



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

RAIMON RIOS DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DA *SOLANUM PANICULATUM* L. (JURUBEBA)

Salvador, BA
2015

RAIMON RIOS DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DA *SOLANUM PANICULATUM* L. (JURUBEBA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo.

Salvador, BA
2015

Ficha catalográfica

Silva, Raimon Rios da.

Investigação do potencial anti-inflamatório *in vitro* da *Sonalum paniculatum* L. (Jurubeba) / Raimon Rios da Silva. - 2015.
78 f. : il.

Inclui anexo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2015.

1. Imunofarmacologia. 2. Inflamação. 3. *Sonalum paniculatum*. 4. Jurubeba. I. Figueiredo, Camila Alexandrina Viana de. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. III. Título.

CDD -
CDU -

À Deus, meu Salvador e Redentor, por ter me coroado com o improvável e à meus pais (Edésio e Vani), por terem escolhido deliberadamente sonhar os meus sonhos em detrimento dos seus.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me conduz e me presenteou com o improvável. Seus planos são mais altos que os meus. Sou grato por Sua presença, luz e força sempre me abençoando e capacitando para todas as boas oportunidades a que me direciona. Obrigado meu Senhor!

A meus pais pela força e determinação, por compreenderem a minha ausência e por vibrarem em cada conquista minha. Devo minha vida a vocês!!!

A meus irmãos pelo amor, carinho e proteção a mim conferidos. Amo vocês!

A minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Camila Alexandrina Figueiredo, principalmente por ter acreditado e apostado em mim. Professora, obrigado por seu carinho, paciência e atenção constantes.

A Prof^ª. Dr^ª. Neuza Maria Alcântara-Neves (Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biointeração), pelas colaborações e por ter gentilmente cedido o espaço físico e equipamentos do LAA para a realização de várias etapas deste trabalho.

A minha Prof^ª. e amiga Dr^ª. Marta Santos Serafim Machado, pela amizade ao longo destes anos e por ter me proporcionado a oportunidade de despertar para aprender a fazer ciência e pesquisa. Sempre serei grato a você! Obrigado!

Ao Prof. Dr. Ryan Costa (Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador), a Tamires Cana Brasil e a Cintia Marques pela amizade e companheirismo. Sei que sempre posso contar com vocês! Meu muito obrigado!

Aos amigos Hugo Bernardino, Norma Vilany e Anaque Pires, pela parceria fiel. Sem dúvida alguma, compartilhei com vocês os melhores momentos desta jornada, inclusive as várias madrugadas e feriados no laboratório. Vocês são inesquecíveis!

A todos os meus colegas e amigos do IMUNOBIO e LAA, pelo apoio, carinho, companheirismo e agradáveis momentos de convivência.

Ao Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo (Departamento do medicamento, Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador) pela colaboração e orientações durante o preparo do extrato.

Ao Prof. Dr. Lain Carlos Pontes-de-Carvalho (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador) por ter viabilizado a aquisição dos animais durante a realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Adilva de Souza Conceição (Departamento de Educação, Universidade do Estado da Bahia, Campus VIII, Paulo Afonso) por ter gentilmente se dedicado a fazer o reconhecimento botânico da planta.

A Telma M. G. da Silva e a Prof^a. Dr^a. Tania Maria S. da Silva (Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife) pela prontidão e eficiência para realizar a padronização do extrato.

Aos funcionários do PPGIm, Dilcea, Geovane e Sônia, pela atenção, carinho e paciência.

A FAPESB e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a CIÊNCIA; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver AMOR, nada serei.”

I Coríntios 13:2.

“[...] Porque Deus é AMOR.”

I João 4:9.

RESUMO

Solanum paniculatum L. (Sp) é uma planta subtropical comum no Brasil, popularmente conhecida como “jurubeba”. Sp é utilizada na medicina popular para o tratamento de gastrite, bronquites e febre. Estudos prévios demonstram potencial antibiótico, antioxidante e de inibição da secreção de ácido gástrico desta espécie, no entanto, o potencial anti-inflamatório da mesma ainda é pouco explorado. No presente trabalho, investigamos o efeito anti-inflamatório do Extrato Hexânico dos Frutos de *S. paniculatum* (Sp). Para isto, esplenócitos de camundongo BALB/c foram estimulados ou não com o mitógeno pokeweed (PWM) e expostos ou não à 15, 30 e 60 µg/ml do extrato padronizado de Sp. O ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT demonstrou ausência de toxicidade de Sp sob células esplênicas, nestas condições. Neste mesmo modelo, avaliamos os níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 no sobrenadante da cultura, por ELISA. A inibição da produção de Óxido Nítrico (NO) foi avaliada pela técnica de Griess, utilizando macrófagos peritoneais murinos. A atividade estabilizadora de membrana foi testada pela indução de hemólise dos eritrócitos murinos e a inibição do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) foi avaliada por RT-qPCR. Os resultados demonstraram que Sp à 15, 30 e 60 µg/ml inibiu a proliferação celular induzida por PWM ($p < 0,001$), reduziu de forma significativa a liberação de IL-4 ($p < 0,001$) no sobrenadante da cultura, inibiu a produção de NO ($p < 0,001$) e melhorou a estabilidade da membrana celular de maneira concentração dependente. Ademais, Sp foi capaz de reduzir a produção de IFN- γ ($p < 0,001$), sem alterar os níveis de IL-10. O mecanismo pelo qual Sp inibiu tais parâmetros inflamatórios pode estar associado à inibição da expressão do NF- κ B ($p < 0,001$), avaliada neste trabalho. Nosso estudo é o primeiro a testar a ação anti-inflamatória de *S. paniculatum* e esta espécie parece ser uma importante candidata para o desenvolvimento de novas drogas. Mais pesquisas para análise do potencial anti-inflamatório de Sp devem ser realizadas, a fim de elucidar possíveis aplicações clínicas.

Palavras-chave: *Solanum paniculatum*. Inflamação. NF- κ B. Citocinas. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Solanum paniculatum L. (Sp) is a common subtropical plant in Brazil, popularly known as "jurubeba". Sp is used in folk medicine for the treatment of gastritis, bronchitis, and fever. Previous studies have shown potential antibiotic, antioxidant as well as the Sp's modulatory effect on gastric acid secretion, however, the Sp's anti-inflammatory potential is unexplored. In the present study, we have investigated the anti-inflammatory effect of the Hexane Extract of *S. paniculatum* Fruits (Sp). To this, mouse spleen cells from BALB/c mice were stimulated or not with pokeweed mitogen, and exposed or not to 15, 30, and 60 µg/ml of the standardized extract of Sp. Sp concentrations were determined by using MTT assay, which demonstrated lack of toxicity in spleen cells under the conditions evaluated. In spleen culture, was assessed the levels of IFN- γ , IL-4, and IL-10 in culture supernatants by ELISA. Also was evaluated the inhibition of nitric oxide (NO) by the Griess technique using murine peritoneal macrophages. The Sp membrane stabilizing property was assessed by hemolysis induced in murine erythrocytes and inhibition of Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) was assessed by RT-qPCR. The results showed that Sp at 15, 30, and 60 µg/ml inhibited cell proliferation ($p < 0.001$), decreased the release of IL-4 ($p < 0.001$) in the culture supernatant, inhibited NO production ($p < 0.001$), and improved the stabilization of the cell membrane in a concentration-dependent manner. Also, Sp was able to decrease the release of IFN- γ ($p < 0.001$) without altering IL-10 levels. The mechanism whereby Sp decreased inflammatory parameters investigated may be related to the inhibition of NF- κ B expression ($p < 0.001$). Our study is the first to test the anti-inflammatory action of *S. paniculatum* and this species appears to be an important candidate for the development of new drugs. Additional studies must be conducted in order to further explore the anti-inflammatory potential of Sp as well as to elucidate possible clinical applications.

Keywords: *Solanum paniculatum*. Inflammation. NF- κ B. Cytokines. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Componentes da via inflamatória.....	18
Figura 2:	Classificação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	24
Figura 3:	Genes sensíveis a glicocorticóides.....	26
Figura 4:	Arquitetura molecular envolvida no efeito anti-inflamatório dos glicocorticóides.....	29
Figura 5:	Descrição do desenho de <i>primers</i>	44
Figura 6:	Cromatograma obtido por CLAE-ELSD dos padrões β -sitosterol e estigmasterol.....	45
Figura 7:	Cromatograma obtido por CLAE-ELSD do estigmasterol e β -sitosterol presentes em <i>Sp</i> .	45
Figura 8:	Efeito citotóxico de <i>Sp</i>	46
Figura 9:	Efeito antiproliferativo de <i>Sp</i>	47
Figura 10:	Efeito de <i>Sp</i> na produção de citocinas.....	48
Figura 11:	Efeito de <i>Sp</i> na produção de NO^{2-}	49
Figura 12:	Efeito de <i>Sp</i> na estabilização da membrana de eritrócitos.....	50
Figura 13:	Efeito de <i>Sp</i> na expressão do NF- κ B.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Análise quantitativa das substâncias identificadas em <i>Sp</i>	46
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
CD	Grupamento de diferenciação
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
COX-3	Ciclooxigenase tipo 3
cPLA₂	Fosfolipase A ₂ citoplasmática
ΔΔCT	Varição do Ciclo Threshold
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio imunoenzimático ligado à enzima
ELSD	Espalhamento de Luz Evaporativo
eNOS	NOS endotelial
G	Força relativa da centrífuga
GCs	Guanilil Ciclase solúvel
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
GMP_c	Guanosina Monofosfato cíclica
GTP	Guanosina Trifosfato
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular tipo 1
IFN-γ	Interferon-gama
IκB	Inibidora de κ B
IκK	Quinase inibidora de NF- κ B
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor para IL-2
iNOS	NOS induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Kinase Ativada por Mitógeno Fosfatase 1
fosfatase 1	
MCP	Proteína quimiotática dos macrófagos

MIP-1	Proteína macrofágica inflamatória 1
MTT-tetrazólio	[3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)]
NF-κB	Fator Nuclear-Kappa B
NK	Neuroquinina
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PWM	Mitógeno <i>pokeweed</i>
RANTES	Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RPMI	Meio de cultura celular Instituto Roswell Park Memorial
RQ	Quantificação relativa
RT-qPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
SCF	Fator de Célula-tronco
Sp	Extrato Hexânico dos Frutos de <i>S. paniculatum</i>
TCR	Receptor de célula T
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	A INFLAMAÇÃO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	16
2.2	FARMACOTERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA.....	21
2.3	BIODIVERSIDADE BRASILEIRA.....	30
2.4	GÊNERO <i>SOLANUM</i> E <i>S. PANICULATUM</i>	32
3.	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	MATERIAL DA PLANTA E EXTRAÇÃO.....	37
4.2	PADRONIZAÇÃO DE <i>SP</i> POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE.....	37
4.3	ANIMAIS.....	38
4.4	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR.....	38
4.5	ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	39
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA.....	40
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE <i>SP</i> NA PRODUÇÃO NO.....	40
4.8	PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS.....	41
4.9	TESTE DE ESTABILIDADE DA MEMBRANA.....	42
4.10	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	42
4.11	PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	43
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO E QUANTIFICAÇÃO DO β -SITOSTEROL E ESTIGMASTEROL EM <i>SP</i>	45
5.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DE <i>SP</i>	46
5.3	<i>SP</i> REDUZIU A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	47
5.4	<i>SP</i> REDUZIU A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS SEM INTERFERIR NA RESPOSTA REGULATÓRIA.....	47
5.5	<i>SP</i> REDUZIU A PRODUÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	48
5.6	<i>SP</i> ESTABILIZOU A MEMBRANA DE ERITRÓCITOS.....	49
5.7	<i>SP</i> INIBIU A EXPRESSÃO DE NF- κ B.....	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO I	78

1 INTRODUÇÃO

Inflamação é um termo geral que consiste em um processo de respostas celulares e vasculares provocadas por estímulos e condições prejudiciais como infecções, exposição ao calor ou frio, isquemia ou trauma tecidual, que representa um mecanismo protetor do organismo para remover estes estímulos e iniciar o processo de cicatrização (SERHAN & WARD & GILROY, 2010; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Uma vez controlada, a resposta inflamatória tem efeitos benéficos, porém, pode tornar-se prejudicial se for prolongada, crônica ou desregulada, causando vários tipos de patologias, tais como, artrite, câncer, acidente vascular cerebral (FERRERO-MILIANI et al., 2007; MEDZHITOV, 2008; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011) e alergias (LAMBRECHT & HASMMAD, 2015).

A inflamação pode manifestar-se como um processo agudo ou crônico (FERRERO-MILIANI et al., 2007). A resposta inflamatória aguda é definida como uma série de respostas iniciais de tecidos que podem ocorrer nas primeiras horas após o estímulo lesivo. Os eventos vasculares que estão na base desta resposta são alterações como vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, adesão de leucócitos polimorfonucleares, agregação de plaquetas e hemorragia, induzidos pela ação de mediadores inflamatórios diversos (OKOLI et al., 2007; SERHAN & WARD & GILROY, 2010). Por outro lado, a inflamação crônica é uma resposta inflamatória prolongada que conduz a um deslocamento progressivo do tipo de células presentes no local da inflamação e é caracterizada por destruição e cura simultâneas dos tecidos lesados (EMING & KRIEG & DAVIDSON, 2007). Considera-se que é causada pela resposta persistente do sistema inato e adquirido, como acontece na artrite, câncer, asma e doenças autoimunes (SERHAN & WARD & GILROY, 2010).

A terapia atualmente disponível para o tratamento de condições inflamatórias são os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e não esteroidais (AINEs), porém estas drogas apresentam diversos efeitos colaterais (PAULI et al., 2005; CARVALHO, 2010; PINHEIRO & WANNMACHER, 2012). Entre os principais efeitos adversos ao uso dos AINEs estão os gastrintestinais, como esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal e insuficiência renal aguda (MONTEIRO et al., 2008). Ademais, existem efeitos indesejáveis como hemorragias e broncoespasmo (CARVALHO,

2010). Estes eventos podem acarretar disfunções sobre vários sistemas, como o cardiovascular, cerebrovascular, renal e reprodutor feminino (PINHEIRO & WANNMACHER, 2012).

Sobre os AIEs, Leclerc et al. (2004) e Pauli e colaboradores (2005), enfatizam que doses supra-fisiológicas ou tratamento prolongado com tais fármacos, promove o aparecimento de muitos efeitos adversos como, por exemplo, atrofia muscular, osteoporose, supressão do sistema imunológico e supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais. Covar et al. (2000) citam efeitos metabólicos adversos, tais como pressão sistólica elevada, níveis aumentados de lipídeos circulantes e resistência à insulina, como observado na síndrome metabólica. Arnaldi e colaboradores (2003) apontam também que o excesso de corticoides tem sido associado a uma síndrome metabólica similar a síndrome de *Cushing*, na qual há uma secreção aumentada de glicocorticoides, devido a um adenoma pituitário, ocasionando obesidade central, hipertensão, hiperlipidemia e intolerância à glicose.

Devido aos efeitos adversos dos anti-inflamatórios, novas substâncias com potencial anti-inflamatório, com baixos custos e associados a uma menor ocorrência de efeitos colaterais têm sido pesquisadas na tentativa de representar alternativa aos medicamentos anti-inflamatórios disponíveis e a flora brasileira pode ser uma importante fonte de fármacos (ANOSIKE & OBIDOA & EZEANYIKA, 2012).

Um estudo etnofarmacológico realizado por nosso grupo em um município do recôncavo baiano localizado às margens da Baía de todos os Santos evidenciou que a população afrodescendente residente neste município usa diversos produtos naturais para tratar inflamações e alergias. Dentre os vários produtos citados pelos indivíduos entrevistados, a espécie *Solanum paniculatum* L. foi uma das mais referidas para tratamento de inflamação alérgica (BERNARDINO & QUEIROZ & RIOS et al. - artigo submetido).

A planta *Solanum paniculatum* L., é uma espécie subtropical, comum no Brasil, conhecida popularmente como “jurubeba verdadeira” e utilizada na medicina popular brasileira como infusão, preparada a partir de suas raízes, folhas ou frutos para o tratamento de icterícia, hepatite crônica, úlcera gástrica e febres intermitentes. Estudos fitoquímicos da espécie mostraram a presença de diversos alcalóides

esteroidais, como jurubebina, jubebina e solanina, bem como algumas saponinas: isojuripidina, isojurubidina, isopaniculidina e jurubidina (MESIA-VELA et al., 2002).

Estudos fitoquímicos prévios têm demonstrado a presença de β -sitosterol e estigmasterol em espécies do gênero *Solanum*, como *S. buddleifolium*, *S. lycocarpum* e *S. cathayanum* (XIE et al., 2008; OLIVEIRA, 2010; PINTO et al., 2013). Um trabalho realizado por Valadares (2009) mostrou a presença de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol em *S. paniculatum*.

β -sitosterol e estigmasterol são esteroides estruturalmente semelhantes à molécula do colesterol, identificados em várias espécies vegetais, com diversas atividades biológicas já descritas, tais como anti-inflamatória, hipocolesterelomiante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica e anticarcinogênica (SOTIROUDIS & KYRTOPOULOS, 2008; PANDA et al., 2009; GABAY et al., 2010). Cavalcante e colaboradores (2010) comprovaram o potencial anti-inflamatório de uma mistura de estigmasterol e β -sitosterol. Além do mais, Backhouse et al. (2008) destacaram a ação analgésica e anti-inflamatória de β -sitosterol e estigmasterol, administrados por via oral e tópica, quando em comparação com anti-inflamatórios padrão como nimesulida (4-nitro-2-fenoxi-metanosulfonânida) e indometacina (1--5-metoxi-2-metil-1H-indole-3-acético).

A literatura descreve atividade antibiótica (LÔBO, 2010) e de inibição da secreção de ácido gástrico (MESIA-VELA et al., 2002) por *S. paniculatum*. Existe, inclusive, no Brasil, um composto fitoterápico com o extrato de várias plantas, incluindo *S. paniculatum*, denominado Ierobina®, indicado para tratamento de dispepsia (MESIA-VELA et al., 2002). Ribeiro (2007) comprovou a capacidade antioxidante da espécie, pelo método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Não existem trabalhos testando o potencial anti-inflamatório de *S. paniculatum*. Aqui, investigamos o efeito anti-inflamatório, bem como o provável mecanismo de ação, do extrato hexânico dos frutos de *S. paniculatum*, em modelos de estudos *in vitro*, utilizando esplenócitos, macrófagos e eritrócitos murinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A INFLAMAÇÃO E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Inflamação ou flogose (do latim *inflamare*, do grego *phlogos*, que significam “pegar fogo”), é um termo geral, usado para caracterizar mudanças que ocorrem nos tecidos em casos de infecções, reações imunológicas ou danos teciduais. Trata-se de uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares e representa um mecanismo protetor do organismo para remover os estímulos prejudiciais e iniciar o processo de cicatrização (FERRERO-MILIANI et al., 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; BRASILEIRO-FILHO, 2011). Embora a inflamação seja um evento intrinsecamente benéfico que leve à remoção de fatores ofensivos e à restauração da estrutura tecidual e da sua função fisiológica, o processo inflamatório prolongado e crônico, associado a níveis elevados de várias citocinas tem sido encontrado na patogênese de várias doenças, como artrite, câncer e acidente vascular cerebral, bem como em doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (FERRERO-MILIANI et al., 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

Os sinais da inflamação foram descritos em papiros egípcios que datam de aproximadamente 3000 a.C. Contudo, foi Celsus, escritor romano do primeiro século d.C., quem primeiro citou os quatro sinais e sintomas clássicos: eritema, edema, calor e dor. Depois, Rudolph Virchow, em 1858, em seu livro intitulado “*Cellular pathologie*”, acrescentou outro sinal que foi a perda de função (COLLINS, 1999).

O vasto conjunto de enfermidades inflamatórias incluem diversas desordens que estão entre os principais problemas de saúde pública no mundo (DUMMER & THOMÉ & VERONESE, 2007; ELIA et al., 2007). Estas doenças sobrecarregam o sistema de saúde, encarecem os investimentos financeiros na área da saúde e implicam na qualidade de vida das pessoas afetadas (BAHADORI et al., 2009).

São muitos os tipos de desordens inflamatórias, a exemplo, doenças cardiovasculares (LIBBY, 2002; PEARSON et al., 2003; RIDKER, 2005), neoplasias

(KARIN, 2006; MANTOVANI et al., 2008; AGGARWAL & VIJAYALEKSHMI & SUNG, 2009), doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson e Alzheimer (WYSS CORAY & MUCKE, 2002), doenças alérgicas tais como asma e dermatite atópica (LAMBRECHT & HASMMAD, 2015) e doenças autoimunes tais como diabetes mellitus e tireoidite de Hashimoto (ERLICH & PAZ, 2010; CATUREGLI & DE REMIGIS & ROSE, 2014; TSUR et al., 2014).

É consenso que a inflamação seja um mecanismo benéfico do organismo para resgate da homeostasia. Por outro lado, sabe-se que quando esse processo cronifica ou amplifica demasiadamente, pode favorecer a instalação e a progressão de doenças diversas (GERARD & ROLLINS, 2001). Moss et al. (2004) enfatizam que a exacerbação da resposta inflamatória leva à perda de tolerância periférica aos componentes dos próprios tecidos, que se tornam antigênicos e desencadeiam inflamação local.

A inflamação pode manifestar-se como um processo agudo ou crônico (FERRERO-MILIANI et al., 2007). A inflamação aguda é a resposta inicial do corpo a estímulos prejudiciais e é alcançada pelo aumento da circulação de plasma e leucócitos do sangue para os tecidos lesados. Esse processo é iniciado por células já presentes nos tecidos e caracteriza-se por alterações vasculares, incluindo vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, induzidos pela ação de mediadores inflamatórios diversos (OKOLI et al., 2007). Por outro lado, a inflamação crônica é uma resposta inflamatória prolongada que conduz a um deslocamento progressivo do tipo de células presentes no local da inflamação caracterizada por destruição e cura simultâneas dos tecidos lesados (EMING & KRIEG & DAVIDSON, 2007).

Uma resposta inflamatória típica consiste de quatro componentes: indutores inflamatórios, sensores que detectam os indutores, mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores e tecidos-alvo afetados pelos mediadores inflamatórios (figura 1). Cada componente vem em múltiplas formas e suas combinações e funções são distintas para cada via inflamatória. O tipo de caminho induzido sob determinadas condições depende da natureza do gatilho inflamatório (PECCHI et al, 2009). Por exemplo, dependendo do tipo de infecção (bacteriana, viral ou parasitária), os sensores, os mediadores e tecidos-alvo irão variar conforme o tipo apropriado de resposta inflamatória induzida (MEDZHITOV, 2010).

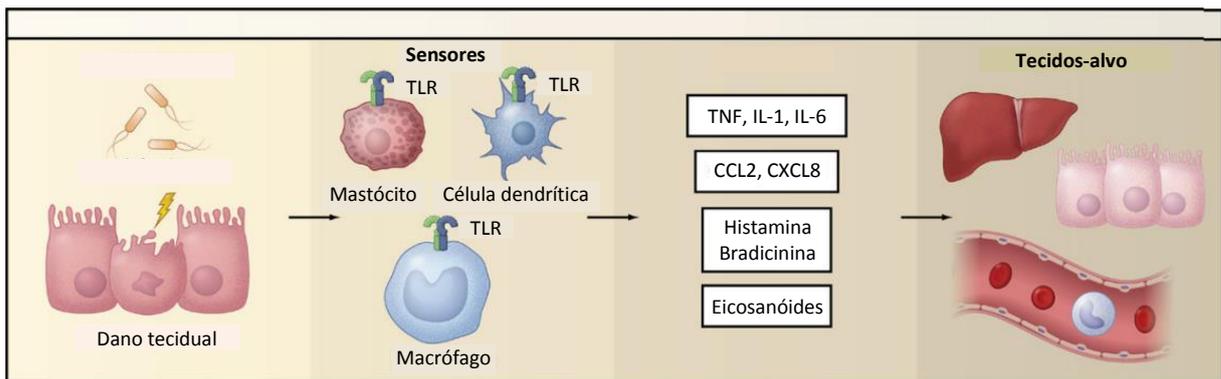


Figura 1: Componentes da via inflamatória.

Fonte: Adaptado de Medzhitov, R. "Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame". Cell, 2010.

A propósito, os mediadores químicos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório podem ser de origem tissular ou plasmática. Os mediadores de origem tissular correspondem às aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária, eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos. Por sua vez, os mediadores de origem plasmática dizem respeito aos sistemas de coagulação, do complemento e das cininas (GILMAN et al., 2006; PERIANAYAGAM & SHARMA & PILLAI, 2006; SPINOSA & GÓRNIK & BERNARDI, 2006; FAVACHO, 2009). Ingersoll et al. (2011), afirmam que estas moléculas mediadoras trabalham em conjunto para provocar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Assim, ocasionam o aumento do fluxo sanguíneo, a exsudação de líquidos e proteínas do plasma e a migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para os tecidos lesados.

O citoplasma dos neutrófilos e monócitos que são atraídos ao local da inflamação pelos mediadores químicos possuem organelas chamadas lisossomos. Os lisossomos contêm enzimas potentes. Durante a fagocitose, o material é incluído nos vacúolos do citoplasma celular e os lisossomos dissolvem o material através da ação de suas enzimas hidrolíticas (CROWLEY, 2010). Além disso, com a necrose dos leucócitos inflamatórios, há extravasamento de enzimas lisossomais e outras substâncias tóxicas para o espaço extracelular devido ao rompimento da membrana dos lisossomos (TORTORA & DERRICKSON, 2009).

É comprovado que a produção de radicais está intimamente ligada ao processo inflamatório. O sistema imune produz um grande número de substâncias químicas potentes que incluem os radicais livres (SARMA & MALLICK & GHOSH, 2010;

JIANG et al., 2014). No processo inflamatório, os radicais que assumem maior relevância são os derivados do óxido nítrico (BOGDAN, 2001; YEN & LAI & CHOU, 2001).

O óxido nítrico é um radical gasoso lipossolúvel produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos. É produzido pela conversão de L-arginina em L-citrulina por meio da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) (REDINGTON, 2006; FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). Há três diferentes isoformas da NOS: NOS neuronal (nNOS) e NOS epitelial (eNOS), expressas constitutivamente, e NOS induzida (iNOS), que precisa ser estimulada para ser ativada (ALDERTON & COOPER & KNOWLES, 2001; FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). Entre as principais funções do NO estão a indução de vasodilatação e a destruição de microorganismos (MACMICKING & XIE & NATHAN, 1997; FÖRSTERMANN & MÜNZEL, 2006; FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). Quando existe em grandes quantidades, assume propriedades pró-oxidantes, de apoptose e regulação dos efeitos das citocinas (NAPOLI et al., 2010).

O mecanismo de ação do NO ocorre principalmente por aumento intracelular de GMPc (Guanosina Monofosfato cíclica). Para isso, NO se liga ao grupo heme da Guanilil Ciclase solúvel (GCs), convertendo GTP (Guanosina Trifosfato) em GMPc, que se liga aos domínios específicos de moléculas efetoras, como proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases, que desencadeiam respostas em nível celular. As enzimas nNOS e eNOS podem ser expressas em níveis basais no sistema nervoso entérico e nas células endoteliais vasculares, respectivamente. A iNOS é expressa em macrófagos e neutrófilos, além de estar presente em células epiteliais e neurônios. Esta enzima é cálcio-dependente e sua expressão é elevada quando há estímulos lesivos e/ou processos inflamatórios com o intuito de aumentar a produção de NO (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012). Conforme Damatta et al. (2000), a produção de óxido nítrico pode ser considerada uma característica típica de macrófagos ativados.

As citocinas, por sua vez, participam do processo inflamatório coordenando e ativando as respostas das células do sistema imune. Por esse motivo, são mediadores críticos no processo inflamatório (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Segundo Cotran & Kumar & Collins (2000), Sherwood & Toliver-Kinsky (2004)

e Verri Junior et al. (2006), citocinas são polipeptídeos sintetizados e secretados por tipos celulares variados em resposta a estímulos provocados por bactérias, vírus, parasitas ou em resposta a outras citocinas e participam crucialmente na formação dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação.

A citocina Interferon (IFN)- γ atua ativando macrófagos, células natural Killer e músculo liso endotelial. O aumento de IFN- γ promove a ativação, diferenciação e proliferação de células T e a ativação de macrófagos para produção de citocinas inflamatórias, especialmente Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e Interleucina (IL)-6 e NO. Além disso, IFN- γ induz a adesão celular, apoptose celular e deposição de matriz extracelular, responsáveis por disfunção das células endoteliais, contribuindo assim, para o processo inflamatório (SIKORSKI, 2012).

Nos casos das inflamações de perfil Th2, o contato com alérgenos ou helmintos estimula o aumento do número de linfócitos T CD4⁺ produtores de citocinas deste perfil (MOSMANN & SAD, 1996; DÍAZ & ALLEN, 2007; BOUCHERY et al., 2014). Existem muitos estudos demonstrando que níveis elevados de IL-4, IL-5 e IL-13 estão diretamente relacionados com o aumento de eosinofilia e inflamação nas vias aéreas, comuns em doenças como asma e rinite alérgica (COFFMAN et al., 1986; MOSMANN & COFFMAN, 1989; WILLIS-KARP et al., 1998; BRAUNSTAHL et al., 2000; BRAUNSTAHL et al., 2001).

Está estabelecido que a IL-4 é responsável pela estimulação de plasmócitos para secretarem IgE. A IL-4 também pode estimular o aumento da expressão de receptores para IgE em mastócitos e basófilos. Isso explica em partes, porque níveis elevados de IL-4 podem acentuar a inflamação alérgica (COFFMAN et al., 1986; PAWANKAR et al., 1997; COSTA et al., 2013). Basófilos e mastócitos apresentam em sua superfície celular o receptor de alta afinidade para IgE e podem reagir imediatamente quando há reexposição a alérgenos relevantes (PAWANKAR et al., 1997; LAMBRECHT & HAMMAD, 2015). Ao entrarem em contato com o alérgeno e serem ativados, estes leucócitos liberam seus grânulos pré-formados, ricos em aminas vasoativas e heparina, dentre outros e produzem mediadores lipídicos e citocinas, estimulando o extravasamento de líquido intravascular e células efectoras CD4⁺ (WAKAHARA et al., 2013). Existe na literatura a indicação de que os basófilos podem estar envolvidos também, no remodelamento tecidual das vias aéreas,

característico na fisiopatologia da asma que ocorre justamente devido a inflamação persistente das vias aéreas (LAMBRECHT & HAMMAD, 2015).

A regulação da produção das citocinas e dos mediadores inflamatórios é controlada por um fator de transcrição chave que participa da coordenação da resposta inflamatória e contribui para o desenvolvimento do sistema imunológico, designado Fator Nuclear-Kappa B (NF- κ B) (SEN, 2011). O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 e p50, descoberto em 1986 por Sen e Baltimore (SEN & BALTIMORE, 1986). Uma vez ativado por agentes como lipopolissacarídeos, o NF- κ B possui a capacidade de ligar-se a regiões promotoras de genes envolvidos na resposta inflamatória (SHALNIK, 2002). Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, designada Inibidora de κ B (I κ B). Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação de I κ B são necessárias para que ocorra a translocação. Vários estímulos podem ativar NF- κ B, estes incluem neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, glicocorticoides e produtos de reações de enzimas como a iNOS e a ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997; GILMORE, 2006).

2.2 FARMACOTERAPIA ANTI-INFLAMATÓRIA

Alguns sinais e sintomas da inflamação como edema, dor ou lesão tecidual, por exemplo, podem causar desconforto aos pacientes. Nesses casos, as intervenções terapêuticas mais comuns incluem o uso de fármacos que reduzem o processo inflamatório por meio da inibição da produção, da liberação ou da ação de mediadores inflamatórios (RAINSFORD, 2007).

Os fármacos anti-inflamatórios podem ser indicados em diversas condições: analgesia, inibição da inflamação, antipirese e até mesmo, profilaxia contra algumas doenças cardiovasculares. São importantes instrumentos no tratamento da dor e podem ser associados com outros compostos, como os opióides, por exemplo, reduzindo as doses analgésicas dos AINEs e a incidência de seus efeitos colaterais

(RAINSFORD, 2007). Por outro lado, os anti-inflamatórios esteroides (AIEs), são utilizados especialmente por pacientes com doenças inflamatórias crônicas, principalmente de origem autoimune e apresentam atividade anti-inflamatória mais ampla do que aquela apresentada pelos AINEs (BARNES & ADCOCK, 1993).

Os AINEs são o grupo de fármacos mais consumidos no mundo (SOLOMON, 2007; YEOMANS, 2011). Desde que Leraux demonstrou os efeitos antipiréticos da salicina em 1829, um longo percurso de pesquisas vem sendo trilhado. Em 1875 o salicilato de sódio foi utilizado para tratamento de febre reumática e gota. Em 1899, finalmente, o ácido acetilsalicílico (AAS) foi introduzido na medicina para tratamento de inflamações (ARDOIN & SUNDY, 2006; SOLOMON, 2007; CARVALHO, 2010; VONKEMAN & LAAR, 2010).

Com a toxicidade do AAS, sobretudo gastrintestinal, buscou-se sintetizar outras substâncias com efeitos adversos menores, e assim desenvolveu-se a fenilbutazona (4-butyl-1,2-diphenyl-pyrazolidine-3,5-dione), o primeiro anti-inflamatório não-salicilato, no início de 1950. Contudo, casos de agranulocitose foram associados ao seu uso, o que ocasionou o progressivo abandono da sua utilização (KLIPPEL et al., 2008). Até os dias de hoje, o desafio é encontrar um equilíbrio entre os benefícios e os efeitos indesejáveis destes fármacos e procurar novos agentes de igual eficácia e maior segurança (YEOMANS, 2011).

O principal mecanismo de ação dos AINES é a inibição da produção de prostaglandinas, provavelmente por competição com o sítio de ligação da enzima ciclooxigenase (COX). Em 1991, investigadores descobriram uma segunda isoforma da COX e denominaram a molécula até então conhecida de COX-1 e a isoforma recém descoberta de ciclooxigenase-2 (COX-2). Assim, em 1998, o celecoxib (4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide), o primeiro inibidor seletivo da COX-2, foi aprovado pela “*Food and Drug Administration*” para utilização em osteoartrite e artrite reumatóide e posteriormente para uso em situações de dor. O sucesso desta nova classe de AINEs surgiu quando foi provado serem tão eficazes quanto os AINES tradicionais (PASCUCCI, 2002).

Mais recentemente, trabalhos descrevem uma terceira isoforma da COX, variante do gene da COX-1, descrita como COX-3, a qual encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral e pode também ser encontrada na medula espinhal e coração,

sendo mais sensível ao paracetamol, sugerindo que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário de analgesia promovida pelos AINEs (CHANDRASEKHARAN et al, 2002). Esse mecanismo de ação explica inicialmente porque essas drogas podem inibir a dor e a febre. A relevância desta isoforma ainda não está completamente explicada (FELDMAN, 2007; KIM & FLACH & JAMPOL, 2010).

Está comprovado que a maioria dos AINEs inibem a COX-1 e COX-2 de forma reversível e não seletiva. No entanto, existem AINES, que as acetilam de forma irreversível, como os salicilatos, por exemplo. As ações anti-inflamatória, antipirética e analgésica ocorrem geralmente pela inibição da COX-2, enquanto os efeitos indesejáveis, na grande maioria das vezes, resultam da inibição da COX-1 (CARVALHO, 2010). A figura 2 mostra uma relação de AINES e os classificam conforme a seletividade ou não seletividade para inibir a COX, independentemente da isoforma inibida.

Entre os principais efeitos colaterais ao uso dos AINEs estão os gastrintestinais, como esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal. Mas, além destes, sabe-se que a inibição da síntese de prostaglandinas pode explicar a toxicidade renal, pois isso ocasiona a isquemia renal reversível, declínio da pressão hidrostática e insuficiência renal aguda (MONTEIRO et al., 2008). Ademais, existem ainda efeitos indesejáveis como hemorragias e broncoespasmo (CARVALHO, 2010). Estes eventos podem acarretar disfunções sobre vários sistemas, como o cardiovascular, cerebrovascular, renal e reprodutor feminino (PINHEIRO & WANNMACHER, 2012).

Pinheiro & Wannmacher (2012) comentam que quanto aos inibidores seletivos da COX-2 (figura 2), sabe-se que eles ligam-se seletivamente à COX-2 e a bloqueiam, mantendo a eficácia anti-inflamatória e com menos efeitos adversos gastrintestinais. Contudo, existem efeitos indesejáveis importantes relacionados ao seu uso, sobretudo relacionados à cardiotoxicidade.

INIBIDORES NÃO SELETIVOS DA COX
Derivados do Ácido Salicílico (salicilatos) <i>Ácido Acetilsalicílico (Aspirina), Salicilato de Sódio, Salicilato de Metila, Diflunisal, Flunfenisal, Sulfassalazina, Olsalazina</i>
Derivados Pirazolônicos <i>Dipirona, Fenilbutazona, Apazona, Sulfimpirazona</i>
Derivados do Para-aminofenol <i>Paracetamol (Acetaminofeno)</i>
Derivados do Ácido Indolacético e Ácido Indenoacético <i>Indometacina, Sulindaco, Etodolaco</i>
Derivados do Ácido N-fenilantranílico (fenamatos) <i>Ácido Mefenâmico, Ácido Meclofenâmico, Ácido Flufenâmico, Ácido Tolfenâmico, Ácido Etofenâmico</i>
Derivados do Ácido Pirrolalcanoico <i>Tolmetino, Cetorolaco</i>
Derivados do Ácido Fenilacético <i>Diclofenaco de Sódio, Aceclofenaco</i>
Derivados do Ácido Propiônico <i>Ibuprofeno, Naproxeno, Flurbiprofeno, Cetoprofeno, Fenoprofeno, Oxaprozino, Indoprofeno, Ácido Tiaprofênico</i>
Derivado do Ácido Enólico (Oxicam) <i>Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Sudoxicam, Isoxicam, Ampiroxicam, Droxicam, Lornoxicam, Cinoxicam, Ampiroxicam, Pivoxicam</i>
Derivado do Ácido Naftilacético <i>Nabumetona, Proquazona</i>
Derivados do Ácido Carbâmico <i>Flupirtina</i>
INIBIDORES SELETIVOS DA COX-2

Derivado da Sulfonamida <i>Nimesulida</i>
Derivado do Ácido Indolacético <i>Etodolaco</i>
Derivado FuranonaDiarilsubstituído <i>Rofecoxib</i>
Derivado PirazolDiarilsubstituído <i>Celecoxib</i>
Derivado BiperidínicoDiarilsubstituído <i>Etoricoxib</i>
Derivado IsoxazolDiarilsubstituído <i>Valdecoxib</i>

Figura 2: Classificação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

Fonte: Adaptado de SILVA & MENDONÇA & PARTATA. “Anti-inflamatórios não-esteroides e suas propriedades gerais”. Revista Científica do ITPAC, 2014.

Apesar dos AINEs estarem entre as drogas mais prescritas para tratamento de inflamações no mundo, não há um fármaco ideal destituído de potenciais efeitos colaterais (BATLOUNI, 2010). Inclusive, não existem estudos na literatura que comprovem a segurança do uso de AINEs. Ainda que estas drogas sejam utilizadas por curto período, não é possível descartar a possibilidade de efeitos adversos atribuídos a elas (PINHEIRO & WANNMACHER, 2012).

Os corticoides, por sua vez, são hormônios produzidos endogenamente no córtex adrenal e, em seguida, secretados para a circulação, através da qual atingem os seus respectivos órgãos-alvo. Por serem compostos lipofílicos, se distribuem livremente nos compartimentos intracelular e extracelular (DÓREA, 2006). Sobre eles, pode-se dizer que são os medicamentos anti-inflamatórios e imunomoduladores mais potentes disponíveis atualmente. Na verdade, quer sejam administrados sistemicamente ou não, são as drogas de primeira linha para o tratamento de muitos processos inflamatórios e têm sido amplamente utilizadas para o tratamento de desordens autoimunes, alergias, rejeição de aloenxertos, dentre outras (BARNES, 1998; BRUTON & LAZO & PARKER, 2006; SIMONS, 2008).

Barnes (2006) e Clark (2008) comentam que os corticosteroides podem suprimir a inflamação, aumentando a síntese de proteínas anti-inflamatórias, tais como a anexina-1, IL-10, Proteína Quinase Ativada por Mitógeno Fosfatase 1 (MAPK Fosfatase 1) e I κ B. Para eles, o mecanismo de ação está ligado ao número de genes diretamente regulado por corticosteroides, estimado como estando entre 10 e 100 ou indiretamente regulados através da interação com outros fatores de transcrição.

Dentre os genes que podem ter sua transcrição alterada pela ação dos glicocorticoides, estão alguns que codificam para proteínas pró-inflamatórias, incluindo um grande número de citocinas tais como as interleucinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, e 13, TNF- α , Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), quimiocinas (IL-8, Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais - RANTES), proteína 1 α macrófágica inflamatória, proteína quimiotática de macrófagos 1, 2, 3, e 4, eotaxina), moléculas de adesão (molécula de adesão intracelular 1, molécula de adesão vascular-1, E-selectina), e as enzimas que regulam a síntese de mediadores (iNOS, COX-2, fosfolipase A₂ citoplasmática – cPLA₂) (ADCOCK & ITO, 2000; PELAIA et al., 2003). A figura 3 mostra genes que são sensíveis a glicocorticoides.

Transcrição aumentada

Lipoproteína-1 / anexina-1 (inibidor de fosfolipase A₂)
 β ₂-adrenoreceptores
 Proteína secretada inibidora de leucócitos (SLPI)
 Proteína celular Clara (CC10, inibidor de fosfolipase A₂)
 Antagonista para o receptor de IL-1
 IL-1R2
 I- κ B α (inibidor de NF- κ B)
 MAPK fosfatase 1
 CD163 (receptor *scavenger*)

Transcrição diminuída

Citocinas

(IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, TNF- α , GM-CSF, SCF)

Quimiocinas

(IL-8, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxina)

iNOS

COX-2

Endotelina-1

Receptores NK₁, Receptores NK₂

Moléculas de adesão (ICAM-1, E-selectina)

cPLA₂

CD163: Grupamento de Diferenciação 163; GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos; SCF: Fator de Célula-tronco; RANTES: Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais; MIP-1: Proteína 1 macrófágica inflamatória; MCP: Proteína quimioatática dos macrófagos; NK: Neuroquinina; ICAM-1: Molécula 1 de adesão intercelular.

Figura 3: Genes sensíveis a glicocorticoides.

Fonte: Adaptado de Adcock & Lane. "Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms". Journal of Endocrinology, 2003.

Sobre a inibição das prostaglandinas, pode-se afirmar que os glicocorticoides podem fazê-lo por pelo menos três mecanismos independentes: indução e ativação de anexina-1, indução de MAPK fosfatase 1 e repressão da transcrição de COX-2, como pode ser visualizado na figura 4 (RHEN & CIDLOWSKI, 2005).

Roviezzo e colaboradores (2002), mostraram que a ativação de cPLA₂ por algum estímulo inflamatório inicia com o movimento da fosfolipase do citosol para a membrana perinuclear, onde ocorre a hidrólise de fosfolipídeos e a liberação do ácido araquidônico. Os glicocorticoides induzem anexina-1, a qual inibe cPLA₂, evitando a liberação do ácido araquidônico e sua posterior conversão para eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e leucotrienos).

Citocinas, infecções bacterianas e virais e radiação ultravioleta são alguns dos sinais inflamatórios que ativam cascatas de MAPK, ativando uma cascata de quinases que ativa Jun N-terminal, culminando na fosforilação do fator de transcrição c-Jun. A MAPK fosfatase 1 induzida pelos glicocorticoides desfosforila e inativa a quinase Jun N-terminal, inibindo a transcrição mediada por c-Jun. MAPK fosfatase 1 também

desfosforila e inativa todas as proteínas da família MAPK, incluindo Jun N-terminal e p38. Por esses motivos, pode-se afirmar que os glicocorticoides inibem a atividade da cPLA₂ (DE BOSSCHER & VANDEN & HAEGEMAN, 2003).

Um alvo principal para a ação dos corticosteroides também é NF-κB (BARNES & KARIN, 1997). Este é ativado por vários estímulos, incluindo citocinas, vírus e desafios imunes (BALDWIN, 2001). Através dos sinais de receptores da superfície celular, como o TCR, por exemplo, há a fosforilação de quinases associadas ao receptor. Estas, por sua vez, fosforilam quinases intracelulares específicas (quinase inibidora de NF-κB - IκK). A fosforilação de IκKs resulta em fosforilação da inibidora citoplasmática de NF-κB (I-κBα) e na consequente marcação desta para ser degradada no proteossoma. Isto liberta NF-κB, permitindo a sua translocação nuclear e a sua ligação a elementos de respostas específicas dentro das regiões reguladoras de genes responsivos no DNA, aumentando a produção de citocinas e mediadores inflamatórios (TRAENCKNER & WILK & BAEUERLE, 1994; GHOSH & KARIN, 2002; RHEN & CIDLOWSKI, 2004).

A figura 4 resume mecanismos de ação dos glicocorticoides, apresentando seu papel na inibição de NF-κB, indução de antagonistas de cPLA₂, anexina-1 e MAPK fosfatase 1 e consequente repressão da COX-2 e da síntese de prostaglandinas (RHEN & CIDLOWSKI, 2005).

Mesmo que os glicocorticoides sejam amplamente utilizados em intervenções terapêuticas, os anti-inflamatórios esteroidais apresentam vários efeitos indesejáveis. O uso prolongado desses medicamentos apresenta efeitos adversos proeminentes devido à ação comum aos esteroides (SCHACKE & DOCKE & ASADULLAH, 2002; ABEBE, 2002). Leclerc et al. (2004) e Pauli e colaboradores (2005), enfatizam que o uso de glicocorticoides pode provocar o aparecimento de muitos efeitos adversos, tais como, atrofia muscular, osteoporose e supressão do sistema imunológico. Covar et al. (2000) e Arnaldi e colaboradores (2003) apontam ainda que o excesso de corticoides tem sido associado a uma síndrome metabólica conhecida como Síndrome de *Cushing*, na qual a secreção aumentada de glicocorticoides, devido a um adenoma pituitário, conduz à obesidade central, hipertensão, hiperlipidemia e intolerância à glicose.

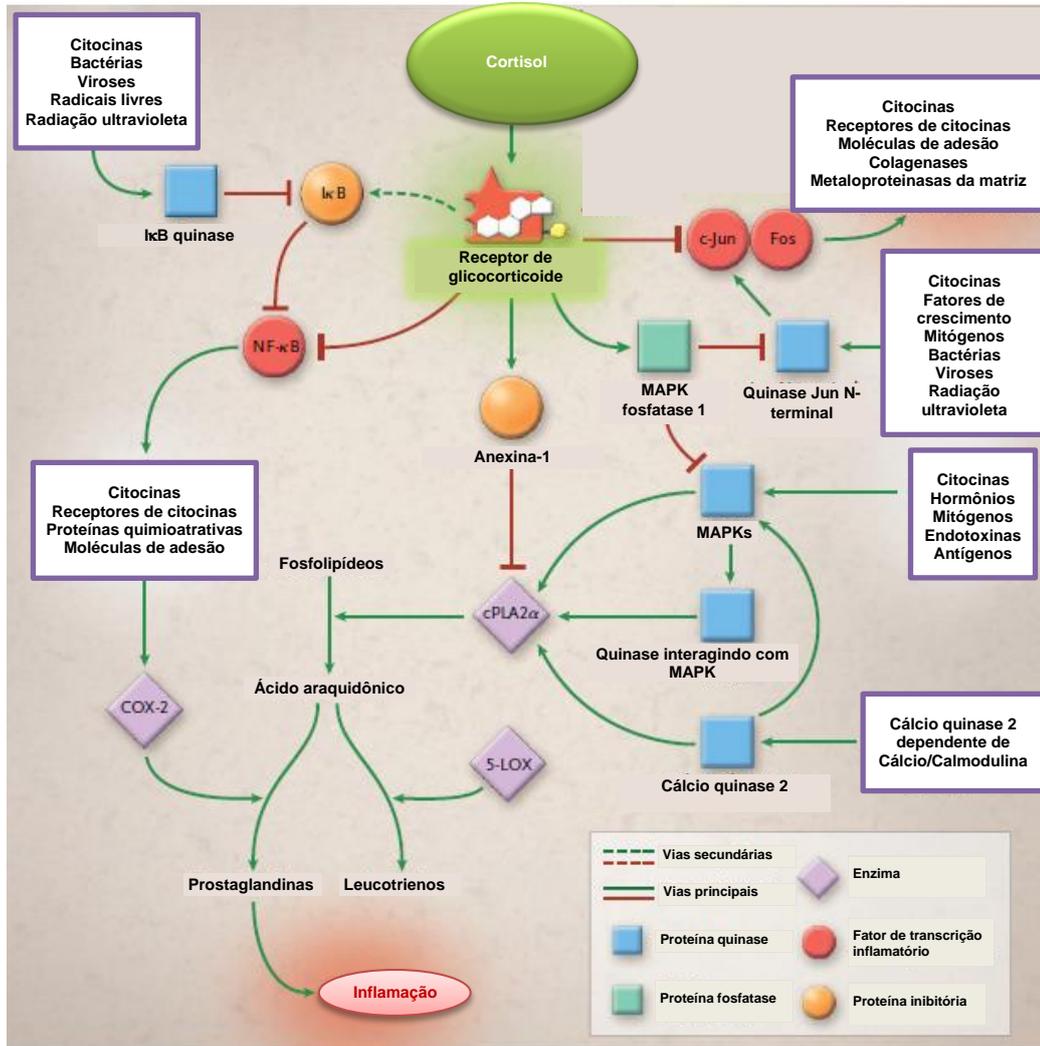


Figura 4: Arquitetura molecular envolvida no efeito anti-inflamatório dos glicocorticoides.

Fonte: Adaptado de “Antiinflammatory action of glucocorticoids: new mechanisms for old drugs”. The New England Journal of Medicine, 2005.

Devido aos efeitos colaterais dos anti-inflamatórios, novas substâncias com potencial anti-inflamatório, com baixos custos e associados a uma menor ocorrência de efeitos colaterais têm sido pesquisadas para representarem alternativa aos medicamentos anti-inflamatórios disponíveis e a flora brasileira pode ser uma importante fonte de fármacos (ANOSIKE & OBIDOA & EZEANYIKA, 2012).

2.3 BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica, o Brasil inclui-se entre os países de maior biodiversidade do planeta, detendo aproximadamente um terço da flora mundial (LEWINSONHN & PRADO, 2002; KLEIN, 2009). Contudo, apenas uma pequena parcela dessa biodiversidade tem sido pesquisada cientificamente quanto ao seu potencial de produção de fármacos, extratos vegetais, inseticidas, corantes naturais e derivados (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

No âmbito dessas pesquisas, os conhecimentos indígenas e das comunidades tradicionais merecem atenção. Inclusive, em 2004, de acordo com o Museu Paraense Emilio Goeldi, estimou-se que através destas comunidades, a probabilidade em se conhecer as propriedades medicinais das plantas seja aumentada em até 400%, reduzindo, dessa forma, os custos e o tempo da pesquisa científica e tecnológica para a obtenção de um novo produto farmacológico. Além disso, vale ressaltar que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2004).

A organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que o conhecimento passado de geração para geração no contexto da medicina popular é uma importante ferramenta para a identificação de potenciais produtos naturais para o tratamento de enfermidades. Nesse sentido, o estudo dos produtos naturais representa uma estratégia relevante na procura de fármacos novos e na validação científica de saberes populares sobre usos e propriedades de plantas medicinais. Inclusive, o Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006, do Ministério da Saúde do Brasil, dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, proporcionando o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais à população brasileira, ampliando as opções terapêuticas, através da garantia de acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, numa perspectiva de integralidade na atenção à saúde, valorizando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Nesse sentido, a utilização de produtos naturais tem sido estimulada até mesmo pela crescente demanda da indústria por novas fontes naturais de medicamentos,

devido aos efeitos colaterais causados pelos fármacos sintéticos disponíveis para combate às inflamações de maneira geral ou ainda por ser a única fonte de medicamentos, especialmente em lugares mais isolados e distantes (BERG, 1993). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial usa produtos naturais, principalmente plantas, para suprir suas necessidades primárias de saúde (BRASIL, 2006). Ademais, segundo Gurib-Fakim (2006), aproximadamente 25% de todas as prescrições médicas são formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados destas.

Além disso, a OMS tem incentivado a utilização das terapias naturais, dentre outros motivos, considerando que mais de um terço da população que vive em países em desenvolvimento tem grandes dificuldades no acesso a medicamentos e porque o tratamento natural é de baixo custo (BRASIL, 2006).

A maioria das plantas que são utilizadas tem sua base de uso no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Na maioria das vezes, as propriedades farmacológicas anunciadas tradicionalmente, não possuem validação científica, por não terem sido investigadas ou comprovadas em testes pré-clínicos e clínicos (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Assim sendo, a tendência observada para a fitoterapia é de participação cada vez mais intensa na assistência à saúde da população (KLEIN, 2009). Dois fatores poderiam explicar este aumento na utilização dos fitoterápicos. O primeiro, seriam os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. O segundo, é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES & PEDROSA & CECHINEL, 2001).

Matsuda (2002) indica que 50% dos europeus e mais de 50% dos norte-americanos fazem uso de fitoterápicos. No Brasil estima-se que o comércio de fitoterápicos seja na ordem de 5% do total de medicamentos, o que corresponde a mais de US\$ 400 milhões/ano. Baseados em dados da OMS, Gullo & Pereira (1998) apontam que, em 1980, o mercado mundial de fitoterápicos e produtos naturais movimentou 500 milhões de dólares. Para o ano de 2000, a previsão era de que somente na Europa registrar-se-ia um volume de vendas de 500 milhões de dólares. No Canadá, as

vendas crescem 15% ao ano e nos Estados Unidos chegam a 20%. Para Newall & Anderson & Phillipson et al. (2002), o interesse na utilização de plantas medicinais decorre principalmente do alto custo dos medicamentos industrializados associado a baixa condição socioeconômica da população. Estes fatores geram a procura dos consumidores pelos produtos naturais.

Estudos têm mostrado que moléculas de origem vegetal apresentam atividade anti-inflamatória e que muitas ações estão relacionadas à sua capacidade imunomoduladora capaz de inibir a síntese ou ação de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, vias do ácido araquidônico, NO e NF- κ B (CALIXTO et al., 2004; WERZ, 2007).

Para Schmitz & Bacher (2005), as preparações a partir de plantas podem agir por vias de ação diversas, potencializando assim, os efeitos anti-inflamatórios. Calixto et al. (2004) comenta que isso se deve ao fato de que nessas preparações há uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente, com mecanismos de ação diversos.

Tais considerações reforçam a ideia de que estudos farmacológicos sobre propriedades terapêuticas e mecanismos de ação de produtos de origem natural são de importância significativa e crescente para a bioprospecção de novos fármacos (COSTA et al., 2010).

2.4 GÊNERO *SOLANUM* E *S. PANICULATUM*

Dentre as famílias botânicas que apresentam atividades terapêuticas elucidadas, a família Solanaceae oferece ampla contribuição para a medicina. O gênero *Solanum* compreende cerca de 1500 espécies, sendo bem representado no nordeste brasileiro, onde aproximadamente 80 espécies são amplamente distribuídas. Destas espécies, cerca de 20 são consideradas “endêmicas” na região nordeste (SILVA & AGRA & BHATTACHARYYA, 2005).

A espécie *Solanum paniculatum* L., é conhecida popularmente como jurubeba, jurupeba, juripeba, jubeba, juvena, juina ou juna. É utilizada na medicina popular

brasileira como infusão, preparada a partir de suas raízes, folhas ou frutos para o tratamento de icterícia, hepatite crônica, úlcera gástrica e febres intermitentes (MESIA-VELA et al., 2002).

Estudos prévios tem revelado que diversas espécies do gênero *Solanum* são ricas em glicoalcalóides esteroidais, sendo utilizadas até mesmo como uma importante fonte para a síntese de hormônios (SIMÕES et al, 2004). Estudos fitoquímicos mostraram a presença de diversos alcalóides esteroidais, como jurubebina, jubebina e solanina em *S. paniculatum*, bem como algumas saponinas: isojuripidina, isojurubidina, isopaniculidina e jurubidina (MESIA-VELA et al., 2002). Outros trabalhos referem ainda, que esta espécie também é rica em polifenóis e flavonoides (RIBEIRO et al., 2007).

Diversas espécies do gênero *Solanum* já foram estudadas quanto ao seu potencial em atividades biológicas. Por exemplo, *Solanum xanthocarpum* e *S. trilobatum* apresentaram eficácia clínica para tratamento de asma brônquica (GOVINDAN, 2004) e há diversas comprovações da eficácia anti-inflamatória (CAI et al., 2010; JAIN et al., 2011; NIRMAL et al., 2012), antineoplásica (HEO, 2004; LEE & LIM, 2008) e antiviral (JAVED et al., 2011) de *S. nigrum*.

Um estudo realizado por Kang & Jeong & Choi (2011), comprovou que uma fração apolar de *S. nigrum* inibiu a síntese de TNF- α e IL-6 e reduziu a produção de óxido nítrico através da inibição da iNOS, em macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com Lipopolissacarídeo (LPS). Em outro trabalho, Heo (2004), demonstrou que *S. nigrum* modula os fatores transcricionais NF- κ B e AP-1 e iNOS em células de câncer de mama responsivas a estrógeno, conhecidas como células MCF-7.

Nirmal et al. (2012), avaliaram o potencial de extratos dos frutos de *S. nigrum* para tratar asma e comprovaram que a porção apolar da planta demonstrou maior atividade antialérgica, broncodilatadora e estabilizadora de mastócitos quando comparada com extratos mais polares dos frutos da espécie. Tais resultados foram creditados à presença de β -sitosterol no extrato de éter de petróleo. Cai et al. (2010) também comprovou a presença de constituintes anti-inflamatórios nos frutos de *S. nigrum*.

Outra pesquisa avaliou o efeito antiasmático de *S. xanthocarpum* e *S. trilobatum* e o comparou a drogas broncodilatadoras, como salbutamol e teofilina. O tratamento com *S. xanthocarpum* e *S. trilobatum* melhorou a função ventilatória, diminuiu edema, secreções, roncos e crepitações pulmonares em pacientes asmáticos. No estudo referido, o efeito foi equivalente ao de teofilina e menor que o de salbutamol (GOVINDAN et al., 2004).

A literatura descreve atividade antibiótica (LÔBO, 2010) e de inibição da secreção de ácido gástrico (MESIA-VELA et al., 2002) por *S. paniculatum*. Existe, inclusive, no Brasil, um composto fitoterápico com o extrato de várias plantas, incluindo *S. paniculatum*, denominado Ierobina®, indicado para tratamento de dispepsia (MESIA-VELA et al., 2002). Por sua vez, Ribeiro et al. (2007), comprovou a capacidade antioxidante desta espécie, pelo método do sequestro do radical livre estável DPPH. Tal capacidade foi atribuída à presença de flavonoides e polifenóis na planta.

Recentemente, um estudo etnofarmacológico realizado em um município do recôncavo baiano localizado às margens da Baía de todos os Santos, evidenciou que a população afrodescendente residente usa diversos produtos naturais do gênero *Solanum* para tratar inflamações e alergias. Dentre os vários produtos mencionados, a espécie *Solanum paniculatum* L. foi uma das mais citadas para tratamento de inflamação alérgica (BERNARDINO & QUEIROZ & RIOS et al. - artigo submetido).

A proteção intelectual de pesquisas e do conhecimento tradicional e o monitoramento contínuo das atividades de pesquisas biotecnológicas desenvolvidas no Brasil através das bases de patentes, são importantes na elaboração das tomadas de decisões estratégicas para o investimento em pesquisa e para criar meios mais eficazes de apropriar os ganhos de competitividade com produtos inovadores oriundos da biodiversidade (WIPO, 2015). *S. paniculatum* é uma planta nativa brasileira (LORENZI & MATOS, 2002) e isso valoriza a importância de pesquisar esta espécie buscando descobrir alvos potenciais para a fabricação de novos fármacos.

Nesse sentido, vale ressaltar que *S. paniculatum* está incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que tem a finalidade de orientar pesquisas e estudos e é composta apenas por espécies vegetais com

potencial para gerar produtos de interesse do Ministério da Saúde do Brasil (SUS, 2014). Contudo, não existem estudos na literatura que investiguem o potencial anti-inflamatório de *S. paniculatum*.

Considerando a necessidade urgente de encontrar novos agentes anti-inflamatórios com farmacologia específica e menor citotoxicidade (FRANCISCO, 2011), a potencial atividade anti-inflamatória de diversas plantas do gênero *Solanum* (GOVINDAN, 2004; CAI et al., 2010; KANG & JEONG & CHOI, 2011; JAIN et al., 2011; NIRMAL et al., 2012), a capacidade antioxidante de *S. paniculatum* (RIBEIRO et al., 2007) e de outras espécies do mesmo gênero (HELMJA, 2007), o incentivo da pesquisa por medicamentos de origem vegetal exercido pela Organização Mundial de Saúde e a orientação para estudo específico de *S. paniculatum* feito pelo Ministério da Saúde através, inclusive, da RENISUS (SUS, 2014), justifica-se o presente trabalho, que pela primeira vez, investigou o efeito anti-inflamatório e o provável mecanismo de ação de *S. paniculatum*, em modelos de estudos *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade anti-inflamatória do extrato hexânico padronizado dos frutos de *S. paniculatum in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Produzir e caracterizar o Extrato Hexânico dos Frutos de *S. paniculatum (Sp)* quanto a presença de compostos esteroidais;

3.2.2 Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de *Sp*;

3.2.3 Investigar o efeito de *Sp* quanto a sua potencial atividade anti-inflamatória na proliferação celular e produção de citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10) e NO;

3.2.4 Avaliar o efeito de *Sp* sobre a estabilidade da membrana de eritrócitos;

3.2.5 Avaliar o efeito de *Sp* na expressão de NF- κ B por meio de RT-qPCR em esplenócitos.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAL DA PLANTA E EXTRAÇÃO

Os frutos de *S. paniculatum* L. (Solanaceae) foram coletados em agosto de 2013, numa fazenda localizada no interior de Várzea da Roça, Bahia, Brasil, município que tem altitude de 459 metros e coordenadas geográficas 11°36'24" de latitude sul e 40°08'14" de longitude oeste (PREFEITURA MUNICIPAL DE VÁRZEA DA ROÇA, 2015). O material vegetal foi identificado pela Dr^a. Adilva de Souza Conceição, Universidade do Estado da Bahia, e depositado no Herbário HUNEB, Coleção Paulo Afonso, da Universidade do Estado da Bahia, Brasil (espécime Abono - 28287). Para preparar os extratos, os frutos secos (2000g) foram extraídos por maceração a frio com hexano PA ACS (Synth, BRA) durante três semanas. Em seguida, o material extraído foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida para assegurar a extração de uma quantidade maior de substâncias. O extrato hexânico foi completamente seco à vácuo, obtendo-se um rendimento de 15,87g. As amostras foram diluídas com 0,003% de Tween 20 (Amresco, EUA) e esterilizadas por passagem através de um filtro de seringa de 0,22µm. Neste estudo, chamamos o extrato hexânico dos frutos de *S. paniculatum* de *Sp*.

4.2 PADRONIZAÇÃO DE *SP* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE

Estudos prévios tem revelado que o gênero *Solanum* é rico em glicoalcalóides esteroidais, sendo utilizado até mesmo como uma importante fonte para a síntese de hormônios esteroidais (SIMÕES et al, 2004). Outros estudos de análise fitoquímica de extratos de *S. paniculatum* mostraram que os principais constituintes da espécie são glicoalcalóides esteroidais (RIPPERGER & SCHREIBER & BUDZIKIEWICZ, 1967; MOLA et al., 1997; VIEIRA, 2007).

Por este motivo, para a padronização de *Sp*, a quantificação do β -sitosterol e do estigmasterol foi realizada utilizando um equipamento da Shimadzu Prominence LC-20AT com um detector de Espalhamento de Luz Evaporativo – ELSD (3300, Alltech Associates, EUA), injetor automático SIL-20AC, forno CTO-20A e degaseificador DGU-20A5. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna Luna C-18 (150mm x 4,6mm x 5 μ m, Phenomenex). Foi utilizado como fase móvel metanol (grau HPLC) com fluxo de 1ml/min, temperatura da coluna de 40°C, temperatura do *drift tube* de 70°C e um fluxo de nitrogênio em 2ml/min. Para a filtração das amostras foram utilizados filtros de nylon (Whatman) 0,45 μ m. A curva de calibração utilizando padrão externo, foi realizada nas concentrações variando de 0,0156 a 0,125 μ g/ml, tanto para o β -sitosterol quanto para o estigmasterol, ambos em triplicata. O limite de detecção e o limite de quantificação para o β -sitosterol foi de 0,135 μ g e 0,408 μ g, respectivamente, e para o estigmasterol foi de 0,131 μ g e 0,396 μ g, respectivamente.

4.3 ANIMAIS

Camundongos BALB/c machos (25-30 g) com idade de 8 a 12 semanas foram utilizados neste estudo. Os animais foram obtidos a partir do Biotério da Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil e mantidos com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil (número de protocolo: 028/2012), conforme documento que segue no Anexo I.

4.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR

Para a avaliação da citotoxicidade de *Sp* foram utilizados esplenócitos de camundongo BALB/c normal. Os animais foram eutanasiados por sobredose de cloridrato de cetamina (300mg/kg) e cloridrato de xilazina (30mg/kg) e o baço foi retirado e macerado. Os esplenócitos obtidos foram suspensos em 10ml de meio RPMI comum (GIBCO *Life Technologies*, EUA) e centrifugados à 1500rpm por 10

minutos à 4°C. Para a lise das hemácias foi adicionado 2ml de tampão de lise de eritrócitos (17mM tris-HCl + 0,144 M de cloreto de amônia, pH 7,2) e os esplenócitos foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 10ml de meio RPMI (GIBCO *Life Technologies*, EUA), suplementado com 2mM de L-Glutamina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), 100 U/ml de penicilina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), 100µg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e 5% de soro bovino fetal (GIBCO *Life Technologies*, EUA). As células foram lavadas 2 vezes à 1500rpm por 10 minutos à 4°C. Em seguida, foram ressuspensas em 1ml do meio RPMI suplementado, conforme descrito acima. Os esplenócitos foram contados em câmara de Neubauer (Improved, EUA) e a concentração foi ajustada para 5×10^6 células/ml. Nos orifícios da placa de microcultura de 96 poços (Corning Incorporated Costar, NY, EUA) foram adicionados 5×10^5 células/poço, na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato (15, 30, 60 e 120 µg/mL). A placa foi incubada 72h em câmara úmida à 37°C e 5% de CO₂. Depois, a placa foi centrifugada à 1000rpm, por 5 minutos à 4°C, o sobrenadante foi aspirado e adicionou-se 100µl/poço da solução de MTT-*tetrazólio* [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)] (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) à 6 mg/ml. As células foram novamente incubadas por 4 horas em câmara úmida à 37°C e 5% de CO₂. A seguir, foi removido o meio de cultura e acrescido 100µl/poço de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich Co., EUA). O valor da leitura de absorbância foi determinado no comprimento de onda à 560nm para as diferentes concentrações utilizando uma leitora de microplacas EZRead 400 (Biochrom, UK). O ensaio foi realizado em quintuplicata / 2 animais.

4.5 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a realização da análise da proliferação celular, a cultura de esplenócitos foi realizada conforme descrito no item 4.4, com algumas modificações. Nos orifícios da placa de microcultura de 96 poços (Corning Incorporated Costar, NY, EUA) foram adicionados 50µl de *Sp* em diferentes concentrações (15, 30 e 60 µg/ml) na

presença de 50µl de Mitógeno *Pokeweed* (PWM) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) à 2,5µg/ml. Os poços do controle negativo não receberam PWM nem o tratamento com *Sp* e os do controle positivo foram apenas estimulados com PWM. Em seguida, foram semeadas 5×10^5 células/poço e a placa foi incubada por 72h em câmara úmida à 37°C e 5% de CO₂. Depois, a placa foi centrifugada à 1000rpm, por 5 minutos à 4°C, o sobrenadante foi aspirado e adicionou-se 100µl/poço da solução de MTT-tetrazólio [*3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)*] (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) à 6 mg/ml. As células foram novamente incubadas por 4h em câmara úmida à 37°C e 5% de CO₂. A seguir, foi removido o meio de cultura e acrescido 100µl/poço de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich Co., EUA). O valor da leitura de absorbância foi determinado no comprimento de onda à 560nm para as diferentes concentrações, utilizando uma leitora de microplacas EZRead 400 (Biochrom, UK). O ensaio foi realizado em quintuplicata.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

Para a realização da análise da produção de citocinas foi realizada a cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c normais conforme explicitado no item 4.5. Os níveis de IFN-γ, IL-4 e IL-10 no sobrenadante da cultura celular foram quantificados utilizando kits de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) disponíveis comercialmente (*BD Bioscience*, EUA). Os ensaios foram realizados conforme as orientações do fabricante.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *SP* NA PRODUÇÃO DE NO

A fim de avaliar a produção de óxido, os animais receberam 20µg/animal de LPS (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), por via intraperitoneal. Após 72h da administração, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi injetada 5ml de salina normal por via intraperitoneal. Após massagem na região abdominal do animal, os macrófagos foram obtidos através da aspiração do

conteúdo anteriormente injetado utilizando uma pipeta de Pasteur. As células foram distribuídas à 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços (Corning Incorporated Costar, NY, EUA) e incubadas à 37°C em câmara úmida contendo 5% de CO₂. As células aderentes foram obtidas após um período de 2 a 4 horas de incubação. As células não aderentes foram removidas. Em seguida, os macrófagos aderidos foram induzidos ou não com 5µg/ml de LPS (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), de estimulação *in vitro* e foi acrescentado também *Sp* em diferentes concentrações (15, 30 e 15 µg/ml). Os poços do controle negativo não receberam LPS ou tratamento com *Sp* e os do controle positivo foram apenas estimulados com LPS. Após 24h de incubação, 50µl do sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da produção de NO. Nitrito (NO²⁻), um metabólito estável de NO, foi determinado pelo método de Griess. Inicialmente, as amostras foram incubadas com um volume igual de reagente de Griess e a absorbância mensurada a 540nm. A concentração de nitrito total foi determinada por comparação com curva padrão de NaNO₂ (GRIESS, 1864). O ensaio foi realizado em quintuplicata.

4.8 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ERITRÓCITOS

Sangue fresco foi coletado a partir de camundongo BALB/c normal (700µl), colocado em tubo com heparina (Vacutainer-Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e centrifugado à 1000 x *g* por 10 minutos à 4°C. Então, o sobrenadante foi descartado de modo a ficar apenas com a porção de eritrócitos. A porção de eritrócitos foi lavada três vezes com solução salina normal (0,9% m/v) à 1000 x *g* por 10 minutos à 4°C. Posteriormente, a porção de eritrócitos lavada foi diluída com solução salina normal de modo a ficar a 40% (v/v). Os eritrócitos presentes no sobrenadante ressuspendido foram utilizados para o teste de estabilização da membrana.

4.9 TESTE DE ESTABILIDADE DA MEMBRANA

Os efeitos de *Sp* na hemólise de eritrócitos induzida por calor foram investigados de acordo com o método previamente descrito por Shinde et al. (1999), com pequenas modificações.

As amostras de extrato/padrão utilizadas foram dissolvidas em salina normal. O volume total da reação (5ml) consistia em 4950 μ l de *Sp* em diferentes concentrações (15, 30 e 60 μ g/ml) ou do padrão e 50 μ l da suspensão de eritrócitos. O ácido acetilsalicílico (AAS) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) à 200 μ g/ml foi utilizado como padrão. No tubo controle, adicionou-se apenas solução salina em vez de droga/padrão. As amostras foram incubadas por 20 minutos à 37°C inicialmente, aumentando-se gradualmente a temperatura até chegar aos 56°C. Após a incubação, os tubos foram arrefecidos com água tépida. A mistura da reação foi centrifugada a 1300 x *g* durante 3 minutos à 4°C. Depois, 100 μ L do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a absorvância do sobrenadante foi lida a 560nm em uma leitora de microplacas EZRead 400 (Biochrom, UK). O procedimento foi realizado em triplicata para todas as amostras. A porcentagem de estabilização da membrana ou inibição da hemólise foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ estabilização da membrana} = (100 - (\text{AbsA}/\text{AbsC}) \times 100)$$

Onde AbsA corresponde à absorvância da amostra a 560nm e AbsC representa a absorvância do controle a 560nm.

4.10 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

O RNA foi isolado a partir de células de baço de cultura realizada conforme explicitado no item 4.5, com o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hamburgo, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Subsequentemente, 0,3 μ g de RNA total de cada amostra foi submetido a transcrição reversa em cDNA utilizando 200U de

Superscript III Transcriptase Reversa (Life Technologies) e 500ng de oligo(dT) (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizada em todas as reações de síntese de cDNA água esterilizada filtrada DEPC.

4.11 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Os primers utilizados para a detecção de NF- κ B e β -actina (gene de referência) foram concebidos com base nas sequências reportadas no GeneBank com o software Primer Express (Applied Biosystems). Os parâmetros escolhidos foram ausência ou pouca estrutura secundária ou interação primer-primer e alta especificidade validado por Blast no NCBI, conforme descrito na figura 5. Ambos os primers foram desenhados em diferentes exons para eliminar potencial contaminação do DNA genômico. As amostras de cDNA, derivadas dos genes investigados, foram detectadas de acordo com as recomendações do fabricante, em um Sistema de Detecção de Sequência QuantStudio 12K (Applied Biosystems). Cada RT-PCR foi realizada com 10ng de amostra de cDNA em 10 μ l de SYBR-PCR MasterMix 2x (Applied Biosystems), 1,0 μ L da respectiva mistura de primers (NF- κ B: *Forward* 100nM e *Reverse* 100nM; β -actina: *Forward* 500nM; *Reverse* 250nM), e H₂O deionizada e purificada em quantidade suficiente para 20 μ L. A quantificação relativa foi realizada usando o método comparativo de Ct ($\Delta\Delta C_T$), como previamente descrito (Applied Biosystems, 1997).

Antes de utilizar o método $\Delta\Delta C_T$ para a quantificação, um experimento de validação foi realizado para verificar que as eficiências de alvo e controle eram aproximadamente iguais. A amplificação de todas as amostras apresentou a mesma eficiência para a quantificação exata de dados de PCR em tempo real (RT-PCR). Uma curva de diluição seriada, começando com 100 ng de cDNA do grupo controle, foi utilizada. Os valores médios do C_T , medidos em duplicatas, foi traçado contra o \log_{10} da respectiva diluição. Os valores da regressão linear aplicados a essa curva foram também obtidos (dados não mostrados). As eficiências de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope})}$) foram perto de 1.0 (100%).

Gene	Sequências	Comprimento do amplicon	T °C
β -actina <i>Forward</i>	ACCACACCTTCTACAATGAG	20	60°C
β -actina <i>Reverse</i>	ATCTGGGTCATCTTTTCACG	20	60°C
NF- κ B <i>Forward</i>	ATTCCGCTATGTGTGTGAAGG	21	60°C
NF- κ B <i>Reverse</i>	GTGACCAACTGAACGATAACC	21	60°C

Figura 5: Descrição do desenho de *primers*. A figura mostra as sequências de primers, o comprimento do amplicon e a temperatura de anelamento. T: Temperatura.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média +/- desvio padrão. A análise de variância foi determinada pelo teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. O tipo de distribuição dos dados foi determinado pelo programa GraphPad-Prisma 5.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO E QUANTIFICAÇÃO DO β -SITOSTEROL E ESTIGMASTEROL EM *Sp*

A Figura 6 mostra o cromatograma com os picos de estigmasterol e β -sitosterol presentes no padrão utilizado para caracterizar *Sp*.

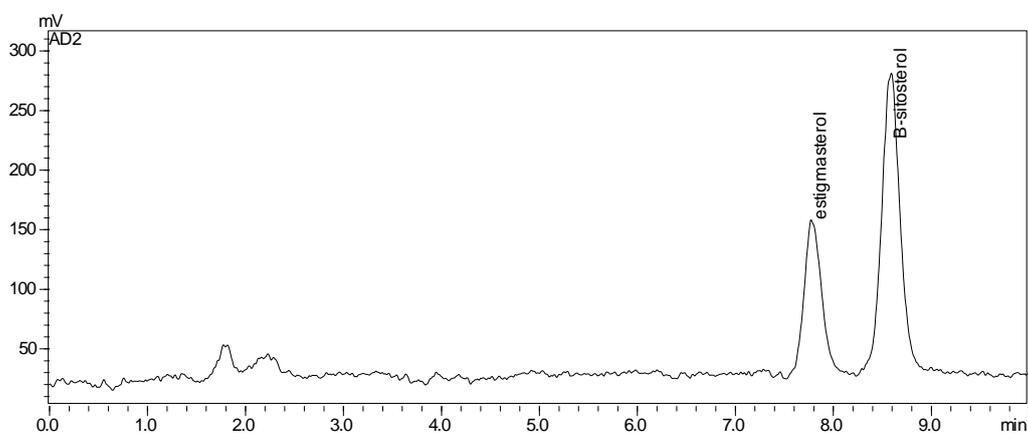


Figura 6: Cromatograma obtido por CLAE-ELSD dos padrões estigmasterol e β -sitosterol.

A figura 7 mostra o cromatograma com os picos de estigmasterol e β -sitosterol presentes em *Sp*.

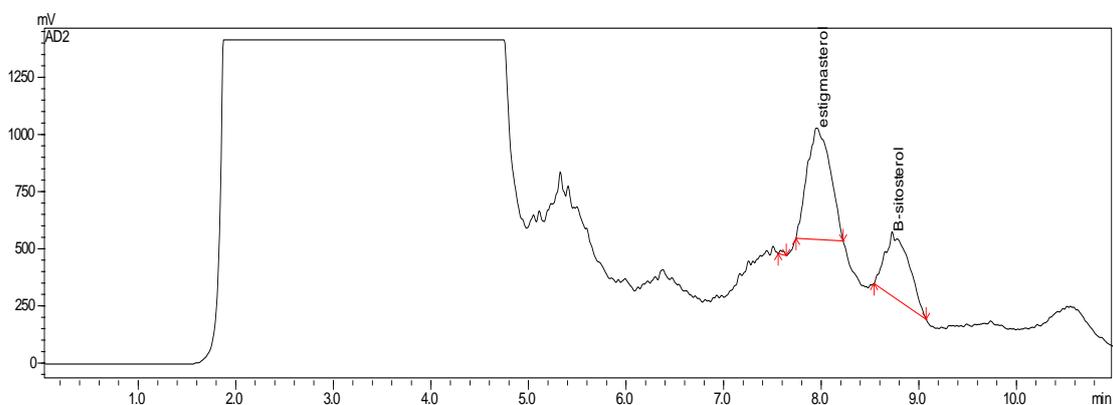


Figura 7: Cromatograma obtido por CLAE-ELSD do estigmasterol e β -sitosterol presentes em *Sp*.

A Tabela 1 mostra a quantificação do β -sitosterol e do estigmasterol presentes em *Sp*. Em cada 200 μ g de *Sp* tem-se 0,829 μ g de β -sitosterol e 2,360 μ g de estigmasterol.

Tabela 1: Análise quantitativa das substâncias identificadas em *Sp* (a cada 200 μ g de extrato).

	β -sitosterol (μ g/200 μ g de extrato)	Estigmasterol (μ g/200 μ g de extrato)
<i>Sp</i>	0,829	2,360

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE *SP*

A avaliação da citotoxicidade de *Sp in vitro* foi realizada em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c normais. Conforme pode ser observado na Figura 8, a concentração 120 μ g/ml reduziu de forma significativa a viabilidade celular em relação ao grupo de células controle, demonstrando potencial citotóxico (figura 8; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). As concentrações de 15, 30 e 60 μ g/ml não foram estatisticamente diferentes em relação ao grupo de células do controle (figura 8; ANOVA-Tukey). Assim, as concentrações não citotóxicas de *Sp* (15, 30 e 60 μ g/ml), foram utilizadas para ensaios posteriores.

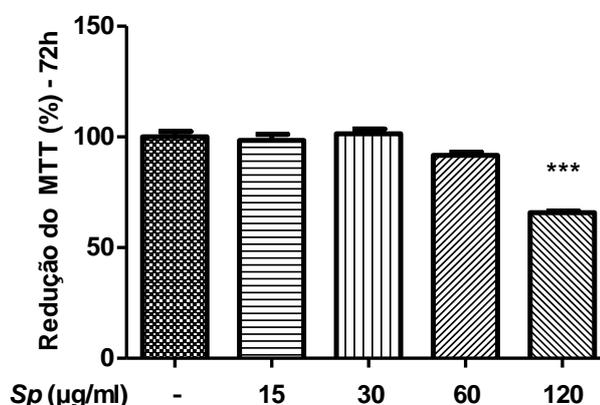


Figura 8: Efeito citotóxico de *Sp*. Avaliação da viabilidade celular de *Sp* em esplenócitos de camundongo BALB/c, durante 72h à 37°C e 5% de CO₂ pela técnica do MTT-*tetrazólio*. Veículo em *Sp*: Tween 20 à 0,003%. * $p < 0,05$ vs *Sp* negativo; *** $p < 0,001$ vs *Sp* negativo. ANOVA-Tukey.

5.3 SP REDUZIU A PROLIFERAÇÃO CELULAR

De acordo com a figura 9, é possível verificar que ocorre um aumento significativo em relação ao grupo controle negativo, na proliferação de esplenócitos na presença de PWM (figura 9; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Quando os esplenócitos foram expostos a 15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$ de *Sp*, houve redução significativa de maneira concentração dependente da proliferação em relação ao grupo controle apenas estimulado com PWM, não exposto a droga (figura 9; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey).

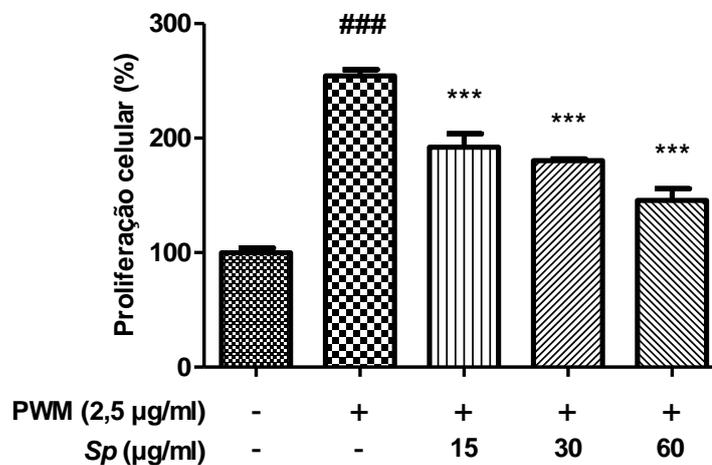


Figura 9: Efeito antiproliferativo de *Sp*. Esplenócitos de camundongo BALB/c foram estimulados ou não com PWM (2,5 $\mu\text{g/ml}$) e tratados ou não com *Sp* à 15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$, durante 72 h à 37°C e 5% CO_2 . O ensaio com MTT-*tetrazólio* foi realizado para a avaliação da proliferação celular. Veículo em *Sp*: Tween 20 à 0,003%. ### $p < 0,001$ vs PWM; *** $p < 0,001$ vs PWM positivo. ANOVA-Tukey.

5.4 SP REDUZIU A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS SEM INTERFERIR NA RESPOSTA REGULATÓRIA

Conforme observado na figura 10, verifica-se que existe um aumento significativo na produção das citocinas $\text{IFN-}\gamma$, IL-4 e IL-10 por esplenócitos na presença de PWM quando comparados com os respectivos grupos negativos (figura 10; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Apenas *Sp* à 60 $\mu\text{g/ml}$ reduziu de forma significativa a quantidade de $\text{IFN-}\gamma$ no sobrenadante da cultura (figura 10a; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Os níveis

de IL-4 foram reduzidos de maneira concentração dependente por todas as concentrações de *Sp* testadas (figura 10b; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). A produção de IL-10 não foi alterada por nenhuma das concentrações de *Sp* que foram utilizadas neste estudo (figura 10c). *Sp* sozinho não estimulou a produção de nenhuma das citocinas avaliadas (dados não mostrados).

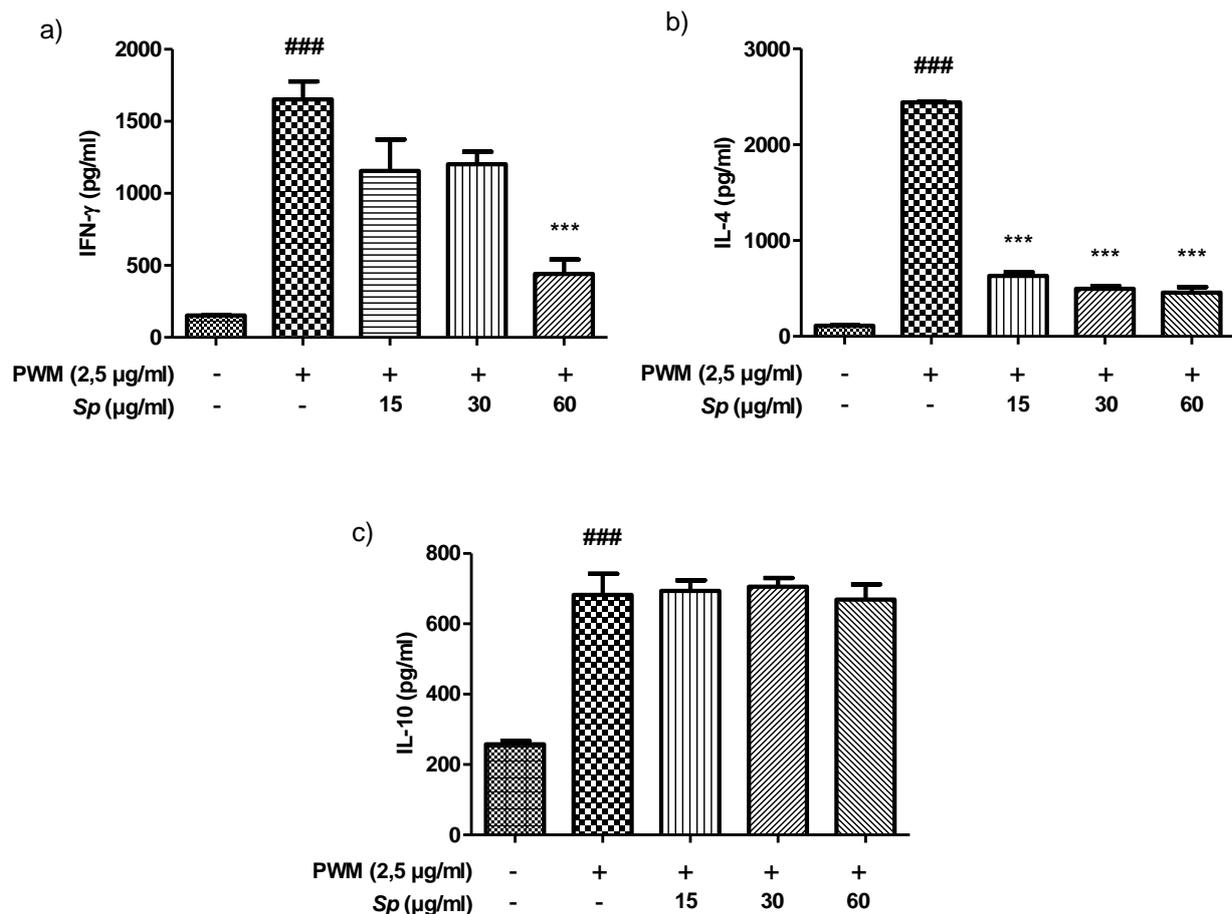


Figura 10: Efeito de *Sp* na produção de citocinas. Níveis de IFN- γ (a), IL-4 (b) e IL-10 (c) produzidos por esplenócitos de camundongo BALB/c estimulados ou não com PWM (2,5 $\mu\text{g/ml}$) e tratados ou não com *Sp* à 15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$, durante 72h à 37°C e 5% de CO₂. Os níveis de citocinas no sobrenadante da cultura foram mensurados por ELISA. Veículo em *Sp*: Tween 20 à 0,003%. ### $p < 0,001$ vs *Sp* e PWM negativo; *** $p < 0,001$ vs Grupo PWM positivo. ANOVA-Tukey.

5.5 *SP* REDUZIU A PRODUÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

De acordo com a figura 11, é possível verificar que ocorre um aumento significativo em relação ao grupo controle negativo, na produção de NO por macrófagos

peritoneais na presença de LPS (figura 11; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Quando os macrófagos foram expostos a 15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$ de *Sp*, houve redução significativa de maneira concentração dependente na produção de NO em relação ao grupo controle estimulado com LPS (figura 11; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey).

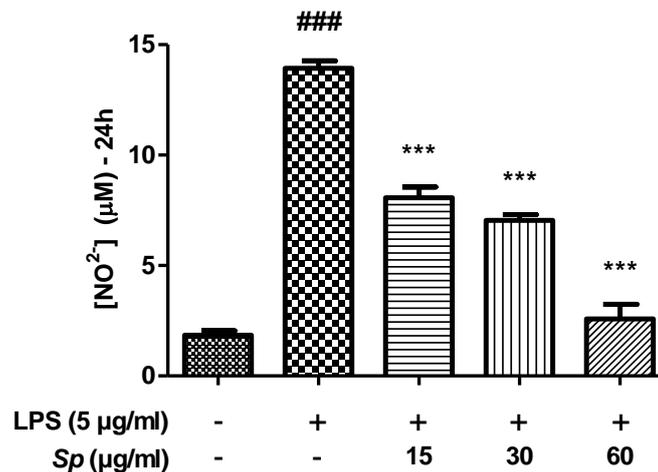


Figura 11: Efeito de *Sp* na produção de NO^2 . Níveis de NO^2 produzidos por macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c estimulados ou não com LPS (5 $\mu\text{g/ml}$) e tratados ou não com *Sp* à 15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$, durante 24h à 37°C e 5% de CO_2 . O gráfico representa as concentrações de nitrito no sobrenadante da cultura mensuradas por reação de Griess. Veículo em *Sp*: Tween 20 à 0,003%. ### $p < 0,001$ vs LPS negativo; *** $p < 0,001$ vs Grupo LPS positivo. ANOVA-Tukey.

5.6 *SP* ESTABILIZOU A MEMBRANA DE ERITRÓCITOS

A figura 12 apresenta o efeito de *Sp* sobre a estabilização da membrana de eritrócitos. É possível verificar que todas as concentrações do extrato de *Sp* (15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$), protegeram de forma significativa de maneira concentração dependente a membrana dos eritrócitos contra a lise induzida por calor quando comparados com o grupo com 100% de hemólise (controle) (figura 12; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey), como é mostrado pela alta porcentagem de inibição da hemólise. As porcentagens de inibição de lise mostradas para o extrato foram menores do que as obtidas pelo padrão utilizado (AAS à 200 $\mu\text{g/ml}$). O AAS estabilizou a membrana em aproximadamente 51,7%, enquanto *Sp* estabilizou, em média, 25,2%, 30,8% e 40,5% à 15, 30 e 60 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (figura 12; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey).

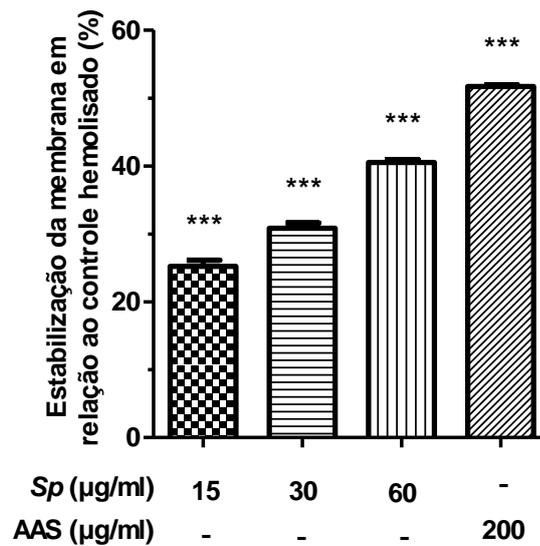


Figura 12: Efeito de *Sp* na estabilização da membrana de eritrócitos. Percentual de estabilização da membrana de eritrócitos de camundongo BALB/c em relação ao controle (100% hemolisado), em ensaio de hemólise induzida em células tratadas ou não com *Sp* à 15, 30 ou 60 µg/ml ou o padrão ácido acetilsalicílico (AAS). Veículo em *Sp*: Tween 20 à 0,003%. *** $p < 0,001$ vs Controle negativo para *Sp* e AAS. ANOVA-Tukey.

5.7 *SP* INIBIU A EXPRESSÃO DE NF-κB

Para avaliar um provável mecanismo através do qual *Sp* exerce sua ação anti-inflamatória, a expressão de NF-κB foi avaliada por RT-qPCR. A figura 13 mostra que o NF-κB foi significativamente mais expresso no grupo de células estimulado com PWM quando comparado ao grupo de esplenócitos do controle negativo (figura 13; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Em contrapartida, *Sp* à 60µg/ml inibiu a expressão de NF-κB em células estimuladas com PWM quando comparado ao grupo PWM (figura 13; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey).

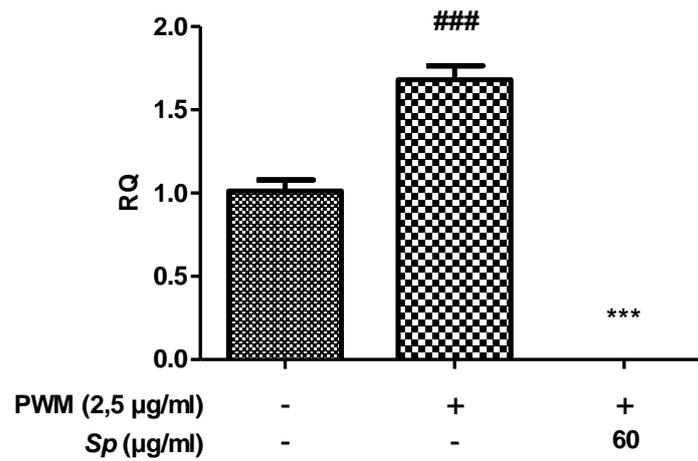


Figura 13: Efeito de Sp na expressão do NF-κB. Expressão do NF-κB em esplenócitos de camundongo BALB/c estimulados ou não com PWM (2,5μg/ml) e tratados ou não com Sp à 60μg/ml, durante 72 horas à 37°C e 5% de CO₂. A expressão de NF-κB foi avaliada por RT-qPCR. Veículo em Sp: Tween 20 à 0,003%. ### $p < 0,001$ vs Controle negativo para Sp e PWM; *** $p < 0,001$ vs PWM positivo. ANOVA-Tukey. RQ: Quantificação relativa.

6 DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares a estímulos nocivos. É também uma tentativa do organismo para remover estímulos prejudiciais e iniciar o processo de cicatrização (FERRERO-MILIANI et al., 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Caracteriza-se por alterações vasculares, incluindo vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, induzidas pela ação de diversos mediadores inflamatórios produzidos por leucócitos ativados, incluindo NO e citocinas diversas (OKOLI et al., 2007). Quando esse processo é crônico ou exacerbado pode provocar doenças cardiovasculares, neoplásicas, neurodegenerativas, autoimunes e alérgicas (FERRERO-MILIANI et al., 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

A terapia atualmente disponível para tratar as desordens inflamatórias, de maneira geral, possui diversos efeitos colaterais. Novas pesquisas têm sido conduzidas, em um esforço para descobrir moléculas com potencial anti-inflamatório, baixos custos e associadas a menor ocorrência de efeitos colaterais, para representarem alternativa aos medicamentos anti-inflamatórios disponíveis (ANOSIKE & OBIDOA & EZEANYIKA, 2012).

Solanum paniculatum é uma planta encontrada no Brasil, utilizada popularmente para tratamento de icterícia, hepatite crônica, úlcera gástrica e febres intermitentes (MESIA-VELA et al., 2002). Não foram encontrados relatos de testes para atividade imunomoduladora em *S. paniculatum*. No presente estudo, investigou-se pela primeira vez, as propriedades anti-inflamatórias de *Sp* em modelos *in vitro*.

O primeiro passo requerido para iniciar testes biológicos com determinada droga é avaliar seu possível efeito tóxico. Para tal, procedeu-se a avaliação do efeito citotóxico de *Sp in vitro*, durante 72h, em esplenócitos de camundongo BALB/c, pelo método do MTT-*tetrazólio*.

O método do MTT-*tetrazólio* se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, para clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis-escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células

viáveis. A posterior lise celular faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados (MOSMANN, 1983; WOERDENBAG et al., 1994; RIBEIRO et al., 2014).

Há relatos na literatura sobre a presença de alcaloides esteroidais em extratos de *Sp* (SIMÕES et al., 2004) reforçando a necessidade de se avaliar possível toxicidade do extrato utilizado no presente estudo. Para isso, utilizou-se o método do MTT-*tetrazólio*, conforme explicitado anteriormente. Vale ressaltar que alcalóides são classes de compostos fitoquímicos que requerem cautela em sua utilização na terapêutica. Já existem relatos de efeito teratogênico da solanina, um dos principais constituintes presentes no gênero *Solanum* (CRAWFORD & MYHR, 1995; GAFFIELD & KEELER, 1996).

Neste estudo observou-se que a exposição de esplenócitos à 120µg/ml de *Sp* ocasionou uma redução significativa da viabilidade celular, revelando potencial atividade citotóxica de *Sp* nesta concentração. Por outro lado, *Sp* à 15, 30 e 60 µg/ml não apresentou diferença significativa em relação ao controle (figura 7; ANOVA-Tukey). Estes dados descartam qualquer efeito citotóxico significativo gerado pelo tratamento com *Sp* à 15, 30 e 60 µg/ml, que possa interferir com os demais resultados experimentais desenvolvidos neste trabalho.

É sabido que PWM é uma lectina obtida a partir de *Phytolacca americana*, com capacidade mitogênica. Dessa forma, promove a ativação e proliferação inespecífica de linfócitos, sendo utilizada em vários estudos para mimetizar a ativação e proliferação de leucócitos em respostas inflamatórias. O PWM é capaz de ativar linfócitos através de ligações cruzadas aos TCRs, sendo conhecido por seu potencial para induzir proliferação. A estimulação dos linfócitos *in vitro* por mitógenos mimetiza a estimulação específica por antígenos (ROITT & BROSTOFF & MALE, 2003).

Segundo Kilpatric (1999), provavelmente o receptor de célula T seja o receptor mitogênico no qual o PWM vai se ligar a porção sacarídica através de seus sítios de ligação a carboidrato, promovendo uma ativação das reações em cascata que resulta na síntese de IL-2 e IL-2R. Após a ligação da IL-2 com IL-2R, ocorre a fosforilação de uma molécula adaptadora Shc que em seguida associa-se com a

molécula adaptadora Grb2, que por sua vez, liga-se a uma proteína chamada SOS, levando à ativação de Ras. Com a ativação de Ras, ocorre uma série de eventos, ainda não esclarecidos, os quais culminam no crescimento e proliferação celular.

A utilização de PWM em modelos de estudos *in vitro* com esplenócitos murinos pode ser justificada devido a quantidade expressiva de trabalhos disponíveis desenvolvidos há décadas usando esta lectina, em condições semelhantes as usadas neste estudo, para estimular a capacidade mitogênica de esplenócitos de camundongos (SHANDS JUNIOR & PEAVY & SMITH, 1973; METCALF & JHONSON, 1978; BANDEIRA et al., 1985).

Os resultados deste trabalho demonstraram que *Sp* à 15, 30 e 60 µg/ml exibiu atividade antiproliferativa de maneira concentração dependente quando reduziu a proliferação celular induzida por PWM, *in vitro* (figura 8; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Vieira Júnior e colaboradores (2003) já haviam mostrado que a fração alcalóide de *S. lycocarpum* diminuiu a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal de camundongo após induzirem peritonite aguda usando carragenina como estímulo. Uma pesquisa conduzida por Anosike & Obidoa & Ezeanyika (2012), demonstrou que o extrato metanólico de *S. aethiopicum* reduziu a migração leucocitária estimulada *in vivo* com agar, em ratos Wistar. No modelo utilizado neste estudo, *Sp* mostrou um importante potencial antiproliferativo.

Durante o processo inflamatório, o sistema imunitário produz um grande número de substâncias químicas potentes, incluindo os radicais livres (SARMA & MALLICK & GHOSH, 2010). Na inflamação, os radicais que assumem maior relevância são os derivados do óxido nítrico (BOGDAN, 2001; YEN & LAI & CHOU, 2001).

O NO é um radical gasoso lipossolúvel produzido, principalmente, por células endoteliais e macrófagos, através da conversão de L-arginina em L-citrulina por meio da ação da enzima NOS. Além disso, é comprovado que existe elevada expressão da iNOS quando há estímulos lesivos ou processos inflamatórios (REDINGTON, 2006; RODRIGUES, 2013). Assim sendo, a produção de NO pode ser considerada uma característica típica de macrófagos ativadas (DAMATTA et al., 2000). As principais funções do NO são promover vasodilatação e destruição de microorganismos, podendo ainda assumir propriedades pró-oxidantes, de apoptose

e regulação dos efeitos das citocinas (NAPOLI et al., 2010; FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

Nesse contexto, é amplamente aceito que em inflamações de perfil Th1, IFN- γ pode ativar macrófagos e linfócitos, promover a proliferação de células T e estimular a síntese e liberação de quantidades exacerbadas de NO e produção de outras citocinas inflamatórias como TNF e IL-1 (SIKORSKI, 2012).

Os resultados deste trabalho demonstraram que *Sp* à 60 μ g/ml foi capaz de reduzir os níveis de IFN- γ no sobrenadante da cultura de esplenócitos estimulados com PWM (figura 9a; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey) e *Sp* à 15, 30 e 60 μ g/ml reduziu, de maneira concentração dependente, a quantidade de NO produzido no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais induzidos com LPS (figura 10; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Estudos prévios têm comprovado que várias espécies do gênero *Solanum* podem interferir na produção de NO. Kang & Jeong & Choi (2011), mostraram que o extrato clorofórmico de *Solanum nigrum* reduziu em 80% a produção de NO induzida por LPS em macrófagos peritoneais de camundongo e Wang et al. (2014) demonstraram recentemente que uma outra espécie do gênero *Solanum* (*S. integrifolium*) reduziu a produção de NO ativada por LPS em macrófagos RAW264.7, pela repressão da expressão da iNOS. Dessa forma, pode-se hipotetizar que o efeito inibitório da produção de IFN- γ e NO observado para *Sp*, pode estar relacionado a interferência na atividade da NOS.

A IL-4 é uma citocina que desempenha um papel importante em inflamações de perfil Th2. Esta citocina pode estimular a proliferação e ativação de linfócitos B e T, mastócitos e basófilos para produzirem outras citocinas de perfil Th2, como IL-5 e IL-13. A produção de IgE pode ser estimulada por IL-4 ao ativar linfócitos B e plasmócitos. Isso explica em partes, porque níveis elevados de IL-4 podem acentuar a inflamação alérgica (COFFMAN et al., 1986; PAWANKAR et al., 1997; HOLGATE, 2012; LAMBRECHT & HAMMAD, 2015).

Os resultados deste estudo demonstraram que as concentrações 15, 30 e 60 μ g/ml de *Sp* reduziram de forma significativa, de maneira concentração dependente, a produção de IL-4 no sobrenadante da cultura de esplenócitos induzidos com PWM (figura 9b; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Estes achados suportam trabalhos na literatura

que testam o gênero *Solanum* para inflamações de perfil Th2. Govindan et al. (2004), demonstrou que *S. xanthocarpum* e *S. trilobatum* foi capaz de melhorar a função ventilatória, diminuir edema, secreções, roncos e crepitações pulmonares em pacientes asmáticos. Um trabalho realizado por Nirmal et al. (2012), comprovou que a porção apolar de *S. nigrum* demonstrou maior atividade antialérgica, broncodilatadora e estabilizadora de mastócitos quando comparada com extratos polares da espécie. Sugere-se que *Sp* pode representar uma fonte de mais pesquisas para tratamento de desordens como asma e alergias.

É sabido que um mecanismo de ação de muitos esteroides é a indução de regulação do sistema imune, aumentando a expressão de genes anti-inflamatórios, como por exemplo, o gene da IL-10 (BARNES, 2006; CLARK, 2008). Então, foi investigado se a ação de *Sp* ao reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias estava associada a indução de resposta regulatória. Para isso, mensurou-se a produção de IL-10 induzida por PWM, *in vitro*. Os achados mostraram que nenhuma das concentrações de *Sp* utilizadas neste estudo (15, 30 e 60 µg/ml), interferiram na produção de IL-10 induzida por PWM (figura 9c; ANOVA-Tukey). Não foram encontrados estudos na literatura mostrando atividade de aumento da resposta regulatória para espécies do gênero *Solanum*. Pelo contrário, em conformidade com os resultados deste trabalho, recentemente, Rodrigues (2013), demonstrou que o tratamento de ratos Wistar com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. paniculatum* não foi capaz de estimular a produção de IL-10 em um modelo de indução de úlceras gástricas. Acredita-se que a atividade anti-inflamatória demonstrada por *Sp* neste estudo, provavelmente, seja por outro mecanismo de ação, que não a indução de resposta regulatória.

Na inflamação, a necrose de leucócitos inflamatórios envolve o extravasamento de enzimas lisossomais e outras substâncias tóxicas para o espaço extracelular devido o rompimento da membrana dos lisossomos (TORTORA & DERRICKSON, 2009). Os neutrófilos transportam nos seus grânulos lisossomais muitas serina proteases (SAKAT et al., 2010; LEELAPRAKASH & DASS, 2011). Isso explica porque em doenças inflamatórias agudas, a infiltração de neutrófilos é responsável por causar danos teciduais no local da inflamação. Muitos fármacos não esteroidais, por exemplo, atuam pela inibição das enzimas lisossomais ou pela estabilização da membrana lisossomal (YOGANANDAM et al., 2010). A membrana dos eritrócitos é análoga à membrana lisossomal e a sua estabilização indica que a droga pode

também estabilizar as membranas lisossomais, prevenindo a liberação de constituintes lisossomais de neutrófilos e macrófagos ativados (SAKAT et al., 2010; LEELAPRAKASH & DASS, 2011).

A exposição das células vermelhas do sangue a injúrias, tais como calor, meio hipotônico e salicilato de metila resulta na lise das membranas, acompanhada de hemólise e oxidação de hemoglobina (MOUNNISSAMY et al., 2008). A estabilização da membrana previne a liberação de fluidos e proteínas para os tecidos durante um período de aumento da permeabilidade causada por mediadores inflamatórios (CHAITANYA et al., 2011).

Como parte do estudo do mecanismo da atividade anti-inflamatória de *Sp*, foi avaliada a sua capacidade de estabilizar a membrana de eritrócitos murinos, cuja hemólise foi estimulada por calor. Esta atividade foi comparada com a ação de um reconhecido anti-inflamatório não esteróide, o AAS. Os resultados demonstraram que *Sp* à 15, 30 e 60 µg/ml estabilizou, de maneira concentração dependente, a membrana dos eritrócitos em aproximadamente 25,2%, 30,8% e 40,5%, respectivamente (figura 11; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). O AAS estabilizou a membrana em 51,7%, em média. Anosike & Obidoa & Ezeanyika (2012), demonstraram recentemente que a atividade anti-inflamatória exercida pelo extrato metanólico de *S. aethiopicum* foi devido à sua capacidade para estabilizar a membrana de eritrócitos humanos. Com base nos resultados deste trabalho, pode-se hipotetizar que seja possível que *Sp* tenha capacidade para estabilizar a membrana de leucócitos, prevenindo a liberação de enzimas líticas e mediadores inflamatórios, como NO e citocinas inflamatórias.

O fator de transcrição NF- κ B é um dos principais fatores reguladores da produção de citocinas e mediadores inflamatórios, possuindo um importante papel no estabelecimento da resposta inflamatória (SEN, 2011). Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória designada I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF- κ B para o núcleo. Em resposta a uma variedade de estímulos e respostas, I κ B pode ser rapidamente fosforilada, ubiquitinada e degradada via proteassoma, liberando o NF- κ B para a translocação nuclear onde irá regular a transcrição de genes diversos (NEGI & KHARSHIING & SHARMA, 2011). Estímulos tais como neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas

neurotóxicas, citocinas, corticoides e produtos de reações de enzimas como a iNOS e a COX-2, podem degradar I κ B (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997; GILMORE, 2006). Uma vez ativado, o NF- κ B possui a capacidade de ligar-se a regiões promotoras de genes de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas induzíveis, como a iNOS (SHALNIK, 2002; MOYNAGH, 2005).

Sabe-se que os glicocorticóides são inibidores potentes do NF- κ B. Isso pode ser observado, por exemplo, no mecanismo de ação da dexametasona, que induz o aumento dos níveis de I κ B, resultando em quantidades reduzidas de NF- κ B translocada para o núcleo (DEVERA et al., 1997). Nesse sentido, estudos referem que a ativação constante do NF- κ B culmina, dentre outros, na supra regulação da atividade da iNOS, o que ocasiona, conseqüentemente, o aumento da produção de NO (FOUAD et al., 2004; CONTESTABILE, 2008).

Neste estudo, a concentração de *Sp* que apresentou os melhores resultados nos parâmetros anti-inflamatórios avaliados foi 60 μ g/ml. Por este motivo, decidiu-se utilizar esta concentração de *Sp* para testar o efeito do extrato sobre a expressão do NF- κ B em esplenócitos estimulados com PWM. No modelo utilizado neste trabalho, *Sp* à 60 μ g/ml inibiu a expressão do NF- κ B em comparação com o grupo de células estimulado com PWM (figura 12; $p < 0,001$; ANOVA-Tukey). Este achado é consistente com o de Chiu & Lin (2008), comprovando que a tomatina, um glicoalcaloide presente em *S. lycopersicum*, inibiu a ativação de NF- κ B. Em outro trabalho realizado por Joo et al. (2009), o licopeno, outro constituinte fitoquímico também presente em *S. lycopersicum*, preveniu a expressão de genes pró-inflamatórios através do bloqueio da via do NF- κ B.

Este estudo é pioneiro em investigar a ação anti-inflamatória da espécie *S. paniculatum*. Seus achados suportam a hipótese de que a redução da proliferação celular, diminuição da produção de IFN- γ , IL-4 e NO observados para *Sp*, provavelmente passem pela atividade de estabilização da membrana e pela forte inibição da via do NF- κ B.

A caracterização de *Sp* mostrou que ele contém estigmasterol e β -sitosterol (figuras 6 e 7; tabela 1). Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de β -sitosterol e estigmasterol em espécies do gênero *Solanum*, como *S. buddleifolium*, *S.*

lycocarpum e *S. cathayanum* (XIE et al., 2008; OLIVEIRA, 2010; PINTO et al., 2013). Um trabalho realizado por Valadares (2009) mostrou a presença de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol em *S. paniculatum*. Estudos prévios demonstraram estigmasterol apresentando atividade anti-inflamatória (AMMAR et al., 2009; GITHINJI et al., 2012). Outros trabalhos têm demonstrado que β -sitosterol mostrou uma boa ação anti-inflamatória (YUK et al., 2007; LOIZOU et al., 2010). Cavalcante e colaboradores (2010) comprovaram o potencial anti-inflamatório de uma mistura de estigmasterol e β -sitosterol. Assim, pode-se hipotetizar que a presença do estigmasterol e do β -sitosterol pode estar relacionada à atividade anti-inflamatória do extrato dos frutos de *S. paniculatum*, descrita no presente estudo.

Novos trabalhos relacionados ao potencial anti-inflamatório de *Sp* devem ser conduzidos, tendo em vista não apenas a comprovação das práticas populares, mas também a elucidação de seus possíveis mecanismos de ação, bem como a investigação de potenciais aplicações clínicas.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que *Solanum paniculatum* é um forte candidato para possuir moléculas com capacidade anti-inflamatória. Nossos achados mostraram *in vitro*, que o extrato hexânico dos frutos de *S. paniculatum* reduziu a proliferação celular, a produção da citocina inflamatória IL-4 e do mediador inflamatório NO e exerceu atividade de estabilização da membrana de maneira concentração dependente. Além disso, *Sp* diminuiu a produção da citocina IFN- γ , sem, contudo, interferir nos níveis de IL-10 e inibiu NF- κ B. Acreditamos que a inibição da expressão do NF- κ B pode ter alterado a expressão da NOS, diminuindo a produção de NO. Além disso, a inibição da expressão do NF- κ B, provavelmente regulou negativamente a expressão de genes de mediadores inflamatórios e quimiocinas, reduzindo a proliferação celular e a produção de citocinas como IFN- γ e IL-4. Nossos resultados suportam afirmar ainda, que a atividade estabilizadora da membrana lisossomal e celular exercida por *S. paniculatum*, também pode explicar em parte, a redução da liberação das citocinas observadas neste trabalho. Mais pesquisas devem ser realizadas para descobrir as moléculas presentes em *S. paniculatum* e melhor compreender os mecanismos através dos quais apresenta seu efeito anti-inflamatório. β -sitosterol e estigmasterol, moléculas presentes no extrato padronizado dos frutos de *S. paniculatum*, podem ser candidatas para pesquisas posteriores. Pensamos que *S. paniculatum* pode ser um alvo para estudos que culminem na descoberta de novas terapias anti-inflamatórias, mais específicas e com menor toxicidade.

REFERÊNCIAS

ABEBE, W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Ther*, v. 27, n. 6, p. 391-401, 2002.

ADCOCK, I. M; LANE, S. J. Corticosteroid-resistant asthma: molecular mechanisms. *Journal of Endocrinology*, v. 178, p. 347-355, 2003.

ADCOCK, I. M; ITO, K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch. Chest.Dis.*, v. 55, p. 256-266, 2000.

AGGARWAL, B. B; VIJAYALEKSHMI, R. V; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, longterm foe. *Clin. Cancer Res.*, v. 15, p. 425-430, 2009.

ALDERTON, W. K; COOPER, C. E; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.*, v. 357, p. 593-615, 2001.

AMMAR, S et al. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine*, v. 16, n. 12, p. 1156-1161, december 2009.

ANOSIKE, C. A; OBIDOA, O; EZEANYIKA, L. U. S. The anti-inflammatory activity of garden egg (*Solanum aethiopicum*) on egg albumin-induced oedema and granuloma tissue formation in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, p. 62-66, 2012.

APPLIED BIOSYSTEMS. *Applied Biosystems User Bulletin*. Applied Biosystems, Boston, MA, 1997.

ARDOIN, S. P; SUNDY, J. S. Update on anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 18, p. 221-226, 2006.

ARNALDI, G et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v. 88, n. 12, p. 5593-5602, 2003.

BACKHOUSE, N et al. Analgesic, antiinflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 2, p. 263-269, 2008.

BAHADORI, K et al. Economic burden of asthma: a systematic review. *BMC Pulm. Med.*, v. 9, p. 24, 2009.

BALDWIN, A. S. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *Journal of Clinical Investigation*, 107, p. 3-6, 2001.

BANDEIRA, A et al. Functional analysis of pokeweed mitogen-dependent cell interactions in murine spleen cells. I. Lack of B-cell mitogenicity and low frequency of effector helper T cells. *Scand. J. Immunol.*, v. 22, n. 3, p. 321-328, 1985.

BARNES, P. J; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, v. 14, n. 12, p. 436-441, Dec. 1993.

BARNES, P. J; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine*, v. 336, p. 1066-1071, 1997.

BARNES, P, J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin.Sci.*, v. 94, p. 557-572, 1998.

_____. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur. Respir. J.*, v. 27, p. 413-426, 2006.

BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.94, n.4 , Apr. 2010.

BERG, M, E. *Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. 2 ed. Rev. e aum. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol*, v.2, p. 907-916, 2001.

BOUCHERY, T et al. The differentiation of CD4⁺ T-helper cell subsets in the context of helminth parasite infection. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. 487, p. 1-13, Oct. 2014.

BRASILEIRO-FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde: série B: textos básicos de saúde. *Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006.

BRAUNSTAHL, G et al. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 107, n. 3, p. 469-476, 2001.

BRAUNSTAHL, G et al. Segmental Bronchial Provocation Induces Nasal Inflammation in Allergic Rhinitis Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 161, p. 2051-2057, 2000.

BRUTON, L. L; LAZO, J. S; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman'S the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11 ed, 2006.

CAI et al. Anti-inflammatory Constituents from *Solanum nigrum*. *Bull. Korean Chem. Soc.* v. 31, n. 1, p. 199-201, 2010.

CALIXTO et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*, v. 69, p. 973-983, 2004.

CARVALHO, Wilson Andrade. Antiinflamatórios Não Esteroides, Analgésicos, Antipiréticos e Drogas Utilizadas na Tratamento da Gota. In: SILVA, Penildo. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 45, p. 439-466.

CATUREGLI, P; DE REMIGIS, A; ROSE, N. R. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity Reviews*, v. 13, p. 391-397, 2014.

CAVALCANTE et al. Steroidal and phenolic compounds from *Sidastrum paniculatum* (L.) fryxell and evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Quim. Nova*, v. 33, n. 4, p. 846-849, 2010.

CHAITANYA, R et al. HRBC Membrane Stabilizing Property of Root, Stem and Leaf of *Glochidion velutinum*. *Int. J. Res. Pharmaceut. Biomed. Sci.*, v. 2, n. 1, p. 256-259, 2011.

CHANDRASEKHARAN, N. V et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

- CHOE, J; KELKER, M. S; WILSON, I. A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, v. 309, p. 581-585, 2005.
- CLARK, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 275, p. 79-97, 2007.
- COFFMAN, R. L et al. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.*, v. 136, p. 4538–4541, 1986.
- COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R. S; KUMAR, V; COLLINS, T (Eds.). *Robbins pathologic basis of disease*. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 3, p. 50-88.
- CONTESTABILE, A. Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. *Prog. Neurobiol.*, v. 84, n.4, p. 317-328, 2008.
- COSTA, R. S et al. Are TGF- β gene polymorphisms associated with asthma risk? *OA Immunology*, v. 1, n. 1, p. 1-5, jun. 2013.
- COTRAN, R. S; KUMAR, V; COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.
- COVAR, R, A et al. Risk factors associated with glucocorticoid-induced adverse effects in children with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 106, n. 4, p. 651-659, 2000.
- CRAWFORD, L; MYHR, B. A preliminary assessment of the toxic and mutagenic potential of steroidal alkaloids in transgenic mice. *Food Chem. Toxicol. Exeter.*, v. 33, n.3, p. 191-194, 1995.
- CROWLEY, L. V. *Essentials of Human Disease*. Jones and Bartlett Publishers, Inc: Mississauga, Ontario, Canadá, 2010.
- DAMATTA, R. A et al. Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. *Parasitol. Res.*, v. 86, p. 239-243, 2000.
- DE BOSSCHER, K; VANDEN, B. W; HAEGEMAN, G. Interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.*, v. 24, p. 488-522, 2003.

DEVERA, M. E et al. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I κ B α and inhibiting NF κ B. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. 1290-1296, 1997.

DÍAZ, A; ALLEN, J. E. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.*, v. 37, n. 12, p. 3319-3326, 2007.

DÓREA, E. L. Fármacos imunossupressores. In: SILVA, P. *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 531-536, 2006.

DUMMER, C. D; THOMÉ, F. S; VERONESE, F. V. Doença renal crônica, inflamação e aterosclerose: novos conceitos de um velho problema. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v. 53, n. 5, p. 446-450, 2007.

ELIA, P. P et al. Análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, internados no hospital universitário clementino fraga filho, rio de janeiro. *Arq. Gastroenterol.*, v. 44, n. 4, p. 332-339, 2007.

EMING, S. A; KRIEG, J; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.*, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.

ERLICH, J. F; PAZ, Z. Postpericardial injury syndrome: an autoimmune phenomenon. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, v. 38, p. 156-158, 2010.

FAVACHO, H. A. S. *Caracterização Fitoquímica e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória e Antinociceptiva do Óleo Fixo de Euterpe Oleracea Mart.* 2009. 79f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Brasil.

FELDMAN, M. D. *NSAIDs (including aspirin): Pathogenesis of gastroduodenal toxicity.* Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/nsaids-including-aspirin-pathogenesis-of-gastroduodenal-toxicity>>. Acesso em: 12 janeiro 2015.

FERRERO-MILIANI, L et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin. Exper. Immunol.*, v. 147, n. 2, p. 227-235, 2007.

FÖRSTERMANN, U; MÜNDEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Circulation*, v. 113, p. 1708-1714, 2006.

FÖRSTERMANN, U; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FOUAD, D et al. Role of NF-kappa B activation and nitric oxide expression during PGE protection against d-galactosamine-induced cell death in cultured rat hepatocytes. *Liver Int.*, v. 24, n. 3, p. 227-236, 2004.

FRANCISCO, V et al. Cymbopogon citratus as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 818-827, 2011.

FULKERSON, P. C et al. IL-5 triggers a cooperative cytokine network that promotes eosinophil precursor maturation. *J. Immunol.*, v. 15, n. 193, p. 4043-4052, oct. 2014.

GABAY, O et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, p. 106-116, 2010.

GAFIELD, W; KEELER, R. F. Induction of terata in hamsters by solanidane alkaloids derived from *Solanum tuberosum*. *K. Toxicol.*, v. 9, p. 426-433, 1996.

GERARD, C; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. *Nat. Immunol.*, v. 2, p.108-15, 2001.

GHOSH, S; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, v. 109 (Suppl), p. S81-S96, 2002.

GILMAN, A. G et al. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11 ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GILMORE, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, v. 25, n. 51, p. 6680-6684, 2006.

GITHINJI, C. J et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of 9-Hexacosene and Stigmasterol isolated from *Mondia whytei*. *Phytopharmacology*, n.2, 1, p. 212-223, 2012.

GOVINDAN, S et al. Further Studies on the Clinical Efficacy of *Solanum xanthocarpum* and *Solanum trilobatum* in Bronchial Asthma. *Phytotherapy Research*. v.18, p. 805-809, 2004.

GREENBERG, A. S; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.*,v. 83, p. 461S-465, 2006.

GRIESS, J. P. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 154: 679. / A.C. Bratton, E.K. Marshall Jr., *Journal of Biology and Chemical*, 128 (1939), v. 537, 1864.

GULLO, C; PEREIRA, C. De volta à inquisição. *Revista Isto É*, sep. 1998, p. 128-130.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. *Molecular Aspect of Medicine*, n. 27, p. 1-93, 2006.

HELMJA et al. Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.* v. 56, n. 4, p. 172-186, 2007.

HEO et al. Glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. inhibits the DNA-binding activities of NF- κ B and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA stimulated MCF-7 cells. *Toxicology in vitro*, v. 18, p. 755-763, 2004.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.*, v. 18, n. 5, p. 673–683, may., 2012.

INGERSOLL, M. A et al. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.*, v. 32, n. 10, p. 470-477, Oct., 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). *Informações estatísticas e geocientíficas*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em 20 dez. 2014.

JAIN et al. *Solanum nigrum*: Current Perspectives on Therapeutic Properties. *Alternative Medicine Review*. v. 16, n. 1, p. 78-85, 2011.

JAVED et al. *In vitro* antiviral activity of *Solanum nigrum* against Hepatitis C Virus. *Virology Journal*. v. 26, n. 8, 2011.

JIANG, L et al. Molecular characterization of redox mechanisms in allergic asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, v. 113, n. 2, p. 137-142, 2014.

JOO, Y et al. Tomato Lycopene Extract Prevents Lipopolysaccharide-Induced NF- κ B Signaling but Worsens Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in NF- κ B^{EGFP} Mice. *PLoS ONE*., v. 4, n. 2, p.1-11, 2009.

KANG, H; JEONG, H. D; CHOI, H. Y. The Chloroform Fraction of *Solanum nigrum* Suppresses Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α in LPS-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages Through Inhibition of p38, JNK and ERK1/2. *The American Journal of Chinese Medicine*. v. 39, n. 6, p. 1261-1273, 2011.

KARIN, M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature*, v. 441, p. 431-436, 2006.

KAWANA, H et al. CD44 Suppresses TLR-Mediated Inflammation. *J. Immunol.*, v. 180, p. 4235-4245, 2008.

KIM, S. J; FLACH, A. J; JAMPOL, L. M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Ophthalmology. *Elsevier Survey of Ophthalmology*, v. 55, n.2, p. 108-133, 2010.

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of mitogenesis. In: RHODES, J.M; MILTON, J. D. (Eds.), *Lectins Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa-NJ, p. 365-378, 1999.

KLEIN, T. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KLIPPEL, J. H et al. *Primer on the rheumatic diseases*. Georgia: Asthritis Foudation, 2008.

LAMBRECHT, B. N; HAMMAD, H. The immunology of asthma. *Nature Immunology*, v. 16, n. 1, p. 45-56, jan. 2015.

LECLERC, N et al. Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. *Journal of molecular Endocrinology*, v. 33, p. 175-193, 2004.

LEE; LIM. Cell death signal by glycine- and proline-rich plant glycoprotein is transferred from cytochrome c and nuclear factor kappa B to caspase 3 in Hep3B cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 19, p. 166-174, 2008.

LEELAPRAKASH, G; DASS, S. *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity Of Methanol Extract Of *Encostemma Axillare*, *Int. J. Drug Dev. & Res.*, v. 3, n. 3, p. 189-196, 2011.

LEWINSONHN, T. M; PRADO, P. I. *Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento*. São Paulo: Editora Contexto, 2002. 175 p.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LÔBO, K. M. S et al. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical prospection of *Solanum paniculatum* Lam. and *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples from the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. *Rev. bras. plantas med.*, v.12, n.2, p. 227-235, 2010.

LOIZOU, S et al. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Nutritional Neuroscience*, v. 54, n. 4, p. 551-558, april 2010.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2002, p. 512.

LYON, C. J; LAW, R. E; HSUEH, W. A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology*, v. 144, p. 2195-2200, 2003.

MACMICKING, J; XIE, Q; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 323-350, 1997.

MANTOVANI, A et al. Cancer-related inflammation. *Nature*, v. 454, p. 436-444, 2008.

MATSUDA, A. H. Fitoterápicos: complementos nutricionais ou medicamentos? In: TORRES, E. A. F. S (org.). *Alimentos do milênio: a importância dos transgênicos, funcionais e fitoterápicos para a saúde*. São Paulo: Signus, 2002. p. 31-41.

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

_____. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771-776, 19 mar. 2010.

MESIA-VELA, S et al. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. *Phytomedicine*, v.9, n.6, p.508-514, 2002.

METCALF, D; JOHNSON, G. R. Production by spleen and lymph node cells of conditioned medium with erythroid and other hemopoietic colony-stimulating activity. *Journal of Cellular Physiology*, v. 96, n. 1, p. 31–42, 1978.

MOLA, J. L et al. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do Distrito Federal. *Química Nova*, v.20, n.5, p. 460-462, 1997.

MONTEIRO, E. C. A et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). *Temas de Reumatologia Clínica*, v. 9, n. 2, maio 2008.

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

MOSMANN, T; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOSMANN, T; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MOSS, R. B et al. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, v. 4, p. 1887-1896, 2004.

MOUNNISSAMY, V. M et al. Evaluation of antiinflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of *Canjara rehedii*. *Iranian. J. Pharmacol. Therapeut.* v. 6, p. 235-237, 2008.

MOYNAGH, P. N. The NF-KappaB pathway. *J. Cell Sci.*, v. 118, p. 4589-4592, 2005.

NAPOLI, C et al. Nitric Oxide, Oxidative Stress, Immune Response and Critical Care. In: IGNARRO, L. J (ed). *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, 2. ed. Salt Lake City, USA: Academic Press, p. 755-772, 2010.

NEGI, S; KHARSHIING, E. V; SHARMA, R. NO way! Is nitric oxide level in tomato regulated by a mammalian IKK/NFκB-like signaling pathway? *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, n.7, p. 1049-1052, Jul. 2011.

NEWALL, C. A; ANDERSON, L. A; PHILLIPSON, J. D. *Plantas Medicinas: Guia para profissional de saúde*. Ed. Premier, 2002.

NIRMAL, S. A et al. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 142, p. 91-97, 2012.

OKOLI, C. O et al. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D.Adams. *J Ethnopharmacol*, v. 109, n.2, p. 219-225, 2007.

OKOYE, F. B. C; OSADEBE, P. O. A new anti-inflammatory flavonol glycoside from *Alchornea floribunda* leaves. *Natural Product Research*, v. 24, n. 3, p. 266-273, 2010.

OLIVEIRA, Sarah Christina Caldas. *Estudo alelopático de espécies do gênero Solanum do Distrito Federal*. 2010. 163f. Tese (doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

O'NEILL, L. A; KALTSCHMIDT, C. NF- κ B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *TINS*, v. 20, p. 252-258, 1997.

O'NEILL, L. A; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, p. 353-364, 2007.

OVESNÁ, Z et al. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma*, v. 51, n. 5, p. 327-333, 2004.

PANDA, S et al. Thyroid inhibitory, antiperoxidative and hypoglycemic effects of stigmasterol isolated from *Butea monosperma*. *Fitoterapia*, v. 80, n. 2, p. 123-126, 2009.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? *The journal of Rheumatology*, v. 28, p. 2375-2382, 2001.

PASCUCCI, R. A. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Indications and complications. *JAOA Clinical Practice*, v. 109, n. 9, p. 487-489, 2002.

PAULI, J. R et al. Influência do treinamento físico sobre parâmetros do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal de ratos administrados com dexametasona. *Rev. Port. Cien.Desp.*, v. 2, p. 143-152, 2005.

PAWANKAR, R et al. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J. Clin. Invest.*, v. 99, p. 1492-1499, 1997.

PEARSON, T. A et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a Statement for Healthcare Professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, v. 107, n. 3, p. 499-511, 2003.

PECCHI, E et al. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol. Behav.*, v. 97, p. 279-292, 2009.

PELAIA, G et al. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci.*, v. 72, p. 1549-1561, 2003.

PERIANAYAGAM, J. B; SHARMA, S. K. S. K; PILLAI, S, K. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.*, v. 104, p. 410-414, 2006.

PINHEIRO, R. M; WANNMACHER, L. Uso racional de anti-inflamatórios não esteroides. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Uso Racional de Medicamentos: Temas relacionados*. Brasília: Editora MS, 2012. Cap. 5, p. 41-50.

PINTO, F. C. Let al. Constituintes químicos de *Solanum buddleifolium* Sendtn. *Quim. Nova*, v. 36, n. 8, p. 1111-1115, 2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE VÁRZEA DA ROÇA. *Aspectos Gerais*. Disponível em: <http://varzeadaroca.ba.gov.br/i/ler_.php?CT=0&CT=22>. Acessado em: 07.jul.2015.

SUS. *RENISUS*: Lista de plantas medicinais do SUS. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/jurubeba-solanum-paniculatum-beneficios.html>>. Acessado em: 02.03.2015.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem.*, V. 42, p. 3-27, 2007.

REDINGTON, A. E. Modulation of nitric oxide pathways: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 533, n. 1-3, p. 263-276, 2006.

RHEN, T; CIDLOWSKI, J. A. Nuclear factor- κ B and glucocorticoid receptors. In: MARTINI, L (ed.). *Encyclopedia of endocrine diseases*. v. 3. Boston: Elsevier Academic Press, 2004. p. 391-398.

_____. Antiinflammatory action of glucocorticoids: new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.*, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

RIBEIRO et al. Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (solanaceae). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*. v.11, n.3, p. 179-183, set./dez. 2007.

RIBEIRO, B. G et al. Influência do anabolizante decanoato de nandrolona sobre a viabilidade de células satélites musculares em processo de diferenciação. *Fisioter. Pesq.*, v. 21, n.1, p. 16-20, 2014.

RIDKER, P. M. C-reactive protein, inflammation and cardiovascular disease - Clinical Update. *Tex. Heart Inst. J.*, v. 32, p. 384-386, 2005.

RIPPERGER, H; SCHREIBER, K; BUDZIKIEWICZ, H. Isolierung von Neochlorogenin und Paniculogenin aus *Solanum paniculatum* L. *Chem. Ber.*, v. 100, p. 1741-1752, 1967.

RODRIGUES, Tamires de Souza. *Avaliação do Efeito Protetor e Cicatrizante do Extrato Hidroalcolico de Folhas de Solanum paniculatum L. frente à úlceras pépticas*. 2013. 133f. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada – Área de concentração em Estrutura e Função de Biomoléculas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP, Brasil.

ROITT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. *Imunologia*, 6. ed. São Paulo: Manole, 2003.

ROVIEZZO, F et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J. Physiol. Pharmacol.*, v. 53, p. 541-553, 2002.

SAKAT, S; JUVEKAR, A. R; GAMBHIRE, M, N. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int. J. Pharm. Pharmacol. Sci.*, v. 2, n. 1, p. 146-155, 2010.

SANDOR, F et al. Importance of extra- and intracellular domains of TLR1 and TLR2 in NF- κ B signaling. *J. Cell Biol.*, v. 162, p. 1099-1110, 2003.

SARMA, A; MALLICK, A. R; GHOSH, A. K. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: Na Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, v.1, n. 3, p. 185-192, 2010.

SCHMITZ, L. M; BACHER, S. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. *Phytochemistry Reviews*, v. 4, p. 19-25, 2005.

SCHREIBER, K; RIPPERGER, H. Jurubine, a novel type of steroidal saponin with (25S)-3 β -amino-5 α -furostane-22 α ,26-diolO(26)- β -D-glucopyranoside structure from *Solanum paniculatum* L. *Tetrahedron Lett*, v. 7, p. 5997-6002, 1966.

SCHREIBER, K; RIPPERGER, H; BUDZIKIEWICZ, H. (22R:25S)-3 β -amino-5 α -spirostan, ein Steroidalkaloid neuartigen Strukturtyps aus *Solanum paniculatum* L. *Tetrahedron Lett*, v. 6, p. 3999-4002, 1965.

SEN, R. The origins of NF- κ B. *Nature Immunology*, v. 12, n. 8, p. 686-688, 2011

SEN R; BALTIMORE D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, v. 46, p. 705-716, 1986.

SERHAN, C. N; WARD, P.A & GILROY, D. W. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press: EUA, p. 473, 2010.

SHANDS JUNIOR, J. W; PEAVY, D. L; SMITH, R. T. Differential Morphology of Mouse Spleen Cells Stimulated In Vitro by Endotoxin, Phytohemagglutinin, Pokeweed Mitogen and Staphylococcal Enterotoxin B. *Am. J. Pathol.*, v. 70, n. 1, p. 1-24, 1973.

SHERWOOD, E. R; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBLI-RAHHAL A; VAN BEEK, M; SCHLECHTE, J. A. Cushing's syndrome. *Clin.Dermatol.*, v. 24, p. 260-265, 2006.

SHINDE, U.A et al. Membrane stabilization activity- a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia*, v. 70, p. 251-257, 1999.

SHOELSON, S. E; LEE, J; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SIKORSKI, K et al. STAT1 as a central mediator of IFN γ and TLR4 signal integration in vascular dysfunction. *JAK-STAT*, v. 1, n.4, p. 241-249, Oct.-Dec., 2012.

SILVA, J. M; MENDONÇA, P. P; PARTATA, A. K. Anti-inflamatórios não-esteróides e suas propriedades gerais. *Revista Científica do ITPAC*, v.7, n.4, Outubro 2014.

SILVA, T. M. S; AGRA, M. F; BHATTACHARYYA, J. Studies on the alkaloids of *Solanum* of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 15, n. 4, p. 292-293, Out./Dez. 2005.

SIMÕES, C. M. O et al. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5. ed. Florianópolis: Ed. UFRGS, 2004.

SIMONS, S. S. What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions. *Bio.Essays*, v. 30, p. 744-756, 2008.

SKALNIK, D. G. Transcriptional mechanisms regulating myeloid-specific genes. *Gene*, v. 284, p. 1-21, 2002.

SOLOMON, D. H. *NSAIDs: Mechanism of action*. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/contents/nsaids-mechanism-of-action>>. Acesso em: 12 janeiro 2015.

SOTIROUDIS, T. G; KYRTOPOULOS, S. A. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *European Journal of Nutrition*, v. 47, n. 2, p. 69-72, 2008.

SPINOSA, H. S; GÓRNIAK, S. L; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 239-272, 2006.

STROBER, W et al. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6 p. 9-20, 2006.

TORTORA, G. J & DERRICKSON, B. *Principles of Anatomy and Physiology*. 12. ed. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons, Inc, 2009.

TRAENCKNER, E, B; WILK, S; BAEUERLE, P. A. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *Embo. J.*, v. 13, n. 22, p. 5433-5441, 1994.

TSUR, A et al. Interdisciplinary exchange of ideas: progestagens for autoimmunity, biologics for pregnancy complications. *Immunol. Res.*, 31 dec., 2014.

TUROLLA, M. S; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 289-306, 2006.

VALADARES, Ydia Mariele. *Remijia ferruginea D.C., Jacaranda caroba D.C. e Solanum paniculatum L*: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico. 2009. 323f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

VERRI JUNIOR, W. A et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.*, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VIEIRA JUNIOR et al. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. *Phytother. Res.*, v. 17, p. 892-896, 2003.

VIEIRA, P. M. Estudo do potencial mutagênico e antimutagênico de *Solanum paniculatum* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. *Rev. Biol. Neotrop.*, v. 4, n.2, p. 173-174, 2007.

VONKEMAN, H. E; LAAR, M. A. F. J. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Elsevier Semin. Arthritis Rheum.*, v. 39, p. 294-312, 2010.

WAKAHARA, K. et al. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory TH2 responses in mice and humans. *Allergy*, v.68, p. 180-189, 2013.

WANG, L et al. Anti-Inflammatory Effect and Mechanism of the Green Fruit Extract of *Solanum integrifolium* Poir. *BioMed Research International*, p. 1-11, 2014.

WERZ, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Médica*, v. 73, p. 1331-1357, 2007.

WEST, P. A; KOBLANSKY, A. A; GHOSH, S. Recognition and signaling by Toll-like receptors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 22, p. 409-437, 2006.

WILLIS-KARP, M et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, v. 282, p. 2258-2261, 1998.

WOERDENBAG, H. J et al. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from Arnica species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Med.*, v. 60, n. 5, p. 434-437, 1994.

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION – WIPO. *Education and Training Programs Portfolio*. Disponível em: <http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/wipo_pub_467_2015.pdf>. Acessado em: 05.maio.2015.

WYSS-CORAY, T.; MUCKE, L. Inflammation in Neurodegenerative Disease -a Double Edged Sword. *Neuron*, v. 35, p. 419-432, 2002.

XIE et al. Chemical constituents of *Solanum cathayanum*. *Zhong Yao Cai*, v. 31, n. 9, p. 1332-1334, sep. 2008.

YAMAMOTO, M et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, v. 30, p. 640-643, 2003.

YEN, G. C; LAI, H. H & CHOU, H. Y. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry*, v. 74, p. 471-478, 2001.

YEOMANS, N. D. Aspirin: Old drug, new uses and challenges. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 26, p. 426-431, 2011.

YOGANANDAM, G. P; ILANGO, K; DE, S. Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane Stabilizing Properties of various extracts of *Punica granatum* L.(Lythraceae). *International Journal of PharmTech Research*, v. 2, n. 2, p. 1260-1263, 2010.

YUK, J. E et al. Effects of lactose-beta-sitosterol and beta-sitosterol on oval- bumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. *International Immunopharmacology*, v.7, p. 1517-1527, 2007.

YUNES, R. A; PEDROSA, R. C; CECHINEL, F. V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ANEXO I

Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS).



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **0282012**, intitulado “**Perfil etnofarmacológico de espécies marinhas da Baía de Todos os Santos e investigação quanto ao seu potencial farmacológico: Um estudo multidisciplinar**”, sob a responsabilidade da Professora Doutora Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, lotada no Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **26 de outubro de 2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research project with protocol number **028/2012** entitled “Ethnopharmacological profile of marine species from “Todos os Santos” Bay and investigation regarding their pharmacological potential: A multidisciplinary study”, under the responsibility of Professor Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, in the Biorregulação Department of the Institute of Health Sciences (ICS), Federal University of Bahia (UFBA). The presented project is in agreement to the Brazilian Law on Animal Experimentation and with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian Society of Animal Science Laboratory (SBCAL) and was **approved** by this Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS) on **October 26, 2012**.

Salvador, 26 de outubro de 2012.

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
Coordenadora da CEUA-ICS