando como corticóide. Sabe-se que os glicocorticóides têm diversas funções, tais como anti-inflamatória, anti-mitótica, pró-apoptótica, vasoconstritora e imunomoduladoras. Estas propriedades estão intimamente associadas com a sua eficácia no tratamento de doenças da pele (AHLUWALIA, 1998). Segundo a revisão de Uva e colaboradores (2012), os corticóides agem de duas maneiras diferentes em nível celular, divididos em vias genômicas e não genômicas. A via genômica é a via pela ligação do cortisol ao GR, subsequentemente homodimerização dos receptores, e ligação a elementos responsivos de glicocorticóides (GREs). Quando o ligante está ausente, o receptor de glicocorticóide se encontra no citoplasma na forma complexada com proteínas, incluindo as proteínas de choque térmico HSP90 e HSP70. A ligação do cortisol ao receptor, interrompe este complexo e o GR migra para o núcleo. Após a dimerização dos receptores GR e ligação a uma sequência promotora palindrômica, é promovido a transcrição de genes com funções anti-inflamatórias, tais como a tirosina amino transferase (TAT), fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), IL-10, receptor β -adrenérgico e um antagonista do receptor de IL-1. Os glicocorticóides também regulam negativamente a expressão de genes pró-inflamatórios como citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, entre outros, por transrepressão do fator de transcrição como NF- κ B (DE BOSSCHER *et al.*, 2003; HEBBAR e ARCHER, 2003; MCMANUS, 2003). Sendo que o último mecanismo, aparentemente requer níveis de cortisol mais baixos do que o mecanismo que envolve o GRE (RHEN e CIDLOWSKI, 2005).

No caso da via não genômica, leva-se em consideração receptores ligados a membranas e segundos mensageiros, e é responsável pelos efeitos rápidos dos glicocorticóides que ocorrem em poucos minutos. Esta via não requer síntese de novas proteínas e atua modulando o nível de ativação e da responsividade de

células alvo, tais como monócitos, células T e plaquetas (UVA *et al.*, 2012). Um dos mecanismos já bem estabelecidos é a interação com fatores de transcrição, como o c-Jun. O c-Jun é um fator de transcrição reconhecido por formar homodímeros e heterodímeros com o c-Fos, a última combinação resulta na AP-1. Ambos homodímero de c-Jun e heterodímero de AP-1 estão associados com transcrição de genes inflamatórios e imunológicos. Há também evidências de interações diretas proteína-proteína entre o receptor glicocorticóide e homodímeros de c-jun e heterodímeros de AP-1, conferindo à via não genômica do cortisol uma grande parte da ação anti-inflamatória dos glicocorticóides (DE BOSSCHER *et al.*, 2003).

Ainda, parece que a via não genômica é suficientemente efetiva para mediar o processo anti-inflamatório por si só (UVA *et al.*, 2012). Em um trabalho de Tanabe e Tohnai (2002), o gene de GR em camundongos foi mutado de forma que o receptor de glicocorticóide perdeu a capacidade de dimerização, e portanto de se ligar ao DNA. Nestes camundongos transgênicos GR^{dim/dim}, os glicocorticóides apresentavam atividade apenas pela via não genômica. Foi induzido a formação de edema de orelha com TPA nos camundongos selvagens e GR^{dim/dim} e foi observado que o edema foi reduzido em ambos os animais após a administração de dexametasona. Além disso, a dexametasona suprimiu os níveis de TNF- α e IL-6 no soro, e a transcrição gênica de TNF- α , IL-6, IL-1 β , e COX-2 induzida por LPS também nos animais tipo selvagem e mutantes (TANABE e TOHNAI, 2002).

Desta forma, é indiscutível que a expressão e a atividade de várias citocinas relevantes para doenças inflamatórias pode ser inibida pelo tratamento com glicocorticóides. Estas citocinas incluem IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, TNF- α , GM-CSF, e quimiocinas, tais como: IL-8, RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , e eotaxina (BARNES, 1998). Assim, para saber se o EHSO estaria promovendo seus efeitos pela interação com GR, utilizamos a mifepristona (RU486), um antagonista de GR. No entanto, o pré-tratamento com a mifepristona não foi capaz de reverter significativamente o efeito antiedematogênico do extrato, apesar de ter causado reversão significativa tanto na formação do edema quanto na atividade da MPO da dexametasona. Já no efeito do EHSO sobre a MPO, o pré-tratamento com a mifepristona reverteu a inibição. Esse mecanismo do extrato foi confirmado pelo ensaio de ligação específica com [³H]-dexametasona em fígado de ratos, quando foi capaz de deslocar a ligação específica ao receptor. Portanto, é possível que

composto(s) presente(s) no EHSg esta(ão) interagindo diretamente com receptores de glicocorticóides, e que este efeito é mais pronunciado na migração celular.

Um dos mecanismo pelo quais os glicocorticóides promovem seu efeito anti-inflamatório e inibitório da migração celular é através da indução da expressão de anexina A1 (lipocortina 1) e do receptor de anexina A1. A anexina A1 é uma proteína principalmente localizada sobre os queratinócitos basais da camada basal. Na pele normal a anexina A1 é encontrada dentro do citoplasma, já na pele lesada aparece apenas na membrana celular. Esta transição pode ocorrer para promover a ligação de anexina A1 a fosfolípidos, por conseguinte, reduzindo a produção de prostanoídes inflamatórios (AHLUWALIA, 1998). Anexina A1 inibe a PLA₂, bloqueando a síntese dos eicosanóides derivados de ácido araquidônico (prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e tromboxanos) (RHEN e CIDLOWSKI, 2005). Os glicocorticóides induzem a um aumento da expressão de anexina A1 em leucócitos e esta pode ser responsável pela inibição de resposta de leucocitária. Os glicocorticóides também aumentam a secreção de anexina A1 por macrófagos e a anexina A1 secretado pelos mastócitos e monócitos, promove a depuração de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Anexina A1 endógena também é libertado a partir de neutrófilos apoptóticos e atua sobre macrófagos que promovem a fagocitose e a remoção das células apoptóticas (D'ACQUISTO *et al.*, 2008; PERRETTI e D'ACQUISTO, 2009). Com base nestes dados e visto que o EHSg foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α na inflamação aguda e os níveis de IL-1 β e TNF- α na inflamação crônica, podemos sugerir então que os compostos presentes no EHSg estão exercendo seus efeitos anti-inflamatórios, principalmente na inibição da migração celular, pela interação com GR através das duas vias, genômica e não genômica.

Considerando a ampla gama de interações entre glicocorticóides e alvos moleculares específicos e inespecíficos dentro da célula é de se esperar que os corticosteróides de prescrição podem produzir diversos efeitos adversos indesejáveis, incluindo a atrofia cutânea, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, entre outros (SCHÄCKE *et al.*, 2002; SCHOEPE *et al.*, 2006). Os efeitos adversos dos glicocorticóides sistêmicos tendem a ser mais severos se comparados ao tratamento tópico, no entanto, a terapia tópica também apresentam alguns desses efeitos (SCHÄCKE *et al.*, 2002). O uso tópico contínuo pode levar a efeitos adversos sistêmicos, por exemplo: em pele psoriática, a função

de barreira prejudicada pelas lesões facilita a penetração cutânea do corticosteróide, a vasodilatação proveniente da inflamação local na pele aumenta a possibilidade de corticosteróides tópicos alcançarem os vasos sistêmicos. Ainda, a grande extensão da superfície corporal e uso a longo prazo de corticosteróides tópicos pode conduzir a uma maior concentração de corticóide no sangue, levando aos efeitos colaterais sistêmicos. Também deve-se levar em consideração que o risco de efeitos colaterais sistêmicos associados ao uso de corticóide tópico crônico aumenta com formulações de alta potência (UVA *et al.*, 2012).

A atrofia da pele é o mais importante efeito colateral da terapia cutânea com glicocorticóides, em que uma das principais funções da pele, a formação de uma barreira de permeabilidade entre o meio externo e o organismo, é comprometida. Atrofia da pele induzida pelos glicocorticóides é caracterizada por um profundo aumento na transparência da pele, uma consistência semelhante a papel de cigarro, acompanhada por um aumento da fragilidade, lacrimejamento, manchas purpuras, superfície fina, brilhante, e telangiectásica (SCHOEPE *et al.*, 2006).

Com o intuito de avaliar se o EHSO poderia ter efeitos semelhantes aos glicocorticóides na atrofia cutânea, realizamos a aplicação contínua do extrato e da dexametasona durante sete dias, duas vezes por dia. Observamos que a dexametasona promoveu a atrofia das orelhas dos camundongos, mas o tratamento com o EHSO não causou alterações na espessura da orelha, e da mesma forma, não alterou o peso corpóreo e nem os níveis glicêmicos dos animais. Contudo, o EHSO alterou o peso de órgãos linfóides tais como timo, baço, adrenais e linfonodos auriculares da mesma forma que a dexametasona. Esta ação sugere que assim como o corticóide dexametasona, o EHSO está sendo absorvido e atingindo a via sistêmica mesmo quando aplicado topicamente. Realizamos também um teste de genotoxicidade nestes mesmos animais, utilizando o ensaio de cometa alcalino, para avaliar o potencial dos tratamentos em promover mutações genéticas e cromossômicas. Observamos que tanto o tratamento com o EHSO quanto a dexametasona não causaram danos ao DNA. Inclusive, os índices foram mais baixos que o grupo que recebeu apenas o veículo, indicando que os tratamentos estariam prevenindo as células de sofrerem mutações cromossômicas.

Deste modo, podemos concluir que o EHSO possui uma atividade anti-inflamatória *in vivo*, em modelos animais de inflamação aguda e crônica, ao reduzir a formação de edema e, principalmente, inibindo a migração celular para o local

inflamado. Provavelmente, este efeito anti-inflamatório ocorre devido a inibição da produção de citocinas chaves no processo inflamatório (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) via interação com receptores de glicocorticóide. A partir destes resultados, a próxima etapa foi estudar os efeitos do EHSg diretamente sobre células importantes como macrófago e queratinócitos envolvidos no processo inflamatório cutâneo.

Inicialmente, avaliamos o potencial citotóxico do EHSg sobre estas linhagens utilizando os ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Estes ensaios podem ser utilizados para rastrear a toxicidade de produtos químicos sobre as células. Já foi relatado anteriormente que diferentes ensaios de citotoxicidade, podem dar resultados diferentes, dependendo do agente de teste usado e o ensaio de citotoxicidade empregado (WEYERMANN *et al.*, 2005), assim, optamos por realizar o ensaio de MTT e o ensaio de vermelho neutro (VN). O MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é um sal de tetrazólio solúvel em água, a redutase succinato desidrogenase cliva o anel de tetrazólio convertendo em formazan dentro da mitocôndria. O produto de formazan possui coloração púrpura, insolúvel e é impermeável à membrana das células e, por conseguinte, se acumula nas células saudáveis (MOSMANN, 1983). O VN é um método capaz de verificar o acúmulo do corante vermelho neutro nos lisossomos de células viáveis, mostrando a viabilidade das células em endocitar este corante (BORENFREUND e PUERNER, 1985).

Observamos que o tratamento com o EHSg sobre a linhagem celular de queratinócitos HaCaT apresentou citotoxicidade somente nas concentrações mais altas (300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), enquanto as concentrações mais baixas não alteraram o funcionamento das células. Novamente, com a linhagem de macrófagos RAW 264.7 o extrato demonstrou que somente a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi tóxica no ensaio de MTT e VN. Porém, no ensaio de VN, o tratamento com concentrações mais baixas do EHSg proporcionaram um aumento da viabilidade celular, ou por aumentar a proliferação das células ou favorecer a atividade endocítica dos macrófagos. Assim, resolvemos investigar melhor estes possíveis efeitos do tratamento com EHSg sobre macrófagos. Visto que macrófagos e células dendríticas e são cruciais para praticamente todos os passos de uma reação imunológica, incluindo a iniciação de uma resposta imune adaptativa, a depuração de agentes infecciosos, bem como a resolução da inflamação inata e adaptativa (MOSSER, 2003; WELLS *et al.*, 2005).

Utilizamos então o ensaio de cristal violeta para determinar se o tratamento estava mesmo aumentando a proliferação celular dos macrófagos. O ensaio de cristal violeta é utilizado como ferramenta para a quantificação do número de células em cultura em monocamada (GILLIES *et al.*, 1986) e, o tratamento com o extrato em todas as concentrações utilizadas demonstrou quase dobrar a proliferação dos macrófagos, se comparado ao veículo. Interessantemente, durante a análise do teste do cristal violeta, reparamos que o EHSO também estava promovendo alterações na morfologia normal das células cultivadas, aumentando o tamanho, e as células pareciam mais espalhadas e com mais prolongamentos, e este efeito estava sendo induzido de forma concentração dependente (FIGURA 25). Para tentar elucidar o que estava promovendo estas modificações morfológicas, optamos por avaliar o *burst* respiratório, a função fagocítica e a ativação dos macrófagos.

O *burst* respiratório (*burst* oxidativo) é o processo em que células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) são capazes de eliminar microrganismos invasores por um mecanismo dependente de oxigênio. A reação é caracterizada por um acentuado aumento no consumo de oxigênio, e este aumento é resultante da ativação de um complexo enzimático oxidase que catalisa redução do oxigênio a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), tendo como doador de elétrons o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). Em seguida o $O_2^{\cdot-}$ é convertido a H_2O_2 pela ação da enzima SOD (FORMAN e TORRES, 2002). Este processo pode ter diferentes intensidades em macrófagos, o que depende do seu local de origem e de como foram obtidas estas células. Macrófagos que nunca entraram em contato com nenhum estímulo, são menos ativos que aqueles obtidos de animais tratados com TPA, os quais produzem três vezes mais oxigênio que células de animais não tratados (COHEN *et al.*, 1981). *In vitro* o TPA aloja-se na membrana dos macrófagos e ativa a PKC, a qual pode ativar o NADPH oxidase através de uma cascata de fosforilação e desfosforilação. (RYVES *et al.*, 1991). Outros agentes, como o IFN- γ , LPS e o muramil dipeptídeo da parede bacteriana, também são capazes de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio *in vitro*. Estes agentes podem potencializar a resposta destas células ao estímulo do qual originou o *burst* respiratório (HALLIWELL, 2006). Intracelularmente, o estresse oxidativo pode ter um grande impacto sobre as vias de sinalização sensível a redox, bem como atuar como um segundo mensageiro em si (POLI *et al.*, 2004). Alvos moleculares sensíveis ao redox geralmente contêm resíduos de cisteína altamente conservado e a sua oxidação, nitrosilação ou a formação de

ligações dissulfureto são eventos cruciais na sinalização oxidante/redox. Tais alvos moleculares incluem fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, tais como as moléculas de sinalização de Ras/Rac ou JNK (quinase c-Jun N-terminal), proteínas tirosina fosfatases, o p21ras (LANDER *et al.*, 1997) e sensores de redox, tais como a tioredoxina que pode sequestrar e inativar quinases como a Ask-1 (quinase 1 reguladora de sinal de apoptose). A ativação de fatores de transcrição sensíveis a redox, como o NF- κ B e AP-1, acaba por induzir a expressão de gene pró-inflamatórios (FILOMENI *et al.*, 2002). Portanto, a superprodução de O₂⁻ e outras espécies reativas de oxigênio pode danificar biomoléculas e contribuir para o processo lesivo de tecidos em locais de inflamação crônica (HALLIWELL, 2006), assim, inibidores da produção de ROS por fagócitos podem agir como anti-inflamatórios (HOUGEE *et al.*, 2006).

O NO tem sido relacionado a numerosas funções homeostáticas, como melanogênese, angiogênese, cicatrização, síntese de colágeno, e vasodilatação (BOISSEL *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2006). Também está envolvido em condições patológicas, tais como processos hiperproliferativos de células, doenças de pele mediadas por resposta imune, e outros processos inflamatórios como queimadura solar, psoríase, necrose epidérmica tóxica e lúpus cutâneo eritematoso (BRUCHGERHARZ *et al.*, 2003; PAUNEL *et al.*, 2005). A isoforma iNOS produz grande quantidade de NO de uma forma sustentada chegando a níveis tóxicos, enquanto que as isoformas constitutivas (endotelial e neuronal) produzem NO em pequena quantidade e por poucos segundos sendo suas atividades de ação direta e curta. Sendo que existem vários mecanismos intracelulares através dos quais o NO pode agir como um mediador pró-inflamatório (SALVEMINI *et al.*, 2003). Em macrófagos, monócitos e outras células a indução da iNOS e a presença do substrato L-arginina são suficientes para iniciar a produção de NO. Esta indução da iNOS pode ser iniciada por citocinas inflamatórias tais como IFN- γ , TNF- α , IL-1 ou LPS (NAKAI *et al.*, 2006). É possível que o coquetel de citocinas ao qual as células são expostas durante o processo inflamatório possa determinar a taxa e magnitude da produção NO (JACOBS e IGNARRO, 2001). No entanto, delaTorre e colaboradores (1999) descreveram que o processo inflamatório é auto-regulado, e isto se deve em parte a expressão da iNOS e produção do NO, que por sua vez, causa S-nitrosilação na subunidade p50 do NF- κ B, impedindo a ativação deste fator de transcrição, e consequente expressão de mediadores. Ainda, os baixos níveis de NO produzidos

pelas sintases constitutivas interagem diretamente com íons carregados positivamente na guanilato ciclase, citocromo P450 e a própria NOS (IGNARRO, 2003). Uma vez que a guanilato ciclase é ativada, ocorre um aumento intracelular de monofosfato guanosina cíclico (GMPc), que, por sua vez, ativa proteínas quinases dependentes de GMPc que medeiam às ações do NO incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, bem como efeitos antiproliferativos, antiplaquetários e antioxidantes (LUGNIER *et al.*, 2000). Portanto, é possível perceber que há a necessidade de um equilíbrio na produção de NO para que se tenha um efeito benéfico, e que a produção em excesso de NO pode vir a ser prejudicial para o tecido.

Para quantificarmos os níveis de NO e ROS liberados pelos macrófagos no meio de cultivo, realizando o tratamento com o EHSg antes e após a indução das células. Quando o tratamento foi realizado após a indução, não foi detectado alterações nos níveis de NO e ROS nas amostras. Esta ausência na alteração da produção de NO e ROS pode ter sido decorrente da troca do meio com o agente indutor pelo meio contendo o tratamento, diminuindo assim os níveis detectáveis. No entanto, quando o tratamento com o EHSg foi realizado antes da indução das células com LPS+IFN- γ e TPA, foi capaz de aumentar os níveis de NO nas concentrações mais baixas (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e reduzir os níveis de ROS com a concentração mais alta (300 $\mu\text{g/mL}$) produzidos pelos macrófagos, respectivamente.

Já foi demonstrado que os glicocorticóides melhoraram a sobrevivência de várias células fagocíticas por suprimir a produção de ROS intracelular e inibir a apoptose induzida por ROS (RUIZ *et al.*, 2002). Em outro trabalho recente, a dexametasona inibiu a produção de ROS por diminuir a expressão de Nox-2 (uma subunidade do NADPH oxidase) e por supressão da via da MAPK p38 e JNK por aumentar a expressão de MAPK fosfatase-1 (MKP-1) (HUO *et al.*, 2011). Portanto, é possível que a redução dos níveis de ROS em macrófagos seja pelo efeito glicocorticóide do EHSg sobre a inibição da NADPH oxidase e da via MAPK, além de aumentar a produção de NO. Estes mecanismos podem estar agindo de forma a impedir a ativação do NF- κB , diminuindo a transcrição de genes pró-inflamatório nos animais.

Ao verificar o efeito do EHSg sobre a função fagocítica dos macrófagos, esperávamos que as células apresentassem uma maior atividade fagocítica, baseado nas alterações morfológicas observadas. Curiosamente, observou-se que o

tratamento em todas as concentrações diminuiu, não apenas o número de células ativas, mas também a capacidade destes macrófagos de fagocitar as leveduras. Este efeito inibitório na capacidade fagocítica é compreendido ao observar o ensaio de ativação celular, realizado pela quantificação da expressão de CD54, onde o tratamento com EHSO também diminuiu a expressão de CD54 nos macrófagos, de forma dependente da concentração.

Outro ponto interessante a se destacar neste resultado, é que o CD54 além de ser utilizado como marcador para quantificar o grau de ativação de células apresentadoras de antígenos (SHEIKH e JONES, 2008), esta proteína é também conhecida como ICAM-1. Trata-se de uma molécula de adesão que está presente constitutivamente na superfície celular de uma ampla variedade de tipos de células como fibroblastos, queratinócitos, neutrófilos, macrófagos, células T, células B, células endoteliais e células epiteliais, e é regulada positivamente em resposta a diversos mediadores inflamatórios, incluindo o ácido retinóico, infecção por vírus, estresses oxidativo, e as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ). Além disso, muitos destes agonistas pode funcionalmente cooperar para ativar sinergisticamente a transcrição de ICAM-1. Por exemplo, TNF- α e IFN- γ juntos aumentam a expressão de ICAM-1 mais do que individualmente. Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias (TGF- β , IL-4 e IL-10) e glicocorticóides, interferem com as vias de transdução de sinal e fatores de transcrição para a indução da expressão de ICAM-1 (ROEBUCK e FINNEGAN, 1999). A ICAM-1 é um ligando para a integrina antígeno-1 da função de linfócito (LFA-1), um receptor encontrados em células T, células B, macrófagos e neutrófilos envolvido no recrutamento para o local da inflamação. Quando ativados, os leucócitos se ligam às células endoteliais através de ICAM-1/LFA-1 para transmigrar para os tecidos (YANG *et al.*, 2005). Desta forma, visto que o EHSO tem a capacidade de interagir com GR, provavelmente a diminuição da expressão de ICAM-1 nos macrófagos seja promovida pelo efeito tipo glicocorticóide do EHSO. Este resultado é importante também para explicar os resultados obtidos nos modelos animais, pois pode ser um dos mecanismo pelo qual o tratamento com o extrato promove seu potente efeito inibitório da migração celular.

Os macrófagos não são uma população homogênea de células, em vez disso, inclui fenótipos distintos que exibem uma vasta gama de atividades pró-inflamatória e anti-inflamatórias. Propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias

de macrófagos depende principalmente da sua fase de diferenciação, bem como sobre os mecanismos distintos de ativação (ANDERSON e MOSSER, 2002; MOSSER, 2003; GORDON e MARTINEZ, 2010). A ativação clássica de macrófagos é conseguida por estimulação com TNF- α ou IFN- γ , seguido por exposição a um gatilho microbiano, tais como o LPS, o que resulta num fenótipo pró-inflamatório. Os macrófagos alternativamente ativados (ativação não-clássica) são gerados por exposição a IL-4, IL-10 ou glicocorticóide (MARTINEZ e GORDON, 2014). Em contraste com os macrófagos ativados classicamente, estes macrófagos alternativamente ativados são envolvidos nas respostas anti-parasitas, reparação de tecidos e reações alérgicas. Sob condições distintas, os macrófagos podem libertar mediadores, tais como TGF- β e IL-10, que são importantes para a resolução de reações inflamatórias (GILROY *et al.*, 2004; WELLS *et al.*, 2005). Assim, os glicocorticóides são capazes de agir sobre monócitos, promovendo ativação não-clássica, e afetando a adesão, o espraiamento, fagocitose e apoptose (KLEIMAN *et al.*, 2012). Características também observadas nos macrófagos quando estes foram tratados com EHSg.

Por fim, quantificamos os níveis das citocinas TNF- α e IL-6 produzidas pelos macrófagos sobre efeito do tratamento com EHSg. Entretanto, obtivemos efeito significativo somente para inibição do TNF- α , e ainda apenas na concentração mais alta. Apesar disso, é possível sugerir novamente que a influência do extrato no nível de TNF- α esteja relacionada ao efeito tipo glicocorticóide do EHSg.

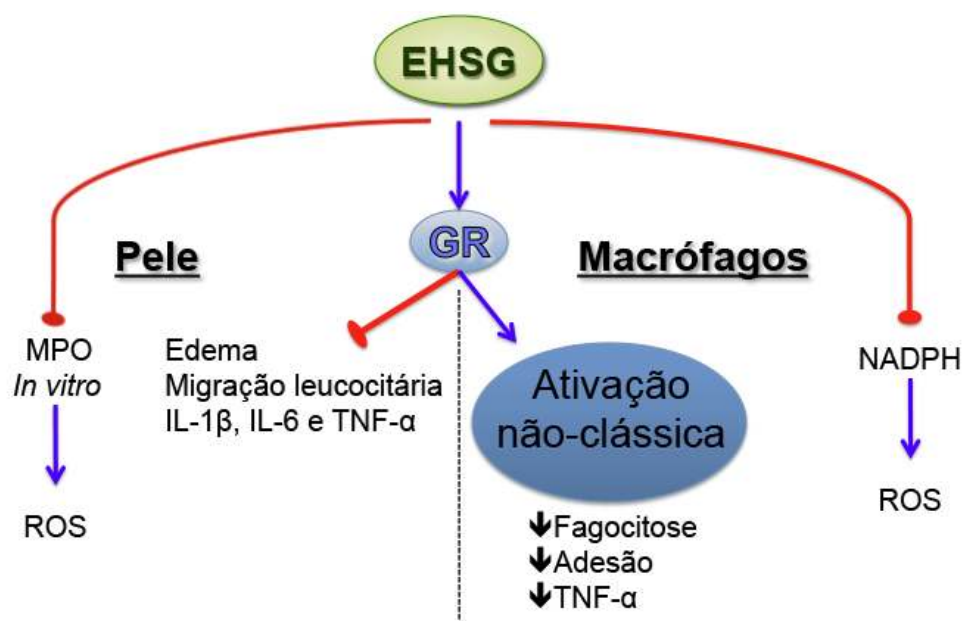
A partir destes resultados, foram obtidas evidências primárias importantes de que o extrato bruto hidroalcoólico 90% das folhas da planta *S. glandulatum* apresenta atividade anti-inflamatória tópica e sistêmica, uma vez que, foi capaz de reduzir parâmetros inflamatórios como, a formação de edema, migração leucocitária, os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em modelos de inflamação aguda e crônica. Ainda, apresentou efeitos que induzem macrófagos a uma ativação alternativa, a qual confere características resolutivas aos macrófagos durante do processo inflamatório. E este efeito anti-inflamatório do EHSg pode ser, pelo menos em parte, atribuído aos mecanismos de ação da via glicocorticóide. Ainda, sugerimos que provavelmente os compostos presentes no extrato estejam agindo de forma sinérgica, visto que as frações não obtiveram sucesso semelhante ao extrato e, nossos resultados mostram a possibilidade de alvos distintos para justificar toda a ação anti-inflamatória do extrato.

Contudo, outros parâmetros ainda precisam ser avaliados para que seja melhor elucidado o mecanismo molecular do EHSg, assim como a análise fitoquímica do extrato para identificação dos compostos presentes e uma avaliação mais aprofundada do potencial tóxico da planta. No entanto, este sendo o primeiro trabalho a relatar uma atividade biológica da planta *S. glandulatum*, e com as evidências encontradas, abre-se um leque de possíveis estudos futuros sobre a atividade anti-inflamatória da espécie, levando em consideração que o EHSg demonstrou ser uma ferramenta em potencial para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a elaboração do extrato das folhas da *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax utilizando o solvente etanol 90% se mostrou mais efetivo na inibição da formação de edema de orelha induzido por TPA dentre os três extratos testados (50%, 70% e 90%).



O EHSG apresentou atividade anti-inflamatória quando aplicado pela via tópica em modelos animais de inflamação de orelha agudo e crônico, ao inibir a formação de edema, a migração leucocitária para o local inflamado e a produção de citocinas chaves no processo inflamatório, tais como, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Ainda, demonstrou também apresentar atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de orelha e edema pata, quando administrado pela via oral, porém com um efeito menos potente. Provavelmente, o extrato esteja promovendo este efeito anti-inflamatório, pelo menos em parte, pela via de receptores do tipo corticoides, visto que a ação do extrato foi revertida parcialmente pelo antagonista do receptor na migração leucocitária, e comprovada sua interação com receptores de glicocorticóides pelo ensaio de ligação específica. Ainda, demonstrou não apresentar efeitos adversos sobre a atrofia cutânea e também não promoveu alterações cromossômicas na células de medula óssea no teste de genotoxicidade.

Os tratamentos *in vitro* com o EHSG não apresentaram citotoxicidade em concentração baixas sobre os queratinócitos epidérmicos HaCaT e macrófagos RAW 264.7. Entretanto, o tratamento com o extrato sobre a linhagem celular de macrófagos promoveu a ativação alternativa (não-classica) destas células, a qual confere característica resolutivas aos macrófagos durante do processo inflamatório, visto que, o EHSG alterou a morfologia normal do macrófagos, tornando-os maiores e mais espalhados, diminuiu a função fagocítica e a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α . Sugerindo mais uma vez que este efeito do EHSG esteja sendo realizado, pelo menos em parte, pela ativação de receptores do tipo glicocorticóide, uma das vias de ativação alternativas de macrófagos.

Referências Bibliográficas

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLUWALIA, A. Topical glucocorticoids and the skin--mechanisms of action: an update. *Mediators Inflamm*, v. 7, n. 3, p. 183-93, 1998.

AHN, S. K.; BAK, H. N.; PARK, B. D.; KIM, Y. H.; YOUM, J. K.; CHOI, E. H.; HONG, S. P.; LEE, S. H. Effects of a multilamellar emulsion on glucocorticoid-induced epidermal atrophy and barrier impairment. *J Dermatol*, v. 33, n. 2, p. 80-90, Feb 2006.

AL MUQARRABUN, L. M.; AHMAT, N.; ARIS, S. R. A review of the medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Sapium*. *J Ethnopharmacol*, v. 155, n. 1, p. 9-20, Aug 8 2014.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol*, v. 72, n. 1, p. 101-6, Jul 2002.

ANVISA. Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. v. 2010. Brasília: ANVISA, 2010.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun*, v. 67, n. 4, p. 1828-36, Apr 1999.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*, v. 78, n. 5, p. 431-41, Dec 22 2005.

BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*, v. 94, n. 6, p. 557-72, Jun 1998.

BHAGWAT, S. S.; MANNING, A. M.; HOEKSTRA, M. F.; LEWIS, A. Gene-regulating protein kinases as important anti-inflammatory targets. *Drug Discov Today*, v. 4, n. 10, p. 472-479, Oct 1999.

BOISSEL, J. P.; OHLY, D.; BROS, M.; GODTEL-ARMBRUST, U.; FORSTERMANN, U.; FRANK, S. The neuronal nitric oxide synthase is upregulated

in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 123, n. 1, p. 132-9, Jul 2004.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v. 24, n. 2-3, p. 119-24, Feb-Mar 1985.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, Mar 1982.

BRALLEY, E. E.; HARGROVE, J. L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D. K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **J Med Food**, v. 10, n. 4, p. 636-42, Dec 2007.

BRIGATI, C.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A.; BENELLI, R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clin Exp Metastasis**, v. 19, n. 3, p. 247-58, 2002.

BROWN, D. A.; CANNING, M. T.; NAY, S. L.; PENA, A. V.; YAROSH, D. B. Bicyclic monoterpene diols stimulate release of nitric oxide from skin cells, increase microcirculation, and elevate skin temperature. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 1, p. 70-6, Aug 2006.

BRUCH-GERHARZ, D.; SCHNORR, O.; SUSCHEK, C.; BECK, K. F.; PFEILSCHIFTER, J.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation. **Am J Pathol**, v. 162, n. 1, p. 203-11, Jan 2003.

BUCKLE, D. R.; HEDGECOCK, C. J. R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 8, p. 325-332, Aug 1997.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-89, Feb 2000.

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.

CALOU, I. B. F.; SOUSA, D. I. M.; CUNHA, G. M. A.; BRITO, G. A. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Topically applied diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) attenuate the dermal inflammation in mouse ear induced by tetradecanoylphorbol 13-acetate-and oxazolone. ***Biological & pharmaceutical bulletin***, v. 31, n. 8, p. 1511-1516, 2008.

CANDI, E.; SCHMIDT, R.; MELINO, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. ***Nat Rev Mol Cell Biol***, v. 6, n. 4, p. 328-40, Apr 2005.

CATAISSON, C.; PEARSON, A. J.; TORGERSON, S.; NEDOSPASOV, S. A.; YUSPA, S. H. Protein kinase C alpha-mediated chemotaxis of neutrophils requires NF-kappa B activity but is independent of TNF alpha signaling in mouse skin in vivo. ***J Immunol***, v. 174, n. 3, p. 1686-92, Feb 1 2005.

CATAISSON, C.; PEARSON, A. J.; TSIEN, M. Z.; MASCIA, F.; GAO, J. L.; PASTORE, S.; YUSPA, S. H. CXCR2 ligands and G-CSF mediate PKCalpha-induced intraepidermal inflammation. ***J Clin Invest***, v. 116, n. 10, p. 2757-66, Oct 2006.

CHAN, L. S. *Animal models of human inflammatory skin diseases*. Boca Raton: CRC Press, 2004.

CHANG, C. A.; GOTTLIEB, A. B.; LIZZUL, P. F. Management of psoriatic arthritis from the view of the dermatologist. ***Nat Rev Rheumatol***, v. 7, n. 10, p. 588-98, Oct 2011.

CHI, Y. S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. ***Biochem Pharmacol***, v. 66, n. 7, p. 1271-8, Oct 1 2003.

COHEN, M. S.; RYAN, J. L.; ROOT, R. K. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect of monolayer formation. ***J Immunol***, v. 127, p. 1007-11, Sep 1981.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. ***Nature***, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. ***Biochim Biophys Acta***, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, Jun 2013.

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. *Br J Pharmacol*, v. 155, p. 152-69, Sep 2008.

DA SILVA, C. H.; SOBRINHO, T. J.; E CASTRO, V. T.; LIMA DDA, C.; DE AMORIM, E. L. Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. *Molecules*, v. 16, n. 6, p. 4728-39, 2011.

DAINICHI, T.; HANAKAWA, S.; KABASHIMA, K. Classification of inflammatory skin diseases: a proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. *J Dermatol Sci*, v. 76, n. 2, p. 81-9, Nov 2014.

DE BERNARDIS, E.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V. M.; AMICO-ROXAS, M. Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. *Agents Actions*, v. 42, n. 1-2, p. 29-33, Aug 1994.

DE BOSSCHER, K.; VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, v. 24, n. 4, p. 488-522, Aug 2003.

DE GROOT, H.; RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol*, v. 12, n. 3, p. 249-55, 1998.

DE LAS HERAS, B.; HORTELANO, S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm Allergy Drug Targets*, v. 8, n. 1, p. 28-39, Mar 2009.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, Mar 1989.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. *Clin Dermatol*, v. 19, n. 5, p. 573-85, Sep-Oct 2001.

DELATORRE, A.; SCHROEDER, R. A.; PUNZALAN, C.; KUO, P. C. Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *J Immunol*, v. 162, n. 7, p. 4101-8, Apr 1 1999.

FENG, D.; NAGY, J. A.; PYNE, K.; HAMMEL, I.; DVORAK, H. F.; DVORAK, A. M. Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. **Microcirculation**, v. 6, n. 1, p. 23-44, Mar 1999.

FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAR, M. C.; MARKUS, R. P. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **J Pineal Res**, v. 38, n. 3, p. 182-8, Apr 2005.

FILOMENI, G.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Cell signalling and the glutathione redox system. **Biochem Pharmacol**, v. 64, p. 1057-64, Sep 2002.

FITZPATRICK, T.; SZABO, G.; SEIJI, M.; QUEVEDO, W. Biology of the melanin pigmentary system. **Dermatology in general medicine**, p. 131–163, 1979.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 166, p. S4-8, Dec 15 2002.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem Toxicol**, v. 33, p. 1061-80, Dec 1995.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v. 160, n. 2, p. 171-7, Jan 5 2006.

FOX, L. P. As bases farmacológicas da terapêutica. In: BRUNTON, L. L. L., J.S.; PARKER, K.L.GOODMAN & GILMAN (Ed.). *Farmacologia dermatológica*. Rio de Janeiro:McGrawHill, 2006. p. 1534-1537.

FREINKEL, R.; WOODLEY, D. *The biology of the skin*. Taylor & Francis, 2001.

FRY, L.; BAKER, B. S.; POWLES, A. V. Psoriasis--A possible candidate for vaccination. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 5, p. 286-289, 2007.

FU, R.; ZHANG, Y. T.; GUO, Y. R.; HUANG, Q. L.; PENG, T.; XU, Y.; TANG, L.; CHEN, F. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the phenolic extracts of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 2, p. 517-24, May 20 2013.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 3, p. 199-209, Mar 2002.

GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. *Budapest: Akadémiai Kiadó*, p. 24-37, 2000.

GARRIDO, G.; GONZALEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCIA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NUNEZ-SELLES, A. J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). **Pharmacol Res**, v. 50, n. 2, p. 143-9, Aug 2004.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de Histologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan S.A., 1999.

GEORGE, S. E.; ANDERSON, R. J.; CUNNINGHAM, A.; DONALDSON, M.; GROUNDWATER, P. W. Evaluation of a range of anti-proliferative assays for the preclinical screening of anti-psoriatic drugs: a comparison of colorimetric and fluorimetric assays with the thymidine incorporation assay. **Assay Drug Dev Technol**, v. 8, p. 389-400, Jun 2010.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Anal Biochem**, v. 159, p. 109-13, Nov 15 1986.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 5, p. 401-16, May 2004.

GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 1, p. 44-55, Jan 2006.

GOODWIN, A. W.; WHEAT, H. E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 53-77, 2004.

GORDON, K. B.; LANGLEY, R. G.; GOTTLIEB, A. B.; PAPP, K. A.; KRUEGER, G. G.; STROBER, B. E.; WILLIAMS, D. A.; GU, Y.; VALDES, J. M. A phase III, randomized, controlled trial of the fully human IL-12/23 mAb briakinumab in moderate-to-severe psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 2, p. 304-14, Feb 2012.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, p. 593-604, May 28 2010.

GOTTLIEB, A.; KORMAN, N. J.; GORDON, K. B.; FELDMAN, S. R.; LEBWOHL, M.; KOO, J. Y.; VAN VOORHEES, A. S.; ELMETS, C. A.; LEONARDI, C. L.; BEUTNER, K. R.; BHUSHAN, R.; MENTER, A. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 2. Psoriatic arthritis: overview and guidelines of care for treatment with an emphasis on the biologics. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 5, p. 851-64, May 2008.

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 6, p. 421-5, Jun 2008.

HAAKE, A.; SCOTT, G.; HOLBROOK, K. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. **The Biology of the Skin**, v. 2001, p. 19-45, 2001.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 10, n. 2, p. 153-63, Nov 2005.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 3, p. 838-57, Feb 15 2012.

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? **Trends Biochem Sci**, v. 31, p. 509-15, Sep 2006.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol Lett**, v. 90, n. 2-3, p. 183-8, Feb 7 1997.

HEBBAR, P. B.; ARCHER, T. K. Chromatin remodeling by nuclear receptors. **Chromosoma**, v. 111, p. 495-504, May 2003.

HEINECKE, J. W. Tyrosyl radical production by myeloperoxidase: a phagocyte pathway for lipid peroxidation and dityrosine cross-linking of proteins. **Toxicology**, v. 177, p. 11-22, Aug 1 2002.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed Pharmacother**, v. 51, n. 8, p. 305-10, 1997.

HOUGEE, S.; HARTOG, A.; SANDERS, A.; GRAUS, Y. M.; HOIJER, M. A.; GARSSEN, J.; VAN DEN BERG, W. B.; VAN BEUNINGEN, H. M.; SMIT, H. F. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished

cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 531, p. 264-9, Feb 15 2006.

HUGGENBERGER, R.; DETMAR, M. The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J Investig Dermatol Symp Proc*, v. 15, n. 1, p. 24-32, Dec 2011.

HUO, Y.; RANGARAJAN, P.; LING, E. A.; DHEEN, S. T. Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. *BMC Neurosci*, v. 12, p. 49, 2011.

HVID, H.; TEIGE, I.; KVIST, P. H.; SVENSSON, L.; KEMP, K. TPA induction leads to a Th17-like response in transgenic K14/VEGF mice: a novel in vivo screening model of psoriasis. *Int Immunol*, v. 20, p. 1097-106, Aug 2008.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol*, v. 53, p. 503-14, Dec 2003.

IKUTA, S.; EDAMATSU, H.; LI, M.; HU, L.; KATAOKA, T. Crucial Role of Phospholipase C ϵ in Skin Inflammation Induced by Tumor-Promoting Phorbol Ester. *Cancer Research*, v. 68, n. 1, p. 64-72, January 1, 2008 2008.

JACKSON, J. R.; SEED, M. P.; KIRCHER, C. H.; WILLOUGHBY, D. A.; WINKLER, J. D. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*, v. 11, n. 6, p. 457-65, May 1997.

JACOBS, A. T.; IGNARRO, L. J. Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*, v. 276, n. 51, p. 47950-7, Dec 21 2001.

KALIMI, M.; HUBBARD, J. R. Development of an exchange assay for cytosolic glucocorticoid receptors using the synergistic effects of molybdate plus dithiothreitol. *Endocrinology*, v. 113, p. 1161-3, Sep 1983.

KATO, Y.; NAGAO, A.; TERAOKA, J.; OSAWA, T. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 67, p. 1136-9, May 2003.

KAWASHIRI, S. Y.; KAWAKAMI, A.; IWAMOTO, N.; FUJIKAWA, K.; ARAMAKI, T.; TAMAI, M.; ARIMA, K.; KAMACHI, M.; YAMASAKI, S.; NAKAMURA, H.; TSURUMOTO, T.; KONO, M.; SHINDO, H.; IDA, H.; ORIGUCHI, T.; EGUCHI, K. Proinflammatory cytokines synergistically enhance the production of chemokine ligand 20 (CCL20) from rheumatoid fibroblast-like synovial cells in vitro and serum

CCL20 is reduced in vivo by biologic disease-modifying antirheumatic drugs. **J Rheumatol**, v. 36, n. 11, p. 2397-402, Nov 2009.

KHAN, A. Q.; KHAN, R.; REHMAN, M. U.; LATEEF, A.; TAHIR, M.; ALI, F.; SULTANA, S. Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NF-kappaB in Swiss albino mice. **Toxicology**, v. 302, p. 266-74, Dec 16 2012.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci**, v. 96, n. 3, p. 229-45, Nov 2004.

KIM, M.-B.; PARK, J.-S.; LIM, S.-B. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 546-552, 10/1/ 2010.

KLEIMAN, A.; HUBNER, S.; RODRIGUEZ PARKITNA, J. M.; NEUMANN, A.; HOFER, S.; WEIGAND, M. A.; BAUER, M.; SCHMID, W.; SCHUTZ, G.; LIBERT, C.; REICHARDT, H. M.; TUCKERMANN, J. P. Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages. **FASEB J**, v. 26, n. 2, p. 722-9, Feb 2012.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **Eur J Cell Biol**, v. 83, n. 11-12, p. 625-9, Dec 2004.

KU, C. M.; LIN, J. Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. **Food Chem**, v. 141, p. 1104-13, Nov 15 2013.

LAI, X.; YANG, Y.; SHAN, X. The investigation of Euphorbiaceous medicinal plants in Southern China. **Economic Botany**, v. 58, n. 1, p. S307-S320, 2004/12/01 2004.

LAM, J.; POLIFKA, J. E.; DOHIL, M. A. Safety of dermatologic drugs used in pregnant patients with psoriasis and other inflammatory skin diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 2, p. 295-315, 2008.

LANDER, H. M.; HAJJAR, D. P.; HEMPSTEAD, B. L.; MIRZA, U. A.; CHAIT, B. T.; CAMPBELL, S.; QUILLIAM, L. A. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. **J Biol Chem**, v. 272, p. 4323-6, Feb 14 1997.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 2, p. 85-94, Apr 2007.

LEONARDI, C.; MATHESON, R.; ZACHARIAE, C.; CAMERON, G.; LI, L.; EDSON-HEREDIA, E.; BRAUN, D.; BANERJEE, S. Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis. **N Engl J Med**, v. 366, n. 13, p. 1190-9, Mar 29 2012.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sci**, v. 8, n. 11, p. 601-6, Jun 1 1969.

LIU, Y.; WU, E. Q.; BENSIMON, A. G.; FAN, C. P.; BAO, Y.; GANGULI, A.; YANG, M.; CIFALDI, M.; MULANI, P. Cost per responder associated with biologic therapies for Crohn's disease, psoriasis, and rheumatoid arthritis. **Adv Ther**, v. 29, p. 620-34, Jul 2012.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

LUGNIER, C.; KERAVALIS, T.; ECKLY-MICHEL, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. **J Physiol Pharmacol**, v. 50, p. 639-52, Dec 2000.

MAINI, R. N.; TAYLOR, P. C.; SZECHINSKI, J.; PAVELKA, K.; BROLL, J.; BALINT, G.; EMERY, P.; RAEMEN, F.; PETERSEN, J.; SMOLEN, J.; THOMSON, D.; KISHIMOTO, T. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. **Arthritis Rheum**, v. 54, p. 2817-29, Sep 2006.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C.; GERMAN NATIONAL GENOME RESEARCH, N. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Exp Gerontol**, v. 42, n. 9, p. 879-86, Sep 2007.

MANANDHAR, N. P.; MANANDHAR, S. *Plants and people of Nepal*. Portland, OR: Timber Press, 2002.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. ***F1000Prime Rep***, v. 6, p. 13, 2014.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. ***Plant Cell***, v. 7, n. 7, p. 1015-26, Jul 1995.

MCMANUS, R. Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation and disease. ***J Endocrinol***, v. 178, p. 1-4, Jul 2003.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. ***Eur J Pharmacol***, v. 559, n. 2-3, p. 227-35, Mar 22 2007.

MESIA, G. K.; TONA, G. L.; NANGA, T. H.; CIMANGA, R. K.; APERS, S.; COS, P.; MAES, L.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 115, n. 3, p. 409-415, 2/12/ 2008.

MIDDLETON, E., JR. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. ***Adv Exp Med Biol***, v. 439, p. 175-82, 1998.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. ***Clin Sci (Lond)***, v. 122, n. 4, p. 143-59, Feb 2012.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. ***Eur J Med Chem***, v. 46, n. 10, p. 4769-807, Oct 2011.

MITCHELL F, D. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. ***The International Journal of Biochemistry & Cell Biology***, v. 36, n. 7, p. 1141-1146, 2004.

MO, B. W.; WEI, J. H.; HUANG, J. W.; WANG, C. M.; ZENG, J. R.; CHEN, M. X.; ZHOU, Y.; XU, Q.; LIN, Y. [Effect of triptolide on airway smooth muscle proliferation and the expression of nuclear factor-kappa B, Bcl-2 in asthmatic rats]. ***Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi***, v. 26, p. 385-90, Nov 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, Dec 16 1983.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 209-12, Feb 2003.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744, 2006.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 9, p. 1331-6, Apr 28 2006.

MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do euphorbiaceae tick as medicinal plants? a review of euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, 2011.

MYERS, W. A.; GOTTLIEB, A. B.; MEASE, P. Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. **Clin Dermatol**, v. 24, n. 5, p. 438-47, Sep-Oct 2006.

NAKAI, K.; KADIISKA, M. B.; JIANG, J. J.; STADLER, K.; MASON, R. P. Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 12, p. 4616-21, Mar 21 2006.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinární Medicína**, v. 58, n. 4, p. 187-205, 2013.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 679-91, Oct 2009.

NORRIS, A. Targeting mast cells. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 7, p. 739-41, Jul 2004.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiat. Res.**, v. 122, n. 1, p. 86-94, Apr 1990.

PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; THITIPONPUNT, Y.; TAESOTIKUL, T.; ARBAIN, D. Anti-inflammatory activity of the alkaloid bukittinggine from *Sapium baccatum*. **Planta Med**, v. 64, p. 530-5, Aug 1998.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends Endocrinol Metab**, v. 17, n. 8, p. 321-7, Oct 2006.

PAUNEL, A. N.; DEJAM, A.; THELEN, S.; KIRSCH, M.; HORSTJANN, M.; GHARINI, P.; MURTZ, M.; KELM, M.; DE GROOT, H.; KOLB-BACHOFEN, V.; SUSCHEK, C. V. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 5, p. 606-15, Mar 1 2005.

PERFEITO, J. P. S. *O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento*. (2012). 162 f. - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2012.

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.

PETERSSON, M.; WIBERG, U.; LUNDEBERG, T.; UVNAS-MOBERG, K. Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. **Peptides**, v. 22, p. 1479-84, Sep 2001.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Curr Med Chem**, v. 11, p. 1163-82, May 2004.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 12, p. 1063-72, Dec 2008.

PUIGNERO, V.; QUERALT, J. Effect of topically applied cyclooxygenase-2-selective inhibitors on arachidonic acid- and tetradecanoylphorbol acetate-induced dermal inflammation in the mouse. **Inflammation**, v. 21, n. 4, p. 431-42, Aug 1997.

RABE, B.; CHALARIS, A.; MAY, U.; WAETZIG, G. H.; SEEGERT, D.; WILLIAMS, A. S.; JONES, S. A.; ROSE-JOHN, S.; SCHELLER, J. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. **Blood**, v. 111, p. 1021-8, Feb 1 2007.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. ***Inflamm Allergy Drug Targets***, v. 8, n. 3, p. 229-35, Jul 2009.

REICH, K.; MROWIETZ, U.; KARAKASILI, E.; ZSCHOCKE, I. Development of an adherence-enhancing intervention in topical treatment termed the topical treatment optimization program (TTOP). ***Arch Dermatol Res***, v. 306, n. 7, p. 667-76, Sep 2014.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H., 3RD; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. ***Biochem Pharmacol***, v. 55, p. 803-10, Mar 15 1998.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. ***N Engl J Med***, v. 353, p. 1711-23, Oct 20 2005.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Bioactivity of flavonoids. ***Pol J Pharmacol***, v. 48, n. 6, p. 555-64, Nov-Dec 1996.

ROEBUCK, K. A.; FINNEGAN, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. ***J Leukoc Biol***, v. 66, n. 6, p. 876-88, Dec 1999.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. *Histologia: Texto e Atlas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica Panamericana, 1993.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. ***Pharmacol Res***, v. 48, n. 6, p. 601-6, Dec 2003.

RUIZ, L. M.; BEDOYA, G.; SALAZAR, J.; GARCIA DE, O. D.; PATINO, P. J. Dexamethasone inhibits apoptosis of human neutrophils induced by reactive oxygen species. ***Inflammation***, v. 26, n. 5, p. 215-22, Oct 2002.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. ***Micron***, v. 35, n. 3, p. 161-71, 2004.

RYVES, W. J.; EVANS, A. T.; OLIVIER, A. R.; PARKER, P. J.; EVANS, F. J. Activation of the PKC-isotypes alpha, beta 1, gamma, delta and epsilon by phorbol esters of different biological activities. ***FEBS Lett***, v. 288, p. 5-9, Aug 19 1991.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods Mol Biol*, v. 225, p. 291-303, 2003.

SAMPAIO, S. A. P.; CASTRO, R. M.; RIVITTI, E. A. *Dermatologia Básica*. 2. ed. São Paulo: Artes médicas, 2000.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochem Pharmacol*, v. 58, n. 5, p. 877-9, Sep 1 1999.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & therapeutics*, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHAKEL, K.; DOBEL, T.; BOSSELMANN, I. Future treatment options for atopic dermatitis - small molecules and beyond. *J Dermatol Sci*, v. 73, n. 2, p. 91-100, Feb 2014.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H.; MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol*, v. 15, n. 6, p. 406-20, Jun 2006.

SCHOEPE, S.; VONK, R.; SCHACKE, H.; ZOLLNER, T. M.; ASADULLAH, K.; ROSE, L. Shortened treatment duration of glucocorticoid-induced skin atrophy in rats. *Exp Dermatol*, v. 20, p. 853-5, Oct 2011.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. *Fitoterapia Racional - Um Guia De Fitoterapia para as Ciências da Saúde*. 4. ed., 2002.

SHAIK, M. S.; CHATTERJEE, A.; SINGH, M. Effects of monensin liposomes on the cytotoxicity, apoptosis and expression of multidrug resistance genes in doxorubicin-resistant human breast tumour (MCF-7/dox) cell-line. *J Pharm Pharmacol*, v. 56, p. 899-907, Jul 2004.

SHEIKH, N. A.; JONES, L. A. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. *Cancer Immunol Immunother*, v. 57, p. 1381-90, Sep 2008.

SHIMIZU, K.; FUKUNAGA, S.; YOSHIKAWA, K.; KONDO, R. Screening of extracts of Japanese woods for melanin biosynthesis inhibition. *Journal of Wood Science*, v. 53, n. 2, p. 153-160, 2007/04/01 2006.

SIGMUNSDOTTIR, H. Improving topical treatments for skin diseases. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, p. 239-45, Jun 2010.

SIMMONS, D. L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug discovery today**, v. 11, p. 210-219, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar 1988.

SKINNER, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 8, p. 22-31, 2005.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J.; KLEIN, R. M. *Euphorbiaceae. Flora Catarinense ilustrada*. Itajaí, 1988.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 5, p. 667-75, Feb 15 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Nova Odessa, SP, Brasil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.

SOWEMIMO, A.; VAN DE VENTER, M.; BAATJIES, L.; KOEKEMOER, T. Cytotoxic activity of selected Nigerian plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 6, n. 4, p. 526-528, 2009.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sci**, v. 67, n. 5, p. 477-502, Jun 23 2000.

SUZUKI, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; MIHARA, M. Anti-inflammatory mechanism of tocilizumab, a humanized anti-IL-6R antibody: effect on the expression of chemokine and adhesion molecule. **Rheumatol Int**, v. 30, n. 3, p. 309-15, Jan 2010.

TAN, J. K.; APHALE, A.; MALAVIYA, R.; SUN, Y.; GOTTLIEB, A. B. Mechanisms of action of etanercept in psoriasis. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 12, p. 38-45, 2007.

TANABE, T.; TOHNAI, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 95-114, Aug 2002.

TAO, X.; FAN, F.; HOFFMANN, V.; GAO, C. Y.; LONGO, N. S.; ZERFAS, P.; LIPSKY, P. E. Effective therapy for nephritis in (NZB x NZW)F1 mice with triptolide and triptodiolide, the principal active components of the Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. **Arthritis Rheum**, v. 58, p. 1774-83, Jun 2008.

THOMAS, M.; FINNEGAN, C. E.; ROGERS, K. M.; PURCELL, J. W.; TRIMBLE, A.; JOHNSTON, P. G.; BOLAND, M. P. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. **Cancer Res**, v. 64, p. 8357-64, Nov 15 2004.

THOPPIL, R. J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World J Hepatol**, v. 3, p. 228-49, Sep 27 2011.

TUNON, M. J.; GARCIA-MEDIAVILLA, M. V.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Curr Drug Metab**, v. 10, p. 256-71, Mar 2009.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S24-32, Feb 2010.

UCHIYAMA, Y.; YOROZU, K.; HASHIZUME, M.; MORIYA, Y.; MIHARA, M. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, ameliorates joint swelling in established monkey collagen-induced arthritis. **Biol Pharm Bull**, v. 31, p. 1159-63, Jun 2008.

UVA, L.; MIGUEL, D.; PINHEIRO, C.; ANTUNES, J.; CRUZ, D.; FERREIRA, J.; FILIPE, P. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. **Int J Endocrinol**, v. 2012, p. 561018, 2012.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERMA, A. K.; WHEELER, D. L.; AZIZ, M. H.; MANOHARAN, H. Protein kinase Cepsilon and development of squamous cell carcinoma, the nonmelanoma human skin cancer. **Mol Carcinog**, v. 45, p. 381-8, Jun 2006.

WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Ann Nutr Metab*, v. 47, p. 95-106, 2003.

WANG, H. Q.; SMART, R. C. Overexpression of protein kinase C-alpha in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF-alpha expression but not tumor promotion. *J Cell Sci*, v. 112 (Pt 20), p. 3497-506, Oct 1999.

WEGER, W. Current status and new developments in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis with biological agents. *Br J Pharmacol*, v. 160, n. 4, p. 810-20, Jun 2010.

WELLS, C. A.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Inflammation suppressor genes: please switch out all the lights. *J Leukoc Biol*, v. 78, n. 1, p. 9-13, Jul 2005.

WENIGER, B.; LOBSTEIN, A.; UM, B. H.; VONTHRON-SENECHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. *Phytother Res*, v. 19, p. 75-7, Jan 2005.

WERTH, V. P. Principles of therapy. In: GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. *Textbook of Medicine*: 22, 2006. p. 2462.

WEYERMANN, J.; LOCHMANN, D.; ZIMMER, A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm*, v. 288, n. 2, p. 369-76, Jan 20 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION: The world medicines situation 2011. *Traditional medicines: global situation, issues and challenges*. Geneva 2011. p. 14.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci*, v. 58, n. 18, p. 1485-507, 1996.

WITTMANN, M.; MCGONAGLE, D.; WERFEL, T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 25, n. 4, p. 443-51, Aug 2014.

YANG, L.; FROIO, R. M.; SCIUTO, T. E.; DVORAK, A. M.; ALON, R.; LUSCINSKAS, F. W. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, v. 106, p. 584-92, Jul 15 2005.

ZACHAROPOULOS, V. R.; PHILLIPS, D. M. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. ***Clin Diagn Lab Immunol***, v. 4, p. 465-8, Jul 1997.

ZHANG, Y.; MA, X. Triptolide inhibits IL-12/IL-23 expression in APCs via CCAAT/enhancer-binding protein alpha. ***J Immunol***, v. 184, p. 3866-77, Apr 1 2010.

ZIVADINOVIC, D.; GAMETCHU, B.; WATSON, C. S. Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. ***Breast Cancer Res***, v. 7, p. R101-12, 2005.

Anexos

9. ANEXOS

Artigos publicados durante o período do Doutorado:

- MENDES, D. A. G. B.; SPONCHIADO, G.; MEYER-SILVA, C.; OLIVEIRA, C. C.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. Anti-inflammatory effects of *Sapium grandulatum* (Vell.) Pax on macrophages cell line. **Phytomedicine**, artigo em preparação.
- MENDES, D. A. G. B.; SOLEY, B. S.; SPONCHIADO, G.; FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MEYER-SILVA, C.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. *Sapium grandulatum* (Vell.) Pax: New specie from gender with important anti-inflammatory activity. **Phytomedicine**, artigo submetido em Janeiro/2015.
- MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; MENDES, D. A.; CABRINI Dde, A.; NASCIMENTO, A. M.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; SANTOS, A. R.; WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: gastroprotective and ulcer healing properties in rats. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84762, 2014.
- HORINOUCI, C. D.; MENDES, D. A.; SOLEY BDA, S.; PIETROVSKI, E. F.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **J Ethnopharmacol**, v. 145, n. 1, p. 311-9, Jan 9 2013.
- DA SILVA, L. M.; ALLEMAND, A.; MENDES, D. A.; DOS SANTOS, A. C.; ANDRE, E.; DE SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; DARTORA, N.; MARQUES, M. C.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. Ethanolic extract of roots from *Arctium lappa* L. accelerates the healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats: Involvement of the antioxidant system. **Food Chem Toxicol**, v. 51, p. 179-87, Jan 2013.
- MENDES, D. A.; HORINOUCI, C. D.; PRUDENTE ADA, S.; SOLEY BDA, S.; ASSREUY, J.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. In vivo participation of nitric oxide in hyperproliferative epidermal phenomena in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 687, n. 1-3, p. 1-8, Jul 15 2012.
- ADAMI, M.; PRUDENTE ADA, S.; MENDES, D. A.; HORINOUCI, C. D.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. **J Dermatol Sci**, v. 66, n. 2, p. 127-35, May 2012.
- PIETROVSKI, E. F.; PALUDO, K. S.; MENDES, D. A.; GUIMARAES FDE, S.; VEIGA, S. S.; BUCHI DDE, F.; FONSECA, R. G.; ZAMPRONIO, A. R.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; FERREIRA, J.; OTUKI, M. F.; CABRINI, D. A. B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. **J Dermatol Sci**, v. 64, n. 1, p. 23-30, Oct 2011.

-
- CABRINI, D. A.; MORESCO, H. H.; IMAZU, P.; DA SILVA, C. D.; PIETROVSKI, E. F.; MENDES, D. A.; DA SILVEIRA PRUDENTE, A.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M.; OTUKI, M. F. Analysis of the Potential Topical Anti-Inflammatory Activity of *Averrhoa carambola* L. in Mice. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2011, p. 908059, 2011.
- ARIZA, D.; LIMA, M. M.; MOREIRA, C. G.; DOMBROWSKI, P. A.; AVILA, T. V.; ALLEMAND, A.; MENDES, D. A.; DA CUNHA, C.; VITAL, M. A. Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 35, n. 10, p. 1620-7, Oct 2010.
- POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L. M.; DOS SANTOS, A. C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MENDES, D. A.; ANDRE, E.; WERNER, M. F.; MARQUES, M. C. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **J Ethnopharmacol**, v. 130, n. 1, p. 85-92, Jul 6 2010.