



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



ANA LUÍSA DE ARAÚJO LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO

João Pessoa – PB
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



ANA LUÍSA DE ARAÚJO LIMA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, área de concentração - Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam

João Pessoa – PB
2014

L732a Lima, Ana Luísa de Araújo.

Avaliação da atividade do extrato de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky no processo inflamatório agudo / Ana Luísa de Araújo Lima.-- João Pessoa, 2014.
145f. : il.

Orientadora: Márcia Regina Piuvezam

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. Farmacologia. 3.
Herissantia tiubae. 4. Citocinas. 5. Migração celular.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



Ana Luísa de Araújo Lima

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, área de concentração - Farmacologia.

Dissertação de Mestrado avaliada em 19 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)
Orientadora

Prof. Dr. Fabio Correia Sampaio
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

Profa. Dra. Marcia Rosa de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais, **Jurandir dos Santos Lima** e **Maria do Rosário de Araújo Lima** e aos meus irmãos, **Aline Maria de Araújo Lima** e **Alcir de Araújo Lima**, pelo amor encorajador, por acreditarem no meu potencial muito antes de mim, e por me apoiarem em todos os meus projetos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por iluminar o meu espírito e guiar os meus caminhos levando-me sempre a águas tranquilas. Por sempre me amparar, não somente em todos os momentos desta jornada, mas desde o meu nascimento até os dias de hoje.

Aos meus pais, Jurandir e Rosário, pelo amor incondicional; por serem meu porto seguro. **Aos meus irmãos**, Aline e Alcir, por serem meus amigos. **Aos meus familiares, ao meu cunhado Mateus e às minhas amigas de infância** por estarem presentes e se alegrarem com minhas pequenas vitórias.

À minha orientadora, professora Márcia Regina Piuvezam, pelo incentivo e apoio constantes, neste projeto. Agradeço por ter acreditado em mim e ter caminhado ao meu lado na construção deste trabalho, mostrando com clareza os passos a serem percorridos até a sua conclusão.

À professora **Maria de Fátima Vanderlei** e **Wemerson Matias**, por produzir e fornecer o extrato utilizado para este trabalho. À professora **Marianna Vieira Sobral Castello Branco**, por colaborar no que foi preciso. À professora **Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek** por me receber no Laboratório de Imunologia Tumoral do Instituto de Bioquímica, UFRJ e com isto proporcionar experiências fundamentais para a minha formação.

A todos os colegas de trabalho e companheiros de bancada do Laboratório de Imunofarmacologia, pessoas incríveis que foram extremamente importantes para o desenvolvimento desta pesquisa. **Giciane, Hermann, Fagner, Talita, Rachel, Talissa, Danilo, Jacqueline, Laércia, Anne, José Guilherme e Adriano**, serei eternamente grata pela ajuda de vocês. Em especial meus colegas diretos de bancada: **Fagner, Rachel, Adriano, Talita e Jacqueline** os experimentos com vocês foram sensacionais.

À **coordenação** do Curso de **Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** e aos **professores** pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas. Aos funcionários do Biotério Prof. Thomas George, em especial **José Crispim Duarte**.

À Universidade Federal da Paraíba, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades; **ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, à **Pró-Reitoria de Pós Graduação (PRPG)**, e ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para o Controle do Câncer (INCTCAN, Proc. N0 573806/2008-0, Coordenador Hector Nicolas Suanez Abreu)** pelo apoio financeiro e a todos que contribuíram direta e indiretamente para a consolidação deste trabalho, muito obrigada.

LIMA, A.L.A., AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO, Mestrado (Programa de pós-graduação em produtos naturais sintéticos bioativos). 2014. 145p.

RESUMO

A espécie *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky, conhecida popularmente como *mela bode* ou *lava-prato*, é uma planta da família Malvaceae, usada na medicina popular para tratar febre e influenza. Outras espécies da família Malvaceae são utilizadas na medicina tradicional e estudos comprovaram atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas e diuréticas. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Herissantia tiubae* (EHt) em modelos experimentais de inflamação aguda. A toxicidade do EHt na dose de 2000 mg/Kg foi analisada, utilizando-se os parâmetros: consumo de água e ração, peso corporal, letalidade e índices de peso dos principais órgãos, bem como parâmetros bioquímicos e hematológicos. Para avaliar seu efeito antiedematogênico, camundongos Swiss pré-tratados com EHt (50, 100 ou 200 mg/kg) foram submetidos aos protocolos de edema de pata induzido por carragenina e permeabilidade microvascular induzida por ácido acético. Para estudar seu efeito anti-inflamatório foram utilizados modelos experimentais *in vivo*, tais como: peritonite induzida por carragenina, onde se avaliou migração de células e produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6); e *in vitro*: produção de NO, citocinas (TNF- α e IL-6) e expressão da L-selectina em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Não foram observados sinais de toxicidade aguda com a administração de 2000 mg/kg do EHt em camundongos macho e fêmea. Além disto, o pré-tratamento com o EHt (50, 100 ou 200 mg/kg) não reduziu o edema de pata induzido por carragenina, bem como não diminuiu o extravasamento de fluidos mediado pelo ácido acético. A migração de neutrófilos e a liberação de citocinas (TNF- α e IL-1 β) provocadas pela carragenina foram reduzidas em animais tratados com o EHt (50 ou 100 mg/kg). *In vitro*, o EHt (50 ou 25 μ g/mL) reduziu a produção de NO, citocinas (TNF- α e IL-6) e expressão da molécula de adesão L-selectina em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Portanto, esses dados sugerem que o EHt possui atividade anti-inflamatória relacionada com a inibição dos eventos celulares e não vasculares da inflamação.

Palavras chave: *Herissantia tiubae*, inflamação, citocinas, migração celular, produtos naturais.

LIMA, A.L.A., AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DE *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO, Mestrado (Programa de pós-graduação em produtos naturais sintéticos bioativos). 2014. 145p.

ABSTRACT

The species *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky, popularly known as “mela-bode” or “lava prato”, is a plant of Malvaceae family, used in folk medicine to treat fever and influenza. Other species of the Malvaceae family are used in traditional medicine and studies have shown anti-inflammatory, antinociceptive and diuretic activities. The aim of this study was to evaluate the activity of the hydroalcoholic extract of aerial parts of *Herissantia tiubae* (EHt) in experimental models of acute inflammation. The toxicity of EHt at dose of 2000 mg/kg was analyzed using the parameters: consumption of water and food, body weight, mortality and rates of weight of major organs, as well as biochemical and hematological parameters. To evaluate its antiedematogenic effect, Swiss mice pretreated with EHt (50, 100 or 200 mg/kg), were submitted to the paw edema induced by carrageenan and microvascular permeability induced by acetic acid protocols. To study its anti-inflammatory effect *in vivo* experimental models were used, such as: carrageenan-induced peritonitis, which evaluated cell migration and cytokine production (TNF- α , IL-1 β and IL-6) and *in vitro*: production of NO, cytokines (TNF- α and IL-6) and L- selectin expression in RAW 264.7 macrophage lineage. No signs of acute toxicity were observed by the administration of EHt in male and female mice. Furthermore, pretreatment with EHt (50, 100 or 200 mg/kg) did not reduce paw edema induced by carrageenan, and did not decrease fluids extravasation mediated by acetic acid. Migration of neutrophils and release of cytokines (TNF- α and IL-1 β) induced by carrageenan was reduced in animals treated with EHt (50 or 100 mg/kg). *In vitro*, EHt (50 or 25 μ g/mL) reduced the production of NO, cytokines (TNF- α and IL-6) and expression of the adhesion molecule L-selectin in RAW 264.7 macrophages lineage. Therefore, these data suggest that EHt has anti-inflammatory activity related to inhibition of cellular but not by vascular events of inflammation.

Keywords: *Herissantia tiubae*, inflammation, cytokines, cell migration, natural products.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C	Antes de Cristo
AA	Ácido araquidônico
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
BAL	Lavado bronco alveolar
BK	Bradicinina
COX1	Ciclo-oxigenase 1
COX2	Ciclo-oxigenase 2
d.C.	Depois de Cristo
DAG	Diacilglicerol
des-Arg9BK	Des-Arg9-bradicinina
DL50	Dose letal média
DMSO	Dimetil-sulfóxido
e.p.m.	Erro padrão da média
ECAM	Moléculas de adesão celular epitelial
ECM	Matriz extracelular
Eht	Extrato hidroalcoólico das partes aéreas da <i>Herissantia tiubae</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
GAMA – GT	Gama glutamiltransferase
i.p.	Intraperitoneal
ICAMs	Moléculas de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Fosfatidil inositol
JAK	Janus cinases
JAMs	Moléculas de adesão juncionais
LCs	Gotículas lipídicas
LD	Lactato desidrogenase
LFA-1	Antígeno associado à função leucocitária 1
LOX	Lipo-oxigenases
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
LysBK	Lys-bradicinina
MAPK	Quinases ativadas por mitógenos
MN	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
NF-kB	Fator nuclear-kB
nNOS	Óxido nítrico sintase neural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PAF	Fator de ativação plaquetária

PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Proteína C reativa
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial/plaquetária 1
PGD2	Prostaglandinas D2
PGE2	Prostaglandinas E2
PGF2a	Prostaglandinas F2a
PGI2	Prostaglandinas I2
PGs	Prostaglandinas
PLA₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
PLC	Fosfolipase C
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PSGL-1	Ligante de glicoproteína da P-selectina 1
RH1	Receptor de histamina tipo 1
RH2	Receptor de histamina tipo 2
RH3	Receptor de histamina tipo 3
RH4	Receptor de histamina tipo 4
ROS	Espécies Reativas de oxigênio
SBF	Soro bovino fetal
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TLRs	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TX	Tromboxanos
v.o.	Via oral
VCAM-1	Molécula de adesão da celular vascular 1
VE	Endotélio vascular
VLA-4	Antígeno de expressão tardia 4

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		PÁGINA
Figura 1	Componentes da inflamação.	17
Figura 2	Inflamação: A resposta do tecido ao estresse.	20
Figura 3	A cascata de recrutamento de neutrófilos clássico atualizado.	22
Figura 4:	Biossíntese de eicosanoides.	28
Figura 5	Imagem de <i>Herissantia tiubae</i> .	36
Figura 6	Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> .	43
Gráfico 1	Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> no edema de pata induzido por carragenina.	61
Gráfico 2	Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> na permeabilidade microvascular induzida pelo ácido acético.	62
Gráfico 3	Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> na celularidade e contagem diferencial do lavado peritoneal.	64
Gráfico 4	Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> nas subpopulações celulares presentes no lavado peritoneal.	67
Gráfico 5	Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> na viabilidade dos leucócitos do lavado peritoneal.	68
Gráfico 6	Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> nos níveis de citocinas do lavado peritoneal.	70
Gráfico 7	Análise da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> em macrófagos da linhagem RAW 264.7.	72
Gráfico 8	Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> na produção de NO em macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados ou não com LPS + INF- γ .	73
Gráfico 9	Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> na produção de citocinas em macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados com LPS + INF- γ .	74
Gráfico 10	Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> na expressão da L-selectina em macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados com LPS.	76

LISTA DE TABELAS

		PÁGINA
Tabela 1	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos Swiss.	57
Tabela 2	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> nos parâmetros hematológico de sangue periférico de camundongos Swiss.	58
Tabela 3	Consumo médio de água e ração e avaliação ponderal por grupo de camundongos Swiss tratados com o extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> .	59
Tabela 4	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Herissantia tiubae</i> sobre os principais órgãos dos camundongos Swiss.	60

SUMÁRIO

	PÁGINA
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XI
LISTA DE TABELAS	XII
SUMÁRIO	XIII
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Inflamação	18
1.1.1 Eventos vasculares	19
1.1.2 Eventos celulares	21
1.1.3 Mediadores inflamatórios	25
2.1 Toxicologia de produtos naturais	32
3.1 <i>Herissantia tiubae</i>	35
2 OBJETIVOS	39
2.1 Geral	39
2.2 Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 MATERIAL	41
3.1.1 Animais	41
3.1.2 Drogas, reagentes e equipamentos	41
3.1.3 Obtenção e preparo do extrato de <i>Herissantia tiubae</i>	41
3.1.3.1 Material botânico e extração	41
3.1.3.2 Obtenção	42
3.1.3.3 Preparo da amostra	42
3.2 MÉTODOS	42
3.2.1 Ensaios preliminares	44
3.2.1.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo	44
3.2.1.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	45
3.2.1.1.2 Avaliação da evolução ponderal e consumo de água e ração	45
3.2.1.1.3 Avaliação do índice de pesos dos órgãos	46
3.2.2 Estudo da atividade <i>in vivo</i> do extrato de <i>Herissantia tiubae</i>	46
3.2.2.1 Edema de pata induzido por carragenina	46
3.2.2.2 Avaliação da permeabilidade microvascular	47
3.2.2.3 Peritonite induzida por carragenina	48
3.2.2.3.1 Contagem de células total e diferencial do lavado peritoneal	49
3.2.2.3.2 Análise das populações celulares por citometria de fluxo	49
3.2.2.3.3 Análise da viabilidade dos leucócitos do lavado peritoneal	50
3.2.2.3.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal	50

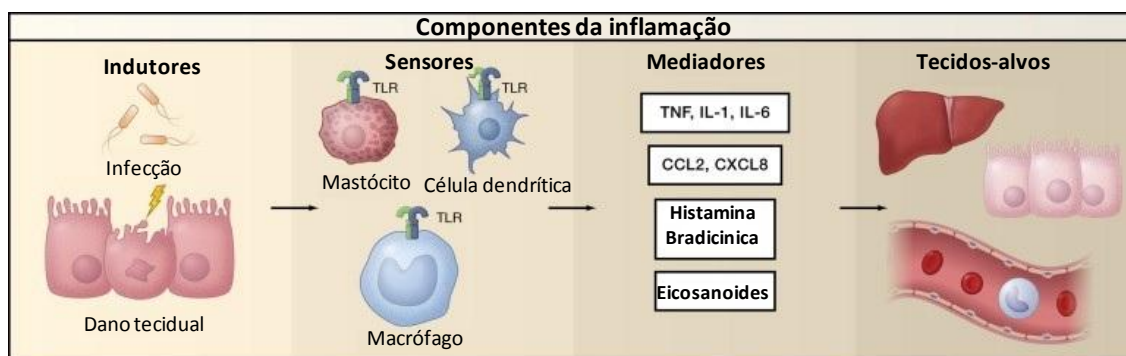
3.2.3 Estudo da atividade <i>in vitro</i> do extrato de <i>Herissantia tiubae</i>	50
3.2.3.1 Cultura contínua de células da linhagem RAW 264.7	50
3.2.3.1.1 Determinação da viabilidade celular	51
3.2.3.1.2 Determinação da produção de óxido nítrico	52
3.2.3.1.3 Determinação da produção de citocinas inflamatórias	52
3.2.3.1.4 Detecção da L-selectina s	53
3.3 Análises estatísticas	53
4 RESULTADOS	56
4.1 Ensaio preliminares	56
4.1.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo	56
4.1.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	56
4.1.1.2 Avaliação da evolução ponderal e consumo de água e ração	59
4.1.1.3 Avaliação do índice de pesos dos órgãos	59
4.2 Estudo da atividade <i>in vivo</i> do extrato de <i>Herissantia tiubae</i>	60
4.2.1 Edema de pata induzido por carragenina	60
4.2.2 Avaliação da permeabilidade microvascular	62
4.2.3 Peritonite induzida por carragenina	63
4.2.3.1 Contagem de células total e diferencial do lavado peritoneal	63
4.2.3.2 Análise das populações celulares por citometria de fluxo	65
4.2.3.3 Análise da viabilidade dos leucócitos do lavado peritoneal	67
4.2.3.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal	68
4.3 Estudo da atividade <i>in vitro</i> do extrato de <i>Herissantia tiubae</i>	70
4.3.1 Cultura contínua de células da linhagem RAW 264.7	70
4.3.1.1 Determinação da viabilidade celular	70
4.3.1.2 Determinação da produção de óxido nítrico	72
4.3.1.3 Determinação da produção de citocinas inflamatórias	73
4.3.1.4 Detecção da L-selectina	74
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ANEXOS	118

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. As características clínicas da inflamação têm sido conhecidas pela humanidade há pelo menos alguns milhares de anos, em parte porque ela acompanhou dois grandes flagelos do passado, feridas e infecções associadas a doenças de pele, e em parte porque é bastante visível. Embora as referências à inflamação possam ser encontradas em textos médicos antigos, datados de aproximadamente 3000 a.C. em papiros egípcios, aparentemente o primeiro a definir seus sintomas clínicos foi o médico romano Cornélio Celsus, no século I d.C. Os sintomas passaram a ser conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: *rubor et tumor cum calore et dolore* (vermelhidão e inchaço com calor e dor). Celsus menciona esses sinais em seu tratado de Medicina, ao descrever os procedimentos para o tratamento da dor no peito, e com isso se tornou uma celebridade médica frequentemente citada. O quinto sinal cardinal, *functio laesa* (perda da função), foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858 em seu livro *Cellular pathologie* (MAJNO, 1975). Hoje, estudos microscópicos tornaram possível estabelecer que os sinais clínicos da inflamação são resultados da vasodilatação, do acúmulo de leucócitos, do aumento do fluido intersticial e da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (ALLER et al., 2007).

A definição clássica da inflamação é uma resposta fisiológica à agressão tecidual e tem por finalidade combater os agentes nocivos (de natureza infecciosa ou não), além de potencializar o reparo tecidual (FLOWER e PERRETTI, 2005). A inflamação é geralmente uma resposta benéfica a lesões do tecido ou infecções e é essencial para manter a homeostase. No entanto, a resposta inflamatória pode ser prejudicial para as células quando ela se torna exarcebada (GOMEZ-MUÑOZ, 2013). A resposta inflamatória típica consiste em quatro componentes: os indutores inflamatórios, os sensores que os detectam, os mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores, e os tecidos-alvos que são afetados pelos mediadores inflamatórios (Figura 1):

Figura 1: Componentes da inflamação.

A via inflamatória consiste de indutores, sensores, mediadores, e os tecidos-alvos. Indutores iniciam a resposta inflamatória e são detectados por sensores. Sensores, como os receptores do grupo *Toll-like* (TLRs), são expressos em células sentinelas especializadas, como macrófagos teciduais residentes, células dendríticas, e mastócitos. Elas induzem a produção de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas, eicosanoides bioativos, e produtos de cascatas proteolíticas, tais como a bradicinina. Estes mediadores inflamatórios agem em vários tecidos-alvos para provocar alterações nos seus estados funcionais que otimizam a adaptação à condição nociva (por exemplo, infecção ou lesão do tecido) associado com os indutores específicos que despertaram a resposta inflamatória. Os componentes específicos apresentados representam apenas uma pequena amostra de uma miríade de diferentes sensores, mediadores, e os tecidos-alvos envolvidos na resposta inflamatória. (Fonte: Adaptado de Medzhitov, 2010).

Cada componente participa do processo inflamatório sob múltiplas formas e suas funções combinadas ativam diferentes vias de sinalização para desencadear a inflamação. Em determinadas condições, o tipo de via induzida depende da natureza do estímulo inflamatório que pode ser: danos mecânicos, infecções, lesões químicas, queimaduras, radiação, injúria tecidual e choque (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). A resposta inflamatória tem sido melhor caracterizada para infecções microbianas (especialmente infecções bacterianas), que é desencadeada por receptores celulares como *Toll-like* (TLRs) e o NOD-like (BARTON, 2008). O reconhecimento inicial da infecção é mediada por macrófagos residentes, células dendríticas e mastócitos, levando à produção e liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas (RUSLAN, 2008). Estes mediadores inflamatórios, então, agem sobre os tecidos-alvos, incluindo os vasos sanguíneos locais, para induzir a vasodilatação, extravasamento de neutrófilos, e vazamento de plasma para o tecido infectado. Esses fagócitos (neutrófilos recrutados e os monócitos que são transformados em macrófagos teciduais) expressam em sua superfície receptores que são ativados ao se ligar a produtos microbianos denominados padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que resulta na

fagocitose do patógeno. Uma vez ativado, esses fagócitos produzem radicais reativos de oxigênio e nitrogênio e enzimas lisossômicas, que destroem os micro-organismos fagocitados, restaurando a homeostase do hospedeiro (MEDZHITOV, 2010; ABBAS et al., 2011).

1.1 Inflamação

A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos, aguda e crônica, divisão essa baseada na duração e características patológicas da reação inflamatória. A inflamação aguda melhor caracterizada trata-se de uma resposta rápida (minutos, horas e/ou dias), normalmente benéfica para o hospedeiro, desencadeada devido à presença de infecções ou aos tecidos lesados, envolve eventos vasculares e celulares, caracterizados por vasodilatação, exsudação de fluido ou exsudato rico em proteínas de fase aguda com formação de edema, migração de células, primariamente neutrófilos, para o sítio lesado, cuja função é erradicar o estímulo inicial e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Se a inflamação aguda é bem sucedida, restaurando a arquitetura do tecido normal ou formando uma cicatriz de tecido conjuntivo, a homeostasia é restabelecida (REUTER et al, 2010; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). O sucesso da resposta inflamatória aguda resulta na eliminação dos agentes infecciosos seguido por uma fase de resolução e reparação, que é mediada principalmente por monócitos que foram recrutados para o foco inflamatório bem como por macrófagos residentes dos tecidos (MEDZHITOV, 2010; MORI et al., 2011).

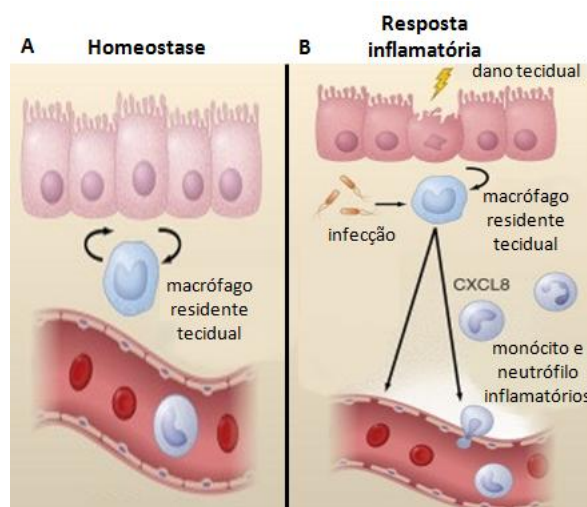
Porém, se o estímulo não é eliminado, o processo inflamatório irá persistir e evoluir. Neste caso, ocorrem alterações na composição dos leucócitos infiltrantes, que passam de neutrófilos, para uma mistura de células mononucleares, principalmente linfócitos e macrófagos (POBER e SESSA, 2007; GRIVENNIKOV et al, 2010; NATHAN e DING, 2010). Assim, caracteriza-se uma inflamação crônica que possui maior duração (semanas, meses e/ou anos) e está associada à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose

tecidual (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). Tem sido relatado que algumas inflamações crônicas podem predispor o hospedeiro a várias doenças crônicas não diretamente relacionadas, incluindo o câncer, artrite reumatoide, asma, hipertensão e obesidade (POBER e SESSA, 2007; GRIVENNIKOV et al., 2010, NATHAN e DING, 2010). Para conseguir a resolução completa da inflamação é necessário desativar a produção de mediadores inflamatórios, bem como a acumulação de células inflamatórias e sua remoção e de detritos sem iniciar uma resposta autoimune. As principais células responsáveis pela depuração das células inflamatórias que sofreram apoptose na fase resolutive da inflamação acarretando a restauração do tecido inflamado e o retorno à homeostasia são as células da série fagocítica mononucleares, incluindo macrófagos residentes e recrutados (GOMEZ-MUÑOZ, 2013).

1.1.1 Eventos vasculares

As reações vasculares da inflamação aguda consistem em mudanças no fluxo sanguíneo e na permeabilidade dos vasos. Em situações de homeostase (Figura 2 A), normalmente as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão contidas no interior dos vasos, em movimento no sentido do fluxo sanguíneo. Diante de um estado inflamatório (Figura 2 B), os vasos sanguíneos passam por uma série de alterações, que facilitam a passagem de proteínas plasmáticas e células da circulação para o local da lesão ou da infecção (KUMAR et al., 2010).

Figura 2: Inflamação: A resposta do tecido ao estresse.



A inflamação é uma resposta a condições nocivas. (A) Em condições normais, macrófagos teciduais residentes mantêm a homeostase tecidual, removendo células mortas e outros detritos e produzindo fatores de crescimento. (B) Em casos de infecção ou lesão tecidual, a resposta inflamatória aguda segue. Esta caracteriza-se pelo recrutamento de neutrófilos e subconjuntos especializados de monócitos da circulação que ajudam a proteger o hospedeiro contra infecções e promovem a reparação tecidual e restauração da homeostase. (Fonte: Adaptado de Medzhitov, 2010).

Logo após a injúria, a vasodilatação é uma das primeiras manifestações da inflamação aguda, mediada pela histamina e pelo óxido nítrico (NO), que agem no músculo liso vascular, se inicia pelas arteríolas e aumenta o leito capilar na região inflamada, causando calor e vermelhidão no local da inflamação como resultado de um fluxo sanguíneo aumentado (ALLER et al., 2007).

Posteriormente, ocorre um aumento da permeabilidade vascular que é um processo altamente coordenado que integra tráfico vesicular, rearranjos complexos juncionais celulares e uma dinâmica refinada do citoesqueleto celular que funcionam em paralelo para regular a passagem de solutos entre o sangue e tecidos, em resposta a um estímulo (GODDARD e IRUELA-ARISPE, 2013). Resumidamente, ocorre a formação de fendas no endotélio das vênulas após a ligação de histamina e leucotrienos aos seus receptores, e ativação de vias de sinalização que levam à fosforilação de proteínas contráteis do citoesqueleto; desta forma, as células endoteliais se contraem e separam as junções intercelulares, sendo este evento de curta duração. Citocinas inflamatórias, por exemplo: interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), cininas e produtos do sistema complemento também são capazes de

aumentar a permeabilidade vascular, entretanto sua ação se dá em períodos entre 2 e 8 horas pós-estímulo. Outros mecanismos como o dano direto e necrose do endotélio podem levar ao aumento da permeabilidade de forma prolongada. O aumento da permeabilidade dos pequenos vasos sanguíneos em uma área de injúria leva ao escape de fluidos, proteínas e células sanguíneas do sistema vascular para dentro do tecido intersticial ou cavidades corporais, produzindo o edema. O extravasamento desse fluido rico em proteínas para o sítio inflamado leva à hemoconcentração, favorecendo a estase venosa e produzindo a vermelhidão localizada. Esse mecanismo é importante, pois o fluxo sanguíneo reduzido aumenta o contato dos leucócitos com o endotélio e permite a adesão e posterior transmigração destas células para o sítio inflamatório (KUMAR et al., 2010). Um papel fundamental da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (ALLER et al., 2007; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

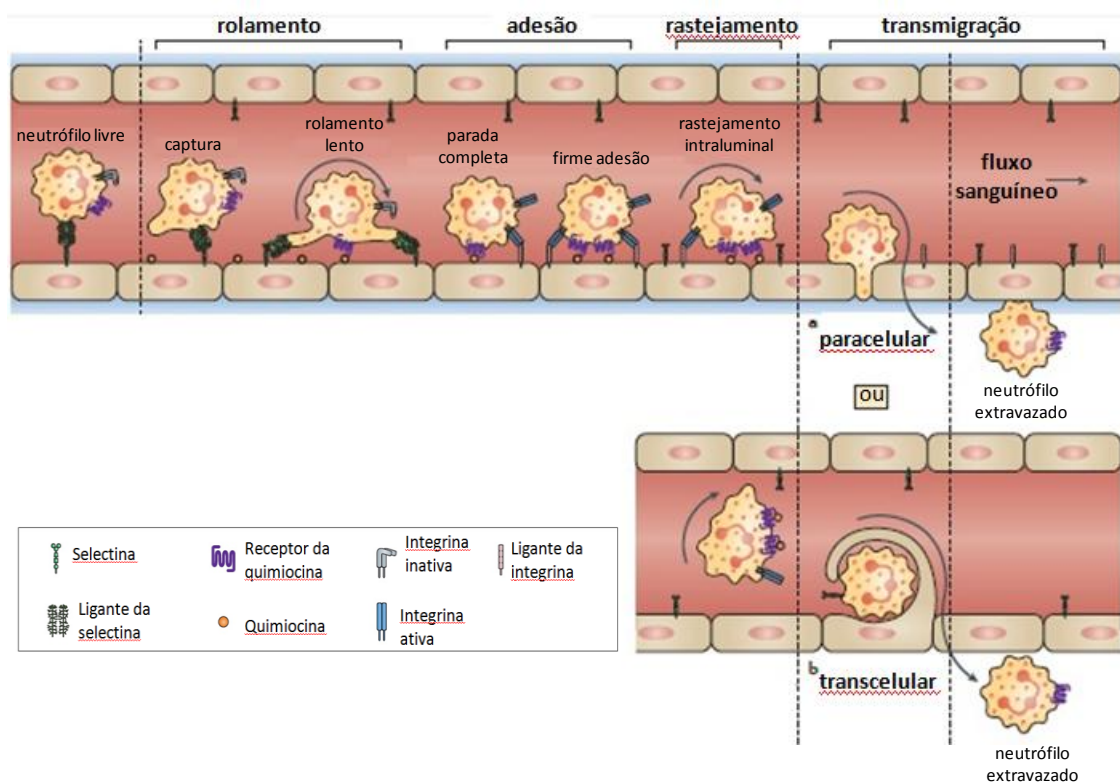
1.1.2 Eventos celulares

O processo de extravasamento de leucócitos a partir do vaso (especificamente das vênulas pós-capilares) para um tecido infectado, inflamado ou lesado, é mediado através de processos moleculares, mecânicos e químicos sequenciados temporalmente, que em conjunto é designado como cascata de adesão leucocitária e são, em geral, bastante semelhantes para as diferentes subpopulações de leucócitos (CHAVAKIS, 2012; LEY et al., 2007; PADMANABHAN e GONZALEZ, 2012; SCHMIDT et al., 2013).

Devido à lentificação do fluxo sanguíneo na estase, as condições hemodinâmicas mudam no interior do vaso; o estresse de cisalhamento na parede do vaso diminui e mais leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial, processo conhecido como marginação (KUMAR et al., 2010). Em seguida, na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento leucocitário envolve comumente as seguintes etapas reconhecidas: captura, rolamento, adesão, rastejamento e, finalmente, transmigração (figura 3). A passagem dos leucócitos do lúmen vascular para o tecido é guiada por

interações adesivas específicas, dependentes da existência de diferentes famílias de moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas) e seus respectivos receptores nos leucócitos e nas células endoteliais (BARREIRO et al., 2010; SUNDD et al., 2011).

Figura 3: A cascata de recrutamento de neutrófilos clássico atualizado.



Passos sequenciais de recrutamento dos neutrófilos da vasculatura para o tecido. Dois métodos possíveis de transmigração são reconhecidos: a) paracelular (entre as células endoteliais) e b) transcelular (através das células endoteliais). Grandes grupos de moléculas de adesão estão envolvidos no processo. Rolamento é principalmente selectina-dependente, enquanto a adesão, rastejamento e transmigração dependem de interações integrina. Quimiocinas que revestem a parte luminal do endotélio ativam neutrófilos rolantes, induzindo, assim, mudanças conformacionais das integrinas na superfície dos neutrófilos permitindo eventos subsequentes. Neutrófilos rastejantes seguem o gradiente de quimiocinas ao longo do endotélio, que os orienta para os locais preferenciais de transmigração (Fonte: Adaptado de Kolaczkowska e Kubes, 2013).

O recrutamento leucocitário é iniciado por mudanças na superfície do endotélio, resultado da estimulação dos mediadores inflamatórios incluindo a histamina, cisteinil leucotrienos e citocinas como TNF- α e IL-1 β que são liberados a partir de leucócitos sentinelas residentes no tecido quando eles entram em contato com PAMPs, ou as células endoteliais também podem ser ativadas diretamente através de receptores de reconhecimento de padrões

(PRR) mediado por detecção de PAMPs que aumentam a expressão de moléculas de adesão (WILLIAMS et al., 2011). Em poucos minutos, as moléculas de P-selectina, assim designada por ter sido encontrada pela primeira vez nas plaquetas, que são pré-armazenadas nos corpos de Weibel-Palade são redistribuídas para a superfície da célula endotelial, bem como a E-selectina é sintetizada no período máximo de 90 minutos e expressa também na superfície endotelial. Estas duas selectinas contribuem para rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial via ligação com seus ligantes glicosilados presentes na membrana dos leucócitos, incluindo o ligante de glicoproteína da P-selectina 1 (PSGL1), levando à captura de leucócitos circulantes livres na superfície endotelial e seu subsequente rolamento ao longo do vaso em direção do fluxo sanguíneo. O rolamento lento exige rápida formação e quebra das ligações adesivas entre P-selectina e PSGL1 (SUNDD et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Embora o papel primário da L-selectina pareça ser promover o endereçamento linfocitário (*homing*) para os nódulos linfáticos, a expressão de L-selectina por leucócitos circulantes pode facilitar a captura secundária de um neutrófilo já em rolamento, ou pode contribuir para eventos de sinalização *downstream* que permitam os neutrófilos aderir ao endotélio ou emigrar para fora da vasculatura (ARBONES et al., 1994; BARGATZE et al., 1994; ZARBOCK et al., 2011).

O rolamento lento dos leucócitos facilita o contato com quimiocinas presentes no endotélio inflamado para induzir a sua ativação. A ativação de receptores de quimiocinas acoplados a proteína G nos leucócitos induz alterações na conformação das integrinas (sinalização de dentro para fora) expressas na membrana dos leucócitos, que subsequentemente apresentam maior afinidade para os seus ligantes, incluindo, mas não se limitando, as moléculas de adesão intercelular (ICAMs) pertencentes à superfamília das imunoglobulinas expressas nas células endoteliais. As integrinas medeiam à adesão firme dos leucócitos ao endotélio e representam uma grande família de proteínas que são classificadas pelas subunidades “ β ”, como a β 1 (CD29), β 2 (CD18), β 3 (CD61) e β 7-integrinas. Existem quatro diferentes tipos de integrinas β 2 (CD11/CD18): LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18), gp150/95 (CD11c/CD18) e CD11d/CD18 (WIESNER et al., 2005). As principais

integrinas que medeiam a firme adesão dos leucócitos ao endotélio são o antígeno associado à função leucocitária 1 (LFA-1) que se liga principalmente à ICAM-1 e o antígeno de expressão tardia 4 (VLA-4) que se liga à molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) que possuem suas expressões aumentadas no endotélio inflamado (HOGG et al., 2002; SMITH et al., 2007; PHILLIPSON et al., 2006; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). O precário funcionamento dessas moléculas de adesão provoca padrões de doenças graves, caracterizadas pela incapacidade de combater patógenos, pois o recrutamento leucocitário fica prejudicado (HERTER e ZARBOCK, 2013).

Uma exceção às etapas da cascata de adesão leucocitária acontece nos capilares sinusoidais hepáticos, onde não acontece o rolamento, os neutrófilos se aderem diretamente ao endotélio por interações MAC-1/ICAM na ausência de inflamação; já na presença de infecções hepáticas, a aderência é mediada por interações CD44, pois a interleucina 10 (IL-10) liberada no fígado infectado induz a diminuição da expressão de MAC-1 nos neutrófilos, permitindo que a adesão seja feita pela molécula CD44 nos neutrófilos juntamente com o ácido hialurônico expressos nas células endoteliais (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

As moléculas participantes no processo de adesão leucocitária constituem alvos de vários agentes anti-inflamatórios, como glicocorticoides, por diminuírem a expressão de moléculas de adesão no endotélio e na superfície do neutrófilo, ou salicilatos, que bloqueiam a ativação de MAC-1 levando a inibição da adesão neutrofílica (FILEP et al., 1997; PILLINGER et al., 1998).

A etapa de adesão da cascata de recrutamento prepara neutrófilos para transmigração, mas isso não ocorre necessariamente no local inicial da sua adesão no endotélio. Os neutrófilos geralmente transmigram nas junções entre células endoteliais, ao qual eles rastejam ativamente via interação de ICAM-1 expresso nas células endoteliais com MAC-1 expresso nos neutrófilos; não necessitando de um gradiente quimiotático para realizar tal tarefa (HEPPER et al., 2012; SCHMIDT et al., 2013).

A fim de deixar o sistema vascular, os neutrófilos devem primeiro atravessar o endotélio, o que leva de 2-5 minutos e, em seguida, a membrana

basal, o que gasta em torno de 5-15 minutos. Transmigração requer integrinas e ICAMs (ICAM-1, ICAM-2 e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), bem como proteínas juncionais diferentes, incluindo a molécula de adesão celular endotelial/plaquetária 1 (PECAM-1, também conhecido como CD31), CD99, moléculas de adesão juncionais (JAMs), molécula de adesão celular epitelial (ECAM) e algumas outras moléculas celulares endoteliais com funções mecânicas pouco esclarecidas (LEY et al., 2007; PHILLIPSON e KUBES, 2011; GONZALEZ-SIMON e ENIOLA-ADEFESO, 2012; SCHMIDT et al., 2013). A passagem através da camada de células endoteliais ocorre tanto paracelularmente (entre as células endoteliais) ou transcelularmente (através de uma célula endotelial). O processo paracelular exige o desligamento das ligações proteicas intercelulares juncionais, tais como os formados pelo endotélio vascular (VE)-caderina. O dois processos levam os neutrófilos para o espaço extravascular, porém os neutrófilos transmigram preferencialmente através do caminho paracelular, mas também utilizam a via transcelular, embora o último seja menos eficiente e dure mais tempo (20-30 minutos) (PHILLIPSON et al., 2008; PETRI, PHILIPSON e KUBES, 2008; PHILIPSON et al., 2011; WOODFIN et al., 2011; GONZALEZ-SIMON AL, ENIOLA-ADEFESO O., 2012).

O último passo da cascata é a migração de neutrófilos através da matriz extracelular (ECM) para alcançar a fonte de infecção. Como um mecanismo de defesa, estas células sofrem processos oxidativos, não-oxidativos, e outros processos intracelulares dentro da matriz, a fim de destruir objetos estranhos, micróbios, proteínas e detritos celulares (HICKEY e KUBES , 2009).

1.1.3 Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MAJNO; JORIS, 2004; KUMAR et al., 2010); ou podem ser classificados de acordo com sua origem plasmática (advindo das cascatas das cininas, coagulação, fibrinólise e complemento) ou

tecidual (aminas e peptídeos vasoativos, mediadores lipídicos enzimas lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas, citocinas) (LANSEN; HENSON, 1983; SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) são mediadores pré-formados, armazenados em grânulos celulares, e estão entre os primeiros a serem liberados durante a inflamação. Estão envolvidas na formação de edema, prurido, e na dor inflamatória, uma vez que participam dos mecanismos causadores da vasoconstrição inicial e vasodilatação subsequente (KUMAR et al., 2010; REUTER et al., 2010; YAKUGAKU Z. et al., 2011).

As fontes mais ricas de histamina são os mastócitos presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos, basófilos e plaquetas no sangue (KUMAR et al., 2010; YAKUGAKU Z. et al., 2011). Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores acoplados à proteína G (HR1, HR2, HR3 e HR4), que podem levar à formação de fosfatidil inositol (IP3), aumento dos níveis de cálcio intracelular, ativação de NF- κ B e da via da adenilato ciclase; sendo o HR1 e HR2 os receptores responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela histamina, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (causando urticária e angioedema, característicos da anafilaxia), aumento da frequência e contração cardíaca e aumento da secreção glandular (JUTEL et al., 2009; BORK, 2014).

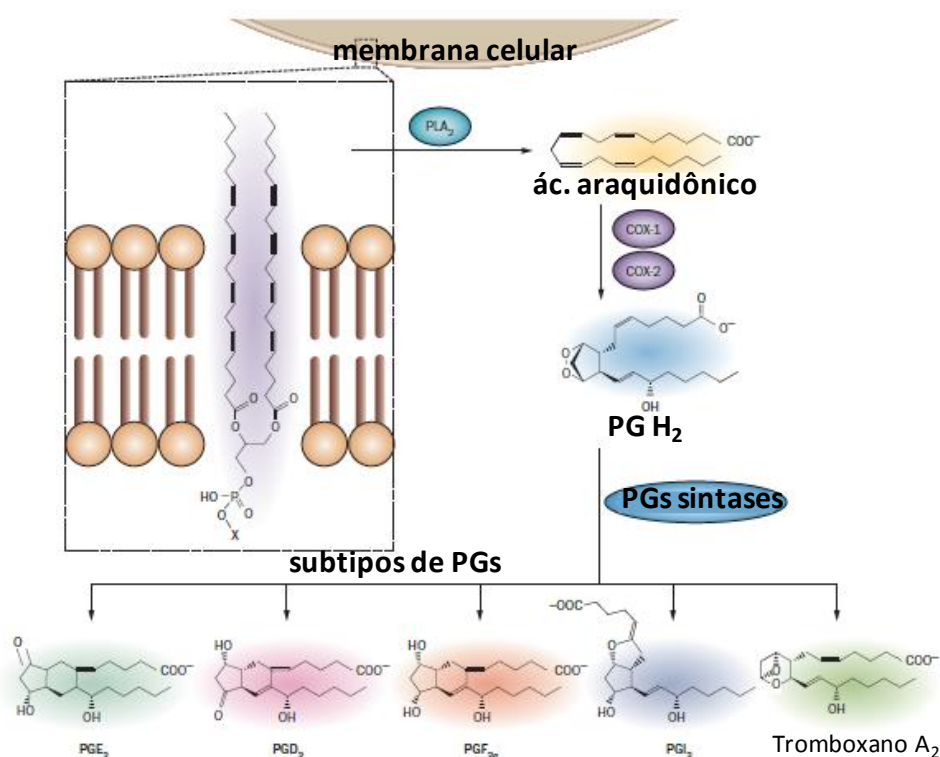
A serotonina, 5 hidroxitriptamina (5-HT), é um importante neurotransmissor no cérebro. Além de sua ação central, apresenta ações periféricas similares àquelas da histamina, está envolvida na sensibilização de nociceptores, regulação do sono, temperatura e pressão arterial. A serotonina pode ainda influenciar na mobilidade e na proliferação de linfócitos, na fagocitose, nas propriedades citolíticas e na síntese de citocinas e quimiocinas. A diversidade de efeitos imunomoduladores da serotonina é determinada pela heterogeneidade dos receptores serotoninérgicos (SEPIASHVILI et al., 2013). A serotonina pode ser encontrada no sangue e em altas concentrações nas plaquetas, que a acumulam a partir do plasma por meio de um sistema de transporte ativo, liberando-a quando sofrem agregação após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina e complexos antígeno-anticorpo (GONZALEZ-REY et al., 2007; KUMAR et al., 2010).

As cininas são peptídeos formados por proteases conhecidas como calicreínas (tissular e plasmática) a partir do precursor cininogênio. Bradicinina (BK), Lys-bradicinina (LysBK) e des-Arg9-bradicinina (des-Arg9BK) são as três cininas importantes no processo inflamatório; estão envolvidas na dor, formação de edemas, vasodilatação e síntese de prostaglandinas. A atividade pró-inflamatória da BK está associada à sensibilização e ativação dos terminais nervosos aferentes nociceptivos, como demonstrado por Steranka e colaboradores em 1988. BK exerce seus efeitos inflamatórios por meio de interação com um dos dois subtipos de receptores (B1 e B2). Os receptores B1 são escassamente expressos em tecidos não inflamados, mas sua expressão pode ser aumentada sob condições particulares, como injúria e infecção. BK interage com receptores B2 que são expressos constitutivamente e distribuídos em diversos tecidos, ativa a fosfolipase C (PLC), com consequente hidrólise do fosfato de inositol (IP) e produção de diacilglicerol (DAG), que por sua vez potencializa a expressão e ativação de receptores TRPV1 vaniloide que proporciona sensação de calor e dor (MARCEAU e REGOLI, 2004; DE FALCO et al., 2013).

Os mediadores lipídicos (eicosanoides e fatores de ativação plaquetária) são derivados de fosfolipídeos, como a fosfatidilcolina, presentes na membrana celular. Após a ativação por íons Ca^{+2} intracelular, a fosfolipase A_2 citosólica (PLA₂) gera ácido araquidônico (AA) e ácido lisofosfatídico, a partir da fosfatidilcolina. O AA é metabolizado em eicosanoides (Figura 4), por ciclo-oxigenases (COX1 e COX2), que geram prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX), ou por lipo-oxigenases (LOX), que geram leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) (FUNK, 2001; EL ALWANI et al., 2006). Os metabólitos do AA derivados das vias das COXs, tais como PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂ e tromboxanos são conhecidos como prostanoides, que possuem sua biossíntese significativamente aumentada em tecidos inflamados. PGE₂ e PGI₂ são os principais prostanoides com ação pró-inflamatória, produzem vasodilatação e a PGE₂ também é um potente indutor de dor e febre. LTs são classificados em duas classes, leucotrieno B₄ (LTB₄) e cisteinil leucotrieno (CysLT), que desempenham papel significativo na fisiopatologia de vários processos inflamatórios das vias aéreas, pele, trato digestivo e no coração por ativar

receptores acoplados a proteína G, promovendo assim a quimiotaxia de leucócitos. Portanto, inibidores ou antagonistas dos LTs, representam importantes ferramentas terapêuticas contra doenças inflamatórias (SADIK et al., 2013). LXs inibem a inflamação, além de promover a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual (FUNK, 2001; SADIK e LUSTER, 2012). A segunda classe de mediadores lipídicos, fator de ativação plaquetária (PAF), são gerados a partir da acetilação do ácido lisofosfatídico e são responsáveis por ativar vários processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de leucócitos, vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas (HIGGS et al., 1984; EL ALWANI et al., 2006; SERHAN, 2007).

Figura 4: Biossíntese de eicosanoides.



Fonte: Adaptado de RAHNAMA et al., 2012.

Corpúsculos lipídicos (LCs) são organelas intracelulares metabolicamente ativas que variam os perfis lipídicos e proteicos em cada tipo de célula, podendo também sofrer variações em resposta a mudanças no estado fisiológico celular. É bem sabido que a função principal dos LCs em adipócitos é assegurar o abastecimento de energia e manter a homeostase de

lipídios no corpo. Em contraste, LCs (rico em triglicerídeo) em mastócitos humanos têm sido implicados na biossíntese de eicosanoides, particularmente em condições inflamatórias. O modelo proposto por Dichlberger e colaboradores (2013) sugere que ocorra lipólise nos LCs, levando a formação de AA para posterior formação dos eicosanoides.

As citocinas consistem em um grande grupo heterogêneo de peptídeos solúveis que têm um importante papel regulador sobre o início, manutenção e término das reações inflamatórias (ABBAS et al., 2011; HELED et al., 2013). Entre as citocinas mais conhecidas, tais como: fator de necrose tumoral α (TNF- α), Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) são vistas como as mais importantes, devido aos seus papéis na fisiopatologia de muitas doenças inflamatórias (EL ALWANI et al., 2006).

O TNF- α e a IL-1 β são encontrados juntos em inúmeros cenários inflamatórios e possuem efeitos fisiológicos essencialmente idênticos, são produzidos principalmente por fagócitos mononucleares ativado e exercem potentes efeitos inflamatórios locais e sistêmicos. Diferentemente do TNF- α , a IL-1 β pode ser produzida por outras células (endoteliais, neutrófilos, linfócitos, células *Natural Killer* e mastócitos) em resposta a diversos estímulos inflamatórios, capazes de ativar as vias das quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fator nuclear-kB (NF-kB) e p38 (EL ALWANI et al., 2006; WAGNER e ROTH, 2000), também são capazes de ativar os sinais transdutores da Janus cinases (JAK) e o transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) (YOSHIMURA et al., 2012; CROKER et al., 2012; HASSELBALCH, 2013). Em nível local, TNF- α e IL-1 β induzem expressão de moléculas de adesão no endotélio ICAM-1 e VCAM-1; síntese de mediadores químicos (incluindo outras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanoides e NO); ativam neutrófilos e fagócitos mononucleares; induzem a produção do fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; MAMBOLE et al., 2010); aumentam a permeabilidade vascular; promovem a liberação do NF-kB no citosol, ao estimular a degradação da subunidade inibitória I κ B. O NF-kB regula a síntese de muitas proteínas que funcionam em vias inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , INF- γ e COXs (EL ALWANI et al., 2006; HASSELBALCH, 2013). Já em nível sistêmico, TNF- α e

IL-1 β induzem reações sistêmicas de fase aguda, causando febre, estimulação da hipófise para liberar hormônios do estresse, também estimulam o fígado a sintetizar inúmeras proteínas de fase aguda como proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e importantes antiproteases (EL ALWANI et al., 2006; KUMAR et al., 2010; YUNG et al., 2013). Uma exceção de função sobreposta dessas duas citocinas é que a IL-1 β não induz, por si só, lesão tecidual ou morte apoptótica, embora possa intensificar os efeitos lesivos do TNF- α (WAGNER e ROTH, 2000). Porém quando receptores do tipo NOD-like (NLR) detectam PAMPs ou padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) ou sinais de perigo no citoplasma de células hospedeiras induzem a produção e maturação de IL-1 β e IL-18 que estão relacionadas com quadros de inflamação aguda e crônica e podem levar a um tipo de morte celular chamada piroptose. Sabe-se que a produção dessas citocinas é induzida por ativação de um complexo proteico intracelular denominado inflamassomo, que ativa a caspase-1, que por sua vez promove a maturação e liberação de IL-1 β e IL-18, que, então, deixam a célula e desempenham diversas funções pró-inflamatórias (BROZ e MONACK, 2011; SAID-SADIER e OJCIUS, 2012).

A IL-6 é outra importante citocina em respostas inflamatórias agudas que também apresenta efeitos locais e sistêmicos; é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e outras células em resposta aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), IL-1 β e TNF- α . O receptor de IL-6 participa da via de sinalização que ativa o fator de transcrição STAT3 (ABBAS et al., 2011; MORI et al., 2011; YUNG et al., 2013). Entretanto, enquanto o TNF- α e a IL-1 β induzem a produção de IL-6, esta última inibe a síntese dos primeiros, produzindo desta forma, um efeito anti-inflamatório por meio de retroalimentação (*feedback*) negativo (EL ALWANI et al., 2006).

As quimiocinas são um grupo de proteínas segregadas dentro da família das citocinas cuja função genérica é induzir a migração celular. Essas "citocinas quimiotáticas" são produzidas pelos leucócitos e outras células e estão envolvidas na quimiotaxia de leucócitos e tráfego de células do sistema imunológico para locais em todo o corpo. As quimiocinas pertencem a duas categorias com base na sua atividade biológica, isto é, na manutenção da

homeostase e na indução da inflamação. Quimiocinas homeostáticas são produzidas de modo constitutivo nos tecidos e desempenham um papel na organização do tecido. Quimiocinas inflamatórias, por outro lado, são produzidas durante as infecções ou como uma resposta a um estímulo inflamatório e facilitam uma resposta imune por guiar as células do sistema imune inato e adaptativo (ABBAS et al., 2011; RAMESH et al., 2013). As quimiocinas apresentam quatro cisteínas conservadas que formam duas ligações de dissulfeto essenciais (Cys1-Cys2 e Cys3-Cys4). As duas maiores famílias das quimiocinas (CC e CXC) são distinguidas de acordo com a posição das duas primeiras cisteínas, que ou são adjacentes (CC) ou separadas por um aminoácido (CXC), cuja atividade difere quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efectoras (BAGGIOLINI, M., 1998; HE et al., 2007)

Outro importante mediador da resposta inflamatória é o óxido nítrico (NO), primeiramente chamado de fator de relaxamento derivado do endotélio. É um gás solúvel produzido pelas células endoteliais, macrófagos e alguns neurônios cerebrais e é produzido a partir da L-arginina pela ação da NO sintase (NOS). Três isoformas da NOS foram identificadas: as NOS endotelial (eNOS) e neural (nNOS), que são produzidas de forma constitutiva e suas expressões aumentam com o efluxo de cálcio, produzem pequenas quantidades de NO, que atua como vasodilatador e neurotransmissor, respectivamente. Em adição, estudos indicam que o aumento na produção de NO, devido a indução da expressão de NOS induzível (iNOS) por citocinas inflamatórias (interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , IL-1 β e IL-6) e lipopolissacarídeo (LPS), é um instrumento da fisiopatologia da inflamação (PACHER et al., 2007; LOSCALZO, 2013). Por sua ação no músculo liso vascular, é um potente vasodilatador e reduz a agregação e adesão plaquetária. O NO também promove sensibilização dolorosa (DURÁN et al., 2010). Além disso, o NO e seus derivados são microbicidas, de forma a ser um mediador na defesa do hospedeiro contra infecções. Mediadores pró-inflamatórios ativam células inflamatórias e enzimas como a iNOS, que produz grandes quantidades de NO e de enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase, produtoras de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-). A produção simultânea de NO e O_2^- resulta na geração de peroxinitrito ($ONOO^-$) que, por sua vez, lesiona

moléculas alvo como proteínas, glutathione (GSH), mitocôndrias e DNA (PACHER et al., 2007; HARDINGHAM et al., 2013).

Dentre os principais fármacos utilizados na clínica para inflamação aguda destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides que possuem aplicações amplas, porém apresentam efeitos colaterais graves e geralmente são onerosos financeiramente para populações carentes (SCHIMMER e PARKER, 2003). Como opção terapêutica, o uso de plantas medicinais como forma de curar os processos inflamatórios é de origem antiga e fundamentada no uso popular por sucessivas gerações. Muitas dessas plantas são alvos de estudos científicos em busca de novas terapêuticas para esta área que apresentem eficácia, menores efeitos adversos e baixo custo; o uso popular, como também novas ações farmacológicas, muitas vezes, são confirmadas pelos resultados das pesquisas científicas (PEREIRA et al., 1999; ZAKARIA et al., 2010). Várias plantas da família Malvaceae têm seu uso popular respaldado cientificamente, por exemplo: *Pseudobombax marginatum* (PAIVA et al., 2013); *Thespesia populnea* (VASUDEVAN et al., 2007), *Malva parviflora* (BOURICHE et al., 2011), dentre outros. *Herissantia tiubae* faz parte da família Malvaceae e a proposta deste estudo é respaldar cientificamente a planta quanto a sua utilização nos processos inflamatórios.

2.1 Toxicologia de produtos naturais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, porém o uso ao longo dos anos evidenciou que determinadas plantas apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA –JUNIOR et al., 2005; SAAD et al., 2006; SHAW, 2010).

Vários exemplos de efeitos tóxicos têm sido registrados na literatura, por exemplo, efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas (CAPASSO et al., 2000). Um caso importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L.) utilizado na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos. Após diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por estes alcaloides, a Organização mundial de saúde (OMS) condenou o uso do confrei (VEIGA –JUNIOR et al., 2005).

O uso tradicional de muitas plantas medicinais ainda é baseado apenas em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas por estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança. Outro fator preocupante é que várias plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006; SAAD et al., 2006).

No Brasil, as várias plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvicultores. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicas pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). A legislação no Brasil para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes

medicamentos, desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC nº 17 de 2000, pela RDC nº 48 de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, e pela Resolução RDC nº 14 de 2010, atualmente em vigor, que dispõe os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos. Na secção V da RDC em vigor aborda-se o relatório de eficácia e segurança que inclui ensaios pré-clínicos e clínicos de segurança e eficácia para avaliar a toxicidade do produto natural (BRASIL, 2004a, 2004b, 2000c, 2010d). Outra importante ferramenta do pesquisador/instituição é a segunda versão do guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, publicada recentemente, que aborda vários tipos de ensaios toxicológicos (por exemplo, a toxicidade de dose única), além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética da substância teste (BRASIL, 2013e).

A avaliação da toxicidade é realizada com o objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta. Outras informações podem ainda ser obtidas numa avaliação de toxicidade aguda como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; diagnóstico e tratamento das reações tóxicas; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (VALADARES, 2006).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais e seus constituintes pelos estudos

científicos para que a população tenha acesso a uma terapia segura e de qualidade.

3.1 *Herissantia tiubae*

Herissantia tiubae (K. Schum) Brizicky (Malvaceae), conhecida popularmente como *mela bode* ou *lava-prato*, consiste de um arbusto que pertence à família Malvaceae. Essa família dispõe cerca de 250 gêneros e 4230 espécies (SIMPSON, 2006), que são distribuídos em todo o mundo e são particularmente abundantes na América do Sul tropical (HEYWOOD, 1993). No Brasil, a família está representada por 31 gêneros e 200 espécies (BARROSO et al., 2002). Quanto à importância econômica, possuem representantes de considerável valor, sendo utilizadas na ornamentação em todo o mundo, como espécies de *Abutilon* Mill., *Alcea* L., *Hibiscus* L., *Malvaviscus* Fabr. e *Thespesia* Sol., ou ainda, por serem utilizadas na indústria têxtil, como espécies de *Gossypium* L. (algodão) e *Urena* L. (juta) (BOVINI, 2010). Espécies de Malvaceae são utilizadas na medicina popular para muitas aplicações, tais como diurético, para o tratamento de reumatismo, distúrbios gastrointestinais, asma, picadas de serpentes e como anti-inflamatórios e analgésicos (FALCÃO-SILVA et al., 2009). Publicações anteriores sobre as espécies da família Malvaceae demonstram ocorrência de flavonoides, ácidos graxos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides e alcaloides (SILVA et al., 2005a).

O gênero *Herissantia* compreende seis espécies, restritas à América tropical com a maior ocorrência no México, Antilhas e América do Sul. Apenas *Herissantia crista* L. (Brizicky) é generalizada, ocorrendo desde os Estados Unidos até a Argentina (SILVA et al., 2009). Já *Herissantia tiubae* pode ser encontrada no nordeste brasileiro, onde ocorre em áreas do semiárido, no domínio da caatinga, em lugares abertos e ensolarados, principalmente às margens das estradas, mormente entre os estados da Bahia e Pernambuco (CORREA, 1978; AGRA, 1996; ALBUQUERQUE et al., 2007). As folhas e

flores da *H. tiubae* sob a forma de infusão é utilizada na medicina popular contra influenza e febre (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Em estudos anteriores com *Herissantia tiubae* (Figura 5), foram descritos quatro flavonoides polioxigenado (SILVA et al., 2005a), a que foram atribuídos amplo espectro de atividades biológicas (CHEN et al., 1997). Foram isolados dois flavonoides glicosilados: canferol 3,7-di- O- α -L-ramnopiranosídeo ou lespedina e canferol 3-O- β -D-(6''-E-p-cumaroil) ou tilirosídeo. A lespedina submetida a ensaios farmacológicos preliminares, mostrou um efeito relaxante sobre a artéria mesentérica superior (SILVA et al., 2005b), sugerindo um possível efeito cardiovascular. Outro estudo aponta o tilirosídeo como um inibidor putativo da bomba de efluxo em bactérias, além de indicar que *Herissantia tiubae* poderia atuar modulando a resistência bacteriana, como uma possível fonte de adjuvantes potenciais de antibióticos derivado de planta (FALCÃO-SILVA et al., 2009).

Figura 5: Imagem de *Herissantia tiubae*.



Fonte: ALVES, 2010.

Quatro triterpenos (frideline, lupeol, cicloartenol e cicloeucalenol), um esteroide (β -sitosterol), e quatro compostos fenólicos (um derivado do ácido benzoico, uma cumarina e dois flavonoides, canferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo e 4',5-di-hidroxi-3,6,7,8,3'-pentametoxiflavona) foram isoladas das partes aéreas de *H. tiubae* (SILVA et al., 2009), onde a mistura de dois triterpenos (cicloeucalenol e cicloartenol) mostrou atividade relaxante no músculo liso do íleo isolado de cobaia (GOMES et al., 2005) e a pentametoxiflavona apresentou um efeito modulador de antibióticos frente a cepa de *Staphylococcus aureus* possuidora da bomba de efluxo como mecanismo de resistência aos antibióticos norfloxacino, tetraciclina e eritromicina (SILVA et al., 2009). Outro estudo relacionado à resistência bacteriana, aponta o tilirosídeo como um inibidor inespecífico da bomba NorA em bactérias. O presente

achado indica que *H. tiubae* poderia servir como uma fonte de produtos naturais que modulam a resistência bacteriana, ou seja, uma fonte de adjuvantes potenciais de antibióticos (FALCÃO-SILVA et al., 2009).

Os estudos mais recentes envolvendo *H. tiubae* referem-se à composição das sementes oleaginosas da planta demonstrando ser rica em ácido palmítico (SILVA et al., 2010) que é um ácido graxo saturado mais comum encontrado em vegetais com propriedades emolientes (PEREIRA et al., 2005) e ao efeito do extrato hidroalcoólico da planta na atividade psicoimunomoduladora em modelos experimentais de asma, onde demonstrou ter efeito tanto anti-inflamatório quanto ansiolítico, importantes no tratamento da asma (MOZZINI-MONTEIRO, 2013).

Contudo, apesar do uso na medicina popular para o tratamento de influenza e febre, não há relatos de estudos do extrato de *Herissantia tiubae* em ensaios pré-clínicos, em modelos de toxicidade aguda e nem na inflamação aguda. Diante disto, o presente trabalho visa avaliar os possíveis efeitos tóxico e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Herissantia tiubae* (EHt) em modelos experimentais de toxicidade e inflamação aguda em camundongos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* em modelos experimentais de inflamação aguda.

2.2 Específicos

- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do extrato de *Herissantia tiubae*;
- Determinar o efeito anti-inflamatório do extrato de *Herissantia tiubae* em modelos experimentais de edema de pata induzido por carragenina;
- Observar o efeito do extrato de *Herissantia tiubae* na permeabilidade microvascular peritoneal induzida por ácido acético;
- Determinar os efeitos do extrato de *Herissantia tiubae* na migração celular e na liberação de citocinas no fluido peritoneal de camundongos Swiss desafiados com carragenina;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato de *Herissantia tiubae* em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7;
- Quantificar a produção de NO e citocinas em culturas de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 estimulados ou não com LPS de *Escherichia coli* e INF- γ , na presença ou ausência do extrato de *Herissantia tiubae*;
- Analisar a expressão da molécula de adesão L-selectina em macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados ou não com LPS de *E. coli*, na presença ou ausência do extrato de *Herissantia tiubae*.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Nos protocolos experimentais de toxicidade e inflamação aguda foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas com peso corporal entre 25 e 30 g. Os mesmos foram fornecidos pelo Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e aprovado pelo comitê de ética em utilização animal (CEUA) da instituição referida com CEPA nº 0508/12.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 24 ± 2 °C e submetidos a ciclos de claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº 11794/2008.

3.1.2 Drogas, reagentes e equipamentos

Descrito ao decorrer do texto.

3.1.3 Obtenção e preparo do extrato de *Herissantia tiubae*

3.1.3.1 Material botânico e extração

As partes aéreas utilizadas no presente trabalho foram coletadas em janeiro de 2010 no município de Juazeirinho, do estado da Paraíba, Brasil. A identificação da planta foi realizada pela botânica Prof^a Dra. Maria de Fátima Agra, do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais/UFPB. Uma exsicata do

material vegetal (Nº 2434) encontra-se arquivada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB). A extração seguiu o protocolo de Silva (2005), onde as partes aéreas de *H. tiubae* foram desidratadas em estufa em temperatura de 40 °C durante 96 horas e trituradas, sendo o pó (5 kg) macerado com etanol comercial a 95 % por 72 horas, e extraído até exaustão. A solução etanólica foi concentrada em rotavapor, produzindo 300 g de extrato etanólico bruto, que foi solubilizado com solução etanol:água (7:3), formando assim o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Herissantia tiubae* (EHt) padronizado pelo grupo da Dra Maria de Fátima Vanderlei (MATIAS, 2013)

3.1.3.2 Obtenção

O EHt utilizado neste trabalho foi preparado pelo Dr. Wemerson Neves Matias e gentilmente cedido pela Prof.(a) Dra. Fátima Vanderlei de Souza, membro do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB.

3.1.3.3 Preparo da amostra

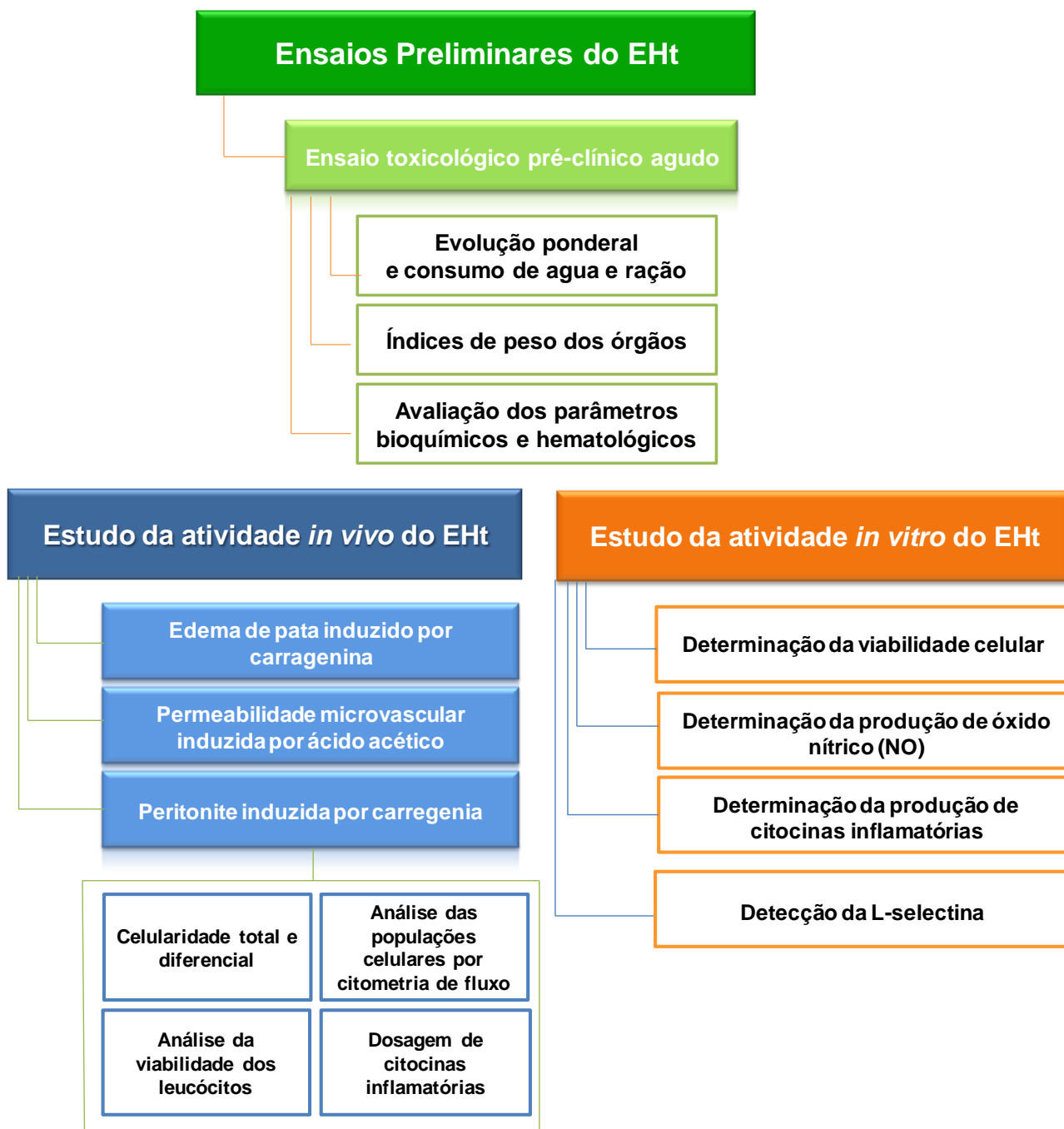
Para a utilização nos experimentos *in vivo*, o EHt foi solubilizado em 2 % de Tween 20 (VETEC®) em água destilada e administrado por via oral (v.o.). Em todos os experimentos, o grupo controle não tratado recebeu igual volume do veículo empregado na dissolução do EHt, pela mesma via de administração.

Para os experimentos *in vitro*, o EHt foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,5 % em cultura celular e a solução estoque foi esterilizada utilizando-se uma unidade filtrante descartável de 0,22 µm de porosidade (Millex Millipore™). Todos os tratamentos foram preparados imediatamente antes de sua utilização.

3.2 MÉTODOS

A sequência de metodologias utilizadas para a avaliação das atividades do EHt está apresentada na Figura 6.

Figura 6: Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae*.



3.2.1 Ensaio preliminares

Os ensaios preliminares foram realizados no Laboratório de Toxicologia do Centro de Biotecnologia da UFPB, coordenado pela prof.(a) Dra Marianna Vieira Sobral Castello Branco.

3.2.1.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

O teste de toxicidade pré-clínico agudo foi realizado conforme o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Este documento sugere como estudos não clínicos de segurança, dentre outros, o estudo de toxicidade de dose única (aguda). Este teste avalia a toxicidade após exposição à dose única ou fracionada administrada no período de 24 horas (BRASIL, 2013e)

Machos e fêmeas (n=6) de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), foram tratados com 2000 mg/kg do EHT via oral (v.o.) e aos grupos controles, machos e fêmeas (n=6), foram administrados apenas o veículo empregado na dissolução do extrato conforme descrito no item 3.1.3.3 e mantidos em observação por um período máximo de 14 dias.

Os animais foram observados cuidadosamente para identificar número de mortes e sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; 4 horas; 24 horas e diariamente durante 14 dias. Durante estes intervalos de tempo, analisou-se a ocorrência de alterações no sistema nervoso central como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonias, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza, levantar, assim como alterações no sistema nervoso autônomo como diarreia, constipação, defecação, micção, tônus muscular, entre outros. A observação desses parâmetros comportamentais foi realizada seguindo o protocolo descrito por Almeida e colaboradores (1999).

3.2.1.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

No décimo quarto dia os animais, em jejum prévio de seis horas, foram anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos) e o sangue, obtido do *sinus orbital* de cada camundongo, foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur heparinizada, e em seguida transferido para dois tubos do tipo Eppendorff. Uma alíquota de sangue foi destinada para avaliação de parâmetros hematológicos (eritrograma e leucograma) e outra foi centrifugada por 10 minutos a 3500 rpm, para obtenção do soro, destinado a análises bioquímicas: ureia, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicerídeo, proteínas totais, albumina, glicose e transaminases (aspartato aminotransferase – AST e alanina aminotransferase-ALT) (PITA, 2010). Para as análises bioquímicas e hematológicas foram utilizados Kits específicos para o equipamento bioquímico automático Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System) e para o equipamento hematológico celular automático *Animal Blood Counter* (Vet), respectivamente. Os esfregaços sanguíneos foram corados manualmente com o corante panótico (RenyLab) e analisados em microscópio óptico, para confirmação e controle da contagem de células.

3.2.1.1.2 Avaliação da evolução ponderal e do consumo de água e ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos após o tratamento com o EHT os animais foram pesados diariamente, bem como, avaliados os consumos de água e ração. O ganho de peso para cada animal do grupo foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ ganho de peso} = \left(\frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) - 1 \times 100$$

3.2.1.1.3 Avaliação dos índices de peso dos órgãos

Após a eutanásia dos animais por overdose de anestésico tiopental sódico (Thiopentax®, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos), os órgãos: timo, coração, baço, fígado e rins foram extirpados e pesados. Os índices de peso dos órgãos foram calculados seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{Índice} = \frac{\text{Peso do órgão (mg)}}{\text{Peso do animal (g)}}$$

3.2.2 Estudos da atividade *in vivo* do extrato de *Herissantia tiubae*

3.2.2.1 Edema de pata induzido por carragenina

O modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina baseia-se no fato de que a administração de agentes flogísticos (por exemplo, carragenina) na pata de um animal produz uma reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, reprodutível e facilmente mensurável. Essa metodologia permite observar a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória da amostra teste a partir de um estímulo inflamatório local, bem como avaliar a melhor dose do tratamento a ser empregado nas metodologias seguintes (LEVY, 1969).

Para a realização desse experimento camundongos Swiss fêmeas (n=6), foram distribuídos em grupos conforme o pré-tratamento com diferentes doses do EHT (50, 100 ou 200 mg/kg v.o.) ou droga controle (Indometacina 10 mg/kg-Roche®), além de um grupo controle não tratado. Após o intervalo de 1h da administração dos compostos, foram administrados 20 µL de uma solução de carragenina λ (Sigma-Aldrich®) 2,5 % em PBS na região subplantar da pata posterior esquerda de cada animal e o mesmo volume de PBS na pata direita. O grupo de animais denominado *basal* foi previamente tratado v.o. com solução salina 0,9 % e recebeu injeção de 20 µL de PBS em ambas as patas, servindo como controle da eficácia na indução da inflamação pelo agente flogístico. A formação do edema de pata foi mensurada em milímetro (mm) com o auxílio de um paquímetro digital (GREAT, MT – 04513) nos tempos de 1, 2, 3

e 4, 6 e 24 h pós-estímulo, e os resultados foram registrados como a diferença entre a medida das patas esquerda e direita (LIAO et al., 2013).

3.2.2.2 Avaliação da permeabilidade microvascular

O teste da permeabilidade microvascular baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal (i.p.) de uma solução de ácido acético a 0,6 % provoca reação inflamatória local envolvendo a liberação de mediadores que induzem o aumento da permeabilidade vascular levando ao extravasamento de líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício, que pode ser quantificadas pela utilização de Kits específicos de dosagem de proteínas totais. A metodologia escolhida para este trabalho foi a do biureto, que trata-se de um teste colorimétrico utilizado para diagnóstico *in vitro* de determinação de proteínas totais. O reagente de biureto é uma solução de hidróxido de potássio (KOH) e sulfato de cobre (CuSO_4), associada com tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Este reagente de coloração azul torna-se violeta na presença de proteínas, pois as ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas no meio. O hidróxido de potássio e o tartarato de sódio e potássio não participam da reação, mas proveem um meio alcalino no qual a reação ocorre (HE e ZHANG, 2011; KROHN, 2011).

Para esse experimento, foram utilizados grupos de camundongos (n=6) tratados previamente com indometacina (10 mg/kg, v.o.), Eht (50 ou 100 mg/kg, v.o.) ou solução salina 0,9 % v.o. (grupo basal). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam 100 μL de ácido acético (Reagen) (0,6 %) intraperitonealmente, com exceção do grupo basal que recebeu 100 μL de solução salina 0,9 % utilizando a mesma via de administração, servindo como controle da eficácia na indução da inflamação. Vinte minutos após o desafio com ácido acético os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram seus peritônios lavados com 3 mL de água destilada. Após esse procedimento 50 μL de cada amostra foram transferidas para placas de 96 poços, juntamente com 150 μL do reagente de biureto (Labtest) conforme orientação do fabricante do Kit (Labtest). A placa foi incubada por 10 min em

estufa de 37 °C e a medida do extravasamento vascular foi estimada indiretamente pela intensidade de cor violeta, obtida com a determinação das absorvâncias a 540 nm, utilizando leitor de microplacas (LOH et al., 2013). A exata determinação das proteínas totais foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 4$$

3.2.2.3 Peritonite induzida por carragenina

O modelo de inflamação peritoneal induzida por carragenina permite analisar a migração celular para o sítio inflamatório, bem como a produção e liberação de mediadores da inflamação no fluido peritoneal. Com a finalidade de observar o efeito anti-inflamatório do Eht no processo inflamatório agudo, foi realizado o modelo de inflamação peritoneal.

Camundongos (n=8) foram tratados 1 h antes do estímulo inflamatório, com Eht (50 ou 100 mg/kg), droga controle (Indometacina 10 mg/kg) ou veículo para os grupos basal e controle positivo (carragenina), conforme descrito no item 3.1.3.3. Decorrido o intervalo de 1 h, a peritonite foi induzida pela injeção i.p. de 300 µL de uma suspensão de carragenina 1 % em solução salina 0,9 %. O grupo basal recebeu injeção de 300 µL de solução salina i.p., servindo como controle da eficácia na indução da inflamação. A coleta do lavado peritoneal foi realizada quatro horas após a injeção da carragenina. Os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Os peritônios dos animais foram expostos e 2 mL de PBS gelado foi injetado na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado por 30 segundos e em seguida, realizado a punção do exsudato contendo fluidos e leucócitos (GUERRA et al., 2011).

3.2.2.3.1 Contagem de células total e diferencial do lavado peritoneal

As amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram separados e congelados em freezer a uma temperatura de -20 °C para posteriores dosagens de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6). As células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de PBS gelado, diluídas em solução de Turk na proporção de 1:40 e quantificadas em microscopia óptica, com ajuda da câmara de Neubauer. Já para a contagem diferencial das células, 100 μ L da suspensão de células do lavado peritoneal foram centrifugados em uma citocentrífuga (Citospin - BIO RESEARCH, Washington – USA) a 1500 rpm por 15 minutos para obtenção de lâminas. As células foram coradas com a coloração de May-Grunwald-Giemsa e a contagem diferencial foi realizada no microscópio ótico (NIKON E200, Melville, NY – EUA) com objetiva de imersão (100x), usando o padrão de critérios morfológicos para diferenciar os polimorfonucleares e os mononucleares (SOUSA et al., 2010).

3.2.2.3.2 Análise das subpopulações celulares por citometria de fluxo

A análise das populações celulares presentes no lavado peritoneal também foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo pela marcação com os anticorpos anti-GR-1 (BD Biosciences[®]) para identificar neutrófilos e anti-MAC-3 (BD Biosciences[®]) para identificar macrófagos.

Para isto, $1,5 \times 10^6$ células foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Para impedir ligações inespecíficas, as células foram previamente mantidas na presença de 2 μ L de soro de camundongo diluído (1:100) por 5 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com 1,5 μ L de MAC-3 ou GR-1. Após o período de incubação, as células foram lavadas e suspensas em 300 μ L de PBS para leitura em citômetro de fluxo (BD FACSCaliburTM).

3.2.2.3.3 Análise da viabilidade dos leucócitos do lavado peritoneal

Para realizar o estudo da influência do pré-tratamento com Eht na viabilidade das células presentes no lavado peritoneal, foi utilizado a técnica de detecção com Anexina-V (BD Biosciences[®]), que permite identificar as células apoptóticas com base na exposição do fosfolípido fosfatidilserina. A Anexina-V é uma proteína com alta afinidade pela fosfatidilserina e a exposição destes aminofosfolídeos ocorre quando a célula encontra-se em apoptose ou necrose. O que torna possível a diferenciação entre esses dois processos é a reação entre o iodeto de propídeo (PI) (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A.) e o DNA nuclear, que ocorre com a integridade prejudicada da membrana plasmática.

As células obtidas do lavado peritoneal, como descrito anteriormente, foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspendidas com 100 μ L do tampão de ligação para anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 25mM CaCl₂). Posteriormente, foi adicionado 2,5 μ L de Anexina-V e 10 μ L de iodeto de propídeo (50 μ g/mL) em 5×10^5 células/100 μ L do tampão de ligação. Estas amostras foram incubadas por um período de 15 minutos a temperatura ambiente. No fim da incubação, as células foram lavadas e suspensas em 300 μ L do tampão de ligação, para posterior leitura em citômetro de fluxo (BD FACSCaliburTM).

3.2.2.3.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal

O lavado peritoneal foi centrifugado e os sobrenadantes foram analisados pelo Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. As metodologias utilizadas foram aquelas recomendadas pelo fabricante dos Kits (BD Biosciences[®]).

3.2.3 Estudo da atividade *in vitro* do extrato de *Herissantia tiubae*

3.2.3.1 Cultura contínua de células da linhagem RAW 264.7

Para os estudos *in vitro*, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, previamente obtidos do banco de células do Rio de Janeiro/Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura celular RPMI-1640 sem vermelho de fenol completo (estreptomicina – 10 mg/mL, penicilina – 6 mg/mL, kanamicina – 2 mg/mL) (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®, Grand Island, NY, USA) à 37 °C e 5 % de CO₂. Repiques semanais para a manutenção da cultura celular foram realizados.

3.2.3.1.1 Determinação da viabilidade celular

As células aderentes nas garrafas de cultura celular 75 cm³ (TPP®) foram removidas com auxílio de um rodinho (Biofil®) e a contagem e a viabilidade celular foram avaliadas em câmara de Neubauer (Hemocitômetro L. Optik ATC-111020) com auxílio de solução de azul de Tripán (Merck®). Os macrófagos RAW 264.7 viáveis foram então semeados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços, num total de 2×10^5 células/poço em 200 µL de meio RPMI completo e incubados em estufa (MCO-15A, SANYO) por 4 h (5 % CO₂ a 37 °C) para adesão à placa. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados para remover as células não aderidas. Posteriormente, as células foram tratadas ou não com Eht preparado conforme descrito em 3.1.3.3 em concentrações finais de 6,25; 12,5; 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL e incubadas em estufa úmida (5 % CO₂ a 37 °C) por 24 h (CAI e CAI, 2011).

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT, que se baseia no fato que o brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich®) é reduzido por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente ativas (TIM, 1983). O formazan produzido na reação é proporcional à quantidade de células viáveis, e dada a sua solubilidade em DMSO, é possível mensurar sua produção utilizando-se instrumentos de fotometria. Para isto, após a remoção do sobrenadante, foram adicionados às células em cultura 100 µL de uma solução de MTT diluída (0,5 mg/mL) em meio RPMI sem vermelho de fenol, em volume final de 100 µL/poço; a solução estoque de MTT utilizada para diluição foi de 5 mg/mL em tampão fosfato-

salina (PBS) (Fluka®). As placas foram incubadas em estufa úmida (5 % CO₂ a 37 °C) por 4 h, e ao final do período de incubação, os sobrenadantes foram removidos e as células lisadas com 100 µL de DMSO, solubilizando o formazan precipitado no citoplasma. As absorbâncias foram determinadas após 5 minutos em leitor de microplacas (570 nm), e a produção de formazan foi determinada.

3.2.3.1.2 Determinação da produção de óxido nítrico

Em placas de 96 poços foram cultivadas as células RAW 264.7 a uma concentração de 2×10^5 células/poço na presença de diferentes concentrações do Eht (6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL) e coestimuladas ou não com 1 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich®) + 10 ng/mL de interferon-γ (INF- γ) (BD Biosciences®). Logo após foram incubadas em estufa úmida (5 % CO₂ a 37 °C) por 24 h (KANG et al., 2011; LEE et al., 2012). Em seguida os sobrenadantes foram coletados, sendo uma alíquota utilizada para a determinação da produção de óxido nítrico e a outra alíquota armazenada a -20 °C para posteriores dosagens de citocinas.

A produção de NO foi avaliada *in vitro* pela dosagem do seu produto de degradação mais estável, o nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como reação de Griess (Sigma-Aldrich®) (NATHAN e XIE, 1994). Neste método, o nitrito, quando presente na amostra, reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro (Leitora de microplacas ELISA ELx800, BIOTEK) em comprimento de onda de 540 nm.

3.2.3.1.3 Determinação da produção de citocinas inflamatórias

As concentrações de TNF-α IL-1β e IL-6 nos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos RAW 264.7 foram quantificadas pela técnica de ELISA.

A metodologia a ser utilizada foi aquela recomendada pelo fabricante do Kit (BD Biosciences[®]) (KANG et al., 2011; LEE et al., 2012).

3.2.3.1.4 Detecção da L-selectina

A análise da expressão da L-selectina nos macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo, por meio da marcação com o anticorpo primário anti-L-selectina para identificar tal molécula de adesão na membrana da célula e o anticorpo secundário de cabra anti-IgG conjugado com um fluorcromo (FITC) que identifica o anticorpo primário ligado na L-selectina.

Em placas de 24 poços foram cultivadas células RAW 264.7 a uma concentração de 1×10^6 células/poço na presença de diferentes concentrações do Eht (6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), estimuladas ou não com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (Sigma-Aldrich[®]) e incubadas em estufa úmida (5 % CO_2 a 37 °C) por 24 h. Em seguida os sobrenadantes foram desprezados e em cada poço foram adicionados 500 μL de PBS (Fluka[®]) gelado e com auxílio do rodinho (Biofil[®]) as células foram soltas e transferidas para tubos de citômetro. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 5 μL do anticorpo primário anti-L-selectina (BD Biosciences[®]) nos tubos contendo as células e por 30 minutos foram mantidas no abrigo da luz e a 4 °C. Foram adicionados 500 μL de PBS gelado nos tubos e as células foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado como descrito acima. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C ao abrigo da luz com 5 μL do anticorpo secundário anti-IgG conjugado com FITC (Millipore[®]). No fim da incubação, as células foram lavadas e suspensas em 300 μL de PBS para leitura em citômetro de fluxo (BD FACSCaliburTM) (TCHERNYCHEV et al., 2003).

3.3 Análises estatísticas

Os resultados obtidos neste trabalho foram expressos como média \pm erro padrão da média, representam pelo menos dois experimentos

independentes e analisados estatisticamente empregando-se o Test t *Student*, ANOVA *one-way* seguido de Tukey ou Teste exato de Fisher, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

Para os experimentos realizados com citometria de fluxo, foi utilizado o software WinMDI (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*, versão 2.9, disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>) na elaboração dos *dot plots* apresentados e cálculo das populações celulares.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio preliminares

4.1.1 Ensaio toxicológico pré-clínico agudo

Após o tratamento agudo com a dose de 2000 mg/kg do Eht não foi evidenciada morte ou alterações comportamentais nos camundongos machos e fêmeas avaliados.

4.1.1.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

A análise toxicológica do efeito do Eht inclui a avaliação de alterações bioquímicas e hematológicas. Não houve mudança significativa nos parâmetros renais (ureia, creatinina e ácido úrico) e hepáticos (atividade enzimática das transaminases ALT e AST) nos animais tratados em comparação com os animais controle. Também não foram observadas mudanças significativas em outros parâmetros bioquímicos, tais como: proteínas totais, colesterol total, triglicerídeo, glicose e albumina (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos Swiss.

Parâmetros Bioquímicos (Unidade)	Controle macho	EHt macho	Controle fêmea	EHt fêmea
Glicose (mg/dL)	123,00 ± 18,61	87,17±7,99	149,00±6,37	150,50±16,76
Ureia (mg/dL)	59,18±4,423	50,88±6,22	54,10±3,78	44,42±1,75
Creatinina (mg/dL)	0,46±0,01	0,50±0,07	0,45±0,08	0,37±0,01
Colesterol Total(mg/dL)	88,02±4,86	98,48±1,06	83,20±3,05	64,84±16,47
Triglicerídeos (mg/dL)	82,00±10,45	97,4 ±10,25	64,50±5,58	55,00±16,02
Ácido úrico (mg/dL)	3,43±0,54	2,45±0,65	2,08±0,19	2,00±0,27
AST^a (U/l)	175,40±19,56	139,0±14,52	184,90±14,16	195,00±7,82
ALT^b (U/l)	79,66±2,44	115,1 ± 30,80	103,3 ± 12,25	84,12±8,53
Proteínas totais (g/dL)	5,04±0,30	4,99±0,18	4,99±0,24	5,22±0,21
Albumina (g/dL)	2,53±0,10	2,31±0,19	2,79±0,08	2,52±0,18

Camundongos Swiss machos e fêmeas (n=6/grupo) pré-tratados com 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* (EHt) foram observados durante 14 dias e ao final do experimento o sangue foi retirado e realizado as dosagens bioquímicas e comparado com animais que receberam apenas o veículo. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância teste t.

a = Aspartato aminotransferase;

b = Alanina aminotransferase.

Em relação à avaliação hematológica, não houve alterações significativas nos parâmetros Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) entre os grupos tratados e controle. Também não foi observado mudança significativa nos parâmetros do eritrograma (número total de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito) nem no leucograma (número total de leucócitos e sua contagem diferencial) (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* nos parâmetros hematológico de sangue periférico de camundongos Swiss.

Parâmetros Hematológicos (Unidade)	Controle Macho	EHt Macho	Controle Fêmea	EHt Fêmea
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,28±0,78	8,90±0,43	8,15±0,32	8,77±0,14
Hemoglobina (g/dL)	13,77±0,85	13,98±0,23	12,82±0,45	13,67±0,24
Hematócrito (%)	43,30±2,82	44,54±1,48	39,56±1,72	43,38±0,49
VCM^a (fm³)	47,00±0,96	48,80±2,31	48,40±0,40	49,80±0,58
HCM^b (pg)	14,98±0,43	15,96±0,38	15,78±0,14	15,58±0,15
CHCM^c (g/dL)	31,85±0,35	31,72±0,35	32,30±0,53	31,22±0,19
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	3,73±0,32	3,76±0,38	4,15±0,93	4,28±0,69
Bastonetes (%)	-	-	-	-
Neutrófilos (%)	35,67±6,87	21,60±6,95	18,40±4,69	30,00±1,78
Basófilos (%)	-	-	-	-
Eosinófilos (%)	-	-	-	-
Linfócitos (%)	58,67±6,08	73,00±6,77	74,60±4,93	65,33±1,33
Monócitos (%)	5,66±1,80	4,20±0,73	6,80±1,39	7,16±1,56

Camundongos Swiss machos e fêmeas (n=6/grupo) pré-tratados com 200 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* (EHt) foram observados durante 14 dias e ao final do experimento o sangue foi retirado e realizado o exame hematológico e comparado com animais que receberam apenas o veículo. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância teste t.

a = Volume Corpuscular Médio;

b = Hemoglobina Corpuscular Média;

c = Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média.

4.1.1.2 Avaliação da evolução ponderal e consumo de água e ração

Na Tabela 3 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, avaliados durante os 14 dias de experimento, bem como a evolução ponderal dos animais. De acordo com os resultados obtidos observou-se que o Eht não induziu alterações no peso do animal nem no consumo de ração quando comparados com seus respectivos grupos controles. No entanto, observou-se um aumento significativo ($p < 0,01$) no consumo de água no grupo fêmea tratado em comparação com seu grupo controle.

Tabela 3: Consumo médio de água e ração e avaliação ponderal por grupo de camundongos Swiss tratados com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae*.

Grupos Parâmetros	Controle macho	Eht macho	Controle fêmea	Eht fêmea
H₂O (mL)	67,50±3,89	59,29±3,05	40,00±4,41	52,29±2,56**
Ração (g)	42,42±1,87	38,20±1,41	36,06±1,32	39,90±1,19
Peso inicial (g)	27,35 ± 0,95	27,72 ± 1,06	25,70 ± 0,41	25,45 ± 0,22
Peso final (g)	34,22 ± 1,00	34,60 ± 0,90	31,43 ± 0,39	30,47 ± 0,70
Ganho de peso (%)	25,39±2,93	27,84±5,30	22,34±1,91	19,84±2,28

Camundongos Swiss machos e fêmeas (n=6/grupo) pré-tratados com 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* (Eht) foram acompanhados durante 14 dias; o consumo médio de água e ração, bem como o peso médio inicial e final, foram comparados com animais que receberam apenas o veículo. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. Os asteriscos indicam a significância após análise de variância teste t. ** $p < 0,01$ quando comparados aos respectivos grupos controle.

4.1.1.3 Avaliação do índice de peso dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos e pesados. Não houve alterações significantes nos índices de peso do coração, fígado, rins, baço e timo entre os grupos tratados, quando comparados ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* sobre os principais órgãos dos camundongos Swiss.

Índices de peso(mg/g)	Controle macho	Eht macho	Controle fêmea	Eht fêmea
Coração	3,93±0,21	4,00±0,3885	4,13±0,40	4,08±0,39
Fígado	61,27±9,09	56,89±2,493	56,53±4,80	56,25±4,36
Rins	12,66±2,98	11,86±1,176	11,09±0,53	10,70±0,78
Baço	5,592±0,52	6,45± 1,176	7,56± 1,32	6,97± 1,51
Timo	2,945±0,84	2,84±0,5437	3,33±0,51	3,89±0,66

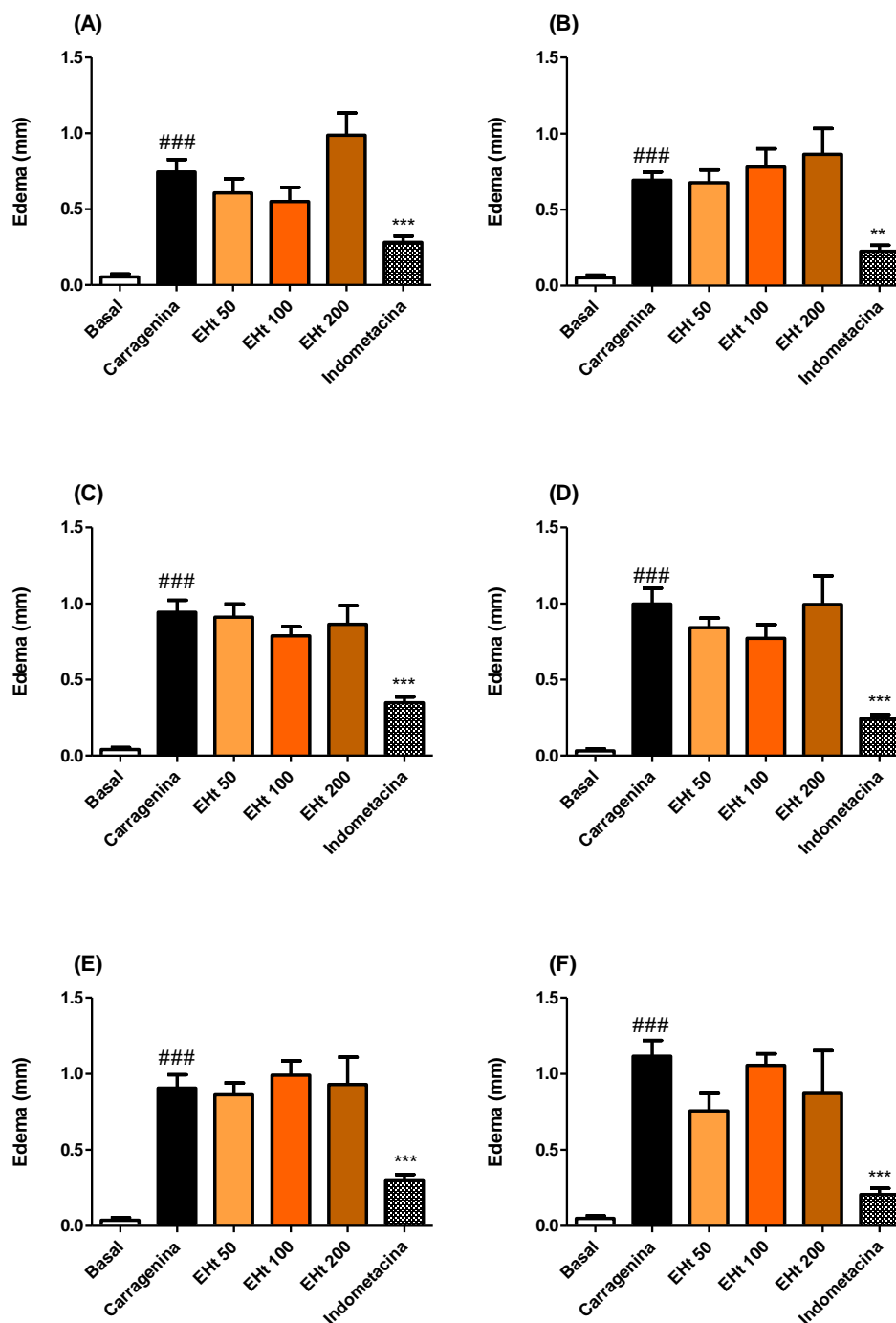
Camundongos Swiss machos e fêmeas (n=6/grupo) pré-tratados com 2000mg/kg extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* (Eht) foram observados durante 14 dias e o peso médio dos órgãos ao final do período foi determinado e comparado com animais que receberam apenas o veículo. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram submetidos à análise de variância teste t.

4.2 Estudos da atividade *in vivo* do extrato de *Herissantia tiubae*

4.2.1 Edema de pata induzido por carragenina

O gráfico 1 demonstra que as doses do Eht testadas (50, 100 ou 200 mg/kg) não foram capazes de inibir significativamente a formação do edema de pata nos tempos de 1h (A), 2h (B), 3h (C), 4h (D), 6h (E) e 24h (F) após a injeção da carragenina, quando comparados ao grupo controle positivo (carragenina).

Gráfico 1: Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* no edema de pata induzido por carragenina.

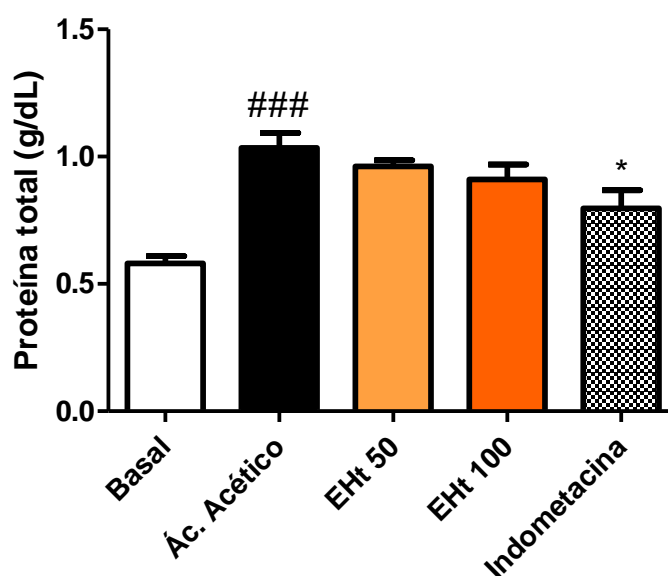


Camundongos Swiss (n=6) foram pré-tratados com extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* (Eht) (50, 100 ou 200 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9 %. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção (20 μ L) de carragenina 2,5 % e PBS nas patas esquerdas e direitas, respectivamente. O grupo basal recebeu injeção (20 μ L) de PBS em ambas as patas. Os gráficos representam a média \pm e.p.m. da diferença entre as patas, medida em 1 h (A), 2 h (B), 3 h (C), 4 h (D), 6 h (E) e 24 h (F) após a indução do edema, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Tukey. ### indica $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle basal. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com grupo controle positivo (carragenina).

4.2.2 Permeabilidade microvascular

O gráfico 2 representa as concentrações de proteínas totais (g/dL) no lavado peritoneal dos animais. Observou-se que a injeção i.p. de ácido acético aumentou significativamente ($p < 0,001$) o extravasamento de proteínas para a cavidade abdominal quando comparado ao grupo basal, e que no grupo tratado com Indometacina houve redução significativa ($p < 0,05$) de proteínas no lavado, quando comparado com o controle positivo (ácido acético). Já o grupo tratado com Eht (50 ou 100 mg/kg) não reduziu a quantidade de proteínas no lavado peritoneal.

Gráfico 2: Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* na permeabilidade microvascular induzida pelo ácido acético.



Camundongos Swiss ($n=6$) foram pré-tratados oralmente com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50 ou 100 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo 1 h antes de uma injeção intraperitoneal de 100 μ L de ácido acético (0,6 % em salina). O grupo basal recebeu injeção i.p. (100 μ L) de salina 0,9 %. O efeito foi avaliado pelo extravasamento de proteínas para a cavidade peritoneal dos camundongos e depois quantificada pelo reagente de biureto, 20 minutos após o desafio com ácido acético. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo basal e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle positivo (Ác. Acético). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Tukey.

4.2.3 Peritonite induzida por carragenina

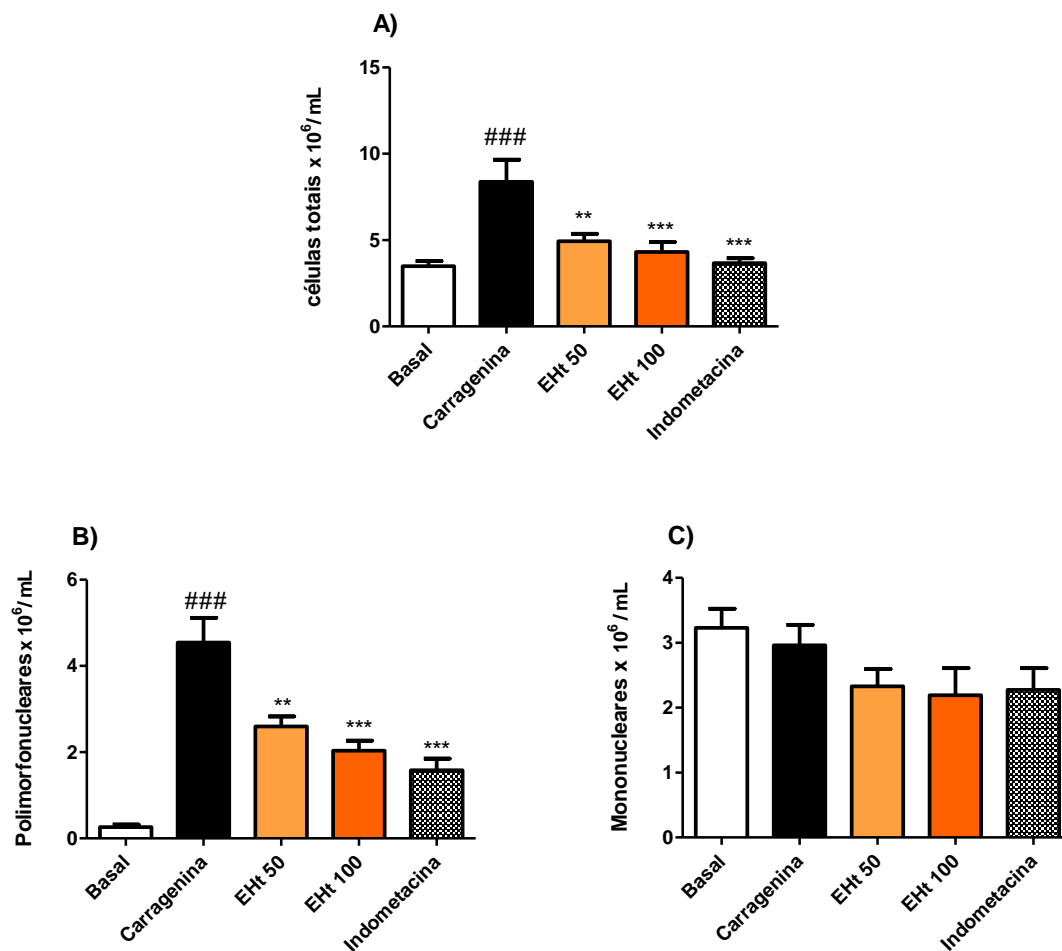
4.2.3.1 Contagem de células total e diferencial do lavado peritoneal

Para avaliar parâmetros como a migração de células e a liberação de citocinas no sítio inflamatório, utilizou-se o modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. Quatro horas após o estímulo inflamatório, o lavado peritoneal colhido foi submetido à contagem de células totais e contagem diferencial, fazendo distinções entre polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) em microscopia óptica. Os resultados estão demonstrados no gráfico 3.

Observou-se aumento significativo ($p < 0,001$) na migração celular total, bem como de PMN para a cavidade abdominal dos camundongos do grupo controle positivo (carragenina) quando comparado ao grupo basal (Gráfico 3 A e B). A migração celular total e de PMN foi significativamente menor ($p < 0,001$) em camundongos tratados com indometacina ou Eht na dose de 100mg/kg e com Eht na dose de 50 mg/kg ($p < 0,01$) quando comparados ao grupo controle positivo (Gráfico 3 A e B).

Entretanto, os tratamentos não foram capazes de alterar migração celular de MN (Gráfico 3 C).

Gráfico 3: Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* na celularidade e contagem diferencial do lavado peritoneal.



Camundongos Swiss (n=8) foram pré-tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50 ou 100 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), ou solução salina 0,9 % para o grupo basal e carragenina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados, indometacina e controle positivo (carragenina) receberam injeção i.p. (300 μ L) de carragenina (1 % em solução salina 0,9 %). O grupo basal recebeu injeção i.p. (300 μ L) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação da celularidade total (A) e diferencial, onde foi realizado a diferenciação entre polimorfonucleares (PMN) (B) e mononucleares (MN) (C). O gráfico representa a média \pm e.p.m. da contagem total e diferencial das células em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Tukey. ### indica $p < 0,001$ quando comparado ao grupo basal. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (carragenina).

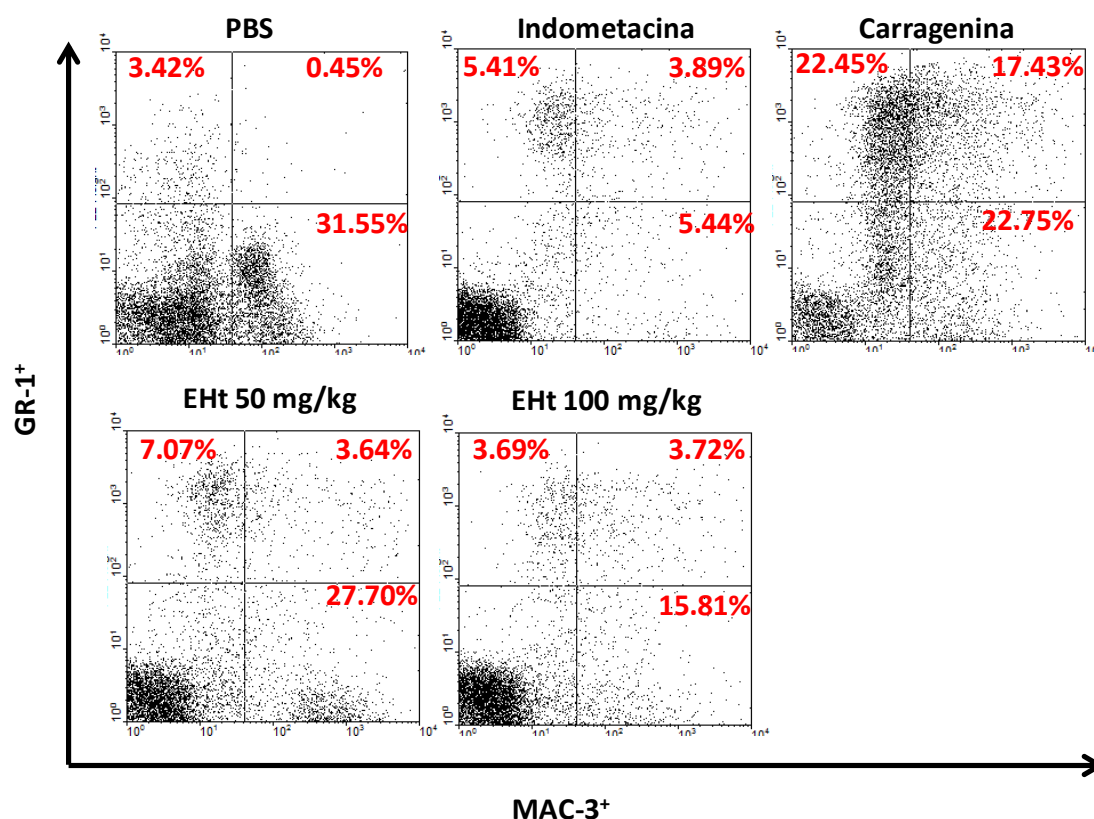
4.2.3.2 Análise das populações celulares do lavado peritoneal por citometria de fluxo

O resultado anterior demonstra que o Eht foi capaz de reduzir o número de células PMN, em microscopia óptica, no modelo de peritonite induzida por carragenina. As células obtidas no lavado peritoneal também foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando-se as sondas anti-GR-1 para identificar os neutrófilos, anti-MAC-3 para identificar os macrófagos. As células marcadas com anti-GR-1 e anti-MAC-3 representam os monócitos.

O gráfico 4 representa *dot plots* com os resultados obtidos por citometria de fluxo. No quadrante superior esquerdo e no quadrante superior direito dos *dot plots* estão representados as subpopulação de neutrófilos (GR-1⁺) e monócitos (GR-1⁺ e MAC-3⁺), respectivamente; mais uma vez, observa-se o aumento do percentual destas células no grupo carragenina quando comparados aos grupos basal (PBS) e controle padrão (indometacina). Além disso, os pré-tratamentos com Eht nas doses de 50 ou 100 mg/kg foram capazes de reduzir a migração de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamatório.

Analisando a subpopulação de macrófagos representada no quadrante inferior direito (MAC-3⁺), nota-se que houve grande variação no percentual destas células no grupo carragenina e nos pré-tratamentos com Eht nas doses de 50 ou 100 mg/kg quando comparados com o grupo PBS. Entretanto, o grupo indometacina foi capaz de reduzir a quantidade de macrófagos no sítio inflamatório.

Gráfico 4: Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* nas subpopulações celulares presentes no lavado peritoneal.

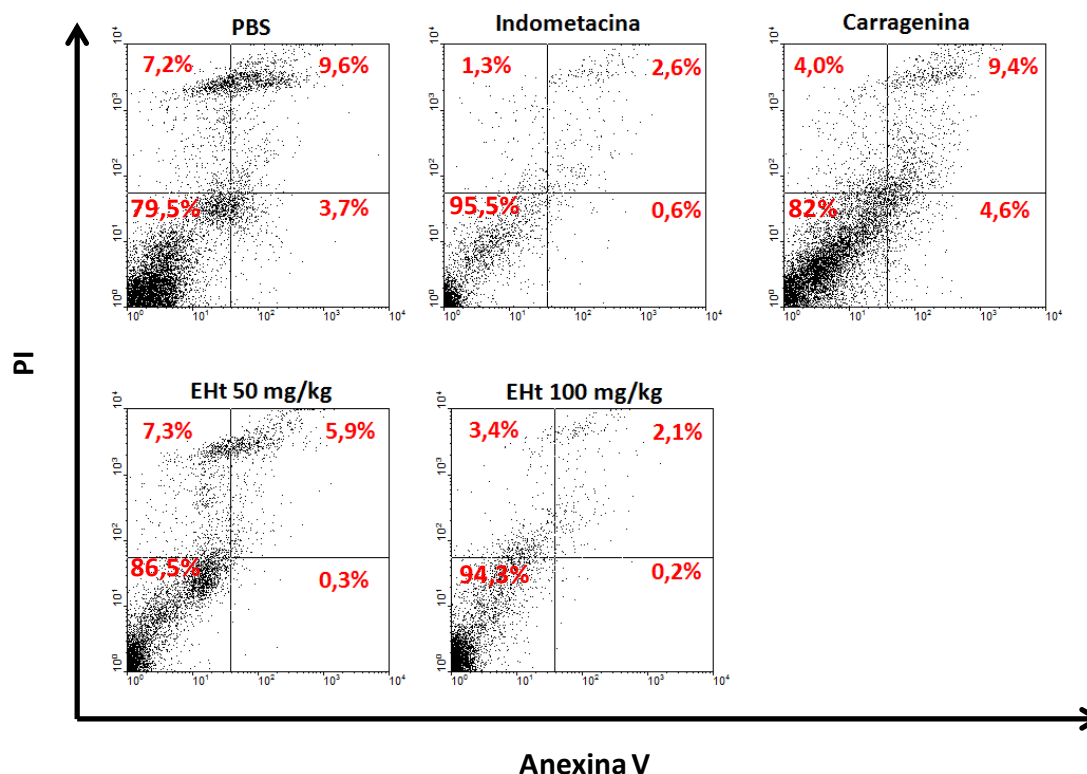


Camundongos Swiss foram pré-tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (EHt) (50 ou 100 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), ou solução salina 0,9 % para o grupo basal e carragenina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados, indometacina e controle positivo (carragenina) receberam injeção i.p. (300 μ L) de carragenina (1 % em solução salina 0,9 %). O grupo basal recebeu injeção i.p. (300 μ L) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para análise das subpopulações celulares por citometria de fluxo. Os *dot plots* representam 10000 eventos cada; a abscissa corresponde à intensidade de fluorescência das células MAC-3+ e a ordenada à fluorescência emitida pelas células GR-1+. Macrófagos estão representados no quadrante inferior direito (MAC-3+); neutrófilos estão representados no quadrante superior esquerdo (GR-1+), e monócitos estão representados no gráfico no quadrante superior direito (MAC-3+/GR-1+). Os percentuais indicados referem-se aos eventos contados em cada quadrante. Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI 2.9. São representativos de 2 análises independentes.

4.2.3.3 Análise da viabilidade dos leucócitos do lavado peritoneal

Os *dot plots* demonstram, no quadrante inferior esquerdo, que fisiologicamente existe 79,5 % de células viáveis presentes na cavidade peritoneal e 20,5 % estão em morte por necrose (quadrante superior esquerdo), por apoptose tardia (quadrante superior direito) e por apoptose inicial (quadrante inferior direito); e que o tratamento com Eht nas doses de 50 ou 100 mg/kg, bem como os grupos: droga padrão (indometacina) e carragenina não interferiram na porcentagem de células viáveis que foram: 86,5 %, 94,3 %, 95,5 % e 82 %, respectivamente (Gráfico 5).

Gráfico 5: Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* na viabilidade dos leucócitos do lavado peritoneal.



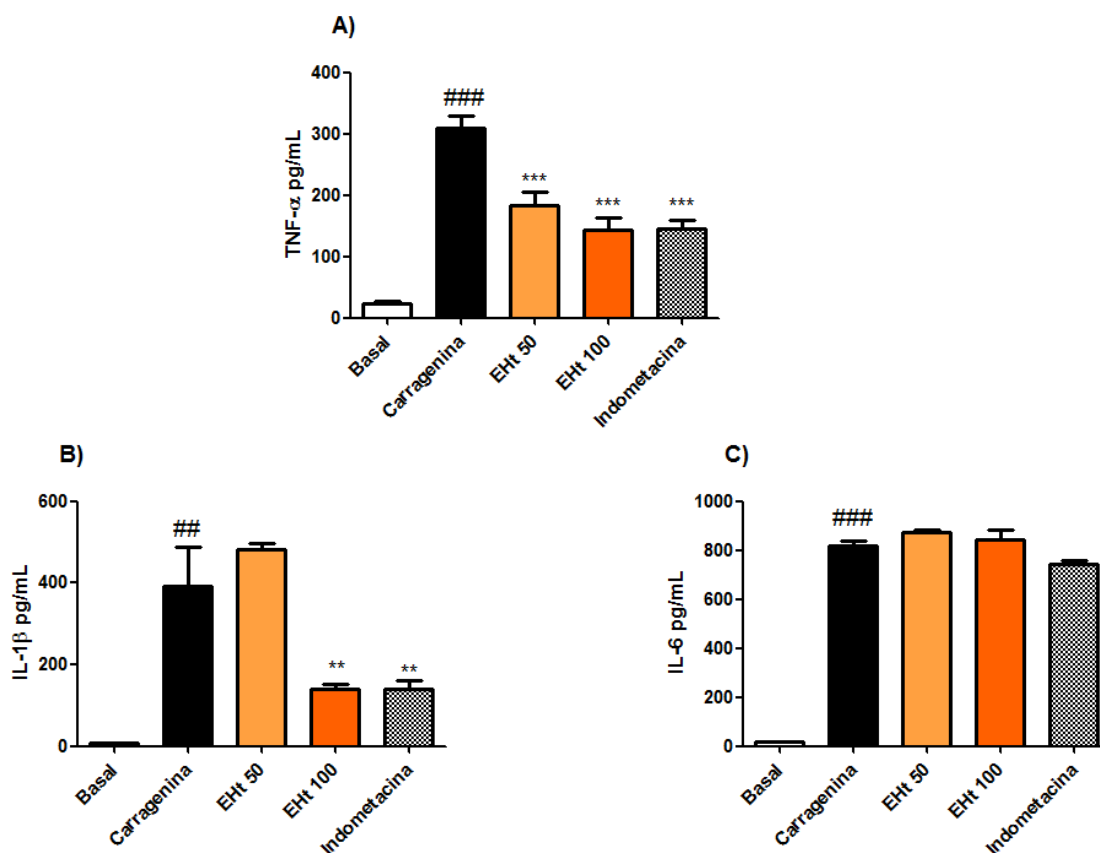
Camundongos Swiss foram pré-tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50 ou 100 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), ou solução salina 0,9 % para o grupo basal e carragenina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados, indometacina e controle positivo (carragenina) receberam injeção i.p. (300 μ L) de carragenina (1 % em solução salina 0,9 %). O grupo basal recebeu injeção i.p. (300 μ L) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação da viabilidade dos leucócitos via citometria de fluxo. As células obtidas do lavado peritoneal foram marcadas com anexina V e iodeto de propídeo para avaliar as células em apoptose e necrose respectivamente. Os números representam a porcentagem de células em apoptose inicial (Anexina V⁺), apoptose tardia (Anexina V⁺ e PI⁺) e necrose (PI⁺). Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI. São representativos de 2 análises independentes.

4.2.3.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal

Após a centrifugação do lavado peritoneal para as análises do conteúdo celular, os sobrenadantes coletados foram analisados quanto a concentração de citocinas características do processo inflamatório, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Tanto o Eht (50 ou 100 mg/kg) quanto a Indometacina reduziram significativamente ($p < 0,001$) os níveis de TNF- α , quando comparado ao grupo controle positivo (carragenina) (Gráfico 6 A). Todavia, apenas o Eht na dose de 100 mg/kg e a Indometacina foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,01$) a quantidade de IL-1 β do lavado peritoneal (Gráfico 6 B). Entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir a produção de IL-6 do fluido peritoneal (Gráfico 6 C).

Gráfico 6: Efeito do pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* nos níveis de citocinas do lavado peritoneal.



Camundongos Swiss foram pré-tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (EHT) (50 ou 100 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), ou solução salina 0,9 % para o grupo basal e carragenina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados, indometacina e controle positivo (carragenina) receberam injeção i.p. (300 μ L) de carragenina (1 % em solução salina 0,9 %). O grupo basal recebeu injeção i.p. (300 μ L) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação dos níveis de TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C). O gráfico representa a média \pm e.p.m. dos níveis de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Tukey. ### indica $p < 0,001$ e ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo basal. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo controle positivo (carragenina).

4.3 Estudos da atividade *in vitro* do extrato de *Herissantia tiubae*

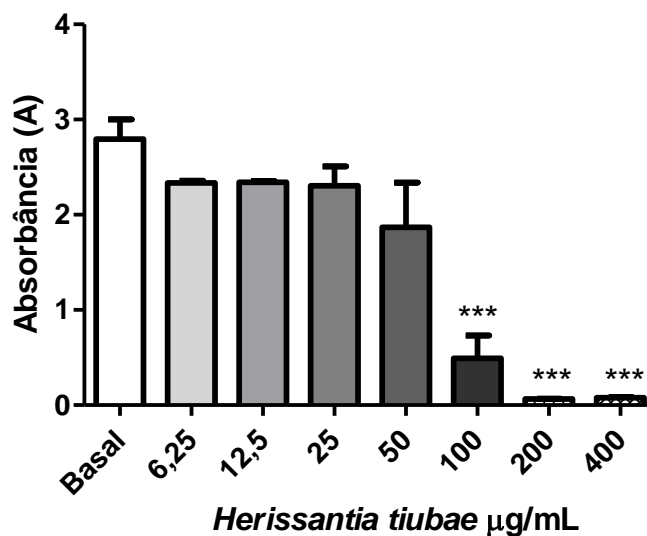
Uma vez que não há estudos anteriores que descrevam a possível toxicidade do Eht em cultura de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para determinar as concentrações ideais do Eht a serem empregadas nos ensaios para determinar a presença de do óxido nítrico, citocinas e molécula de adesão L-selectina nos macrófagos.

4.3.1 Cultura contínua de células da linhagem RAW 264.7

4.3.1.1 Determinação da viabilidade celular

As concentrações de 6,25 a 50 µg/mL do Eht não reduziram significativamente a capacidade metabólica dos macrófagos, quando comparados com o controle. Entretanto, as concentrações de 100 a 400 µg/mL reduziram significativamente ($p < 0,001$) a conversão do MTT a formazan, em células da linhagem RAW 264.7 indicando diminuição na capacidade metabólica dos macrófagos (Gráfico 7).

Gráfico 7: Análise da viabilidade celular do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* em macrófagos da linhagem RAW 264.7.



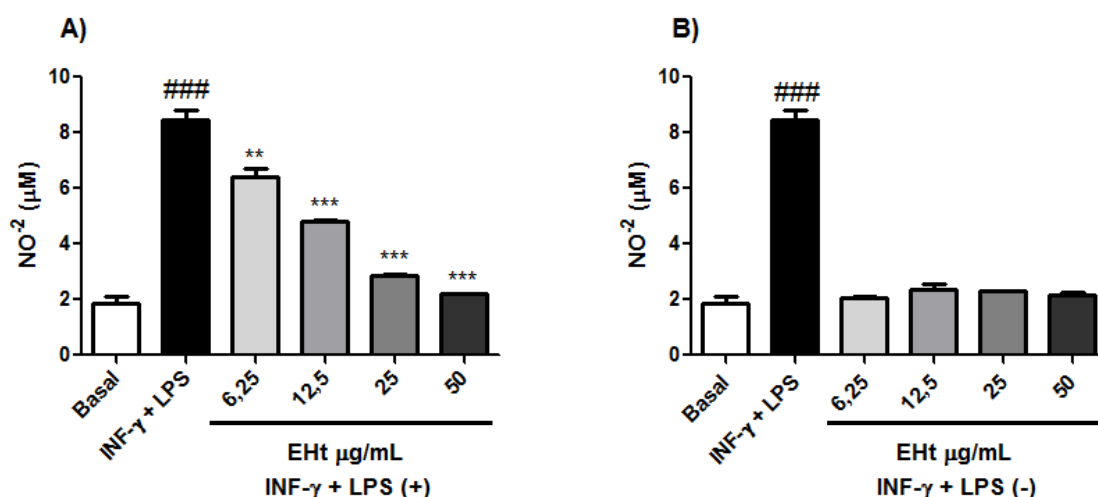
Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (2×10^5 células/poço) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF, tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50 ou 100 mg/kg) (400, 200, 100, 50, 25; 12,5 ou 6,25 µg/mL) e incubados por 24 h. Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido e as células incubadas em meio completo com MTT (0,5 mg/mL) por 4 h. Ao final, as células foram lisadas com DMSO e o formazan contido no citoplasma solubilizado. O gráfico representa a média \pm e.p.m. das densidades ópticas do lisado celular em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *oneway*, seguida de pós-teste de Tukey.

*** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

4.3.1.2 Determinação da produção de óxido nítrico

As concentrações de 6,25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ do Eht foram empregadas no tratamento das células para a determinação indireta do NO nos sobrenadantes da cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7. No gráfico 8 observa-se que a exposição das células ao Eht por 24h não induziu a produção de NO (Gráfico 8 B). Entretanto, quando os macrófagos foram coestimulados com LPS + INF- γ , ocorreu aumento significativo da produção de NO ($p < 0,001$) (Gráfico 8 A) e o Eht (6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) a concentração deste mediador no sobrenadante da cultura celular.

Gráfico 8: Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* na produção de NO em macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados ou não com LPS + INF- γ .



Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (2×10^5 células/poço) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF, tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50, 25, 12,5 ou 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e coestimulados ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) de *E. coli* + INF- γ (10 ng/mL). Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido para dosagem do NO pelo método de Griess. O gráfico representa a média \pm e.p.m. das concentrações de nitrito em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Tukey.

indica $p < 0,001$ quando comparados os grupos controle e controle LPS + INF- γ .

** $p < 0,01$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle LPS + INF- γ .

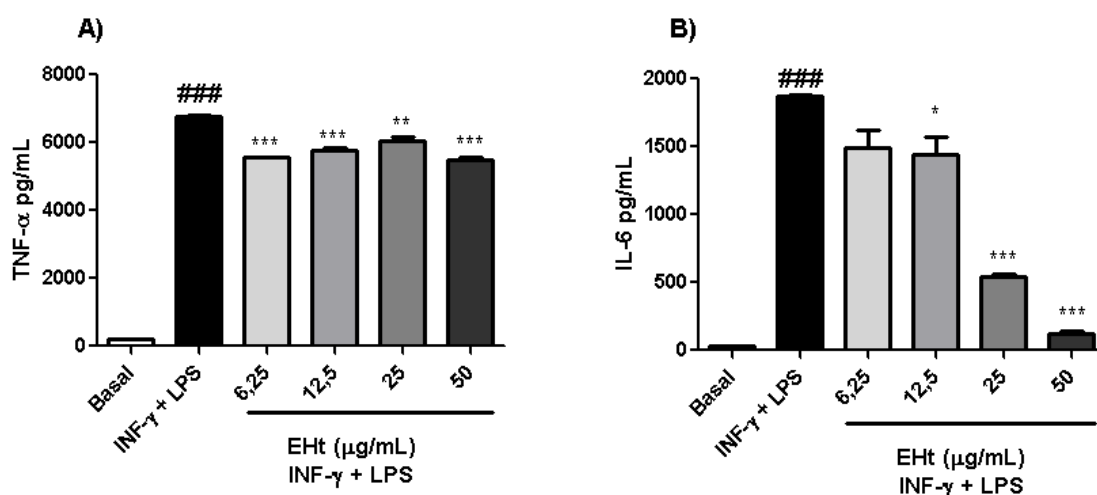
*** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle LPS + INF- γ .

4.3.1.3 Determinação da produção de citocinas inflamatórias

A exposição dos macrófagos ao LPS + INF- γ (controle positivo) foi capaz de induzir a produção significativa ($p < 0,001$) de TNF- α (Gráfico 9 A) e IL-6 (Gráfico 9 B) quando comparados com o grupo basal (controle negativo).

O tratamento de macrófagos, coestimulados com LPS + INF- γ e tratados com Eht foi capaz de inibir a produção de IL-6 e TNF- α de forma significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) (Gráfico 9 A e B).

Gráfico 9: Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* na produção de citocinas em macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados com LPS + INF- γ .



Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (2×10^5 células/poço) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF, tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50, 25, 12,5 ou 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e coestimulados ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) de *E. coli* + INF- γ (10 ng/mL). Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido para determinação dos níveis de TNF- α (A), e IL-6 (B). O gráfico representa a média \pm e.p.m. dos níveis de citocinas no sobrenadante da cultura em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida de pós-teste de Tukey.

indica $p < 0,001$ quando comparado o grupo controle positivo (LPS+INF- γ) com o controle negativo.

* $p < 0,05$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle positivo (LPS+INF- γ).

** $p < 0,01$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle positivo (LPS+INF- γ).

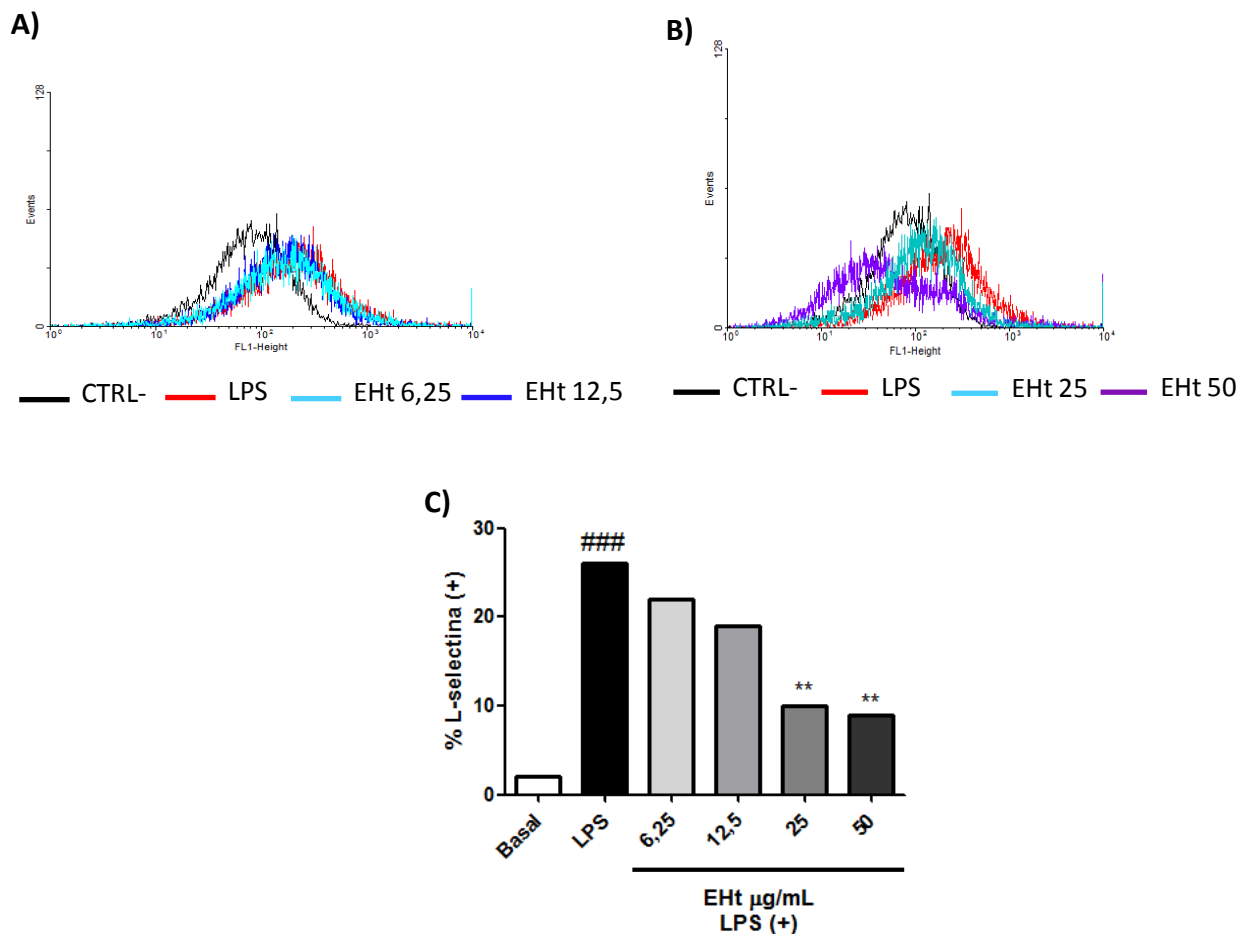
*** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle positivo (LPS+INF- γ).

4.3.1.4 Detecção da L-selectina

A exposição dos macrófagos ao LPS por 24 h foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,001$) a expressão/produção de L-selectina quando comparados com as células controles (macrófagos não estimulados com LPS). O tratamento com Eht (6,25 ou 12,5 $\mu\text{g/mL}$) não foi capaz de diminuir a expressão da L-selectina nos macrófagos (Gráfico 10 A e C).

Entretanto, as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do Eht foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,01$) a expressão dessa molécula de adesão nas células em estudo quando comparados ao grupo controle positivo (macrófagos estimulados com LPS) (Gráfico 10 B e C).

Gráfico 10: Efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* na expressão da L-selectina em macrófagos da linhagem RAW 264.7 ativados com LPS.



Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (1×10^6 células/poço) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF, tratados com extrato de *Herissantia tiubae* (Eht) (50, 25, 12,5 ou 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e estimulados ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) de *E. coli*. Após 24 h de incubação, as células foram marcadas com anti-L-selectina, lavadas e marcadas com anticorpo secundário Ig-G para detecção da L-selectina na membrana dos macrófagos via citometria de fluxo (A e B). Os dados foram analisados utilizando o programa WinMDI. O gráfico representa a porcentagem da expressão de L-selectina em função dos tratamentos (C). Os dados foram submetidos ao teste exato de Fisher.

indica $p < 0,0001$ quando comparados os grupos controle e controle LPS.

** $p < 0,01$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle LPS.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou estudar a ação do extrato hidroalcolico das partes aéreas de *Herissantia tiubae* (EHt) na resposta inflamatória aguda, bem como avaliar sua toxicidade.

O aumento no número de usuários que fazem uso de plantas medicinais tem levantado preocupações da comunidade científica sobre a toxicidade e efeitos prejudiciais das plantas (SAAD et al., 2006). O uso popular indiscriminado de *H. tiubae*, sem considerar a possível toxicidade ou eficácia, pode causar sérios riscos à saúde. Em virtude da ausência de informações acerca da toxicidade pré-clínica dessa planta, foi realizada uma avaliação toxicológica preliminar para verificar o seu efeito na mortalidade de animais, verificar alterações comportamentais, avaliar o potencial tóxico em órgãos específicos, bem como, alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos nos animais decorrentes do tratamento.

Após o tratamento oral agudo com a dose de 2000 mg/kg do EHt a qual representa a dose mais provável de produzir morte em animais (OECD 423, 2001) não foi evidenciada morte, o que caracteriza baixa toxicidade do extrato e uma DL50 acima de 2000 mg/kg. De acordo com o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos da ANVISA (2013), os estudos para a determinação da DL50 (dose que mata 50 % dos animais) não são necessários, porém podem ser utilizados métodos alternativos para a sua estimativa envolvendo um menor número de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD. Também não foram observadas alterações comportamentais nos camundongos machos e fêmeas avaliados. O valor acima de 2000 mg/kg da DL50 do EHt confirma a sua baixa toxicidade aguda, indicando que o extrato pode ser administrado com elevado grau de segurança.

Esses resultados corroboram com a literatura, uma vez que plantas da família Malvaceae apresentaram uma DL50 acima de 2 g/kg, nenhuma morte ou alteração comportamental. Como exemplos, o extrato de *Sida rhombifolia* em doses orais únicas de 4, 8, 12 e 16 g/kg em ratos, no ensaio de toxicidade aguda, não demonstrou mortalidade ou alteração comportamental (ASSAM et al., 2010); bem como os valores das DL50 dos extratos acetato de etila de *Sida*

acuta Burn f. e *Sida cordifolia* L. foram de 3,2 g/kg e 3,4 g/kg, respectivamente (KONATÉ et al., 2012); já o extrato aquoso de *Sida cordifolia* demonstrou uma DL50 acima de 3 g/Kg (FRANZOTTI et al., 2000). Outro estudo de toxicidade oral aguda com o extrato etanólico da casca de *Thespesia populnea* mostrou que não houve mortalidade inclusive na maior dose de 2000 mg/kg (VASUDEVAN et al., 2007), confirmando baixa toxicidade aguda de plantas pertencentes a família Malvaceae. Em adição, Lima e colaboradores (2009) avaliaram o extrato metanólico das partes aéreas de *Herissantia crispa* e demonstraram que o extrato (5000 mg/kg, v.o. ou 2000 mg/kg i.p.) não alterou os parâmetros comportamentais, bem como não causou mortes nos animais. Esses dados, portanto, confirmam a baixa toxicidade do gênero *Herissantia* spp.

Nas células são encontradas atividades de inúmeras enzimas. Isso acontece devido ao equilíbrio entre a síntese e a degradação das mesmas; entretanto, das muitas enzimas existentes, há pequenas quantidades que conseguem chegar ao espaço extracelular em condições fisiológicas. Em muitas afecções, a atividade de várias enzimas aumenta no espaço extracelular. Muitas delas deixam às células devido à permeabilidade aumentada das membranas ou pela destruição das estruturas celulares, alterando a atividade das mesmas na corrente sanguínea. As determinações das atividades enzimáticas no soro assumem um importante auxílio no diagnóstico de enfermidades e monitoramento de lesões de órgãos e tecidos afetados (PEREIRA, 2008).

Os hepatócitos são células metabolicamente complexas que contêm concentrações elevadas de diversas enzimas. As principais atividades enzimáticas dosadas no soro para determinar a gravidade da lesão hepática são aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GAMA – GT) e lactato desidrogenase (LD) que estão distribuídas intracelularmente em localizações específicas (HENRY, 2008). O conhecimento das localizações intracelulares das enzimas é importante para estabelecer a intensidade da lesão hepática. A enzima ALT pode ser encontrada apenas na mitocôndria e AST na mitocôndria e citoplasma (PEREIRA, 2008). Para avaliar a função hepática, as concentrações séricas de AST e ALT foram avaliadas, pois esses são considerados marcadores da

função hepática e alterações hepáticas têm sido relatadas após o uso de alguns produtos fitoterápicos (CORNS, 2003; YUEN et al., 2009). Embora essas enzimas não sejam específicas dos hepatócitos e poderem estar aumentadas em lesões de outros órgãos, as hepatopatias são as causas mais comuns de elevações séricas dessas duas enzimas (HENRY, 2008). Como os resultados obtidos neste trabalho não mostraram alterações significantes nos níveis de ALT e AST, esses dados indicam não comprometimento hepático após tratamento agudo com o EHT.

Esses resultados corroboram com a literatura, uma vez que outro membro da família Malvaceae (*Sida rhombifolia*) foi avaliado no modelo de toxicidade aguda e demonstrou que doses de até 8 g/kg não provocaram alterações nos parâmetros bioquímicos séricos, como ALT, AST e creatinina. Entretanto, doses elevadas (12 e 16 g/kg) desse extrato foram capazes de alterar esses parâmetros indicando comprometimento hepático e renal (ASSAM et al., 2010) entretanto nesse caso deve-se considerar as altas dosagens administradas. Outra planta desta família, *Sida cordata* apresentou atividade hepatoprotetora corroborando com sua utilização em doenças do fígado na medicina popular (SHAH et al., 2013; MISTRY et al., 2013). Porém, a administração oral crônica do extrato hidroalcoólico da planta *Hibiscus sabdariffa* foi descrito como tóxico, pois afetou as concentrações séricas de ALT, AST e creatinina causando distrofia muscular e perda de peso significativos em camundongos nas doses de 300 e 2000 mg/kg (FAKEYE, 2008a).

Para avaliar a função renal, alguns compostos nitrogenados não proteicos (NPN) foram avaliados: ureia, creatinina e ácido úrico. Esses compostos são formados no organismo como resultados do catabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas, respectivamente. Concentrações elevadas dos principais componentes dos NPN ocorrem como consequência da função renal diminuída (CHANDRAMOHAN et al., 2009).

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, sendo formado no fígado. A concentração do ácido úrico nos fluidos corporais é determinada pela relação entre os índices de produção e eliminação do mesmo. Uma das causas de hiperuricemia é o defeito na eliminação onde se observa hiperuricemia sem uricúria associada com elevação da ureia no sangue,

como ocorre na insuficiência renal, inibição farmacológica da função renal, entre outros (PEREIRA, 2008). A ureia é um produto da degradação do metabolismo dos aminoácidos, produzida a partir da amônia no ciclo da ureia hepática. A ureia é filtrada pelos glomérulos e reabsorvida nos dutos coletores juntamente com a água (GROSS et al., 1996). A produção de ureia é afetada pela ingestão de proteína e pela taxa de síntese; a nutrição deficiente leva a valores plasmáticos reduzidos de ureia, enquanto os estados catabólicos (queimaduras) e cargas elevadas de proteína causam aumento da mesma. Uma vez que a ureia é sintetizada no fígado, a hepatopatia avançada frequentemente esta associada com ureia plasmática reduzida (LUM e LEAL-KHOURI, 1989). Como os resultados obtidos nesse estudo não mostraram alterações significantes nos níveis plasmáticos de ureia entre os grupos de animais tratados como Eht, sugere-se o não comprometimento hepático e portanto corroborando com os níveis séricos de ALT e AST. Também não foi observado nesse estudo alteração significativa do ácido úrico sérico, indicando que a função renal também não está comprometida, bem como, a função hepática está normal.

No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina, que serve como uma fonte rica de energia. Fisiologicamente, a creatina perde água espontaneamente, formando sua amida cíclica (creatinina). Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A taxa de produção da creatinina está relacionada à massa muscular, à atividade muscular e à ingestão de creatina na carne, bem como à ingestão total de proteínas; quão elevadas essas variáveis, maior a concentração sérica de creatinina e enquanto reduções nessas variáveis diminuem o valor sérico de creatinina (RAHN et al., 1999). A creatinina é excretada na circulação em taxa relativamente constante. Uma fração substancial da excreção da creatinina nos rins é o resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. A creatinina sérica elevada está associada com uma redução na taxa de filtração glomerular (HENRY, 2008). Existe uma variação diária relativamente pequena da creatinina em um individuo saudável, com variação média de aproximadamente 5 % (KEEVIL et al., 1998). Portanto, pequenas variações nos limiares da

creatinina em uma pessoa servem como marcadores sensíveis de alterações na função renal se outras causas de alteração da creatinina puderem ser eliminadas (HENRY, 2008). Como os resultados obtidos neste trabalho não mostraram alterações significantes nos níveis plasmáticos de creatinina entre os grupos de animais tratados com Eht, sugere-se o não comprometimento renal, corroborando com os níveis séricos de ácido úrico acima discutido.

As determinações das concentrações do colesterol total e triglicerídeo, entre outros lipídios plasmáticos, são importantes nas hiperlipidemias que consistem no principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PEREIRA, 2008). Também não foi observado mudanças significativas nas dosagens de colesterol total e triglicerídeos, sugerindo que o tratamento com o Eht não oferece riscos para o desenvolvimento de dislipidemias.

Os níveis de glicose, proteínas totais e albumina foram dosados para avaliar o perfil bioquímico geral dos animais tratados com o Eht e determinar a presença de alterações metabólicas. Os valores séricos dos compostos acima citados não foram significativamente diferentes entre os grupos controle e tratados em ambos os gêneros, sugerindo que o Eht não influencie no perfil bioquímico geral do organismo.

O sistema hematopoiético é um dos alvos mais sensíveis a compostos tóxicos e um importante indício de estado patológico no animal (MUKINDA e SYNCE, 2007; HARPER, 1973). Neste estudo, os parâmetros hematológicos analisados permaneceram inalterados quando comparados ao grupo controle sugerindo que o Eht não exerce efeitos sobre as células hematopoiéticas. Entretanto, resultados demonstrados por Fakeye (2008) com o extrato hidroalcoólico de *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) na dose de 100 mg/kg, bem como a fração acetato de etila no modelo de toxicidade de doses repetidas, indicaram que a fração acetato de etila na dose de 100 mg/kg aumentou o número total de leucócitos e a dose de 50 mg/kg causou efeito reverso. Em adição, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *Hibiscus sabdariffa* causou redução na contagem de neutrófilos (FAKEYE, 2008b) demonstrando que membros da família Malvaceae podem conter compostos que alteram o número sérico das populações de leucócitos.

Segundo Raza (2002), as alterações no peso corporal de animais submetidos a tratamentos com extratos ou compostos de plantas podem indicar efeitos adversos. No presente estudo, não houve diferença nos pesos dos animais e no consumo de ração após tratamento com Eht. No entanto, observou-se um aumento significativo no consumo de água no grupo fêmea tratado, em comparação com o grupo controle. Tal resultado pode estar associado à susceptibilidade e sensibilidade diferenciada aos fármacos entre os gêneros (ANDERSON, 2008), entretanto estudos mais detalhados de toxicidades aguda e doses repetidas devem ser realizados para confirmar tal teoria. Os resultados apresentados nesse trabalho são semelhantes aos de Konaté (2013) que afirma que as doses de 1800, 2000, 2500, 3000 e 6000 mg/kg do extrato de *Sida urens* (Malvaceae) também não apresentaram mudanças no peso corporal dos camundongos tratados por via intraperitoneal. Entretanto, outro estudo avaliou o extrato hidroalcoólico de *Hibiscus sabdariffa* (Malvaceae) na dose de 100 mg/kg no modelo de toxicidade de doses repetidas e demonstrou que o extrato causou perda acentuada nos pesos dos camundongos tratados (FAKEYE, 2008b). O tratamento de doses repetidas deverá ser avaliado com o extrato de *H. tiubae*.

Não houve mudanças significativas no índice de peso dos órgãos (coração, fígado, rins, baço e timo) entre os grupos de animais tratados ou não tratados com Eht, confirmando, portanto que o Eht apresentou baixa toxicidade aos animais.

O sistema imune é uma rede de interações entre moléculas, células e órgãos para defender o organismo contra ataques de invasores. A degeneração ou atrofia de órgãos relacionados ao sistema imune pode influenciar na resposta imune. Por exemplo, o baço serve como reservatório de células do sistema imune e filtra ou purifica o sangue e linfa que flui através dele. Quando o baço sofre danos ou é removido, o indivíduo se torna mais susceptível às infecções (YU et al., 2007). O timo é um órgão linfático que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e maturação de células T do sistema imunitário durante a infância. O timo é sensível a qualquer tipo de estresse físico, incluindo infecções sistêmicas, neoplasias, cirurgias e quimioterapias, e responde com atrofia rápida, podendo retornar ao seu tamanho original, ou até mesmo maior (NASSERI e EFTEKHARI, 2010). Em

animais adultos, o timo está envolvido no estabelecimento e restauração das funções imunes, em particular na produção e desenvolvimento de linfócitos T (YOKOZI, 1973). Assim, o timo e o baço são órgãos essenciais para o bom funcionamento do sistema imune. Nesse trabalho avaliamos o peso desses órgãos e os dados mostram que o Eht não apresentou atividade imunoestimulante ou imunossupressora, pois não houve alteração no índice de peso do baço e do timo. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a influência do Eht no sistema imune.

O fígado é o órgão de detoxificação e os rins o órgão excretor mais importante nos mamíferos. Ambos são susceptíveis a maioria das drogas, pois atuam ativamente na biotransformação e na excreção de drogas respectivamente. O coração faz parte do sistema cardiovascular essencial para ejeção de sangue para os sistemas vasculares e para distribuição de oxigênio e nutrientes para todo o organismo (KATZUNG, 2003). Nesse estudo demonstramos que os índices de peso do fígado, rins e coração não foram alterados pelo tratamento com Eht, apontando a não influência nas funções homeostáticas desses órgãos. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a influência do Eht na fisiologia dos órgãos citados.

Os resultados apresentados nesse estudo são preliminares quanto à investigação da toxicidade pré-clínica da planta *Herissantia tiubae* e ensaios toxicológicos adicionais são necessários, tais como: toxicidade de doses repetidas, reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, bem como, identificar a toxicocinética do Eht, e com isso definir uma janela terapêutica para que este extrato possa ser utilizado com eficácia e segurança.

Frente ao exposto, avaliamos o possível efeito anti-inflamatório do Eht tendo em vista que a planta vem sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças com características inflamatórias.

A carragenina é um polissacarídeo natural, obtido a partir de algas vermelhas comestíveis da Classe *Rhodophyceae*, que possuem diversas atividades biológicas, incluindo efeito imunomodulador (NECAS e BARTOSIKOVA, 2013). O edema de pata induzido por carragenina é amplamente utilizado para determinar atividade antiedamatogênica e anti-inflamatória de compostos e adicionalmente constitui num modelo animal simples de avaliação da dor no local da inflamação, sem qualquer dano ou

prejuízo para a pata inflamada (SUGISHITA et al., 1981;. HENRIQUES et al., 1987;. JAIN et al., 2001; SINI et al., 2010). Esse modelo tem sido cada vez mais utilizado para testar novas drogas anti-inflamatórias, bem como para estudar os mecanismos envolvidos na inflamação (POSADAS et al., 2004).

Nesse modelo experimental, a carragenina quando injetada na pata promove uma resposta inflamatória de longa duração que envolve diversos mecanismos como a liberação de mediadores imediatos (histamina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, NO), migração de leucócitos e hiperalgesia (DAMAS e REMACLE-VOLON, 1992; HANDY e MOORE, 1998; MEDEIROS et al., 1995; VAZ et al., 1996). O desenvolvimento do edema tem sido descrito como um evento bifásico, idade e peso dependente, onde vários mediadores operam em sequência para produzir uma resposta inflamatória. Didaticamente, o edema é dividido em primeira fase (0-24h) que é caracterizada por um edema de baixa intensidade e segunda fase (24-96h), caracterizada por um edema mais pronunciado com um efeito máximo entre 48 e 72h. Nas primeiras seis horas da primeira fase, os mediadores detectáveis são os eicosanoides (PGE₂), as aminas vasoativas (histamina, serotonina), bradicinina e NO. Após seis horas, ocorre migração leucocitária (principalmente neutrófilos), bem como os níveis de mieloperoxidase (MPO) que são considerados marcadores da migração neutrofílica e níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) estão aumentados em 6h e permanece elevada até 24h. As enzimas, principalmente COX-1, colaboram com a manutenção dos níveis de PGE₂ nos tecidos inflamados na primeira fase e na segunda fase (72h) a PGE₂ é produzida pela COX-2. Além disso, os níveis de NO também possuem um pico de concentração elevada na primeira fase produzido pela eNOS e um outro na segunda fase produzido pelas isoformas iNOS e eNOS (POSADAS et al., 2004).

A segunda fase do edema induzido por carragenina ocorre depois de 24 horas, provocando um edema mais pronunciado devido à migração celular. Nos tempos tardios (entre 24h e 96h), o principal mediador responsável pela manutenção do edema é a PGE₂ (POSADAS et al., 2004).

O presente trabalho demonstrou que o tratamento por via oral com EHT (50, 100 ou 200 mg/kg) não foi capaz de reduzir o edema formado pela

carragenina nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6 e 24h. Estes resultados sugerem que o extrato não antagoniza os efeitos dos mediadores inflamatórios imediatos (aminas vasoativas, bradicinina ou prostaglandinas) envolvidos na fase inicial da inflamação, indicando que o extrato não apresenta compostos em concentrações suficientes para apresentar efeito antiedematogênico.

Confrontando esses dados com a literatura observamos resultados semelhantes àqueles obtidos por Franzotti (2000) que demonstrou que a administração por via oral, nas doses 200, 400 e 800 mg/kg, do extrato aquoso de *Sida cordifolia* (Malvaceae), no modelo de edema de pata induzida por carragenina também não foi eficaz de diminuir o edema de pata. A dose de 200 mg/kg não alterou a formação do edema e as doses de 400 e 800 mg/kg na terceira hora reduziram o edema em 28,31 % e 7,33 %, respectivamente. Entretanto, Paiva (2013) demonstrou que o extrato hidroalcoólico da *Pseudobombax marginatum* (Malvaceae), nas doses de 100 e 300 mg/kg foi capaz de diminuir a formação do edema de pata induzido por carragenina nos tempos de 2, 3 e 4h (PAIVA et al., 2013). Os resultados do nosso trabalho também divergem com aqueles apresentados por Vasdevan e col. (2007) que demonstraram que o extrato etanólico da casca de *Thespesia populnea* (Malvaceae) foi capaz de reduzir o edema nas doses de 200 e 400 mg/kg na 3h; já a dose de 100 mg/kg não foi capaz de reduzir o edema provocado pela carragenina nos tempos avaliados. Esses resultados indicam claramente que embora as plantas em análise pertençam à família Malvaceae os seus conteúdos quanto aos compostos farmacologicamente ativos e suas concentrações devem ser diferentes.

Como os resultados preliminares não nos apontaram uma dose do extrato capaz de diminuir o edema de pata produzido pela carragenina, portanto não nos permitindo selecionar uma dose(s) específica(s) para os ensaios subsequentes, nos baseamos nos resultados obtidos no trabalho realizado por Mozzini-Monteiro (2013) que demonstrou que o extrato hidroalcoólico da planta *Herissantia tiubae* (Malvaceae) apresentou ação anti-inflamatória no modelo de asma experimental (inflamação crônica) nas doses de 50 e 100 mg/kg. Portanto, as doses escolhidas foram as citadas nesse trabalho.

O modelo experimental de permeabilidade microvascular que é capaz de demonstrar o influxo de fluidos para o sítio inflamatório foi escolhido para dar prosseguimento aos estudos com EHT.

A injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético em baixas concentrações em camundongos induz contorções abdominais características e extravasamento de plasma rico em proteínas, característica dos momentos iniciais da inflamação; a inibição deste extravasamento pode contribuir para a redução da formação de edema e para diminuir a migração de neutrófilos. Entre as importantes proteínas plasmáticas que adentram os sítios inflamatórios estão as proteínas do sistema complemento, os anticorpos e as proteínas de fase aguda. O modelo foi estabelecido em 1964 por Whittle, e além de ser útil para a avaliação da permeabilidade microvascular também pode ser empregado no estudo de mecanismos nociceptivos e antinociceptivos (WHITTLE, 1964). Os aumentos da permeabilidade vascular e a hiperalgesia provocados pelo ácido acético estão relacionados com a liberação local de bradicinina, prostaglandinas, serotonina e histamina (COLLIER et al., 1968; DERAEDT et al., 1980).

Nesse estudo, observamos que o EHT administrado antes da injeção i.p. de ácido acético não preveniu o extravasamento de fluidos para a cavidade peritoneal sugerindo que o EHT não influenciou na produção e/ou liberação local de bradicinina, prostaglandinas, serotonina ou histamina. Entretanto para confirmar tal hipótese as dosagens de tais mediadores deverão ser realizadas.

O EHT parece não influenciar na produção/liberação dos mediadores característicos dos momentos iniciais da inflamação; não inibindo o extravasamento de plasma rico em proteínas e conseqüentemente não reduzindo o edema. Tal resultado corrobora com aquele observado no edema de pata induzido por carragenina acima descrito. De certa forma, esses dados divergem da literatura, uma vez que os extratos metanólicos e aquosos de uma planta da família Malvaceae, *Malva parviflora* diminuíram significativamente a permeabilidade microvascular em 36 e 40 %, respectivamente (BOURICHE et al., 2011).

A migração de leucócitos para o tecido lesionado é outro aspecto importante no processo inflamatório (GONZALEZ et al., 2013). Para confirmar e

avaliar a ação anti-inflamatória do Eht nas doses de 50 e 100 mg/kg, onde Mozzini-Monteiro (2013) relatou redução de migração celular do lavado bronco alveolar (BAL) no modelo de inflamação crônica, foi realizado o modelo de peritonite induzida por carragenina, modelo este de inflamação aguda.

A peritonite é um modelo experimental que provoca, na cavidade peritoneal, reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções, inflamações ou neoplasias. A administração intraperitoneal de carragenina produz um aumento sustentado da permeabilidade pós-capilar venular, levando a um aumento da infiltração celular, principalmente de neutrófilos (MALECH e GALLIN, 1987). Assim, este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, sob a ação de agentes quimiotáticos, principalmente de leucotrienos e citocinas. Esse modelo é sensível à ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (BROOKS e DIA, 1991). Além disso, esse modelo é considerado, por muitos pesquisadores, como o mais completo, uma vez que se pode avaliar o efeito de substâncias tanto sobre os eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 1997).

Nesse estudo, observamos que o Eht (50 ou 100 mg/kg), foi capaz de reduzir significativamente o número total de leucócitos do lavado peritoneal, caracterizado pela diminuição de PMN e não de MN, quando comparado com o grupo controle positivo (carragenina). Também foi possível observar via análise das subpopulações celulares do lavado peritoneal por citometria de fluxo, que o Eht inibiu percentualmente a migração do neutrófilo, principal célula da inflamação aguda, quando comparado com o grupo carragenina. Esses resultados demonstraram que o Eht inibiu migração leucocitária no modelo experimental de inflamação aguda bem como na inflamação crônica previamente demonstrada por Mozzini-Monteiro (2013). De forma semelhante Paiva e colaboradores (2013) demonstraram que o extrato da planta *Pseudobombax marginatum* (Malvaceae), no modelo de peritonite induzida por carragenina, inibiu a migração de PMN para a cavidade peritoneal em 59, 63 e 71 % para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente; mas não interferiu na migração das células mononucleares.

Para descartar a possível morte de células no lavado peritoneal causada pelo tratamento com Eht realizou-se o ensaio de viabilidade celular o qual

permite analisar a ocorrência de morte por apoptose (inicial ou tardia) e/ou necrose das células. Nesse estudo, observamos que o pré-tratamento com o EHt (50 ou 100 mg/kg) não alterou o percentual de células viáveis quando comparado com o grupo fisiológico. Diante desses dados, podemos inferir que o pré-tratamento com o EHt não provoca apoptose e/ou necrose dos neutrófilos no sítio inflamatório.

Em adição à migração celular, a peritonite induzida por carragenina também envolve exsudação de plasma e produção de mediadores, tais como NO, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (SALVEMINI et al., 1996; LORAM et al., 2007). Considerando esta informação adicional, nós avaliamos o efeito do EHt nos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 no exsudato peritoneal. Os resultados obtidos mostraram que o EHt na dose de 100 mg/kg diminuiu significativamente as concentrações de IL-1 β e TNF- α na cavidade peritoneal dos animais, quando comparado ao grupo carragenina. No entanto, não reduziu os níveis de IL-6. Já o pré-tratamento com EHt na dose de 50 mg/kg reduziu significativamente a concentração de TNF- α , mas não alterou os níveis de IL-1 β e IL-6.

A produção de IL-1 β pode acontecer por duas vias: uma pela via dos PAMPs que se ligam aos receptores de reconhecimento padrão (PRR) na membrana celular, capazes de ativar várias vias de sinalizações intracelulares (MAPK, NF- κ B, dentre outros) (EL ALWANI et al., 2006; WAGNER e ROTH, 2000), e a outra via por receptores do tipo NOD-like (NLR) que detectam PAMPs no citoplasma de células hospedeiras induzindo a produção de IL-1 β via a ativação de um complexo proteico intracelular denominado inflamassomo, que ativa a caspase-1, que por sua vez promove a maturação e liberação de IL-1 β (BROZ e MONACK, 2011; SAID-SADIER e OJCIUS, 2012). Tal divergência nos níveis de IL-1 β decorrentes dos pré-tratamentos com EHt nas doses de 50 e 100 mg/kg pode ser explicado, em parte, pela diferença quantitativa de compostos presentes no extrato capazes de antagonizar a produção de IL-1 β ; sugerimos que na dose de 50 mg/kg não são encontrados concentrações ideais de compostos capazes de inibir as duas vias de produção de tal citocina. Entretanto na dose de 100 mg/kg esses compostos devem estar em concentrações ideais para bloquear as duas vias de produção da IL-1 β . Adicionalmente, diferentemente do TNF- α , a IL-1 β é também produzida por

muitos tipos celulares que não os macrófagos, como neutrófilos, células epiteliais e endoteliais (WAGNER e ROTH, 2000).

Correlacionando os resultados da viabilidade dos leucócitos com a diminuição do TNF- α no lavado peritoneal, podemos inferir que os dados são coerentes, uma vez que essa citocina quando ligada ao seu receptor de membrana, TNF-RI (receptor do TNF tipo I) na maioria das células, leva ao recrutamento de uma proteína adaptadora que ativa caspases e desencadeia a morte celular por apoptose (WAGNER e ROTH, 2000), portanto, o pré-tratamento com o Eht protegeu os leucócitos da morte devido, em parte, a diminuição do TNF- α .

Além disso, o efeito anti-inflamatório do Eht pode ser, em parte, devido à inibição da produção de IL-1 β e TNF- α nos locais de inflamação, uma vez que estas citocinas pró-inflamatórias promovem a expressão de moléculas de adesão no endotélio (ICAM-1 e VCAM-1), migração de leucócitos, aumento da permeabilidade microvascular e migração transendotelial (HALLEGUA e WEISMAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; MAMBOLE et al., 2010; SCHMIDT et al., 2013). É relevante discutir que a IL-6 exerce um efeito anti-inflamatório por meio de retroalimentação (*feedback*) negativo sobre a síntese de TNF- α e a IL-1 β (EL ALWANI et al., 2006) e o Eht não alterou as concentrações de IL-6, portanto não interferiu no seu efeito regulador.

O mecanismo de ação pelo qual a carragenina induz os processos inflamatórios é via sinergismo entre os vários mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas, leucotrieno B₄, e outros agentes quimiotáticos (FOSTER et al., 1986). Estudos *in vitro* com macrófagos de camundongos deficientes do receptor (*knockout*) TLR4-MyD88- na presença de carragenina demonstraram que a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) foi amplamente prejudicada. Além disso, a resposta inflamatória no modelo *in vivo* de edema de pata induzido por carragenina foi significativamente reduzida nessas linhagens de camundongos. Esses resultados indicam que a ativação da imunidade inata pela carragenina é dependente de TLR4/MyD88. Entretanto, ainda é desconhecido se a carragenina é reconhecida por outros tipos de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (TSUJI et al., 2003). É descrito na literatura que uma das

principais vias de sinalização desencadeadas pela ativação do TLR4 é a via do fator de transcrição NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) que ao se translocar para o núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiopatológicos tais como os genes de citocinas e quimiocinas importantes no recrutamento de leucócitos para o sítio inflamado (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

Portanto, os resultados apresentados nesse estudo sugerem que a ação anti-inflamatória do extrato de *Herissantia tiubae* é devida, pelo menos em parte, à diminuição da migração celular e a redução da produção de citocinas inflamatórias. Não influenciando diretamente na exsudação de fluidos. Desse modo, o Eht exerce um papel modulador do sistema imune, inibindo significativamente os eventos celulares e não os eventos vasculares. Isso fornece subsídios necessários para comprovar cientificamente a atividade anti-inflamatória dessa planta, apoiando o seu uso popular no tratamento de diversas doenças inflamatórias. Esses resultados abrem perspectivas de estudos mais detalhados sobre seu mecanismo de ação em células inflamatórias e em células do endotélio vascular, bem como uma investigação da relação entre os componentes desse extrato e sua atividade biológica.

Os macrófagos são células do sistema imunológico versáteis que desempenham papéis indispensáveis tanto nas respostas imunes inata quanto na adaptativa. Eles exibem várias respostas imunitárias, frente aos desafios antigênicos, tais como fagocitose, secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, apresentação de antígenos às células T e aderência. Devido à sua ampla gama de funções, os macrófagos são extensivamente utilizados como ferramenta para estudar possíveis agentes imunomoduladores (MAURYA et al., 2013).

Uma vez que não há estudos anteriores que descrevam a toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* em cultura de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7, foi realizado o ensaio de viabilidade celular para determinar quais as concentrações ideais a serem empregadas nos ensaios *in vitro* subsequentes.

Observou-se que as concentrações de 100 a 400 µg/mL do Eht reduziram significativamente a capacidade metabólica destas células, quando comparadas com as culturas celulares sem o estímulo, sugerindo que essas

concentrações são citotóxicas para o macrófago. Entretanto, as concentrações de 6,25 a 50 µg/mL não reduziram significativamente a conversão do MTT a formazan, em células da linhagem RAW 264.7. Portanto, a escolha das concentrações para os ensaios subsequentes foram de 6,25 a 50 µg/mL.

Esses resultados são semelhantes aos da literatura quando Park (2012) demonstrou que a viabilidade das células da linhagem RAW 264.7 diminuiu, para um grau estatisticamente significativo, frente ao extrato metanólico de *Wercklea insignis* (Malvaceae) (40 µg/mL) sendo as concentrações 5, 10 e 20 µg/mL não tóxicas para as células testadas.

O NO é uma molécula extremamente reativa, produzida a partir da L-arginina (NATHAN, 1994). Dependendo das concentrações nos tecidos o óxido nítrico pode apresentar uma variedade de funções biológicas que incluem o relaxamento vascular, a modulação da agregação plaquetária, algumas formas de neurotransmissão central e periférica, além de ação citotóxica e citostática de macrófagos (HIBBS et al., 1988). Macrófagos ativados por diferentes estímulos, entre eles o LPS e o INF- γ , produzem grandes quantidades de NO, pela indução da iNOS (KRONCKE et al., 1997; LIN et al., 2008). O NO produzido pelos macrófagos ativados é capaz de provocar lesão tecidual, por mecanismos diversos, entre eles a inibição da função mitocondrial e diminuição da replicação do DNA (ALLER et al., 2006; DRAPIER e HIBBS, 1988). Adicionalmente, o NO promove reação inflamatória por aumentar a síntese e liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e derivados do ácido araquidônico incluindo PGE2 (MARCINKIEWICZ et al., 1995; MOLLACE et al., 2005).

O tratamento *in vitro* com o Eht (6,25; 12,5; 25 ou 50 µg/mL), em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264.7 coestimulados com LPS + INF- γ , foi capaz de reduzir a liberação de NO, destacando-se a concentração 50 µg/mL, pois a produção de NO foi reduzida para níveis basais. Tal resultado é importante, pois a presença de NO no sítio inflamatório pode levar ao dano tecidual, estimular a vasodilatação e o extravasamento de fluidos para o interstício.

Esses resultados corroboram com a literatura onde as concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg/mL do extrato metanólico de *Wercklea insignis* (Malvaceae) foram capazes de reduzir de maneira concentração dependente a produção de

NO nas células da linhagem RAW 264.7 estimuladas com LPS (PARK et al., 2012).

Os macrófagos desempenham papel importante no processo inflamatório via produção de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β , e TNF- α). Como resultado, agentes que regulem a produção de citocinas inflamatórias podem apresentar efeitos terapêuticos (MAURYA et al., 2013). A produção de citocinas inflamatórias em macrófagos em resposta ao LPS e INF- γ é mediada pela ativação dos fatores de transcrição: NF-kB e STAT, respectivamente. O Eht foi capaz de reduzir a produção de IL-6 e TNF- α nos macrófagos da linhagem RAW 264.7, sugerindo que esse extrato possa está atuando, em parte, inibindo as vias de sinalização de produção de citocinas.

Esses dados corroboram com a literatura, pois estudos *in vitro* utilizando o extrato metanólico de *Wercklea insignis* (Malvaceae) demonstraram que o extrato foi capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , e TNF- α) em células estimuladas com LPS (PARK et al., 2012). Outro estudo *in vitro* com o extrato metanólico de *Hibiscus cannabinus* L. (Malvaceae) demonstrou bloquear significativamente o TNF- α em até 70 % (400 μ g/mL) em células de RAW 264.7 estimuladas com LPS (LEE et al., 2007).

Correlacionando os resultados do Eht nos experimentos *in vitro* com aqueles obtidos no modelo de peritonite induzida por carragenina, observamos que os níveis de TNF- α diminuíram em ambos os ensaios, porém, a quantidade de IL-6 diminui apenas no ensaio *in vitro*. Esse fato pode ser explicado, em parte, que no modelo *in vitro* existe apenas a interação do macrófago com o estímulo (INF- γ + LPS) e a droga testada, já no modelo *in vivo*, existe uma complexa interação entre o organismo e o extrato; podendo este sofrer alterações nas estruturas químicas pela ação de enzimas (processo conhecido como biotransformação), produzindo metabólitos secundários que não apresentaram efeito sobre a produção de IL-6.

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que há uma redução na produção de citocinas inflamatórias tanto *in vivo* quanto *in vitro* e essas citocinas, dentre outras funções, promovem expressão de moléculas de adesão tanto no endotélio quanto em leucócitos e isto nos levou a estudar a ação do Eht na expressão da molécula de adesão L-selectina nos macrófagos.

O extravasamento dos leucócitos é um processo mediado pela interação de moléculas de adesão expressas na superfície dos leucócitos e nas células endoteliais. Esta migração é mediada por moléculas de adesão, tais como aquelas pertencentes aos membros da família das selectinas. A família das selectinas é composta por três moléculas diferentes nomeadas por sua distribuição específica nas células. A E-selectina e P-selectina são expressas principalmente no endotélio vascular, e a L-selectina é expressa na superfície dos leucócitos (TAKESHI et al., 2010).

Embora o papel primário da L-selectina seja em promover o endereçamento linfocitário (*homing*) para os nódulos linfáticos, ela está implicada em diversos processos tais como o tráfico de leucócitos inflamatórios, tanto na inflamação aguda quanto na crônica (ROSEN, 2004). A expressão de L-selectina por leucócitos circulantes pode facilitar interações secundárias de um neutrófilo ou monócito já em rolamento, ou pode contribuir para eventos de sinalização *downstream* que permitam os leucócitos aderir ao endotélio ou emigrar da vasculatura (TCHERNYCHEV et al., 2003; ARBONES et al., 1994; BARGATZE et al., 1994; ZARBOCK et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos macrófagos RAW 264.7 com Eht (25 ou 50 µg/mL) estimuladas com LPS por 24 horas, foi capaz de reduzir a expressão da L-selectina na membrana da célula. Tal resultado corrobora com o modelo de peritonite induzida por carragenina, uma vez que a migração leucocitária foi reduzida, reforçando a teoria que o extrato exerça sua atividade anti-inflamatória por reduzir a produção de citocinas e consequentemente a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos.

Diante do exposto, podemos afirmar que a administração sistêmica do extrato hidroalcoólico de *Herissantia tiubae* (Eht) apresenta efeito anti-inflamatório relacionado com a redução da liberação de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β), redução na migração de leucócitos para o sítio inflamatório; entretanto, o Eht não interfere na produção de mediadores imediatos da inflamação. O Eht exerce efeito modulador sobre o macrófago da linhagem RAW 264.7, reduzindo a produção de NO, produção de citocinas (TNF- α e IL-6) e expressão da molécula de adesão L-selectina.

Portanto, os resultados apresentados nesse trabalho quanto aos efeitos anti-inflamatórios do Eht corroboram e respaldam os resultados obtidos no

trabalho Mozzini-Monteiro (2013) e na medicina popular que utiliza a planta, na forma de infusão, para os males relacionados com os processos inflamatórios.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Herissantia tiubae* (EHt) em modelos experimentais de toxicidade aguda e inflamação aguda nos possibilitam concluir que:

O EHt apresentou baixa toxicidade após administração oral na dose de 2000 mg/kg, bem como exerceu atividade anti-inflamatória nas doses de 50 e 100 mg/kg via inibição da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e consequentemente modulação da migração de neutrófilos para o local inflamado. Não apresentou efeito antiedematogênico pois não diminuiu a formação do edema induzido por carragenina, bem como não reduziu o extravasamento de plasma para o local inflamado. Em adição o EHt também não influenciou na permeabilidade microvascular induzida por ácido acético.

Por fim, a atividade anti-inflamatória foi confirmada *in vitro*, uma vez que o EHt (25 ou 50 μ g/mL) reduziu a produção de NO, de citocinas (IL-6 e TNF- α), bem como a expressão da molécula de adesão L-selectina nos macrófagos da linhagem RAW 264.7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

AGRA MF. *Plantas da medicina popular dos Cariris Velhos*. Joao Pessoa Paraiba. **Editora Uniao**. 1996.

ALBUQUERQUE UP, MEDEIROS PM, ALMEIDA ALS. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol** **114**: 325–354, 2007.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses, Edinburgh**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SANCHEZ-PATAN, F. *et al.* The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 10, p. RA225-34, Oct 2006.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ANDERSON, G. D. Gender differences in pharmacological response. **International review of neurobiology**, v. 83, p. 1-10, 2008.

ANTAS E SILVA, D., Falcao-Silva, V. S., GOMES, A. Y. S.; COSTA, A. D.; LEMOS, V. S.; AGRA, M. F.; Braz-Filho, R.; Siqueira-Junior J. P.; SOUZA, M. F. V. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,49,-dihydroxy-3,6,7,8,39-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. **Pharmaceutical Biology**, vol. 47(4), p. 279–284, 2009.

ARBONES, M. L. *et al.* Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. **Immunity**. vol.1, p.247–260, 1994.

ASSAM, A.J.; DZOYEM, J.P.; PIEME, C.A.; PENLAP, V.B. In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). **BMC Complement Altern Med**.vol.10, 2010.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**. vol.392, p.568-68, 1998.

BARGATZE, R. F., KURK, S., BUTCHER, E. C. & JUTILA, M. A. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. **J. Exp. Med**. vol. 180, p.1785–1792, 1994.

BARREIRO, O.; MARTIN, P.; GONZALEZ-AMARO, R. *et al.* Molecular cues guiding inflammatory responses. **Cardiovascular research**, v. 86, n. 2, p. 174-182, May 1 2010.

BARROSO, G.M., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L., COSTA, C.G., GUIMARÃES, E.F. In: **Sistemática de angiospermas do Brasil**, 2 ed. Editora UFV, Viçosa. 2002.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J. Clin. Invest**. Vol. 118, p. 413–420, 2008.

BOADI, W. Y.; IYERE, P. A.; ADUNHYA, S. E. Effect of quercetin and genistein on copper-and iron-induced peroxidation in methyl linolenate **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, p. 363-369, 2003.

BORK, K. Angioedema. **Immunol Allergy Clin North Am**. vol.34, p.23-31, 2014.

BOURICHE, H.; MEZITI, H.; SENATOR, A.; ARNHOLD, J. Anti-inflammatory, free radical-scavenging, and metal-chelating activities of *Malva parviflora*. **Pharm Biol**. vol. 49, p. 942-6, 2011.

BOVINI, M.G. Malvaceae *s.str.* na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 6, p. 289-301, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Resolução RE nº 90 de 16 de março de 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução – RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução – RDC nº. 14 de 31 de março de 2010d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2 versão. 31 de janeiro de 2013e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa—Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “Resolução-RE nº 90. Guia para a realização de estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos,” 2004.

BROOKS PM, DAY RO. Non-steroidal anti-inflammatory drugs differences and similarities. **N Engl J Med.** vol. 24, p.1716–25, 1991.

BROZ, P.; MONACK, D.M. Molecular Mechanisms of Inflammasome Activation during Microbial Infections. **Immunol Rev.** vol. 243, p. 174–190, 2011.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107 (2), p. 139 – 154, 2005.

CAI, T. & CAI, Y. cis-Ampelopsin E, a stilbene isolated from the seeds of *Paeonia suffruticosa*, inhibits lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages via blockade of nuclear factor-Kappa B signaling pathway. **Biol Pharm Bull**, 34, 1501-7, 2011.

CHANDRAMOHAN, G.; AL-NUMAIR, K. S.; PUGALENDI, K. V. “Effect of 3-hydroxymethyl xylitol on hepatic and renal functional markers and protein levels in streptozotocind diabetic rats,” **African Journal of Biochemistry Research**, vol. 3, pp. 198–204, 2009.

CHAVAKIS, T. Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. **Eur J Clin Invest**; vol. 42 p. 686–691, 2012.

CHEN, J.; MONTANARI, A. M.; WIDMER, W.W. Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids. **J Agr Food Chem.** vol. 45. p. 364–368, 1997.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; LIU, M. C.; LIN, C. C. In vitro antiviral activities of

Caesalpinia pulcherrima and its related flavonoids **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n 2, p. 194-198, 2003.

CORNS, C. M. "Herbal remedies and clinical biochemistry," **Annals of Clinical Biochemistry**, vol. 40, no. 5, pp. 489–507, 2003.

CORRÊA MFP, MELO GO, COSTA SS. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Ver Bras Farmacogn 18 (Supl.):** 785-797, 2008.

COSTA, H. F.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; BARBOSA FILHO, J. M. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 519-25, Apr 2008.

CROKER, B. A., KIU, H., PELLEGRINI, M., TOE, J., PRESTON, S., METCALF, D., O'DONNELL, J. A., CENGIA, L. H., McARTHUR, K., NICOLA, N. A., Alexander, W. S., ROBERTS, A. W. IL-6 promotes acute and chronic inflammatory disease in the absence of SOCS3. **Immunol. Cell Biol.** 90, 124–129, 2012.

DE FALCO L, FIORAVANTI A, GALEAZZI M, TENTI S. Bradykinin and its role in osteoarthritis. **Reumatismo.** vol.65, p.97-104, 2013.

DE VASCONCELOS, D. I.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L. T. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, p. 912925, 2011.

DEBAN, L.; RUSSO, R. C.; SIRONI, M. *et al.* Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. **Nature Immunology**, v. 11, n. 4, p. 328-334, 2010.

DEENADAYALAN, A., MADDINENI, P., RAJA, A. Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis. **BMC Research Notes**, vol.6, p.120, 2013.

DEWEY, C. F. JR., BUSSOLARI, S. R., GIMBRONE, M. A. JR & DAVIES, P. F. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. **J. Biomech. Eng.** vol.103, p.177–185, 1981.

DICHLBERGER, A.; KOVANEN, P.T.; SCHNEIDER, W.J. Mast cells: from lipid droplets to lipid mediators. **Clinical Science**. vol.125, p.121–130, 2013.

DINIZ, M. F. F. M; MEDEIROS, I. A.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; AGUIAR, F. B.; TOSCANO, M. G.; RIBEIRO, E. N. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar. **Rev. Brasileira de Ciências da Saúde**. vol. 10(2), p. 171-176, 2006.

DOHERTY, N. X., POUBELLE, P., BORGEAT, P., BEAVER, T. H., WESTRICH, G. L., SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**. Vol.30, p.769–789,1985.

DRAPIER, J. C.; HIBBS, J. B., JR. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. **Journal of immunology**, v. 140, n. 8, p. 2829-38, Apr 15 1988.

DURÁN WN, BRESLIN JW, SÁNCHEZ FA. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. **Cardiovasc Res**. vol.87, p.254-61, 2010.

EL ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 171–183, 2006.

FAKEYE TO, Anirban Pal and SPS Khanuja. Anxiolytic and sedative effects of extracts of *Hibiscus sabdariffa* Linn (family Malvaceae). **Afr. J. Med. Med. Sci**, 2008a.

FAKEYE, T.O. Toxicity and immunomodulatory activity of fractions of *hibiscus sabdariffa* linn (family malvaceae) in animal models. **Afr. J. Trad**. vol.5, p. 394 – 398, 2008b.

FALCÃO-SILVA VS, SILVA DA, SOUZA MFV, SIQUEIRA-JUNIOR JP. Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by a kaempferol glycoside from *Herissantia tiubae* (Malvaceae). **Phytother. Res**. vol.23: 1367-1370, 2009.

FILEP, J. G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y. et al. Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 295-301, Jul 1 1997.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine (JME)**, v. 201, p. 671-674, 2005.

FOSTER SJ, MCCORMICK ME, HOWARTH A, AKED D. Leukocyte recruitment in the subcutaneous sponge implant model of acute inflammation in the rat is not mediated by leucotrieno B4. **Biochem Pharmacol**; vol.35, p.1709–17, 1986.

FRANCESCA, C.; ANGELO, A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.; RODRIGUES, H.M.; MOURÃO, R.H.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **J Ethnopharmacol**. Vol. 72, p.273-7, 2000.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**. vol.294, p.1871, 2001.

GODDARD, L. M.; IRUELA-ARISPE, M. L. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. **Thrombosis and Haemostasis**. vol. 109 p. 407–415, 2013.

GOMES, A. Y. S.; SOUZA, M. F. V.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Mechanism involved in spasmolytic effect of a mixture of two triterpenes, cycloartenol and cycloeucalenol, isolated from *Herissantia tiubae* in the guinea-pig ileum. **Planta Med** vol. 75. p. 1025–1029, 2005.

GOMEZ-MUÑOZ, A.; GANGOITI, P.; ARANA, L.; OURO, A.; RIVERA, G. I.; ORDOÑEZ, M.; TRUEBA, M. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1060–1066, 2013.

GONZÁLEZ CP, VEGA RS, GONZÁLEZ-CHÁVEZM, SÁNCHEZMAZ, GUTIÉRREZ SP. Antiinflammatory activity and composition of *Senecio salignus* Kunth. **BioMed Res Int** vol. 2013, p.1–4, 2013.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 1, p. 52-63, Jan 2007.

GONZALEZ-SIMON AL, ENIOLA-ADEFESO O. Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Host Response to Biomaterials. **Cambridge: Springer**. p. 143-58, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, p. 883 - 899, 2010.

GROSS, P.; WEHRLE, R.; BUSSEMAKER, R. Hyponatremia: Pathophysiology, differential diagnosis and news aspect of treatment. **Clin. Nephrol.** vol. 46, p. 273-276, 1996.

GUERRA, A. S. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. Vol. 11, p. 1816-1822, 2011.

HALLEGUA DS, WEISMAN MH. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. **Ann Rheum Dis**; vol.61 p.960–7, 2002.

HARDINGHAM N, DACHTLER J, FOX K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. **Front Cell Neurosci.** vol.7, p:190, 2013.

HARPER, H. A. **Review of Physiological Chemistry**, LangeMedical Publications, Los Altos, Calif, USA, 14th edition, 1973.

HASSELBALCH, H.C. The role of cytokines in the initiation and progression of myelofibrosis. **Cytokine Growth Factor Rev.** vol.24, p.133-45, 2013.

HAYAKAWA M., JAYADEV S., TSUJIMOTO M., HANNUN Y.A., ITO, F. Role of ceramide in stimulation of the transcription of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase 2, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** vol.220,p. 681–686, 1996.

HE, M.; LAU, H. Y.; NG, S. W. *et al.* Chemokines in acute inflammation: regulation, function and therapeutic strategies. **International Journal of Integrative Biology**, v. 1, n. 1, p. 10, 2007.

HE, M.; ZHANG, J. Evaluation of four commercial biuret reagent kits of serum total protein by the American Association for Clinical Chemistry reference measurement procedure. **Clin Chem Lab Med.** Vol. 6, p. 989-92, 2011.

HELED Y, FLEISCHMANN C, EPSTEIN Y. Cytokines and their role in hyperthermia and heat stroke. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**. Vol.24, p.85-96, 2013.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HEPPER, I. et al. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. **J Immunol**. vol.188, p.4590–4601, 2012.

HERTER, J., ZARBOCK, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. **J Immunol**.,vol. 190, p.4451-7, 2013.

HEYWOOD, V.H. Flowering Plants of World. **Batsford**, London, 1993.

HICKEY MJ, KUBES P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. **Nat Rev Immunol**. vol. 5, p. 364-75, 2009.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Eicosanoids in inflammation. **Annals of Clinical Research**, v. 16, p. 287–299, 1984.

HU, G. p120-Catenin: a novel regulator of innate immunity and inflammation. **Crit Rev Immunol**., vol. 32(2): p. 127–138. Jan 2013.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C.A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**. vol.39, p.1786–1800, 2009.

KANG, S.S.; RYU, Y.H.; BAIK, J.E.; YUN, C.H.; LEE, K.; CHUNG, D.K.; HAN, S.H. Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* induces nitric oxide production in the presence of interferon- γ in murine macrophages. **Molecular Immunology**. Vol.48, p.2170– 2177, 2011.

KATZUNG, B. G., 2003. **Farmacologia básica e clínica**. 9 ed. MacGraw-Hill Medical: USA 1088, 2003.

KEEVIL B.G.; KILPATRICK, E.S., NICHOLS, S.P. MAYLOR, P.W. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. **Clin. Chem.**, vol. 44, p. 15-35, 1998.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, p. 159-175, Mar 2013.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B. *et al.* Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492-504, Jun 2010.

KONATÉ, K.; BASSOLÉ, I.H.N.;HILOU, A.; AWORET-SAMSENY, R.R.R.; SOUZA, A.; BARRO, N.; DICK, M.H.; DATTÉ, J.Y.;BATCHI, B.M.Toxicity assessment and analgesic activity investigation of aqueous acetone extracts of *Sida acuta* Burn f. and *Sida cordifolia* L. (Malvaceae), medicinal plants of Burkina Faso. **Complementary and Alternative Medicine**, vol.12, 2012.

KONATÉ, K.; ZERBO,P.; OUÉDRAOGO, M.; DIBALA, C.I.; ADAMA, H.; SYTAR, O.; BRESTIC, M.; BARRO, N. Anti-nociceptive properties in rodents and the possibility of using polyphenol-rich fractions from *sida urens* L. (Malvaceae) against of dental caries bacteria. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**.vol.12, 2013.

KROHN, R.I. The colorimetric detection and quantitation of total protein. **Curr Protoc Cell Biol**. 2011.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 1, n. 2, p. 107-20, Apr 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Inflamação aguda e crônica. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. (eds.) Robbins e Contran. **Patologia – bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 43-77. 2010.

LABOW, M.A., NORTON, C.R., RUMBERGER, J.M., LOMBARD-GILLOOLY, K.M., SHUSTER, D.J., HUBBARD, J., BERTKO, R., KNAACK, P.A., TERRY, R.W., HARBISON, M.L.,. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. **Immunity**. Vol. 1, p. 709–720, 1994.

LANDOLFI R, MOWER RL, STEINER M. Modification of platelet function andarachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relationships. **Biochem Pharmacol** **33**: 1525-1530, 1984.

LEE, K.H.; CHOW, Y.L.; SHARMILI, V.; ABAS, F.; ALITHEEN, N.B.M.; SHAARI, K.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.H.; SYAHIDA, A. BDMC33, A Curcumin

Derivative Suppresses Inflammatory Responses in Macrophage-Like Cellular System: Role of Inhibition in NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. **Int. J. Mol. Sci.** Vol. 13, p. 2985-3008, 2012.

LEE, Y.G.; BYEON, S.E.; KIM, J.Y.; LEE, J.Y.; RHEE, M.H.; HONG, H.; WU, J.C.; LEE, H.S.; KIM, M.J.; CHO, D.H., CHO, J.Y. Immunomodulatory effect of *Hibiscus cannabinus* extract on macrophage functions. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 113, p. 62–71, 2007.

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

LEWIS, R.W.; BILLINGTON, R.; DEBRYUNE, E.; GAMER, A.; LANG, B.; CARPANINI, F. "Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies," **Toxicologic Pathology**, vol. 30, no. 1, pp. 66–74, 2002.

LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI, NOURSHARGH S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**. vol. 9 p. 678-89, 2007.

LIAO, J.C.; TSAI, J.C.; PENG, W.H.; CHIU, Y.J.; SUNG, P.J.; TSUZOKI, M.; KUO, Y.H. Anti-Inflammatory Activity of *N*-(3-Florophenyl)ethylcaffeamide in Mice. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 14, p. 15199-15211, 2013.

LIMA, I.O.; COSTA V.B.M; MATIAS, W.N.; DA COSTA, D.A.; ANTAS E SILVA, D.; AGRA, M.F.; SOUZA, M.F.V.S, LIMA, E.O.; BATISTA, L.M. Biological activity of *Herissantia crispa* (L.) Brizicky. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. vol.19, p. 249-254, 2009.

LIN, C. F.; TSAI, C. C.; HUANG, W. C. et al. IFN-gamma synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 746-755, Oct 15 2008.

LOH, T.P.; LEONG, S.M.; SETHI, S.K. High concentration of IgM- κ paraprotein causes over-estimation of serum total protein by certain biuret method. **Clin Chem Lab Med**. vol. 9, p. 205-7, 2013.

LOPEZ-LAZARO, M. Flavonoids as anticancer agents. structure-activity relationship study. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents** , v. 2, p. 691-714, 2002.

LOSCALZO J. The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor. **Circ Res**. vol.113, p.100-3, 2013.

LUM, G.; LEAL-KHOURI, S. Significance of low serum urea nitrogen concentrations. **Clin. Chem**. vol. 35, p. 1630-40, 1989.

MAJNO, G. **The Healing Hand - Man and wound in the ancient world.** Cambridge, MA: Harvard University Press. 1975.

MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology.* New York: **Oxford University Press**, 2 ed, 2004.

MALECH HL, GALLIN JI. Current concepts: immunology-neutrophils in human diseases. *N Engl J Med.* vol. 317, p.687–94, 1987.

MAMBOLE, A.; BIGOT, S.; BARUCH, D. *et al.* Human neutrophil integrin alpha9beta1: up-regulation by cell activation and synergy with beta2 integrins during adhesion to endothelium under flow. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 2, p. 321-7, 2010.

MARCEAU, F.; REGOLI, D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 10, p. 845-852, Oct 2004.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European journal of immunology**, v. 25, n. 4, p. 947-51, Apr 1995.

MARINHO, M. G. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A. *et al.* *Amburana cearensis* e cumarina imunomodulam os níveis de anticorpos antígeno-específico em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 5, 2004.

MATIAS, W.N. Avaliação dos parâmetros Fitoquímicos e Tecnológicos para a padronização de extratos de *Herissantia tiuabe*(K.schum) Brizicky. 2013. 126f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa- PB, 2013.

MAURYA, M.R.; GUPTA, S.; LI, X.; FAHY, E.; DINASARAPU, A.R.; SUD, M.; BROWN, H. A.; GLASS, C.K.; MURPHY, R.C.; RUSSELL, D.W.; DENNIS, E.A.; SUBRAMANIAM,S. Analysis of Inflammatory and Lipid Metabolic Networks across RAW264.7 and Thioglycolate-elicited Macrophages. **J. of Lipid Research**, vol.54, p.2525-42, 2013.

McEVER RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. **Curr Opin Cell Biol**;v. 6, p. 14:581, 2002.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n.6, p. 771-6, 2010.

MISTRY, S.; DUTT, K.R.; JENA, J. Protective effect of *Sida cordata* leaf extract against CCl₄ induced acute liver toxicity in rats. **Asian Pac J Trop Med.** vol. 6, p.280-4, 2013.

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E. et al. Modulation of prostaglandin MORI, T.; MIYAMOTO, T.; YOSHIDA, H. *et al.* IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6- STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. **International immunology**, v. 23, n. 11, p. 701-12, 2011.

MOZZINI-MONTEIRO, T. Estudo da atividade psicoimunomoduladora do extrato de *Herissantia tiubae* em modelos experimentais de asma. 2013. Dissertação de Mestrado Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB.

MUKINDA, J. T., SYCE, J. A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afrainrodents*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 138-144, 2007.

MUROTA, K.; TERRÃO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

NASSERI, F., EFTEKHARI, F. Clinical and Radiologic Review of the Normal and Abnormal Thymus: Pearls and Pitfalls. **RadioGraphics**; vol 30., p.413–428, 2010.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Rev. Immunol.** 6, 173–182, 2006.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature** 420, 846–852, 2002.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-82, 2010.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13725-13728, May 13 1994.

NECAS, J., BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, vol. 58., p. 187–205, 2013.

NODA, M.; KARIURA, Y.; AMANO, T. et al. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. **Life sciences**, v. 72, n. 14, p. 1573-1581, 2003.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **TRENDS in Immunology**, v.26, p. 158 – 165, 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiology Reviews, Bethesda**, v. 87, p. 315-424, 2007.
PADMANABHAN J., GONZALEZ A. L. The Effects of Extracellular Matrix Proteins on Neutrophil-Endothelial Interaction — A Roadway To Multiple Therapeutic Opportunities. **Yale journal of biology and medicine.**, p.167-185., 2012.

PAIVA, D.C.; DOS SANTOS, C.A.; DINIZ, J.C.; VIANA, F.A.; THOMAZZI, S.M.; FALCÃO, D.A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar. **J Ethnopharmacol.** vol.149, p.416-21, 2013.

PAIVA, F. P., MAFFILI, V. V., SANTOS, A. C. S., Curso de manipulação de animais da Fundação Oswaldo Cruz. 28: 12-24, 2005.

PARK, J.W.; KWON, O.K; JANG, H.Y.; JEONG, H; OH, S.R.; LEE, H.K.; HAN, S.B.; AHN, K.S. A Leaf Methanolic Extract of *Wercklea insignis* Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Blocking the NF-κB Signaling Pathway in RAW 264.7 Macrophages. **Inflammation.** vol. 35, 2012.
PEREIRA, J.V. **Bioquímica Clínica.** 2ed. João Pessoa-PB. Ed. Universitária, 2008.

PEREIRA, N.P.; MIGUEL, O..G.; MIGUEL, M.D. Composição química do óleo fi xo obtido dos frutos secos da [Chamomilla recutita (L.) Rauschert] produzida no município de Mandirituba, PR. **Rev. Bras. de Farmacognosia.** vol. 15(4). p. 334-337, 2005.

PEREIRA, R. L.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 31-37, Jun 1999.

PETRI, B., PHILLIPSON, M. & KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an *in vivo* perspective. **J. Immunol.** vol.180, p.6439–6446, 2008.

PHILLIPSON, M. & KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Med.** vol.17, p.1381–1390, 2011.

PHILLIPSON, M. *et al.* Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J. Exp. Med.** vol.203, p.2569–2575, 2006.

PHILLIPSON, M., KAUR, J., COLARUSSO, P., BALLANTYNE, C. M. & KUBES, P. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. **PLoS ONE.** Vol.3, p1649, 2008.

PILLINGER, M. H.; CAPODICI, C.; ROSENTHAL, P. *et al.* Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14540-14545, Nov 24 1998.

PITA, J. C. L. R. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do Trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae). 2010. Dissertação de Mestrado Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa-PB.

PLAPER, A.; GOLOB, M.; HAFNER, I.; OBLACK, M.; SOLMAJER, T.; JERALA, R. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 530-536, 2003.

POBER, J. S., SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Rev. Immunol.** 7, 803–815, 2007.

QI, L. H.; KANG, L. P.; ZHANG, J. P.; SHI, N.; ZHANG, M.; WU, T. M. Antifibrotic effects of genistein and quercetin *in vitro*. **Yao Xue Xue Bao**, v. 9, p. 648-651, 2001.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAHN, K. H.; HEIDENREICH, S.; BRUCKNER, D. How to assess glomerular function and damage in human. **J. Hypertens.** vol. 17, p. 309-317, 1999.

RAHNAMA, I.M.S.; VAN KERREBROECK, P.E.V.; DE WACHTER, S.G.; VAN KOEVERINGE, G.A. The role of prostanoids in urinary bladder physiology. **Nature Reviews - Urology**. v.9, p.283-291, 2012.

RAMESH, G.; MACLEAN, A.G.; PHILIPP, M.T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators Inflamm**. vol.2013, 2013.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. "Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice," **Scientia Pharmaceutica**, vol. 70, no. 2, p.135–145, 2002.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M.M. BHARAT B. Aggar wal Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine** , v. 49, p. 1603 - 1616, 2010.

RIBEIRO, R. A. et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **International Archives Allergy and Immunology**, Basel, v. 112, n. 1, p. 27-35, 1997.

ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation. **Handbook of experimental pharmacology** Eds. Vane, Jr.; Ferreira S.H., New York: Springer-Verlag, p. 6-25,1978.

ROSEN, S.D. Ligands for I-selectin: homing, inflammation, and beyond. **Annu. rev. immunol.** vol 22, p.129–56, 2004.

RUSLAN MEDZHITOV. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 454: 428-435, 2008.

SAAD, B. Safety of traditional Arab herbal medicine. Evidence – based Complementary and Alternative Medicine. **Oxforg**, v. 3, n. 4, p. 433–439, 2006.

SADIK, C. D.; LUSTER, A.D. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. **J Leukoc Biol.** vol.91, p.207-15, 2012.

SADIK, C.D.; SEZIN, T.; KIM, N.D. Leukotrienes orchestrating allergic skin inflammation. **Experimental Dermatology**. vol. 22, p. 705–709, 2013.

SAID-SADIER, N.; OJCIUS, D.M. Alarmins, Inflammasomes and Immunity. **Biomed J.** Vol. 35, p.447-449, 2012.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteroides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. . In: (Ed.). **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, 2003.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHMIDT, S.; MOSER, M.; SPERANDIO, M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. **Molecular Immunology**. Vol. 55, p. 49– 58, 2013.

SEDGWICK, A. D.; MOORE, A. R.; AL-DUAIJ, A.; WILLOUGHBY, D. A. Studies into the association between leucocyte accumulation and edema formation. **Agents Actions**. V. 17, p. 209 - 213, 1985.

SEPIASHVILI, R.I.; BALMASOVA, I.P.; STAURINA, L.N. [Serotonin and its immune and physiological effects]. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova**. vol.99, p.17-32, 2013.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 101–137, 2007.

SHAH, N.A.; KHAN, M.R.; AHMAD, B.; NOUREEN, F.; RASHID, U.; KHAN, R.A.; Investigation on flavonoid composition and anti free radical potential of *Sida cordata*. **BMC Complement Altern Med**. Vol. 13, 2013.

SHAW, D. Toxicological Risks of Chinese Herbs. **Planta Med**; vol.76, p.2012–2018, 2010.

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, I. J.; DUNCAN, H. W. E.; LAY, D. C.; MENCH, J. A. .; O'CONNOR, C. E.; PETHERIC, J. C. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 8, p. 291-305, 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA DA, CHAVES MCO, COSTA DA, MORAES MRR, NÓBREGA FBP, SOUZA MFV. Flavonoids from *Herissantia tiubae*. **Pharm Biol** **43**: 197–200, 2005a.

SILVA DA, COSTA DA, SILVA DF, SOUZA MFV, AGRA MF, MEDEIROS IA, BARBOSA-FILHO JM, BRAZ-FILHO R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo. **Rev. Bras. Farmacognosia**: **15** 23-29, 2005b.

SILVA, A. C. O.; OLIVEIRA, A. F. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SILVA, S. I. An approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some Malvaceae species. **Biochemical Systematics and Ecology**. vol. 38, p.1035–1038, 2010.

SILVA, D. A.; FALCÃO-SILVA, V. S.; GOMES, A. Y. S.; COSTA, D. A.; LEMOS, V. S.; AGRA, M. F.; BRAZ-FILHO, R.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; SOUZA, M. F. V. Triterpenes and phenolic compounds isolated from the aerial parts of *Herissantia tiubae* and evaluation of 5,49,-dihydroxy-3,6,7,8,39-pentamethoxyflavone as a modulator of bacterial drug resistance. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 128-133, 2009.

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

SIMÕES, C. M. O; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J.R. Plantas de medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1986.

SIMPSON, M.G. Plant Systematics. **Elsevier Academic Press**, San Diego, 2006.

SOUSA, L. P.; LOPES, F.; SILVA, D. M. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 895-904, May 2010.

STERANKA LR, MANNING DC, DEHAAS CJ, et al. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. **Proc Natl Acad Sci USA.**; vol.85, p.3245-9, 1988.

SUNDD, P.; POSPIESZALSKA, M. K.; CHEUNG, L. S. et al. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**, v. 48, n. 1, p. 1-35, 2011.

TAKESHI T, KEISUKE N, TAKAAKI I, MAKOTO Y, TATSUJI N. Involvement of adhesion molecule in in vitro plaque-like formation of macrophages stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. **J Periodont Res**; vol.45, p. 550–556, 2010.

TARBODA, C., MEHNERT, D.U, SILVA C. A. **Manual de Normas Técnicas do Biotério de Experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédica – USP.** 24: 22-23, 2004.

TCHERNYCHEV, B.; FURIE, B.; FURIE, B.C. Peritoneal macrophages express both P-selectin and PSGL-1. **The Journal of Cell Biology.** Vol. 163, 2003.

TIM, M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55-63, 1983.

TRUEBA GP, Sanchez GM. Los flavonóides como antixodantes naturales. **Acta Farm Bonaerense** 20: 297-306, 2001.

TRUEBA GP. Los flavonóides: antioxidantes o prooxidantes. **Rev Cubana Invest Biomed** 22: 48-57, 2003.

TSUCHIYA H, SATO M, MIYAZAKI T, FUJIWARA S, TANIGAKI S, OHYAMA M, TANAKA T, IINUMA M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Ethnopharmacol.** vol. 50, p.27-34, 1996.

TSUJI, R.F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N.M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. Suppression of allergic reaction by carrageenan: Toll-like receptor 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clin Exp Allergy.** vol. 33, p.249-258, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. de Ciên. Farm.** vol. 42, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*. Vol 3(2), 93-98, 2006.

VASUDEVAN, M.; GUNNAM, K.K.; PARLE, M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Thespesia populnea* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 109, p. 264–270, 2007.

VEIGA –JUNIOR, V.F; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**. Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VESTWEBER D. Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. **Immunol Rev**. v. 96, p. 218:178, 2007.

VOEHRINGER, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, p. 362-375, Apr 2013.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.

WANG, H. K. The therapeutic potential of flavonoids **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 2103-2119, 2000.

WILLIAMS, M. R.; AZCUTIA, V.; NEWTON, G.; ALCAIDE, P.; LUSCINSKAS, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. Innate immune cell trafficking. **Trends in Immunology**. vol. 32, p. 461-69, 2011.

WOODFIN, A. *et al.* The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils *in vivo*. **Nature Immunol**. vol.12, p.761–769, 2011.

YAKUGAKU Z. et al. [Roles of histamine in the pathogenesis of bronchial asthma and reevaluation of the clinical usefulness of antihistamines]. **The pharmaceutical society of Japan**. vol. 131, p.185-91, 2011.

YOKOZI, K. **Men-eki No Byori**, Edited by MIHASHI, S.; AIZAWA, M.; HANAOKA, M. Asakura, Tokyo, 1973.

YOSHIMURA, A., SUZUKI, M., SAKAGUCHI, R., HANADA, T., YASUKAWA, H. SOCS, inflammation, and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**. v. 3, 2012.

YU, F.; YU, F.; MCGUIRE, P.M.; WANG, R. Effects of Hydrocotyle sibthorpioides extract on transplanted tumors and immune function in mice. **Phytomedicine**. vol. 14, p. 166-171, 2007.

YUEN, M.-F.; TANAKA, Y.; FONG, D. Y.-T. "Independent risk factors and predictive score for the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B," **Journal of Hepatology**, vol. 50, no. 1, pp. 80–88, 2009.

YUNG S, CHEUNG KF, ZHANG Q, CHAN TM. Mediators of Inflammation and Their Effect on Resident Renal Cells: Implications in Lupus Nephritis. **Clin Dev Immunol**. Vol.2013, 2013.

ZAKARIA, Z. A.; PATAHUDDIN, H.; MOHAMAD, A. S. et al. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of Piper sarmentosum. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 42-48, Mar 2 2010.

ZARBOCK, A., LEY, K., MCEVER, R. P. & HIDALGO, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood**. vol. 118, p.6743–6751, 2011.

ZUANAZZI JAS, MONTANHA JA. FLAVONÓIDES. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 577-614, 2004.

ANEXOS

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I D ã O

João Pessoa, 18 de novembro de 2012.

CEUA N° **0508/12**

Ilmo(a). **Prof(a) Dr(a) Márcia Regina Piuvzam**

Departamento **Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS - UFPB**

Orientando(a): **Ana Luísa de Araújo Lima, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **16/11/12** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO DA *Herissantia tiubae* NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO.**

Com previsão de empregar **444 (Camundongos, linhagens Swiss).**

Provenientes de **ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **15/08/12 a 01/02/14**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Standardization of *Herissantia tiubae* extract by high-performance liquid chromatographic method and evaluation of toxicity of hydroalcoholic extracts.

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID:	PLAMED-2013-09-0925-OP
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	04-Sep-2013
Complete List of Authors:	de Souza, Maria de Fátima; University of Paraíba, Department of Pharmaceutical Science Matias, Wemerson; University of Paraíba, de Araújo Lima, Ana; University of Paraíba, Monteiro, Talissa; University of Paraíba, Dantas de Andrade, Fabricio; University of Paraíba, Souza, Fábio; University of Paraíba, Piuvezam, Marcia; University of Paraíba,
Keywords:	Herissantia tiubae, Malvaceae, hydroalcoholic extracts, standardization, evaluation, toxicity

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Standardization of *Herissantia tiubae* extract by high-performance liquid**
4 **chromatographic method and evaluation of toxicity of hydroalcoholic extracts.**
5
6
7
8
9

10 **Wemerson Neves Matias¹; Ana Luisa de Araújo Lima¹; Talissa Mozzini**
11 **Monteiro¹; Fabricio Havy Dantas de Andrade²; Fábio Santos Souza².Marcia**
12 **Regina Piuvezam¹; Maria de Fátima Vanderlei de Souza^{1*}**
13
14
15
16
17

18 **Affiliation**

- 19
20
21
22 1- Post-Graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive / CCS /
23 University of Paraíba, Campus I, University City, João Pessoa, PB 58059-
24 970,Brazil.
25
26
27 2- - Department of Pharmaceutical Sciences, Unified Laboratories of
28 Pharmaceutical Development and Assays, Federal University of Paraíba,
29 Campus I, University City, João Pessoa, PB 58059-970, Brazil.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Correspondence**

41
42 Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Department of Pharmaceutical
43 Science, University of Paraíba, João Pessoa, Zip Code 58059-970, Email:
44 mfvanderlei@lft.ufpb.br
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Plant extracts with complex phytochemical mixtures may have several advantages over single molecules for the treatment of several diseases including low or absent toxic side effects. This study aims to develop and validate an analytical methodology for HPLC for standardization of the hydroalcoholic extract (EHT) from *Herissantia tiubae* and to analyze the possible toxic effects induced after oral treatment in mice. For the chromatographic method validation, the selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness parameters were analyzed and in order to analyze toxicity, we analyzed biochemical and hematological parameters and cytotoxicity. The method was precise, accurate, selective and robust, according to the parameters tested. The oral acute treatment with EHT did not cause death or behavioral changes in the analyzed animals (male and female) as well as no difference in animal weight and feed intake. The organ indexes (heart, liver, kidneys, spleen and thymus) among the animal groups were similar with no significant changes in renal (urea, creatinine and uric acid) and liver parameters (transaminases activity of ALT and AST). Also, there were no significant changes in biochemical parameters. Based on these results, we conclude that a selective, precise, robust and accurate HPLC–UV method has been developed for the standardization and quantification of kaempferol in *Herissantia tiubae* extract and no toxic effect was observed in EHT-orally treated animals.

Keywords:

Herissantia tiubae Malvaceae, hydroalcoholic extracts, standardization, evaluation, toxicity.

Introduction

In recent decades, medicinal plants in modern medicine are giving important contributions to health care. According to the World Health Organization, 80% of the world population still depends on herbal and medicinal plants to have their primary health care needs. [1]

The toxic or low toxic effects of modern medicines for many chronic diseases such as diabetes, heart diseases, cancer and psychiatric disorders have increased the interest in studying alternative drugs and the herbal plants have been the goal of several studies nowadays. Therefore, the recent interest in medicinal plants and herbal medicines made it necessary to develop and establish well designed methodologies for raw materials standardization and herbal formulations as a way to ensure their quality, safety and efficacy. The World Health Organization emphasizes the importance of qualitative and quantitative methods for the quantification of biomarkers and /or chemical markers to characterize the samples.[2]

Brazil stands out as the first among the countries with the greatest plant diversity in the world, along with Mexico, Colombia, Zaire, Madagascar, Indonesia, China, Costa Rica, Ecuador, Kenya, Peru, South Africa, Venezuela and India. The so-called "green gold" is available in Amazon ecosystems (25 to 30 thousand species), Mata Atlântica (16,000 species), Cerrado (7000 species), the others being distributed in the Brazilian Caatinga and Pantanal. [3]

In this context of plants, the Malvaceae family, which comprised 250 genera and 4.230 species and exists all over the world, mainly in South America, presented therapeutic potential. Many species of this family are used in folk medicine to treat fever, inflammation rheumatism and as emollients and diuretics.[4].

Phytochemical studies of species of Malvaceae have described the isolation of fatty acids, sesquiterpenelactones, triterpenes and flavonoids, among many other compounds [5-13]. In previous publications concerning *Herissantia tiubae* **K L Schum Brizicky** (Malvaceae), we described the isolation and structural identification of four polyoxygenated flavonoids [12] to which a broad spectrum of

1
2
3 biological activities have been attributed [14]. We also isolated two flavonol
4 glycosides, kaempferol 3,7-di-O- α -L-l-rhamnopyranoside and kaempferol 3-O- β -D-
5 (6''-E-p-coumaroyl) glucoside [13]. Kaempferol 3, 7-di-O- α -L-l-rhamnopyranoside
6 that presented a relaxing effect over the superior mesenteric artery suggesting a
7 possible cardiovascular effect [13]. Cycloeucaleanol and cycloartenol, previously
8 isolated from *H. tiubae*, also showed a muscle relaxant effect in the ileum of the
9 guinea-pig. [15]
10

11
12
13
14 Taken the pharmacological and phytochemical data from *Herissantia tiubae*, the
15 aim of this study was to develop the standardization of the hydroalcoholic extract
16 (EHT) from the plant through an analytical methodology for high performance liquid
17 chromatography (HPLC), with kaempferol being the chemical marker in the *H.*
18 *tiubae* extract as well as to analyze the possible toxic effect of the extract *in vivo* and
19 *in vitro*.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results and Discussion

The mobile phase chromatograms, the sample of standard USP Kaempferol and the extracts used are illustrated in figure 1 (1a-1c). The data showed no significant interference at the retention time of kaempferol (15 min) and it can be observed that the method showed a relatively satisfactory resolution (R) of the marker from its neighboring peaks in the chromatogram of the *H. tiubae* extract (Fig. 1c) and maintained their appearance when compared, showing no co-eluting interferences. The linearity calibration curve was linear over the proposed range (0.4–7.6 µg/mL), as by linear regression coefficients of average curve ($r^2 = 0.9996$) (Fig. 2) demonstrating an acceptable data fit to the regression line. Statistical analysis of linear regression (F-test) demonstrated the statistical significance of the linearity of the method. Plotting the values in the residue graph, it was observed that a curvilinear effect fits into the quadratic model, and the observed values are very close to the predicted values.

The sensitivity of the kaempferol method was expressed as the slope of the analytical curve, and as the LOD and LOQ values of 0.17 and 0.56 µg/mL, respectively. The standard in the spiked sample accuracy was evaluated at three levels: 26.5, 45.9 and 62.7 µg/mL for kaempferol, with recoveries of approximately 99%, with no statistical difference by the F test ($p < 0.05$) and RSD% 1.3% in all determinations of the recovery test (Table 1). The method showed good accuracy at low, medium and high level concentrations for the marker, within the linearity of the method. This validation parameter showed good reliability in determining the marker level in the extract of *H. tiubae* extract.

The precision calculated as the CV% was always below 5%. In the analyzes of the intra-day CV, the method ranged from 2.6% - 3.2%, while in the inter-day, this coefficient was 0.5% (Table 2), these results are in accordance with the criteria established by the National Agency for Sanitary Vigilance (ANVISA) for reproducibility, showing the high precision of the method, which can be reproduced with low variation in the results.

The robustness of the method was analyzed by small, deliberate variations in mobile phase flow (1.1, 1.2 and 1.3 mL /min), oven temperature (48, 50 and 52°C), and

1
2
3 pH of aqueous phase (1.5, 1.6 and 1.7) as shown in Table 3. The values obtained with
4 changes in methodology did not show significant variations when compared to the
5 proposed methodology. With a confidence interval of 95%, compared to average values,
6 it can be considered a robust method in terms of the variables analyzed.
7
8

9
10 The oral acute treatment with Eht did not induce death or behavioral changes in
11 the analyzed animals (male and female) as well as no difference in animal weight and
12 feed intake (Table 4). However, it was observed a significant increase in water
13 consumption in the female treated group as compared to the female control group. The
14 organ indexes (heart, liver, kidneys, spleen and thymus) among the animal groups were
15 similar with no significant changes (Table 4).
16
17

18
19 No significant changes in renal (urea, creatinine and uric acid) and liver
20 parameters (enzymatic activity of transaminases ALT and AST) were observed in the
21 treated animals as compared with the control animals. Also, there were no significant
22 changes in other biochemical parameters (total cholesterol, triglycerides, total protein
23 and albumin). However, it was observed a statistical significance ($p < 0.05$) in the
24 glucose reduction in the female treated group. Regarding hematological evaluation,
25 there were no significant changes in parameters such as mean corpuscular volume
26 (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular
27 hemoglobin (MCH) between the treated and control groups. There were also no
28 significant changes in the number of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin and
29 hematocrit (Table 5 and Table 6).
30
31
32
33
34
35
36
37

38
39 *In vitro* analyzes showed that Eht at concentrations ranging from 6.25 to 50 $\mu\text{g} /$
40 mL were not toxic for LPS-activated and -non activated macrophages and these
41 concentrations decreased NO (nitric oxide) production by activated macrophages
42 (Figure 3 and 4). However, Eht at 400, 200 and 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ were toxic in both LPS-
43 activated and non-activated cells (Figure 3). To better analyze the effect of the extract in
44 cultured cells it will be necessary to use concentrations bellow 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. An
45 interesting result obtained in this study was that Eht decreased the amount of NO from
46 activated macrophages. NO is generated by several type of cells including monocytes,
47 macrophages, and neutrophils as part of the immune response. These cells are armed
48 with inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO secreted as an immune response is
49 as a free radical and is toxic to bacteria. The toxic mechanism includes DNA damage
50 [16-17] and degradation of iron sulfur centers into iron ions and iron-nitrosyl
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 compounds [17]. Therefore, the inhibition of NO production by macrophages indicates
4 an immunomodulatory effect of the extract.
5

6 These studies indicated that Eht was not toxic to Swiss mice when administered
7 orally. The analyzed parameters were the percentage of death, feed and water intake,
8 biochemical and hematological parameters and behavioral changes. In addition, *in vitro*
9 studies showed that Eht until a concentration of 100 µg / mL was not toxic to the cells
10 and also decreased the amount of NO in activated macrophage.
11
12

13 Based on the data presented, it can be concluded that a selective, precise, robust
14 and accurate HPLC–UV method has been developed for quantifying kaempferol in
15 standardized extracts of *Herissantia tiubae*, which is useful for future studies as a
16 medicinal plant and/or vegetable derivative and to produce a phytomedicine based on
17 *Herissantia tiubae* also, its extract was not toxic *in vivo* as well as *in vitro* and decreased
18 the amount of NO produced by LPS-activated macrophage.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Materials and Methods

Reagents and standards

All the solvents were HPLC grade (Tedia, Fairfield, Ohio, USA) and were degassed by helium gas. The water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Massachusetts, USA). All the solutions were filtered through a 0.45 µm membrane (Millipore, Massachusetts, USA). The standard employed in the analyses was kaempferol (97% pure) by Merck, Brazil.

Plant material.

The plant material was collected in January 2010 in the city of Juazeirinho, in Paraíba, Brazil. It was identified by Maria de Fatima Agra from the University of Paraíba/Brazil. A voucher specimen (n°. 2434) is deposited in the Herbarium Lauro Pires Xavier-JPB at the same University. The botanic material was dried at 40 °C in a circulating air oven and ground to powder.

Preparation of hydroalcoholic extract.

The dried and pulverized material of *H. tiubae* (1kg) to 491 microns was submitted to exhaustive extraction by maceration with ethanol-water (70:30) at room temperature, with plant:solvent ratio of 20:80 (w/v) and in the final extraction process the solution was filtered in filter paper.

HPLC analysis

A Shimadzu Proeminence LC-20AT LC system (Shimadzu, Tokyo, Japan), consisting of a binary pump and a Shimadzu SPD- M20A photodiode array detector, SIL-20AHT auto-sampler, DGU- 20A5 in-line degasser and software Class VP (version 6.14), was used. The injections (10 µL) were carried out on a Phenomenex (Torrance, California, USA) Luna C18 5 mm (250-4.6 mm) conditioned in a Shimadzu CTO-10AS VP column oven equilibrated at 50°C, with detection at 210 and 370nm. For the method development, different solvent systems were assayed in isocratic and

1
2
3 gradient conditions using methanol and acidified water (pH 1.6 with phosphoric acid),
4 at 1.2 mL min⁻¹. The best gradient was chosen: gradient methanol (A): acidified water
5 pH 1.6 with (B): phosphoric acid of 47:53 (A: B) (15min); 80:20 (7min), maintaining
6 this composition until 30 min then returning to the initial conditions for a further 5 min.
7
8

9
10 At least five individual injections of kaempferol Standard Solution were
11 performed before all the measurements to assess the suitability parameters, including
12 resolution (R) between kaempferol and neighboring peak of (R>1.0), tailing factor (T)
13 of kaempferol< 1.5 and repeatability of the kaempferol peak area (RSD% < 2.0).
14
15
16

17 **Sample preparation**

18
19 Samples of *Herissantia tiubae* extracts were analyzed by adding 1 mL of extract
20 to 2 mL of Hexane. The mixture was then subjected to vortex for 2 min. and then
21 centrifuged for 10 min. After hexane phase was done, 3 mL of dichloromethane were
22 added to 500 µL of the resulting extract, which was subjected to vortex for 2 min. and
23 centrifuged for 10 min. This process was repeated 3 times, resulting in 9 mL of
24 dichloromethane phase. Four mL of this phase were evaporated in a water bath and
25 reconstituted in 2 mL of methanol, filtered, transferred to a vial and brought to HPLC
26 analysis.
27
28
29
30
31
32
33

34 **Standard solution**

35
36 Kaempferol stock solutions were prepared by dissolving the reference standard
37 in methanol-water (70:30 v/v), sonicated for 20 min, and measured for the concentration
38 of 200µg/mL to the mother solution. This solution was diluted with methanol-water to
39 produce a working solution (4µg/mL) for assay of the samples.
40
41
42

43 The standard solutions for linearity were prepared through successive dilution
44 with methanol until the concentrations of 0.4, 0.6, 1.6, 2.8, 4.0, 5.2, 6.4 and 7.6 µg / ml
45 from the stock solution of 200 µg/mL. All solutions were freshly prepared and filtered
46 through a 0.45mm modified PTFE membrane (Millexs), prior to injection into the
47 chromatograph.
48
49
50

51 **HPLC–UV method validation**

52
53 The method was validated according to the ICH guidelines (2005) and the
54 Brazilian legislation. [18]
55
56
57
58
59
60

Selectivity tests

The selectivity of the HPLC method was evaluated by comparison between the chromatogram of a blank (methanol: water 47:53 v/v), the mobile phase, the standard sample solution and the sample extract solution to detect any co-elution interferences.

Linearity, LOD and LOQ.

Linearity was evaluated through analytical curves using the procedure indicated in section 2.4.2. Three sets of eight different calibration solutions were injected into the chromatographic system by a single injection, after filtration through a 0.45mm modified PTFE membrane. These solutions were prepared in triplicate, and injected into the chromatographic system after filtration through a 0.45mm modified PTFE membrane. A 24-point analytical curve was plotted and statistically evaluated for each solution. The Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were mathematically determined through the calibration curve.

Accuracy

The accuracy of the method was measured through the analytic recovery test in six times. Standard concentrations of about 2.3, 11.4 and 20.5 $\mu\text{g/mL}$ for kaempferol were added to the sample solution. The kaempferol recovery was calculated after discounting the analytic area present in the sample solution without the addition of KA. The solutions were prepared in triplicate and injected after filtration through a 0.45mm modified PTFE membrane.

Precision

Repeatability (intra-day trials) of the method was evaluated by six determinations of the sample solution on the same day. The intermediate precision (inter-day) was performed on three consecutive days by different analysts, with six determinations on the same day. Studies of intra-day and inter-day coefficients were determined by the variance (CV%) as recommended by Resolution 899 of 2003 of ANVISA. [19]

Robustness

The robustness of the chromatographic method, related to the R and assay of kaempferol in the sample, was evaluated by changing: (i) the mobile phase flow (1.1, 1.2, 1.3 mL/min), (ii) the mobile phase pH (1.5, 1.6 and 1.7), (iii) the oven temperature of column (48, 50 and 52 °C). For each of the above conditions, the sample solution and the standard solution (prepared as described in Section 2.4.1 and Section 2.4.2) were injected (triplicate) after filtration through a 0.45mm modified PTFE membrane. The data were evaluated using single-factor analysis of variance (ANOVA) ($p < 0.05$).

Acute toxicological test

All experiments on animals were performed in accordance with the recommendations of Commission of Ethics for Use of Animals (CEUA) from Universidade Federal da Paraíba, which was recorded under number 0508/12.

Male ($n=6$) and female ($n=6$) Swiss mice (*Mus musculus*), 6-8 weeks (25-30g) provided by Prof. Thomas George vivarium (UFPB) were used for the acute toxicological tests [18]. Groups of animals were treated orally with *Herissantia tiubae* extract (EHt) at dose of 2000 mg/kg or received vehicle (Tween 20 at 2% in distilled water). The animals were observed for signs of general toxicity in intervals of 0, 15, 30 and 60 min., 4 h and 24 h later and daily for 14 days. During these intervals of time, occurrence of central nervous system changes were analyzed: hyperactivity, irritability, aggressiveness, tremors, convulsions, catatonia, analgesia, anesthesia, ptosis, decreased touch response, ambulation, cleaning capacity, raise, and autonomic nervous system changes: diarrhea, constipation, defecation, urination, muscle tone, among others [20]. Throughout the experiment it was observed the consumption of water and food intake and weight gain. On day 14th, the treated animals and non-treated animals were euthanized by anesthetic: sodium thiopental (Thiopentax ®, Cristália - Pharmaceutical Chemicals) and some organs were removed: heart, liver, kidneys, spleen and thymus to

1
2
3 determine its indexes. The weight gain for each animal of the groups was determined
4 using the formula:
5

$$\begin{aligned} 6 & \quad \% \text{ of weight gain} = 100 \times \frac{\text{animal weight on last challenge}}{\text{Animal weight on first challenge}} \\ 7 & \\ 8 & \\ 9 & \end{aligned}$$

10
11
12 The index of the weight organs was calculated following the formula below:
13

$$\begin{aligned} 14 & \quad \text{Index} = \frac{\text{Organ weight (mg)}}{\text{Animal weight (g)}} \\ 15 & \\ 16 & \\ 17 & \\ 18 & \\ 19 & \\ 20 & \end{aligned}$$

21 **Evaluation of biochemical and hematological parameters**

22
23
24
25
26

27 On the 14th day animals from different groups, fasted for 6 h. Then, they were
28 anesthetized with sodium thiopental and orbital sinus blood was collected using a
29 heparinized Pasteur pipette and then transferred into two tubes (Eppendorff) for each
30 mouse. The blood was analyzed for hematological (erythrocyte and leukocyte counts)
31 and biochemical parameters (urea, creatinine, uric acid, alanine transaminase-ALT,
32 aspartate transaminase-AST, albumin, total protein, triglycerides, glucose and total
33 cholesterol).
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **Cytotoxic assay**

43
44
45
46

47 BALB/c mice (n=6) were elicited with intra-peritoneal injection of 2 mL of 3%
48 thioglycollate broth to obtain peritoneal macrophages. After five days, peritoneal lavage
49 was performed with 6 ml of RPMI 1640 medium without phenol red (4°C)
50 supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum - complete medium) and the cell
51 suspension transferred to a tube (Falcon). This suspension was centrifuged (1500 rpm,
52 10 min, 4 ° C), the pellet re-suspended in 5 ml of complete medium and counted using
53 trypan blue solution. Macrophages (4x10⁵) were placed in 96 well plates and incubated
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 for 4 h (5% CO₂ 37°C). After this period of time the plate was washed with PBS
4 solution (37°C) to remove non-adherent cells and added, to the wells of the plate,
5 different concentrations (400, 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/mL) of the Eht on
6 lipopolysaccharide (LPS) - stimulated or non-stimulated cells. The plate was incubated
7 (5% CO₂ at 37 °C) for 24h, the supernatant analyzed for the amount of NO with Griess
8 reagent [21] and the cell viability was analyzed by MTT assay. [22]
9
10
11
12
13
14
15

16 **Statistical analysis**

17
18 The acute toxicological results were analyzed by the Student t test in which
19 values are expressed as mean ± standard error of mean (SEM), and results were
20 considered significant when $p < 0.05$. The hematological data (n = 4-6) were analyzed
21 by Mann-Whitney test, comparing control and treated groups. The biochemical data (n
22 = 3-6) were analyzed by Student "t", as compared to the control group with treated
23 group. Data from *in vitro* toxicological testing were submitted to ANOVA *one way*
24 followed by Tukey post-test.
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Acknowledgements**

34 Thanks are due to CNPq financial support
35
36
37
38

39 **Conflict of Interest**

40 The authors declare no conflict of interest
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1 Kunle, Oluyemisi Folashade, Egharevba, Henry Omoregie and Ahmadu, Peter
2 Ochogu. Standardization of herbal medicines-A review. IJBC 2012; 4:101-112.
- 3 Rathod Shobhen, Patel N.M, Patel P.M . A review on modification of analytical
4 techniques in herbal research. IJRPA 2011; 2: 1483-1485.
- 5 Simões C.M.O. Farmacognosia: da Planta ao medicamento, first edition. Porto Alegre:
6 Florianópolis; 1999: 11-24
- 7 Ana Carolina Oliveira da Silva, Antônio Fernando Morais de Oliveira, Déborah Yara
8 Alves Cursino dos Santos, Suzene Izídio da Silva. An approach to chemotaxonomy to
9 the fatty acid content of some Malvaceae species, Biochemical Systematic and Ecology
10 2010; 38: 1035-1038.
- 11 Carmody DR, Dejong W, Smith TR. Buttonweed seed oil: A source of linoleic acid.
12 Oil & Soap 1945; 522: 263–265.
- 13 Vickery JR. The fatty acid composition of seed oils from ten plant families with
14 particular reference to cyclopropene and dihydrosterculic acids, JAOCS 1980; 57:87–
15 91.
- 16 Schimid KM, Patterson GW. Distribution of cyclopropenoid fatty acids in Malvaceous
17 plant parts, Phytochemistry 1988; 27: 2831–2834.
- 18 Nakatani M, Fukunaga Y, Hase T. Two aliphatic enone ethers from *Hibiscus rosa-*
19 *sinensis*, Phytochemistry 1986; 25: 449–452.
- 20 Ames JM, Macleod G. Volatile components of okra. Phytochemistry 1990; 29:1201–
21 1207.
- 22 Sharma PV, Ahmad ZA. Two sesquiterpene lactones from *Abutilon indicum*.
23 Phytochemistry 1989;28: 3525–3527.
- 24 Ahmed ZK, Kazmi SN, Malik AA. A new pentacyclic triterpene from *Abutilon*
25 *pakistanicum*. J Nat Prod 1990; 33: 1342–1344.
- 26 Silva D.A, Chaves M. C.O, Costa D.A, de Moraes M. R.R, da Nobrega F. B.P, Souza
27 M.F.V. Flavonoids from *Herissantia tiubae*, Pharmaceutical Biology 2005; 43: 197-200.
- 28 Silva D.A, Costa D.A, Silva D.F. Souza M. F.V, Agra M.F, Medeiros I.A, Barbosa-
29 Filho J.M, Braz-Filho R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum)
30 Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-
31 ramnopiranosídeo. Brazilian Journal of Pharmacognosy 2005; 15:23-29

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

¹⁴Chen J, Montanari AM, Widmer WW. Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anti-cancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids, *J Agr Food Chem* 1997;45:364–368.

¹⁵Gomes A.Y.S, Souza M.F.V, Cortes S.F, Lemos V.S. Mechanism involved in the spasmolytic effect of a mixture of two triterpenes, cycoartenol and cycloeucalenol, isolated from *Herissantia tiubae* in the guinea-pig ileum, *Planta Medica* 2005;71:1025-1029.

¹⁶Nguyen T; Brunson D, Crespi C.L, Penman B.W, Wishnok J.S, Tannenbaum S.R. "Dna damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 1992; 89: 3030–3034.

¹⁷Li C.Q, Pang B, Kiziltepe T, Trudel L.J, Engelward B.P, Dedon P.C, Wogan G.N. Threshold Effects Of Nitric Oxide-Induced Toxicity And Cellular Responses In Wild-Type And P53-Null Human Lymphoblastoid Cells. *Chem res toxicol* . 2006;19: 399–406.

¹⁸Hibbs, Jb; Taintor Rr, Vavrin Z, Rachlin. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*1988; 157: 87–94.

¹⁹ICH, Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology — ICH Harmonized Tripartite Guideline, Geneva 2005.

²⁰Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE 899, 29 May 2003, D.O.U.02/03/2003, Brasília 2003.

²¹Almeida R.N, Falcão A.C.G, Diniz R.S.T, Quintans -Júnior, L.J, Polari R.N, Barbosa-Filho J.M, Agra M.F, Duarte J.C, Ferreira C.D, Antonioli A.R, Araújo C.C.

Metodologia para avaliação de plantas com atividades no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 1990; 80: 72-76.

²²Green L.C, Wagner D.A, Glogowski J, Skipper P.L, Wishnok J.S, Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite an [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* 1982; 126: 131-138

²³Mosmam, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*1983; 65: 55-63.

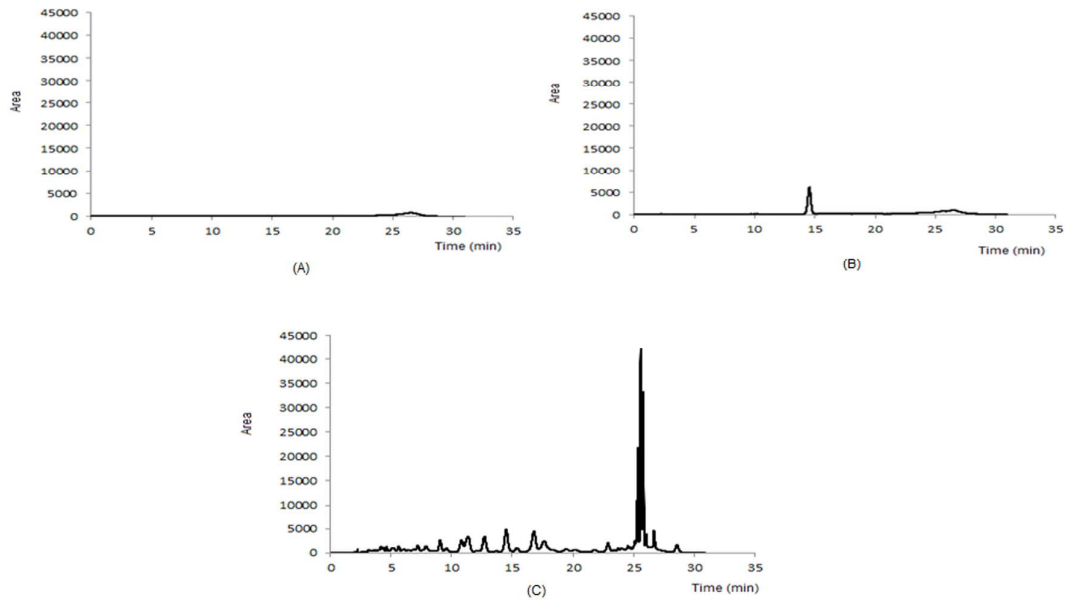
1
2
3
4
5 **Legends for Figures**
6
7

8 Figure 1: Chromatographic profile at 370nm of:(a) blank solution (methanol :water pH
9 1.6); (b) sample solution of standard USP Kaempferol ; (c) sample solution of extract of
10 *Herriantia tiubae.*;
11
12

13
14 Figure 2 : Calibration curves of Kaempferol at 370 nm
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

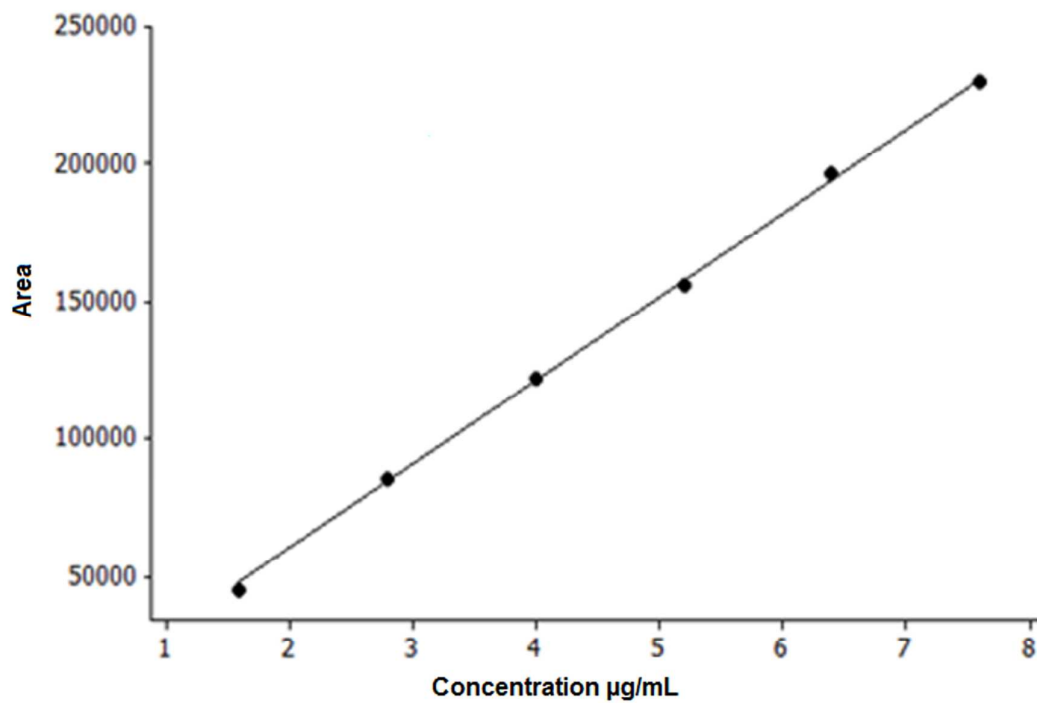
For Peer Review

Fig 1



Peer Review

Fig 2 -



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Supporting Information

Standardization of *Herissantia tiubae* extracts by high-performance liquid chromatographic method and evaluation of toxicity of hidroalcoholic extracts.

Wemerson Neves Matias¹; Ana Luiza de Araújo Lima¹; Talissa Mozzini Monteiro¹; Fabricio Havy Dantas de Andrade²; Fábio Santos Souza². Marcia Regina Piuvezam¹; Maria de Fátima Vanderlei de Souza^{1*}

Affiliation

- 1- Post-Graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive / CCS / University of Paraíba, Campus I, University City, João Pessoa, PB 58059-970, Brazil.
- 2- - Department of Pharmaceutical Sciences, Unified Laboratories of Pharmaceutical Development and Assays, Federal University of Paraíba, Campus I, University City, João Pessoa, PB 58059-970, Brazil.

Correspondence

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza, Departamento f Pharmaceutical Science, University of Paraíba, João Pessoa, Zip Code 58059-970, Email: mfvanderlei@lft.ufpb.br

Figure 3

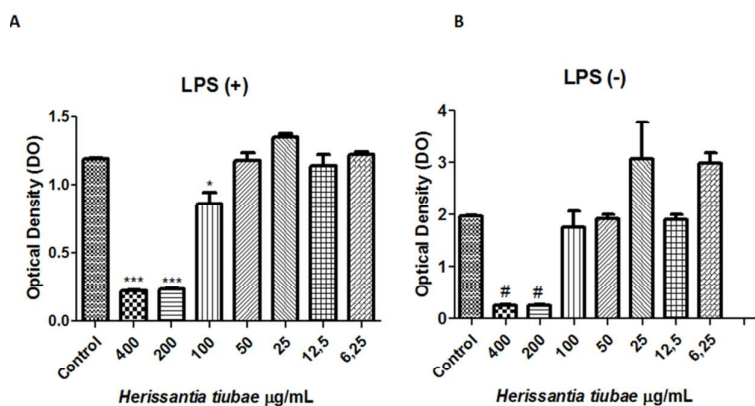


Figure 3: Analysis of the Eht cytotoxicity in murine peritoneal activated and non-activated macrophages. Murine peritoneal macrophages (4×10^5 cells / well) were cultured in RPMI supplemented with 10% SBF and treated with Eht (400, 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg / mL) and exposed (A) or not (B) to LPS of *Escherichia coli* (10 µg / mL). After 24 h incubation, the supernatant was removed and the cells incubated in complete medium with MTT (0.5 mg / mL) for 24 h. At the end, cells were lysed with DMSO and the formazan was solubilized in the cytoplasm. The graph represents mean \pm S.E.M. optical densities of cell lysate according to the treatments. Data were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey post-test.

*** p < 0.001 when compared to the groups treated with the control group exposed to LPS.

* p < 0.05 when compared to the groups treated with the control group exposed to LPS.

p < 0.05 when compared to the groups treated with the control group not exposed to LPS.

Figure 4

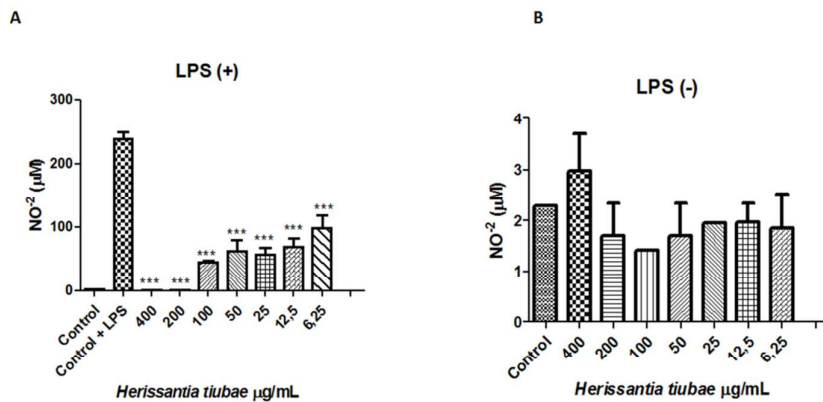


Figure 4: Analysis of the Eht effect on NO production by murine peritoneal activated and non activated macrophages. Murine peritoneal macrophages (4×10^5 cells / well) were cultured in RPMI supplemented with 10% SBF and treated with Eht (400, 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg / mL) and exposed (A) or not (B) to LPS of *Escherichia coli* (10 µg / mL). After 24 h incubation, the supernatant was removed for measurement of NO by the Griess method. The graph represents mean \pm S.E.M. concentrations of nitrite as a function of treatments. Data were analyzed by oneway ANOVA followed by Tukey post-test.

*** p < 0.001 when compared to the groups treated with LPS + control group.

Table 1: Accuracy Caenferol in 3 levels of Concentration

Level (%)	Nominal concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Accuracy			
		Area \pm SD	Concentration found	Accuracy %	CV %
120	27,29	84834 \pm 3084	26,54	97,06	3,64
200	45,48	154497 \pm 2881	48,34	105,67	1,86
280	63,67	193012 \pm 5378	60,4	96,25	2,79

Table 2: Coefficient of variance in percentage of inter-day studies by HPLC of kaempferol in hydroalcoholic extracts *Herissantia tiubae*.

Days	Area \pm SD	Concentration	Conc %	CV%
01	72307 \pm 1929	22,60	100	
02	72103 \pm 1595	22,74	99,72	1,82
03	69961 \pm 1568	21,71	96,75	

Table 3: Coefficient of Variance in percentage intra-day studies by HPLC of kaempferol in hydroalcoholic extracts *Herissantia tiubae* Coefficient of Variance in percentage intra-day studies by HPLC of kaempferol in hydroalcoholic extracts *Herissantia tiubae*

Replications	Area	Intra-day			
		Concentration $\mu\text{g/mL}$	Conc %	Average %	Average CV%
01	75259	23,5	104,08	100	2,7
02	73087	22,9	101,08		
03	71992	22,5	99,56		
04	70467	22,0	97,45		
05	70011	21,9	96,82		
06	73029	22,9	101		
01	73,131	22,9	101,14	99,72	2,6
02	74,312	23,2	102,77		
03	70,576	22,1	97,61		
04	72,877	22,8	100,79		
05	71,484	22,4	98,86		
06	70,240	22,0	97,14		
01	71,479	22,4	98,85	96,75	3,2
02	69,636	21,8	96,31		
03	67,065	21,0	92,75		
04	70,757	22,1	97,86		
05	70,891	22,1	98,04		
06	69,936	21,9	96,72		

Table 4. Parameters of toxicity in Swiss mice

Parameter (Unit)	Male (Control)	Male (EHt)	Female (Control)	Female (EHt)
Feed intake (g)	41,88± 2,98	38,13± 1,15	37,08± 2,73	42,79± 1,36
Water consumption (mL)	67,50± 3,89	59,29± 3,05	40,00± 4,42	52,29± 2,56*
Initial weight (g)	28,60± 1,26	25,50± 1,29	30,05± 0,98	28,17± 1,01
Final weight (g)	38,05± 3,22	39,98± 1,27	33,14± 2,31	33,15± 1,07
Weight gain (%)	41,06± 6,15	50,19± 5,03	14,43± 3,46	17,79± 1,48
Index heart (%)	3,93± 0,08	4,01± 0,17	4,136± 0,18	4,080± 0,16
Index liver (%)	61,27± 3,71	56,89± 1,11	56,53± 2,15	56,25± 1,78
Index kidneys (%)	12,66± 1,22	11,86± 0,99	11,09± 0,24	10,70± 0,32
Index spleen (%)	5,59± 0,21	6,45± 0,53	7,57± 0,59	6,97± 0,62
Index thymus (%)	2,94± 0,34	2,83± 0,24	3,33± 0,23	3,895± 0,27

Values are presented as mean ± standard error of mean.

* p<0,01 compared to control female (t Test)

Table 5. Hematological and biochemical parameters in Swiss mice

Parameters (Unit)	Male (Control)	Male (EHt)	Females (Control)	Females (EHt)
Red blood ($10^6/\text{mm}^3$)	9,28± 0,78	8,90± 0,43	8,15± 0,32	8,78± 0,14
Hemaglobin (g/dL)	13,77± 0,85	13,98± 0,23	12,82± 0,45	13,67± 0,24
Hematocrit (%)	43,30± 2,82	44,54± 1,48	39,56± 1,72	43,38± 0,49
VCM (fm^3)	47,00± 0,97	48,80± 2,31	48,40± 0,40	49,80± 0,58
HCM (pg)	14,98± 0,43	15,96± 0,38	15,78± 0,14	15,58± 0,15
CHCM (g/dL)	31,85± 0,35	31,72± 0,35	32,30± 0,53	31,22± 0,19
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	3,73± 0,32	3,76± 0,39	4,15± 0,93	4,28± 0,69
Band cells (%)	-	-	-	-
Neutrophil (%)	35,67± 6,87	21,60± 6,95	18,40± 4,70	30,00± 1,78
Basophil (%)	-	-	-	-
Eosinophil (%)	-	-	-	-

Linfocytes (%)	58,67± 6,08	73,00± 6,77	74,60± 4,94	65,33± 1,33
Monocytes (%)	5,667± 1,80	4,200± 0,73	6,800± 1,39	7,167± 1,56

Values are presented as mean ± standard error of mean.

* p<0,05 compared to control female (Mann Whitney Test)

Table 6. Biochemical parameters in Swiss mice

Biochemical(Unit)	Male	Male	Females	Females
	(Control)	(EHt)	(Control)	(EHt)
Glucose (mg/dL)	65,33± 19,10	78,20± 11,85	92,00± 2,00	73,80± 3,99*
Urea (mg/dL)	47,00± 7,00	34,00± 5,02	30,80± 4,26	40,67± 2,06
Creatinine (mg/dL)	0,6333± 0,12	0,81± 0,09	0,618± 0,50	0,69± 0,11
Total Cholesterol (mg/dL)	65,00± 14,22	74,80± 16,61	39,80± 4,21	51,17± 3,94
Tricylerides (mg/dL)	104,5± 7,50	124,40± 4,50	70,60± 4,24	94,17± 9,61
Uric acid (mg/dL)	2,600± 0,55	3,31± 0,71	3,008± 0,80	3,17± 0,95
AST (U/l)	130,3± 28,67	139,00± 14,52	127,2± 22,65	152,30± 16,25
ALI (U/l)	6,667± 2,03	19,40± 7,67	15,20± 1,16	19,75± 1,80
Total proteins (g/dL)	4,673± 0,32	4,99± 0,18	4,210± 0,32	5,34± 0,21
Albumin (g/dL)	1,317± 0,21	1,90± 0,06	1,588± 0,18	1,77± 0,06

Values are presented as mean ± standard error of mean.

* p<0,05 compared to control female (Mann Whitney Test)