



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
DAREDE BIONORTE**



TÍTULO DA TESE: Caracterização química e estudo da atividade e do mecanismo de ação anti-inflamatório do extrato hidroetanólico e compostos isolados da entrecasca da *Dilodendron bipinnatum* Radlk.

RUBERLEI GODINHO DE OLIVEIRA

**Cuiabá-MT
28 de abril de 2017**

RUBERLEI GODINHO DE OLIVEIRA

TÍTULO: Caracterização química e estudo da atividade e do mecanismo de ação anti-inflamatório do extrato hidroetanólico e compostos isolados da entrecasca da *Dilodendron bipinnatum* Radlk.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. DOMINGOS TABAJARA DE OLIVEIRA MARTINS.

Coorientador: Prof. Dr. FÁBIO MIYAJIMA

Cuiabá-MT

28 de abril de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

G585c Godinho de Oliveira, Ruberlei.
Caracterização química e estudo de atividade e do mecanismo de ação anti-inflamatório e composto isolados da entrecasca da *Dilodendron bipinnatum* / Ruberlei Godinho de Oliveira. -- 2017
101 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Domingos Tabajara de Oliveira Martins.
Co-orientador: Fábio Miyajima.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Cuiabá, 2017.
Inclui bibliografia.

1. *Dilodendron bipinnatum* Radlk. 2. Inflamação. 3. Plantas medicinais. 4. Mato Grosso. 5. Pantamal. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

RUBERLEI GODINHO DE OLIVEIRA

Caracterização química e estudo da atividade e do mecanismo de ação anti-inflamatório do extrato hidroetanólico e compostos isolados da entrecasca da *Dilodendron bipinnatum* Radlk.

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. DOMINGOS TABAJARA DE OLIVEIRA MARTINS

Coorientador: FÁBIO MIYAJIMA

Banca examinadora

Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins
Orientador

Prof. Dr. Antonio Quiróz Macho
Examinador 2 - interno

Prof. Dr. Fabrício Rios Santos
Examinador 3 – interno

Profa. Dra Renata Dezengrini Shlessarenko
Examinador 4 – interno

Profa. Dra Neyres Zínia Taveira de Jesus
Examinador 5 – externo

Cuiabá-MT
28 de abril de 2017



113ª ATA DE DEFESA DE TESE

Aos vinte e oito dias do mês de abril de dois mil e dezessete, às 08:30 horas, no Auditório do Instituto Nacional de Pesquisas do Pantanal (INPP) – Campus Avançado do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), o doutorando **Ruberlei Godinho de Oliveira**, defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: “**Caracterização química e estudo do mecanismo anti-inflamatório do extrato hidroetanólico de Dilodendron bipinnatum Raldk**”.

Banca de Examinadores:

Membros/Instituição	Parecer	Assinatura
Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins (UFMT) CPF: 109.726.923-04	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Antônio Macho Quirós (UFMT) CPF: 236.116.278-44	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Fabrício Rios Santos (UFMT) CPF: 891.650.555-00	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dr. Amílcar Sabino Damazo (UFMT) CPF: 165.559.138-00	Aprovado (X) Reprovado ()	
Dra. Neyres Zínia Taveira de Jesus (UNEMAT)	Aprovado (X) Reprovado ()	
CPF: 469.179.851-04	Aprovado (X) Reprovado ()	

Cuiabá (MT), 28 de abril de 2017.

Resultado Final: Aprovado (X) Reprovado ()

Profa. Dra. Carolina Joana da Silva
Coord. Estadual do PPG-BIONORTE/MATO GROSSO

Prof. Dr. Spartaco Astoiff Filho
Coord. Geral do PPG-BIONORTE

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, a **DEUS PAI**, pelo dom da vida, oportunidade e a realização de mais sonho!

Aos meus pais, **Lucimar Aparecida Godinho de Oliveira e Rubewaldo José de Oliveira**, pelo amor, dedicação, ensinamentos, incentivo para que eu avançasse nos estudos. Agradeço todos os dias pela educação, formação humana e o incentivo permanente nos estudos, obrigado por tudo, vocês são meu grande tesouro!

A minha esposa, **Michele Daiane Goularte Oliveira**, obrigado pelo apoio incondicional e por sempre estar ao meu lado ao longo dessa caminhada e da vida, Te amo!

A **minha família**: irmãos, Romulo Godinho de Oliveira e Lucélia Godinho de Oliveira, cunhados, sobrinhos João Matheus, Luise e Pedro Romulo, avós, sogro (Valmir Goularte) e sogra (Ozana Goularte) presentes de Deus na jornada da minha vida! Muito obrigado por tudo que proporcionaram!

A minha querida e amada **Vó Gê**, minha eterna gratidão, ajuda, simplesmente, Te amo!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só se tornou possível pelo empenho, participação e colaboração de uma grande equipe. Muito obrigado a todos que ajudaram-me nessa caminhada sem vocês e ajuda de Deus nada seria possível.

MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos Tabajara de Oliveira Martins, pela sua disponibilidade, paciência, dedicação, companheirismo e grandiosa orientação ao longo desses anos no Mestrado e Doutorado, de muito amadurecimento técnico-científico, profissional e pessoal ao seu lado e de toda sua equipe, serei eternamente grato;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fábio Muyajima, da University of Liverpool pela parceria e apoio incondicional em todos os momentos;

À Universidade Federal de Mato Grosso e Universidade do Estado de Mato Grosso dos Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, e seus professores, pela oportunidade e pela formação acadêmica;

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi, Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte/UFAM durante o período de realização desse Doutorado;

Ao Prof^a. Dra Carolina Joana da Silva, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte durante o período de realização desse Doutorado;

A Prof. Dr. Amlcar Sabino Damazo, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da UFMT, agradeço pelos ensinamentos, colaboração e parceria nos estudos de histologia;

Ao Laboratório de Investigação em nome da profa. Dra. Rosane Cristine Hahn e Fabrício Rios Santos, pela convivência e auxílio sempre que disponibilizado;

Ao Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da UFMT, em nome da profa. Dra. Leticia M. Ignácio de Souza pelo apoio nos experimentos de PCR em Tempo Real; e ao prof. Dr. Roberto Vilela, presidente do CEUA, pela aprovação do projeto de pesquisa;

Aos professores Dr^a. Cláudia Marlise Balbinotti Andrade e Dr^a. Nair Honda, ambas do Laboratório de Bioquímica da UFMT, pela colaboração sempre que solicitada;

A Prof. Dra. Marcia Goettert, nossa pós-doc querida, agradeço pelos ensinamentos e muitos momentos alegres de convivência contigo durante todo o pós-doutoramento aqui na UFMT;

Ao pós-doc, Antonio Macho Quirós, agradeço pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo e discussão dos resultados;

A profa. Dra. Virgínia Claudia da Silva, Tereza Auxiliadora Nascimento Ribeiro ambas do Programa de Pós-Graduação em Química da UFMT pela colaboração nos experimentos de isolamento e elucidação estrutural da mulher pobre;

Ao prof. Dr. Paulo Teixeira de Sousa Jr. pela parceria e colaboração na fitoquímica e elucidação estrutural;

Ao Me. Joaquim Corsino da Silva Lima, Técnico Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFMT, pela disponibilidade de sempre com os animais;

Ao prof. Dr. Edgar Paredes Gamero e a Prof. Dra. Yara M. Michelacci ambos da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp-EPM) pela recepção e valiosas colaborações;

Ao Laboratório Multiusuário (INFAR) da Unifesp-EPM pela colaboração nos experimentos com microscopia confocal em nome do Doutorando André Cunha;

A doutoranda Ma. Angela Marcia Selhorst Silva e Beserra e ao Prof. Dr. Rogério Alexandre Nunes dos Santos (Unemat) pelo incentivo à pesquisa e inserção intelectual em minha vida desde a iniciação científica, meu muito obrigado!

As meus amigos Heron Fernandes Vieira Torquato, Suellen Iara Guirra Rosa, Lucas Olivo e Daniele Ayr pela amizade e colaboração nos experimentos in vitro e in vivo e pelos momentos de risadas e auxílio na discussão dos resultados;

Aos meus amigos da pós-graduação da UFMT Eduarda Pavan, Claudio Luis Venturini, Fabiana Freitas, Luciano Mafioleti, Walquiria Simi, Leticia Borges, Nayara Zuchi, Thamires Oliveira Eduardo Rodrigues, Morena Giordani, Samantha Soares, Leticia Oliveira, Marilene Passos, Lilian Braga e Camila Oliveira pela alegre e enriquecedora convivência ao longo do curso e aprendizado mútuo com todos vocês;

Aos meus amigos Dr. Iberê Ferreira Silva Junior, Dra. Larissa Scalon, Dr. Sikiru Olaitan Balogun, Dra. Isanete Bieski, Dr. Reginaldo Ribeiro, Dra. Vanessa de Fátima Gazoni, Ma. Angela Marcia Selhorst, Dra. Suellen Guirra e Dra. Daniele Ayr pelo apoio incondicional e auxílio nas discussões dos resultados;

Aos alunos de Iniciação Científica, Geovane Roberto Castilho, Thassia de Oliveira, Taila Luz, Thais Campos, Joabe Cardoso de Mello, Célia, Célio, Layen Antonielli e Mateus Engelbrecht pelo carinho e pelo auxílio imprescindível em todos os experimentos;

Aos estagiários do Laboratório de Farmacologia pelo apoio incondicional em todos os experimentos ao longo desses 5 anos de Mestrado e Doutorado;

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação da Rede Bionorte, Francismar Petini, pelas orientações administrativas e pelo convívio sempre alegre;

Às agências de fomento CNPq, FAPEMAT e CAPES pelo auxílio financeiro e bolsa de estudo, essenciais ao desenvolvimento do Projeto de Pesquisa;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Áreas Úmidas (INCT/INAU) e Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP) pelo apoio financeiro;

Ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA/UFMT), pela análise e aprovação do meu projeto;

Ao Prof. MSc. Benedito Luis Figueiredo, Coordenador do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso, pelo fornecimento dos animais utilizados nos experimentos;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para a execução desse trabalho.

Essas poucas palavras são insuficientes para agradecer os que aqui foram citados e os que estão para sempre em meu coração. Fica aqui o meu muito obrigado!!!

O valor de um homem deve medir-se pelo que dá e não pelo que recebe. Não se converta em um homem de sucesso senão num homem de valores.

Albert Einstein

RESUMO

OLIVEIRA, Ruberlei, Godinho de. **Caracterização química e estudo da atividade e do mecanismo de ação anti-inflamatório do extrato hidroetanólico e compostos isolados da entrecasca da *Dilodendron bipinnatum* Radlk.** 2016. 54 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2016.

RESUMO

Relevância etnofarmacológica: *Dilodendron bipinnatum* Radlk., Sapindaceae, é uma planta nativa, mas não endêmica no Pantanal. Preparados caseiros da entrecasca do caule são utilizados em distúrbios inflamatórios nas formas de decocto e macerado. Mostramos recentemente, que estas preparações possuem propriedades anti-inflamatórias, que são mediadas pela inibição da migração celular e pela modulação das citocinas Th1 e Th2, embora não elucidou-se o mecanismo de ação molecular.

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi investigar mais detalhadamente os mecanismos responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias do extrato hidroetanólico da casca do caule de *Dilodendron bipinnatum* (EHDb).

Materiais e métodos: O pó da entrecasca do caule foi macerado em solução hidroetanólica 70% (p/v, 1:3), e concentrado para a obtenção do EHDb. A viabilidade celular, o estado redox intracelular e as alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foram avaliados pelo pré-tratamento de 1 h com o EHDb em células RAW 264,7 estimuladas por 24 h com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, após marcação com Anexina-V e 7-amino-actinomicina-D, DCFH-DA e JC-1, respectivamente, por citometria de fluxo. O efeito do EHDb sobre os níveis das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10) e PGE₂ foram avaliados por ELISA e a expressão das proteínas citoplasmáticas MAPKs (p-p38, p-JNK e p-ERK), MKP-1 e COX-2 por western blotting. A translocação nuclear de NF- κ B foi avaliada por microscopia de imunofluorescência e os resultados quantificados na relação núcleo: citoplasma.

Resultados: O LPS, EHDb e NAC demonstraram ser não citotóxico, com viabilidade celular em cerca de 80%. EHDb atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e PGE₂ induzida por LPS, mas não afetou a IL-10. A produção de ROS também foi inibida pela EHDb (1, 5 ou 20 $\mu\text{g/mL}$), mesmo na concentração mais baixa; a 20 $\mu\text{g/mL}$, o EHDb foi mais eficaz do que o NAC, que foi utilizado como controle positivo (74,1% e 66,2% de inibição do efeito do LPS, respectivamente). O LPS induziu um aumento de $\Delta\Psi_m$ (19,2%, $p < 0,001$), enquanto o EHDb inibiu a alteração em $\Delta\Psi_m$ (7,7% a 20 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,001$). Os resultados de western blotting mostraram que EHDb inibiu a expressão de MAPK p-p38, p-JNK e COX-2, enquanto a expressão de MKP-1 foi aumentada e p-ERK não foi afetada. O LPS promoveu a translocação nuclear de NF- κ B p65 (67%, $p < 0,01$) em células RAW 264.7, em comparação com o grupo basal (33%). O pré-tratamento com EHDb inibiu esta translocação de NF- κ B p65 (58% a 20 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,001$). Conclusão: A EHDb possui uma potente atividade anti-inflamatória e atua sobre múltiplos alvos e vias biológicas de potencial relevância terapêutica.

Palavras-Chave: *Dilodendron bipinnatum*, inflamação, MAPK, NF- κ B, macrófagos, COX-2.

ABSTRACT

de OLIVEIRA, Ruberlei Godinho. **Chemical characterization and study of activity and anti-inflammatory mechanism of action hydroethanolic extract and compounds isolated from the bark of *Dilodendron bipinnatum* Radlk.** 2017. 101 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2017.

Ethnopharmacological relevance: *Dilodendron bipinnatum* Radlk., Sapindaceae, is a native plant, but not endemic in the Pantanal. The inner stem bark preparations are used in inflammatory disorders in the forms of decoction and maceration. We have recently shown that these preparations have anti-inflammatory properties, which are mediated by the inhibition of cell migration and the modulation of the Th1 and Th2 cytokines, although the mechanism of molecular action has not been elucidated.

Objective: The objective of the present study was to investigate in detail the mechanisms responsible for the anti-inflammatory properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Dilodendron bipinnatum* (EHDb).

Materials and methods: The powder of inner stem bark was macerated in 70% (w/v, 1:3) hydroethanolic solution and concentrated to obtain EHDb. Cell viability, intracellular redox status and changes in membrane potential mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) were evaluated by the 1 h pretreatment with the EHDb in RAW 264.7 cells stimulated for 24 h with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, after labeling with Anexinna-V and 7-aminoactinomycin-D, DCFH-DA and JC-1, respectively, by flow cytometry. The effect of EHDb on cytokines levels (TNF- α , IL-1 β and IL-10) and PGE₂ were evaluated by ELISA and the expression of the cytoplasmic proteins MAPKs (p-p38, p-JNK and p-ERK), MKP-1 and COX-2 by western blotting. The nuclear translocation of NF- κ B was evaluated by immunofluorescence microscopy and the results quantified nuclear nucleation: cytoplasm.

Results: LPS, EHDb and NAC demonstrated to be non-cytotoxic, with 80% average viability. EHDb attenuated the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and PGE₂ induced by LPS, but did not affect IL-10. ROS production was also inhibited by EHDb (1, 5 or 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), even at the lowest concentration; At 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EHDb was more effective than NAC, which was used as a positive control (74.1% and 66.2% inhibition of LPS effect, respectively). LPS induced an increase of $\Delta\Psi_m$ (19.2%, $p < 0.001$), while EHDb inhibited the change in $\Delta\Psi_m$ (7.7% at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.001$). Results from western blotting showed that EHDb inhibited the expression of MAPK p-p38, p-JNK and COX-2, whereas the expression of MKP-1 was increased. p-ERK was not affected. LPS promoted nuclear translocation of NF- κ B p65 (67%, $p < 0.01$) in RAW 264.7 cells, compared to the basal group (33%). Pretreatment with EHDb inhibited this translocation of NF- κ Bp65 (58% to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p < 0.001$).

Conclusion: EHDb has a potent anti-inflammatory activity and acts on multiple targets and biological pathways of potential therapeutic relevance.

Key words: *Dilodendron bipinnatum*, inflammation, MAPK, NF- κ B, macrophages, COX-2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura I.** *Dilodendron bipinnatum* Radlk..... 7
- Figura II.** Nível de sinalização na inflamação e os candidatos a alvos terapêuticos. Ab, anticorpo; GR, de receptores de glicocorticoides; IKK, IκB quinase; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos-1; TNFR, receptor do fator de necrose tumoral, COX-2, ciclo-oxigenase 2; anti-inflamatórios não esteroidais(NSAIDs, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)..... 9
- Figura III.** Agentes reguladores e imunomoduladores da expressão de MKP-1 (MKP-1, *Mitogen-activated protein kinase phosphatase*)..... 10
- Figura IV.** Receptores TLR4 (*Toll like receptors-4*) via ativação dependente de MyD88, levando à translocação de NF-κB para o núcleo e a transcrição gênica de MAPK p38, ERK, JNK, e citocinas genes pró-inflamatórias..... 12
- Figura V.** Papel importante ERO mitocondrial na regulação de inflamosoma, os complexos de alto peso molecular ativadores de caspases e citocinas inflamatórias em macrófagos..... 18
- Figura VI.** A inflamação alérgica tem sido caracterizada como uma doença de células T auxiliares 2 (Th2). Portanto, os esforços para alterar o equilíbrio das células Th2-Th1 na asma têm sido responsáveis, quer por inibição de citocinas de células Th2 (em particular, IL-4, IL-13 e IL-5) ou Th1(IFN-γ e IL-12)..... 21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Processo inflamatório	2
1.2. <i>Dilodendron bipinnatum</i> Radlk	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Plantas Medicinais	9
2.2. <i>Dilodendron bipinnatum</i> Radlk	9
2.2.1 Habitat	9
2.2.2 Usos populares	10
2.2.3 Fitoquímica	10
2.2.4 Farmacologia	10
2.4 Proteínas quinases ativas por mitógenos	11
2.5 Fator nuclear kappa-B	15
2.6 Espécies reativas de oxigênio	16
2.7 Asma alérgica	19
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. RESULTADOS	23
5. CONCLUSÃO	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
7. ANEXOS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processo inflamatório

A palavra inflamação deriva do termo grego “*phogosis*” e do latim “*flama*” significando “atear fogo” ou “áreas em chamas”, respectivamente. Papiros egípcios de 2.000 a.C. já se referiam à inflamação ao relatarem a formação de pus. Esse fenômeno foi caracterizado pelos clássicos sinais cardinais do processo inflamatório rubor, calor, dor e tumor, descritos por Cornelius Celsus no primeiro século d.C. e pela “*functio laesa*” (perda de função) adicionado por Virchow no final do século XIX (WHITE; MANTOVANI, 2013).

A inflamação é uma resposta do sistema imune desencadeada por estímulos químico, físico e biológico (MASKREY et al., 2011), sendo caracterizada por alterações vasculares e celulares que representam uma ameaça à homeostase tecidual, e caracterizada na fase aguda pelo aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático, resultando em acúmulo de fluido, transmigração de leucócitos e liberação de mediadores (citocinas, quimiocinas e eicosanoides) para a área inflamada (FULLERTON; GILROY, 2016).

A ativação do sistema imune inato ocorre após o reconhecimento de receptores padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*) e/ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs - *damage-associated molecular patterns*). Atualmente, várias classes desses receptores são bem elucidadas, a exemplo dos receptores Toll like (TLRs - *Toll-like receptors*) e receptores Nod-like (NLR-like *receptors*) (TABAS; GLASS, 2013).

O recrutamento de neutrófilos e macrófagos desempenham um papel fundamental na iniciação das respostas inflamatórias sendo células versáteis com múltiplas funções como a fagocitose, produção de citocinas e, os macrófagos também participam da apresentação de antígenos (GINHOUX et al., 2016).

Na resposta imune adaptativa aumenta a especificidade através da proliferação e diferenciação de antígenos específicos pelas células de memória (linfócitos B), bem como pela expansão clonal dos linfócitos T (COHEN, 2010). Entre os quais, há três grupos principais: as células B, responsáveis pela produção de anticorpos (resposta humoral); as células T, importantes na fase de indução da resposta imunológica e as células NK, que são células linfoides especializadas, as quais são ativadas durante a resposta inata (SUN et al., 2012).

A expansão clonal de linfócitos T e B ocorrem após o reconhecimento aos antígenos específicos, devido a um contato anterior através da exposição aos agentes imunogênicos,

resultando em uma população de células de memória capazes de responder ativamente ao antígeno (LANGIER et al., 2010).

A modulação da resposta dos linfócitos é realizada de acordo com as características do agente invasor, sendo que nas infecções intracelulares ocorre à ativação dos macrófagos macrófagos residentes e posterior liberação de IL-12 e ativação linfócitos Th1 desencadenado a liberação de INF- γ (Interferon gama) (ABBAS, 2003).

Na imunidade humoral, os linfócitos Th2 (*T helper lymphocytes*) ativam eosinófilos e mastócitos através da liberação IL-5 e IL-4; enquanto os linfócitos B secretam anticorpos que ativam e promovem opsonização, citotoxicidade de células NK e degranulação mastocitária. Em adição, as células T CD4⁺ diferenciam-se em subconjuntos de linfócitos T reguladores (Treg - *regulatory T cells*) e o fator de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1 - *transforming growth factor beta 1*) promovendo a diferenciação de células Treg adaptativas, que suprimem respostas de células T para evitar a autoimunidade (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

Dependendo da combinação dos mediadores inflamatórios, as células T naive desenvolvem-se em diferentes linhagens: Th1, Th2, Th17 e Treg. A citocina IL-12 induz respostas Th1, e IL-4 em conjunto com as IL-5 e IL-13, são fatores de diferenciação Th2. O TGF- β promove o desenvolvimento de células Treg e diferenciam células T naive em células Th17 em conjunto com a IL-6 (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

O lipolissacarídeo (LPS, *lipopolysaccharide*) presente na estrutura de parede bactérias Gram negativas, ativam os macrófagos via reconhecimento por TLR₄, e desencadeia a fosforilação subsequente de proteínas citoplasmáticas como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-activated protein kinases*), incluindo a quinase reguladas por sinal extracelular (ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinases*), a JNK (JNK, *Jun N-terminal kinases*) e a p38 MAPK (*p38 kinase*) (HOU et al., 2015), bem como os fatores de transcrição nuclear kappaB (NF- κ B - *nuclear transcription factor kappa B*) e a proteína ativadora 1 (AP-1, *Activator protein 1*) (SUN et al., 2013).

Estudos de Lee et al. (2012), relataram a fosforilação oxidativa e das MAPK promovem uma aumento de moléculas pró-inflamatórias, moléculas de adesão intracelular (ICAM, *intercellular adhesion molecule*;) e vascular celular (VCAM, *cell adhesion molecules*), e transmigração (ECAM, *epithelial cell adhesion molecule*; PECAM, *platelet and endothelial cell adhesion molecule 1*), fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), quimiocinas (IL-8), eicosanoides lipídicos (PGE₂ e LTB₄), bem como a ativação de enzimas induzíveis (COX-2 e iNOS - *inducible nitric oxide synthase*) e de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS - *reactive oxygen species*) (COSTA et al., 2012).

Essas alterações citoplasmáticas e nucleares sistematizam as alterações vasculares e celulares do processo inflamatório, resposta imune, proliferação e sobrevivência celular (LAWRENCE, 2009).

No entanto, a persistência dos estímulos flogísticos ou a desregulação dos mecanismos na fase de resolução acarreta o surgimento da inflamação crônica devido a um desequilíbrio homeostático nos processos fisiológicos da inflamação. Reconhecidamente, são fatores fundamentais na progressão de uma ampla gama de doenças crônicas, incluindo, a aterosclerose, artrite, doença inflamatória intestinal e neurodegenerativas, como o, Alzheimer e a esclerose múltipla (MASKREY et al., 2011).

O tratamento farmacológico da inflamação envolve, principalmente, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs). Os AINEs são os medicamentos mais prescritos em todo o mundo, e objetivam o controle térmico, doloroso e do edema na inflamação, atuando através da inibição da COX, e dessa forma inibindo a liberação de PGs (FUNK, 2001). No entanto, essa classe de fármacos tem mais de 50 anos de descoberta e seu uso contínuo apresentam efeitos colaterais graves, como lesões gastrointestinais e hepáticas clinicamente significativas, bem como associados a alguns AINEs um maior risco de eventos cardiovasculares e renais (DIAZ-GONZALES; SÁNCHEZ-MADRID, 2015).

Os AIEs (corticoides) possuem acentuada atividade anti-inflamatória e imunossupressora. Essa classe de fármacos atuam por mecanismos de repressão da transcrição gênica da enzima fosfolipase A₂ (via indução da expressão de anexina-1), COX-2 e citocinas, (associadas à inibição de ambas das atividades das MAPK p38 e JNK) (VOLMER, 2012).

Embora, apresentem prodigiosos efeitos terapêuticos, a administração de AIEs são frequentemente, acompanhados por graves e, algumas vezes, irreversíveis efeitos colaterais, como diabetes mellitus, síndrome de Cushing, osteoporose, atrofia cutânea, psicose, glaucoma, entre outras (COSTA et al., 2012).

Em decorrência das limitações do uso dos anti-inflamatórios, especialmente, em pacientes que seus usos sejam contraindicados ou quando do uso crônico, faz necessário à busca por novos agentes anti-inflamatórios, mais acessíveis e com menor incidência de reações adversas e/ou toxicidade. Por outro lado, nos últimos anos tem havido intensas pesquisas por fármacos anti-inflamatórios que atuem na inibição ou modulação de NF-κB, adesão celular e MAPKs, reconhecidamente relatadas como reguladores da expressão transcricional e pós-transcricional de genes induzíveis em diversas situações fisiológicas e patológicas que apresentem menores efeitos colaterais (DZOYEM; ELOFF, 2015).

Nesse contexto, as plantas medicinais constituem fontes permanentes para investigação de novas moléculas e desenvolvimentos de fitofármacos e/ou fitoterápicos anti-

inflamatórios, especialmente no Brasil, país da megadiversidade florística e énicocultural (MMA, 2002; RBG KEW, 2016). Mato Grosso apresenta três importantes biomas e rica diversidade étnica cultural (CAMARGO et al., 2014) representada descendentes de europeus, índios e africanos. Existe uma necessidade clínica de identificar novos compostos que sejam seguros, para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias (Hur et al., 2012). Plantas medicinais são alternativas viáveis para a descoberta de novos compostos bioativos mais seguros (Gautam e Jachak, 2009).

De fato, há evidências de que drogas derivadas dos produtos naturais modulam vários mediadores inflamatórios, incluindo seus efeitos na expressão de moléculas pró-inflamatórias que são chave a inflamação, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase (COX-2), IL-1 β , TNF- α e IL-10 citocinas (Bellik et al., 2013).

Tendo em vista a importância do saber popular sobre plantas medicinais, bem como a utilização popular de *D. bipinnatum* em doenças inflamatórias, a elucidação do mecanismo de ação anti-inflamatório de *D. bipinnatum*, torna-se um passo fundamental no desenvolvimento de futuro fitoterápicos e/ou fitofármacos.

D. bipinnatum Radlk., Sapindaceae, é nativa, mas não endêmica no Brasil, com ampla distribuição geográfica na Amazônia, Cerrado e floresta semidecidual, bem como em alguns países da América do Sul como Peru, Bolívia e Norte do Paraguai conforme Lista de Espécies da Flora do Brasil (SOMNER et al., 2016). De acordo com estudos de Bieski et al. (2012) e Steyermark(1987) *D. bipinnatum* é comumente conhecida na região do Pantanal por “mulher-pobre”, “maria-pobre”, “correio”, “farinha-seca” or “mamona-pobre”.

Há poucos relatos na literatura sobre a *D. bipinnatum* e estes referem-se às suas propriedades antimicrobiana (SANTOS et al., 2010), anti-inflamatória (DE OLIVEIRA et al., 2014) e toxicológica (DE AZEVEDO NETA MAHON et al., 2014). Os estudos fitoquímicos são escassos e descreveram as pesenças de saponinas esteroidais (Santos et al. (2010), taninos e flavonoides (DE OLIVEIRA et al., 2014).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

A utilização de espécies vegetais pelo homem, com fins medicinais, remonta à antiguidade, e vem sedimentando-se ao longo do tempo, tendo ganhado grande impulso e popularidade apesar do poderio da indústria químico-farmacêutica (ROCHA et al., 2015).

Com a Declaração de Alma-Ata, em 1978, o uso de plantas medicinais passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), quando esta recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso (OMS, 2002).

Em sua 40ª Assembleia Mundial de Saúde (1987), a OMS reitera sua posição a respeito da necessidade de valorizar-se a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário, levando-se em conta que 68% da população mundial utilizam plantas ou preparados destas em seus cuidados primários de saúde. Ao lado disso, destaca-se a participação dos países em desenvolvimento nesse processo, já que possuem 67% das espécies vegetais do mundo (BRASIL, 1990). Em sua estratégia global sobre medicina tradicional, complementar e alternativa para o período de 2002-2005, a OMS reforçou o compromisso em estimular o desenvolvimento de políticas públicas com o objetivo de ser inserido no sistema oficial de saúde dos 191 estados membros (OMS, 2002).

Estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2000). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Entre os 51 medicamentos anti-inflamatórios lançados entre 1981 e 2010, 13 são derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Mais ainda, o lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2006, por meio do Decreto nº 5.813, constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira. Além, de proteger o reconhecimento de práticas e saberes da medicina tradicional, contemplando interesses e formas de usos diversos, desde aqueles das comunidades locais até o das indústrias nacionais, passando por uma infinidade de outros arranjos de cadeias produtivas do setor de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016).

Atualmente, os fitoterápicos constituem importante fonte de inovação em saúde, sendo objeto de interesses empresariais privados e fator de competitividade do Complexo Produtivo da Saúde. Esse contexto impõe a necessidade de ação transversal voltada ao fortalecimento da base produtiva e de inovação local e à competitividade da indústria nacional (BRASIL, 2016).

Em outubro de 2014, o Ministério da Saúde aprovou 19 projetos na área de plantas medicinais e fitoterápicos através do edital SCTIE/MS 1/2014, aos quais foram destinados uma verba total no valor de mais de 7 milhões, com investimentos na aquisição de equipamentos, insumos, contratação de serviços e capacitações (BRASIL, 2014).

O Brasil possui a maior biodiversidade mundial, que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tem o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. No entanto, menos de 10% das espécies vegetais foram avaliadas no que diz respeito às suas características biológicas e menos de 5% foram submetidas aos estudos fitoquímicos mais aprofundados (CALIXTO, 2000).

O estado de Mato Grosso ocupa lugar de destaque no cenário nacional e internacional, por apresentar três dos principais ecossistemas brasileiros (Pantanal, Cerrado e Floresta Amazônica). Além disso, conta com diversas comunidades tradicionais, distribuídas em todo o território, formadas principalmente por índios, quilombolas e brancos de origem portuguesa, cujos conhecimentos sobre plantas medicinais foram herdados de seus ancestrais, porém encontra-se em risco de extinção (MATO GROSSO, 2005).

Dentre os ecossistemas presentes no Brasil, destaca-se o Pantanal, a maior planície inundável do mundo, com mais de 110.000 km², reúne um mosaico de diferentes ambientes e abriga uma rica biota terrestre e aquática. O frágil equilíbrio dos ecossistemas pantaneiros, definidos por dinâmicas de inundações periódicas, está sendo ameaçado pelas novas tendências de desenvolvimento econômico. Os modelos tradicionais de pesca e pecuária estão sendo rapidamente substituídos pela exploração intensiva, acompanhada de desmatamentos e alteração de áreas naturais (MMA, 2007).

Hanke et al. (2016) afirmam que drogas anti-inflamatórias são um exemplo impressionante de sucesso no desenvolvimento de fármacos com origem em extratos ou decocções de plantas medicinais, como exemplo, folhas e casca do salgueiro (*Salix alba*).

Desta forma, observa-se a necessidade da elucidação química para a comprovação da segurança, eficácia e qualidade das diversas espécies utilizadas como medicinais, especialmente do seu uso no registro e controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos (FERREIRA, 2005).

Há diversos estudos afirmando o papel vital de várias plantas medicinais na remissão de processos inflamatórios (SHAH et. al., 2010; de MORAIS LIMA et al., 2011; APU et. al., 2012; ASIJA et. al., 2014; VISHAL et al., 2014). Ghasemian et al., (2016) demonstraram que a *Curcuma longa* possui evidência clínica no tratamento de diferentes processos inflamatórios crônicos, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e uveíte. Estudo de revisão realizado por Marmitt et al., (2013), destacam a *Aloe vera*, *Schinus terebenthifolius* e *Uncaria tomentosa* na Lista do RENAME e disponibilizadas no SUS como fitoterápico. Nesse trabalho, ainda relatam que das 20 plantas de interesse, oito são nativas do país, sendo a *Curcuma longa* e *Zingiber officinale* com maiores números de publicações com potencial anti-inflamatório.

Com relevância entofarmacológica internacional, o grupo de pesquisa de Farmacologia da UFMT publicou relevantes estudos como a atividade anti-inflamatória de importantes espécies de Mato Grosso oriundas da Floresta Amazônica, Cerrado e Pantanal.

Recentemente Rosa et al. (2017) descreveram a atividade anti-alérgica de *Echinodorus scaber* Ratj., chapéu-de-couro, em modelos murinos de asma e a inibição da migração leucotária em camundongos estimulados com LPS. Com as mesmas atividades, estudos com a *Macrosiponia longiflora*, velame branco ou velame do campo, foram relatados por da Silva et al. (2014) e De Almeida et al. (2017) nos mesmos modelos.

2.2 *Dilodendron bipinnatum*

2.2.1 Habitat

D. bipinnatum Radlk. pertencente à família das Sapindaceae, é uma árvore nativa, mas não endêmica no Brasil, com ocorrência no Pantanal e Cerrado de Mato Grosso, e habitat geralmente na floresta semidecidual, matas de galeria inundáveis, e desenvolve-se em solos arenosos ou argilosos férteis (LORENZI, 2000). Com ampla distribuição geográfica na Amazônia, Cerrado e floresta semidecidual, bem como em alguns países da América do Sul, como Peru, Bolívia e Norte do Paraguai (SOMNER et al., 2016).

D. bipinnatum é uma árvore de aproximadamente 12 metros de altura, caracterizada por apresentar um conjunto de folhas com dentes convexas e visivelmente ciliados, pinadas opostas, parte inferior das nervuras central e lateral possuindo tricomas espalhados e flores normalmente com pétalas bem desenvolvidas, lóbulo do cálice arredondado na porção apical (GENTRY; STEYERMARK, 1987) (**Figura 1**).

Figura 1 - *Dilodendron bipinnatum* Radlk.



Fonte: Mahon (2012) e Lima (2013).

2.2.2. Usos populares

D. bipinnatum conhecida popularmente como “mulher-pobre”, tem seu macerado e decocto da entrecasca do caule amplamente utilizada pelos pantaneiros do Mato Grosso para o tratamento de inflamações uterinas, fraturas ósseas, dores em geral e dermatites (BIESKI et al., 2012). Estudos etnofarmacológicos em comunidades tradicionais do Pantanal Mato Grossense revelaram que a entrecasca do caule é usada na forma de decocto e macerado, tomando-se um copo de 150 mL, 2-3 vezes ao dia, por 15-30 dias. Não há relatos de toxicidade, por parte dos pantaneiros, sobre a utilização destas preparações (BIESKI et al., 2012).

Em investigação realizada por Neto et al. (2000) com espécies da família Sapindaceae do Estado de Mato Grosso do Sul, foi observado o potencial de *D. bipinnatum* como árvore de madeira aproveitável e com possibilidades ornamentais. Estudos de Resis et al. (2016) relatam a influência do sombreamento no desenvolvimento inicial e eficiência no uso de nutrientes de *D. bipinnatum*.

2.2.3 Fitoquímica

Os estudos fitoquímicos com o EHDb são escassos. Santos et al. (2010) relataram que o extrato etanólico das folhas e entrecasca de *D. bipinnatum* apresentou, em sua composição, uma mistura de esteroides (β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e 3-O- β -d-citostenona) e triterpenos (cicloeucaleanol e 24-metileno cicloartanol).

A padronização do EHDb já foi previamente realizada (DEOLIVEIRA et al., 2014), através de análises fitoquímicas que envolveram a obtenção de um cromatograma no HPLC, revelando as presenças de flavonoides e taninos como classes metabólicas majoritárias, tais como, galato de epigallocatequina, catequina, ácido gálico e galocatequina.

2.2.4 Farmacologia

Os estudos farmacológicos consistem em apenas dois trabalhos publicados recentemente por de Oliveira et al. (2014) que demonstraram que o EHDb apresenta potente atividade anti-inflamatória aguda e de Azevedo Neta Mahon et al. (2014) relataram baixa toxicidade aguda, subcrônica e ausência de citotoxicidade. Os estudos de mecanismos de ação anti-inflamatória demonstraram que o EHDb atua por inibir a migração de leucócitos (particularmente de neutrófilos), e as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), ao mesmo tempo que aumenta a concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 (DE OLIVEIRA et al., 2014) no modelo de peritonite induzida por LPS em camundongos e independentemente da via NO.

2.4 Proteínas quinases ativadas por mitógenos

As MAPKs são uma família de serina-treonina quinases que medeiam à sinalização intracelular associados com um papel crítico na iniciação resposta imune inata e diversas funções biológicas, incluindo a proliferação celular, diferenciação, a regulação de nucleossomas e a expressão gênica, bem como a estabilidade do RNAm e a tradução de genes pró-inflamatórios (GHOSH; DASS, 2008).

Considerada uma importante via ativada por diversos estímulos extracelulares e intracelulares como o LPS bacteriano, fatores de crescimento, citocinas (TNF- α e IL-1 β), hormônios, e vários fatores de “stress celular”, tais como ERO (citoplasmático e mitocondrial) (PARK et al., 2013).

Em cultura de células de macrófagos, o LPS ativa uma cascata de transdução de sinal após o reconhecimento pelos receptores TLR4 acoplado a unidade mieloide (MyD88 - *myeloid differentiation primary response protein*), pela via dependente da ativação do fator de crescimento transformante (TGF- β – *Transforming Growth Factor*) ativadora da cinase 1 (TAK-1- *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*) com fosforilação subsequente da MAP3K que ativa uma MAP2K, que por sua vez ativa o MAPK por dupla fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina (Thr-Tyr) (ARTHUR; LEY, 2013).

As três principais MAPK efetoras são a p38, ERK1/2 e JNK são ativadas por estímulos extra e intracelulares, incluindo fatores de crescimento peptídicos, citocinas, hormônios, bem como o stress oxidativo (Kim et al., 2010). Após a fosforilação as MAPK promovem a transcrição de AP-1 (c-Fos e c-Jun), ATF-2, ADP, CREB e STAT1 e assim, posteriormente a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α e IL-6) (TABAS; GLASS, 2013), bem como enzimas como a COX-2 e iNOS (TSATSANIS et al., 2006).

Dentre as MAPKs, a ERK compreende duas subunidades, ERK1/2, que possui um papel central no controle da proliferação celular, sendo regulada rapidamente por agentes mitogênicos, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor receptor*), fator de crescimento epidérmico humano (EGF, *human epidermal growth factor receptor*) e o fator de crescimento do nervo (NGF, *nerve growth factor*). Em células normais (não tumorais), sua ativação é primordial para um controle da fase G1 e progressão para a fase S do ciclo celular (CARGNELLO; ROUX, 2011).

A JNK, por sua vez, é representada por três subunidades efetoras principais JNK1, JNK2 e JNK3. Sendo, as duas primeiras com uma ampla distribuição nos tecidos, enquanto que JNK3 parece estar localizada principalmente no sistema nervoso central (SNC), testículos e no miocárdio (ROY et al., 2008). Nesse contexto, JNK é considerada um alvo potencialmente relevante no tratamento de doença inflamatória, pois regula a maturação e a

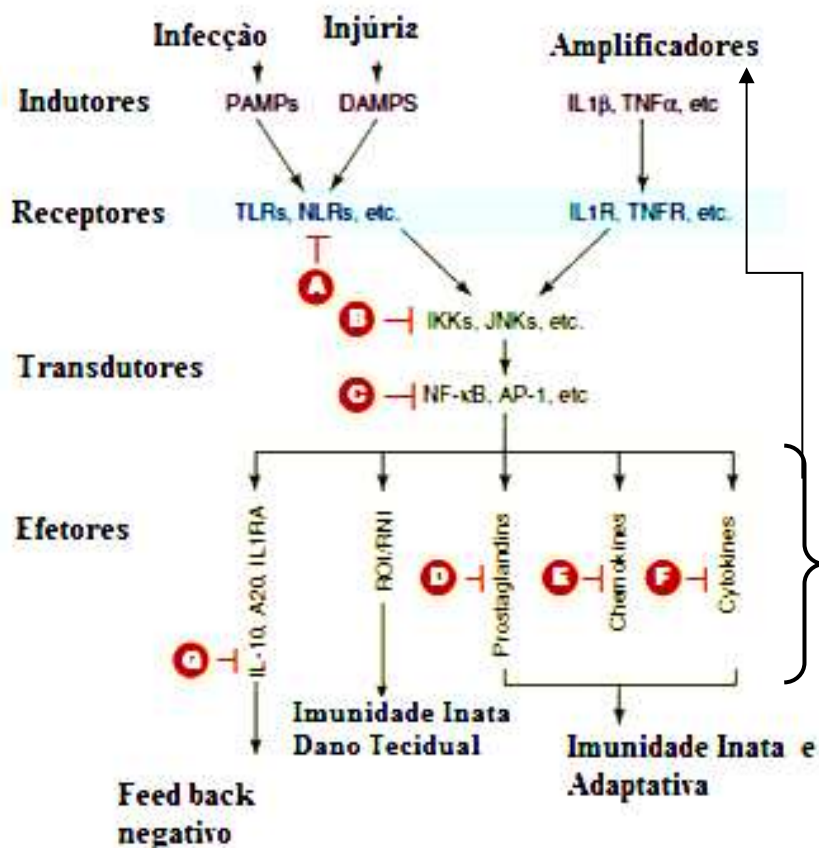
atividade de células Te a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-2, IL-6 e TNF- α (BUBICI; PAPA, 2014).

As ações da via p38 MAPK tem sido associada à inflamação e, assim como a ERK, ao crescimento, diferenciação e a morte celular. De acordo com estudos de Kaminska(2005) há quatro isoformas da p38 identificadas compartilhando cerca de 60% de homologia. Duas isoformas (p38 α e p38 β) são ubiquamente expressas, p38 γ é predominantemente expressa no músculo esquelético, ao passo que a expressão gênica da p38 δ localiza-se no pulmão, rim, testículo, pâncreas e intestino delgado. Uma das principais funções das isoformas de p38 é a biossíntese de citocinas pró-inflamatórias e a regulação de fatores de transcrição, tais como, o ATF-2 (YOKOTA; WANG, 2016).A p38 ativada induz a transcrição de IL-1 β , TNF- α e iNOS pela ativação de NF- κ B. Em nível pós-transcricional, a p38 melhora a estabilidade de RNAm contendo elementos ricos em AU (ARE), incluindo aqueles de TNF- α , COX-2, c-Fos e IL-8 (KAMINSKA, 2005).

A maioria dos estímulos que ativam MAPK p38 é semelhante para as isoformas da JNK (JNK 1/2/3). A fosforilação subsequente é desencadeada por citocinas pró-inflamatórias, (TNF- α e IL-1 β), mas também pelo aumento ERO (ASTOLFI et al., 2015). Com o advento de inibidores específicos da p38 (SB203580), JNK (SP600125) e ERK (PD98025) pela competição dos sítios intracelulares de ATP, tem-se buscado drogas para a modulação dessas MAPKs na clínica em diversas patologias inflamatórias (KIM et al., 2010; ASTOLFI et al., 2015; SHIA et al., 2015; YOKOTA et al., 2015).

Figura II.Nível de sinalização na inflamação e os candidatos a alvos terapêuticos. Ab, anticorpo; GR, de receptores de glicocorticoides; IKK, I κ B quinase; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos-1; TNFR, receptor do fator de necrose tumoral, COX-

2, ciclo-oxigenase 2; anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs, *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*).



EXEMPLOS DE ALVOS	EXEMPLO DE DROGAS
A – Receptores TLR, inflamossoma	Anticorpo neutralizador, inibidores de caspases I
B – IKK, JNK, MAPK p38, ERK	Pequenas moléculas inibidoras das quinases
C – NF-κB, AP-1, ATF-2	Inibidores de ligantes, receptor dos glicorticoides
D – COX-2	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)
E – MCP-1/CCR2	Anticorpos neutralizadores e pequenas moléculas inibidoras
F – TNF-α e IL-1β	Anticorpos neutralizadores
G – Retroalimentação negativa	Resolução (ex. resolvinas)

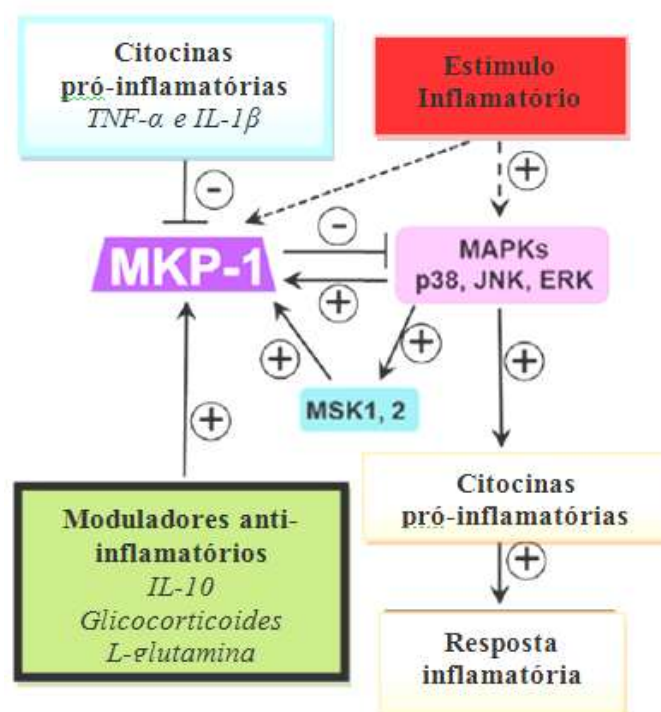
Fonte: Adaptado de Tabas; Glass (2013).

Entre os novos alvos farmacológicos anti-inflamatórios, merece destaque a MKP-1 (MKP-1 - *protein kinase phosphatase-1*), conhecida também como DUSP (DUSP, *dual-specificity phosphoprotein phosphatase*) é uma proteína quinase fosfatase e tem sido descrita

por regular negativamente a ativação da MAPK, em especial a p38 e JNK, em vários níveis, incluindo transcricional, pós-transcricional e na estabilidade proteica (COMALADA et al., 2012). Além disso, esta criticamente envolvida na sinalização inflamatória de macrófagos, com participação na regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (TUCSEK et al., 2011).

Segundo Wancket et al. (2012) a MKP-1 promove a acetilação em macrófagos estimulados com LPS, pois aumenta a afinidade entre MKP-1 e p38 e resultando na atenuação e posterior desfosforilação de p38 e JNK.

Figura III. Agentes reguladores e imunomoduladores da expressão de MKP-1 (MKP-1, *Mitogen-activated protein kinase phosphatase*).



Fonte: Adaptado de Wancket et al. (2012). Agentes imunomoduladores e reguladores da inflamação, através da modulação de MKP-1. Através da indução da expressão de MKP-1, incluindo glicocorticoides, IL-10 e L-glutamina, levando a desfosforilação de p38 e JNK e conseqüentemente atenuação da inflamação. Em contraste, fatores pró-inflamatórias, incluindo as citocinas TNF-α e IL-1β que inibem a expressão de MKP-1, prolongando vias de sinalização p38 e JNK e aumentando a inflamação. ERK e p38 promovem uma *upregulation* da expressão de MKP-1 através da indução de MSK1 (MSK-1, *mitogen- and stress-activated protein kinase-1*) e MSK (*mitogen and stress activated protein kinase-2*).

2.5 Fator nuclear kappa B

A família NF- κ B, que consiste de p65/RelA, cRel, RelB, p50, e p52, participam diretamente da ativação da transcrição de um amplo número de genes inflamatórios, presente em quase todos os tipos de celulares. Sua modulação envolve numerosos processos biológicos, tais como a inflamação, a imunidade, diferenciação, crescimento celular, apoptose e tumorigênese (YEOM et al., 2015). Recentemente, a disfunção dessa via foi causalmente associada a inúmeras PAMPs mediadas pelo sistema imunológico e evidência crescentes indicando a relação entre a progressão e instalação de doenças malignas humanas (ASHKENAZIA et al., 2016).

A ativação das isoformas IKK α e IKK β regulam duas vias de sinalização divergentes do NF- κ B, a via canônica (clássica) e a via não canônica (alternativa) (HOESEL, 2013). Na primeira, a sinalização excitatória pode ser mediada através de receptores TLR, receptor de interleucina-1 (IL-1R), receptor de fator de necrose tumoral (TNFR), bem como de receptores antigênicos. As moléculas típicas de sinalização dessa via são as citocinas (TNF- α e IL-1 β) e o LPS bacteriano. A estimulação através destes receptores leva à ativação do complexo I κ B quinase (IKK), que por sua vez fosforila I κ B α e principalmente por IKK2 (GAMBLE et al., 2012).

Na inflamação, a fosforilação de IKK (*I κ B kinase complex*) conduz à degradação de I κ B α e, translocação nuclear do NF- κ B para o núcleo celular intensificando a transcrição gênica de COX-2 e iNOS, com o intuito de amplificar o sinal inflamatório. Essas alterações ocasionam um *upregulating* de moléculas de adesão e quimiocinas (IL-8 e RANTES) no interior dos tecidos e do endotélio. Além dos efeitos nucleares do NF- κ B induzindo o recrutamento e a ativação de células efetoras, inicialmente, de neutrófilos e macrófagos para o sítio inflamatório (ANTUS et al., 2015).

Na via alternativa de ativação de NF- κ B, origina-se de diferentes classes de receptores incluindo, o fator de ativação de células B (*BAFFR- B-cell activation factor*), receptor de linfotoxina β (*LT β R -lymphotoxin β -receptor*), CD40, receptor ativador para o fator nuclear kappa B (*RANK-Receptor activator for nuclear factor kappa B*), TNFR2 e Fn14. Estes conduzem à ativação da quinase indutora de NF- κ B (*NIK - inducing NF-kappaB-inducing kinase*), a qual fosforila e ativa predominantemente a IKK α . A atividade desta última enzima induz fosforilação de p100 resultando em sua ubiquitinação e degradação parcial para p52 (HOESEL, 2013).

Como a etapa de fosforilação proteica é um processo dinâmico, no qual as fosfatases contrabalançam a ação das quinases, essas enzimas podem ser utilizadas para inibir a ativação

de NF- κ B. A fosfatase proteica 2, por exemplo, é uma serina/treonina fosfatase que foi descrita com atividade de desfosforilar e modular a atividade de IKK β (GUPTA et al., 2010).

Na terapia anticâncer, a inibição de NF- κ B é pelo menos um mecanismo de ação importante através do bloqueio do proteassoma, uma vez que a ativação de NF- κ B requer a degradação proteossômica de moléculas de I κ B (YEOM et al., 2015). Estudos com a desidroximetylepoxiquinomicina, um epóxiquinoide fúngico que tem atividade anti-inflamatória e antitumoral em vários modelos de camundongos, tem sido relatada como sendo um inibidor específico da translocação nuclear do NF- κ B. Contudo, a combinação de agentes quimioterapêuticos clássicos com inibidores da ativação de NF- κ B parece resultar em sinergias promissoras (UMEZAWA, 2006).

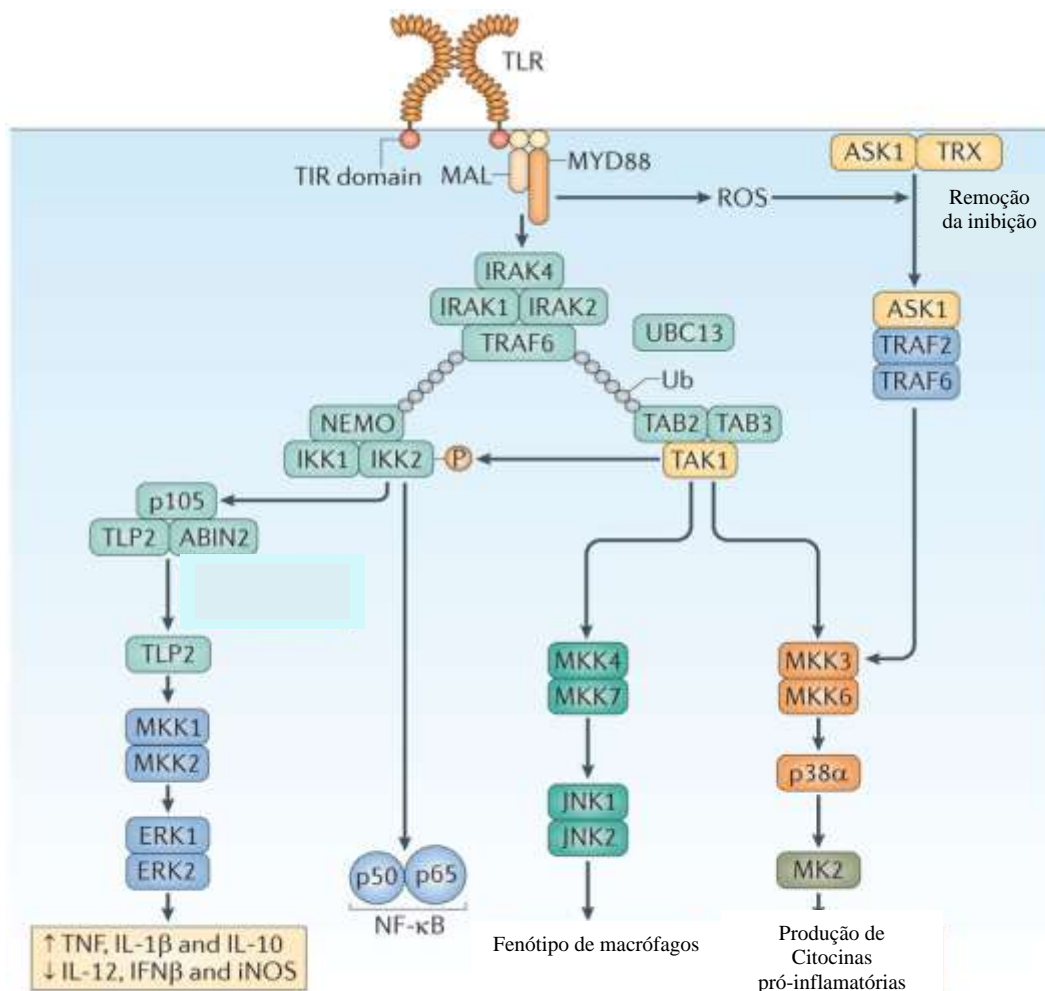
Uma abordagem para inibir a ativação de NF- κ B têm sido a ação de peptídeos que atravessam a membrana celular e bloqueiam a translocação nuclear do complexo NF- κ B, como por exemplo, o SN50, que inibe eficazmente a translocação nuclear de NF- κ B induzida por LPS e TNF- α em diferentes linhas celulares e atenua as respostas inflamatórias *in vivo* (GUPTA et al., 2010).

Além disso, o estrogênio e os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERM), tais como o raloxifeno, podem inibir a ativação de NF- κ B. Os AINEs aspirina e o sulindac inibem a ativação do NF- κ B pela inibição da fosforilação de I κ B α (YAMAMOTO; GAYNOR, 2001). Em concentrações mais elevadas, demonstrou-se que a aspirina bloqueia a atividade de NF- κ B ligando-se diretamente e inibindo a atividade quinase de IKK β , reduzindo a sua capacidade para se ligar a ATP, e ainda a atividade do proteassoma (DIKSHIT et al., 2006). Nesse contexto, a terapia com aspirina em altas doses pode ter aplicações no tratamento de doenças nas quais a atividade do NF- κ B está envolvida, incluindo câncer, diabetes e doença cardíaca (TAKADA et al., 2004).

Interessantemente, a indústria farmacêutica Bayer lançou o TPCA1, que exibe atividade inibitória sobre a IKK α . O composto de *Bristol Myers Squibb* (BMS 345541) também exibe ação contra IKK α e IKK β , exibindo seletividade de 10 vezes em relação à IKK β (GAMBLE et al., 2012).

Assim como os alvos descritos acima, novas terapias para uso clínicos com menores efeitos colaterais e/ou bloqueiam os reguladores citoplasmáticos (IKK e I κ B), e a segmentação da translocação nuclear do NF- κ B ou mesma interfira alostericamente com a sua ligação ao DNA, no núcleo celular, bem como *downregulation* dessas vias são drogas promissoras para o tratamento de doenças inflamatórias (ASHKENAZI et al., 2016).

Figura IV. Receptores TLR4 (*Toll like receptors*) via ativação dependente de MyD88, levando à translocação de NF- κ B para o núcleo e a transcrição gênica de MAPK p38, ERK, JNK, e citocinas genes pró-inflamatórias.



Nature Reviews | Immunology

Fonte: Adaptado de Arthur; Ley (2013).

2.6 Espécies reativas de oxigênio

Neutrófilos e macrófagos desempenham um papel importante no mecanismo de defesa do hospedeiro contra agentes invasores através da produção de ERO, óxido nítrico (NO) e citocinas (MITTAL et al., 2014). A geração de ERO em grandes quantidades tem sido implicada na propagação da inflamação ao desencadear a liberação de mediadores pró-inflamatórios (LEDESMA et al., 2009).

A fagocitose está associada à produção de ERO por meio da explosão respiratória, uma resposta efetora necessária para a destruição de microrganismos intracelulares. Embora, as ERO sejam principalmente produzidas pelo sistema NADPH oxidase de membranas citoplasmática nos fagócitos, o metabolismo oxidativo mitocondrial é também

uma das principais fontes de ERO celular. A produção de mERO (Espécie reativas de oxigênio mitocondrial) tem sido considerada uma consequência deletéria do transporte de elétrons. No entanto, evidências indicam que mERO também facilitam a sinalização na resposta imune inata e na atividade bactericida dos fagócitos (WEST et al., 2011).

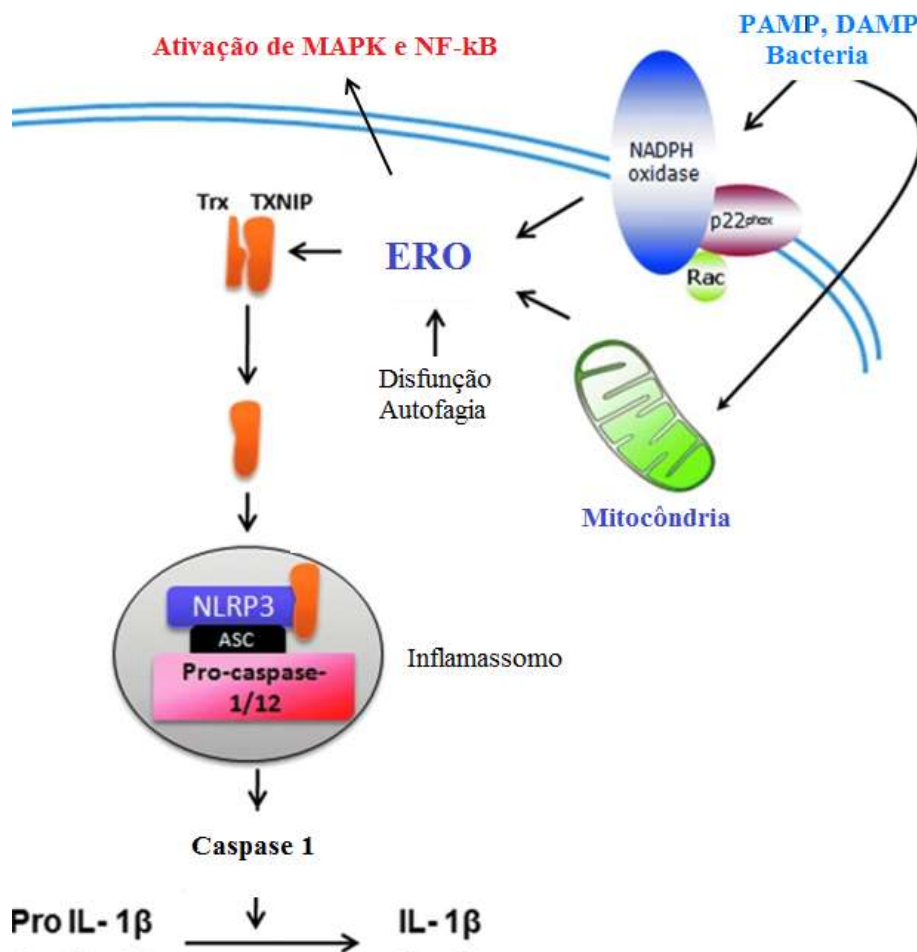
O recente foco de pesquisa sobre a mitocôndria é atribuído a observações de que a organela está envolvida na homeostase de íons celulares, estresse oxidativo, morte celular apoptótica e necrótica (INDO et al., 2017). De fato, estudos de Li et al. (2013) identificaram uma série de distúrbios comuns com ligações aparentes às mitocôndrias, incluindo doenças metabólicas (por exemplo, diabetes tipo 2) e cardiovasculares, cancer, doenças neurodegenerativas, distúrbios psiquiátricos, cefaleias da enxaqueca e processo de envelhecimento, algumas das quais estão associadas a mutações do DNA mitocondrial (mtDNA). O interesse nessa organela está associado ao seu papel na morte celular programada, na qual os anions superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e seus produtos ERO e a disfunção no processo de produção de energia (ATP – *adenosina trifosfato*) são fatores subjacentes comuns (KALUDERCICet al., 2014).

Embora, asERO possam danificar as proteínas celulares, lipídeos e ácidos nucleicos através da oxidação, são também segundos mensageiros cruciais em várias vias de sinalização sensíveis aoxirredução. Como as mitocôndrias são uma fonte significativa de ERO em muitas células eucarióticas, são sugeridas que ERO mitocondriais (mERO) modulem várias vias de sinalização (PARK et al., 2015).

Vários estudos demonstraram que drogas antioxidantes como a N-acetil-L-cisteína (NAC) podem inibir a ativação do NF- κ B impedindo a translocação nuclear do NF- κ B (DIRSCHet al., 1998). Recentemente, foram detectados níveis significativamente elevados de succinato (a um intervalo de alguns milimolar) em macrófagos expostos ao LPS, aumentandoos níveis do succinato, intermediário do ciclo ácido tricarboxílico nessa via bioquímica, e atuando como um metabólito na sinalização imune inata, que estabiliza HIF-1 α (*HIF-1 α -hypoxia inducible factor1 alpha subunit*) e aumenta a produção de interleucina-1 β durante a inflamação (TANNAHILL et al., 2013).

Mais ainda, o LPS estimula rapidamente a geração de mtERO e intracitoplasmático através da interação com a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase), bem como,estimula a oxirredução do NF- κ B e a transcrição de genes de pró-inflamatórios, resultando em ativação das vias das MAPKs, e a secreção de citocinaspró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 β .Assim, a modificação oxidativa de proteínas de sinalização por ERO e mtERO pode ser um mecanismo plausível para a ativação de NF- κ B e MAPK (KASAHARA et al., 2011).

Figura V. Papel importante ERO mitocondrial na regulação de inflamassoma, os complexos de alto peso molecular ativadores de caspases e citocinas inflamatórias em macrófagos.



Fonte: Adaptado de Mitall et. al., (2014).

2.7 Asma alérgica

Em todo o mundo, estima-se que aproximadamente 300 milhões de pessoas sofrem de asma, sendo que 250.000 mortes são atribuídas à doença a cada ano, podendo atingir em torno de 100 milhões até 2025 (GINA, 2017). No Brasil, há aproximadamente 20 milhões de asmáticos, se for considerada uma prevalência global de 10%, acarretando graves detrimentos aos cofres públicos e morbidade aos pacientes acometidos (BRASIL, 2012).

A fisiopatologia da asma é caracterizada por um processo inflamatório crônico, complexo e heterogêneo, com manifestações clínicas diversas, incluindo hiper-responsividade das vias aéreas com produção de muco, obstrução brônquica, edema, fibrose e remodelação pulmonar em resposta aos estímulos ambientais (alérgenos) (OLIN; WECHSLER et al., 2014).

Essas características decorrem da ativação do sistema imune (inato e adaptativo), *up-regulation* de mediadores pró-inflamatórios como a histamina, leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄), bem como recrutamento de múltiplas células inflamatórias, principalmente eosinófilos para os pulmões (POSTMA et al., 2015). A amplificação e a severidade dos sintomas da asma estão diretamente integradas à participação dos linfócitos, de fenótipo Th2 que secretam as citocinas IL-4 e IL-13 estimulando linfócitos B para troca de classe IgE, bem como a IL-5 na diferenciação eosinofílica (BARNES, 2008).

Atualmente, o tratamento da asma baseia-se em uma farmacoterapia paliativa com ação broncodilatadora (β -bloqueadores e antagonistas muscarínicos), anti-inflamatória e imunossupressora (corticoides inalatórios) e drogas antagonistas dos receptores de leucotrienos (Montelukast[®]), porém com baixa resposta terapêutica e severos efeitos adversos.

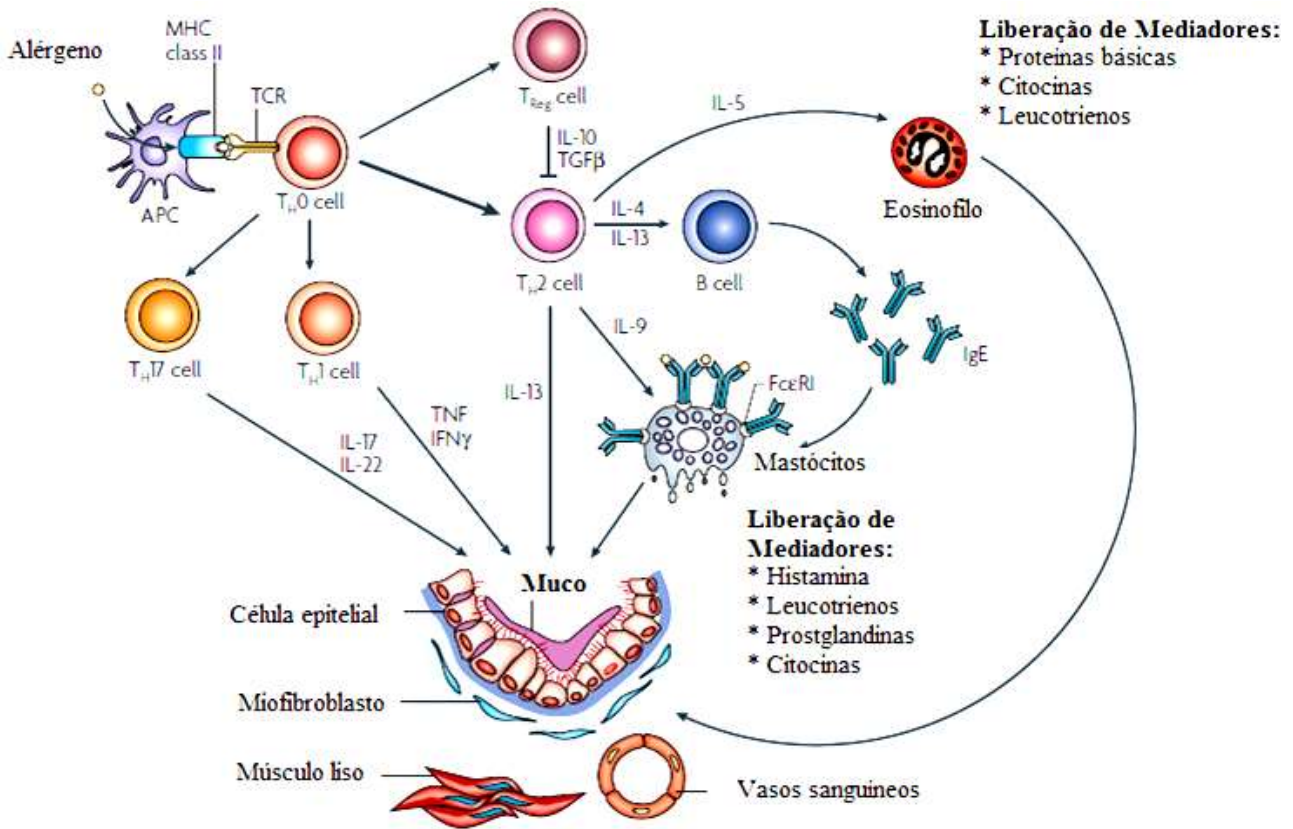
A inflamação mediada por células Th2 em vias aéreas asmáticas é suprimida pelos AIEs através da inibição da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, cujos genes codificadores são regulados pelo NF- κ B e a AP-1 (HOLGATE; POLOSA, 2008). Embora, em asmáticos resistentes aos AIEs, ocorra uma maior morbidade, mortalidade e prejuízos econômicos. Além disso, os AIEs não são inibidores eficazes das alterações da remodelação das vias aéreas e do uso crônico estar associados aos efeitos secundários debilitantes (NADER et al., 2012).

Portanto, são urgentemente necessárias, novas alternativas terapêuticas mais potentes, seguras e com acessibilidade à população, visando amenizar os mecanismos fisiopatológicos graves responsáveis pelo fenótipo asmático (KHORASANIZADEH et al., 2017).

Uma alternativa, embora com altos custos são os anticorpos monoclonais anti-citocinas anti-IL-5 (mepolizumab e reslizumab), mas também anti-IL-4/13 (LIU et al., 2013; HAMBLY; NAIR, 2014; SKLOOT, 2016; LEUNG et al., 2017), bem como o bloqueio de IgE (omalizumab) com anticorpos monoclonais que elevada especificidade (Figura VI).

Por estas razões, inúmeras estudos que objetivam a comprovação da segurança, eficácia e qualidade dos produtos naturais tenham relatados promissores resultados *in vivo* e *in vitro* para o tratamento da asma (WEI et al., 2012; TIWARI et al., 2014; HUANG et al., 2016; MOREL et al., 2017; SHERGIS et al., 2016).

Figura VI. A inflamação alérgica tem sido caracterizada como uma doença de células T auxiliares 2 (Th2). Portanto, os esforços para alterar o equilíbrio das células Th2-Th1 na asma têm sido responsáveis, quer por inibição de citocinas de células Th2 (em particular, IL-4, IL-13 e IL-5) ou Th1 (IFN- γ e IL-12). A inibição do componente alérgico da asma atópica pode também ser conseguida utilizando anticorpos monoclonais específicos para IgE. APC, célula apresentadora de antígeno; Fc ϵ RI, receptor de alta afinidade para IgE; Rh, recombinante humano; TCR, receptor de células T.



Fonte: Adaptado de Holgate & Polosa (2008).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o mecanismo de ação anti-inflamatório do extrato hidroetanólico da entrecasca de *Dilodendron bipinnatum* de seus isolados em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Coletar e identificação de material botânico;
2. Preparar o extrato e frações do EHD_b pelo particionamento convencional;
3. Isolar e elucidar as estruturas dos compostos isolados;
4. Avaliar o efeito do EHD_b sobre a viabilidade celular e apoptose;
5. Avaliar a ação do EHD_b sobre as concentrações de L-1 β , TNF- α e IL-10 *in vitro*;
6. Avaliar a ação do EHD_b sobre as concentrações de PGE₂ *in vitro*;
7. Avaliar a ação *in vitro* do EHD_b sobre a expressão de MAPKs (p38, ERK e JNK), MKP-1, COX-2;
8. Avaliar a ação *in vitro* do EHD_b sobre a translocação nuclear de NF- κ B;
9. Avaliar a ação *in vitro* do EHD_b sobre a produção de ERO e mtERO;
10. Avaliar a ação *in vitro* do EHD_b sobre a enzima LOX;
11. Avaliar a ação EHD_b sobre a infiltração pulmonar de leucócitos em modelo de asma alérgica;
12. Avaliar a ação do EHD_b sobre os níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 em modelo de asma alérgica;
13. Avaliar a ação do EHD_b sobre os níveis de IgE em modelo de asma alérgica;
14. Avaliar a ação do EHD na histopatologia pulmonar em modelo de asma alérgica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1 - *Dilodendron bipinnatum* Radlk.inhibits pro-inflammatory mediators through the induction of MKP-1 and down-regulation of MAPKp38/JNK/NF- κ B pathways and COX-2 in LPS-activated RAW 264.7 cells.

^{ab}Ruberlei Godinho de Oliveira, ^aGeovane Roberto de Campos Castilho, ^cFábio Miyajima^{a*}Domingos Tabajara de Oliveira Martins

^aDepartment of Basic Health Sciences, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Correa da Costa, no. 2367, Coxipó, Cuiabá, Mato Grosso, 78060-900, Brasil.

^bFaculdade de Farmácia, Universidade de Cuiabá, Avenida Beira Rio, no. 3100, CEP: 78025-190. Cuiabá-MT, Brasil.

^cDepartment of Molecular and Clinical Pharmacology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool L69 3GL, UK.

*Corresponding author. Tel.: +55 653615623; fax: +55 6536156231.

E-mail address: taba@terra.com.br (D.T.O. Martins).

¹Present address: Federal University of Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, Boa Esperança, Cuiabá, Mato Grosso, 78060-900, Brasil.

Abstract

ETHNOPHARMACOLOGICAL RELEVANCE: The stem bark of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. (Sapindaceae), a tree native to Pantanal of Mato Grosso, Brazil, popularly known as "mulher-pobre" (poor woman), has been historically used by the locals, after decoction and maceration, for the treatment of inflammatory conditions. We have recently shown that these preparations indeed possess anti-inflammatory properties, which are mediated by the inhibition of cell migration and the modulation of Th1 and Th2 cytokines. The NO pathway was not affected.

AIM OF THE PRESENT STUDY: The aim of the present study was to further investigate the mechanisms responsible for the anti-inflammatory properties of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb).

MATERIALS AND METHODS: HEDb was obtained by maceration of the stem bark of *D. bipinnatum* as previously described. The corresponding effects on a macrophage-like cell line, RAW 264.7, were investigated. The apoptosis of RAW 264.7 upon treatment with LPS, HEDb and N-acetyl-L-cysteine (NAC) was assessed by flow cytometry, using an Annexin V-PE kit. The production of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-10) and PGE₂ were evaluated by ELISA, after cell challenge with LPS. The intracellular redox state and changes in mitochondrial membrane potential were also assessed by flow cytometry, using DCFH-DA and JC-1 as probes. The protein expression levels of MAPK p-p38, p-ERK, p-JNK, MKP-1 and COX-2 were analysed by western blotting. Nuclear translocation of NF- κ B was assessed by immunofluorescence microscopy. The quantified results are presented as a nuclear:cytoplasmic ratio.

RESULTS: LPS, HEDb and NAC did not appear to decrease the number of viable cells in comparison to control treatment. HEDb attenuated the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and PGE₂ induced by LPS but did not affect IL-10. The production of ROS was also inhibited by HEDb (1, 5 or 20 μ g/mL), even at the lowest concentration; at 20 μ g/mL, HEDb was more effective than NAC, which was used as a positive control (74.1% and 66.2% inhibition of LPS's effect, respectively). LPS induced an increase in $\Delta\Psi$ m (19.2%, $p < 0.001$), while HEDb inhibited the change in $\Delta\Psi$ m (7.7% at 20 μ g/mL, $p < 0.001$). The results of western blotting showed that HEDb inhibited the expression of MAPK p-p38, p-JNK and COX-2, while the expression of MKP-1 was increased. p-ERK was not affected. LPS promoted the nuclear translocation of NF- κ B p65 (67%, $p < 0.01$) in RAW 264.7 cells, in comparison to baseline (33%). Pre-treatment with HEDb inhibited this translocation of NF- κ B p65 (58% at 20 μ g/mL, $p < 0.001$).

CONCLUSION: HEDb has a potent anti-inflammatory activity and acts on multiple targets and biological pathways of potential therapeutic

Keywords: *Dilodendron bipinnatum*, inflammation, MAPK, NF- κ B, macrophages, COX-2.

1. Introduction

Inflammation is a defensive response of the organism to infection, physical injury, chemical, or even radiation (Maskrey et al., 2011). Macrophages play a key role in the initiation of immune and inflammatory responses and are versatile cells that play many functions such as phagocytosis, production of a wide range of core molecules and antigen presentation (Ginhoux et al., 2016).

In response to many inflammatory stimuli, macrophages are activated via Toll-like receptors (TLR), for example, LPS by binding to TLR4 triggers the subsequent phosphorylation of cytoplasmic proteins such as mitogens activated protein kinases (MAPK) p38, ERK JNK (Hou et al., 2015) and which together trigger activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and subsequent transcriptional mediators that exacerbate inflammation (Park et al., 2015).

These coordinated events, amongst several other effects, increase the production of pro-inflammatory mediators like adhesion molecules, growth factors, pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), lipid eicosanoids (PGE2 and LTB4), as well as activation of inducible enzymes (COX-2 and iNOS) and intracellular reactive oxygen species (ROS). These cytoplasmic and nuclear alterations promote inflammation, augmented innate immune response, vasodilation, cell proliferation and survival (Lawrence, 2009; Costa et al., 2012).

Although a natural response to harmful stimuli aiming to deal with the tissues damaged and eradicates the initial cause of cell injury, inflammation is a generic process that can be detrimental for the functioning of organism if not limited.

Current management of inflammation with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) is widespread but may not reduce disease progression, and currently there are no treatments that effectively suppress chronic inflammation. Moreover, their continuous use may lead to clinically significant gastrointestinal kidney damage, higher risk of cardiovascular events, and liver injury, whether or not in tandem with inhibition of the COX-1 enzyme (Diaz-Gonzales; Sánchez-Madrid, 2015).

In pursuit of safer and more effective compounds of less side effects, the medicinal plants have been (and still remain) a vital source of therapeutics for various illnesses and disease processes, including inflammation (Dzoyem and Eloff, 2015). However, the road leading to the discovery and validation of novel compounds remains locked inside the floristic biodiversity of our lands, with Brazil particularly amongst the countries with the largest botanic wealth (MMA, 2002).

Dilodendron bipinnatum Radlk., Sapindaceae, is a native, but not endemic to Brazil. It is a tree characterized by outer margin leaflet teeth convex, noticeable ciliate leaflet margin, the lower midrib and lateral nerves possess spreading hairs; flowers usually with small well-developed petals with apically rounded calyx lobes (Gentry; Steyermark, 1987). It is widely distributed in Amazon, Cerrado (Brazilian Savanah) and Atlantic rain forest of Brazil where, as well as in the South American countries such as Peru, Bolivia and North of Paraguay according to List of Species of the Brazilian Flora (Somner et al., 2016).

It is popularly known as “mulher -pobre”, “maria-pobre”, “correiro”, “farinha-seca” or “mamona-pobre” (Bieski et al., 2012; Gentry; Steyermark, 1987).

Ethnopharmacological Studies of traditional in the Pantanal Mato Grossense communities revealed that the stem bark is used in the form of decoction and maceration by taking a glass of 150 ml, 2-3 times a day for 15-30 days. There are no reports of toxicity by the Pantanal dwellers on the use of these preparations (Bieski et al., 2012).

There are few reports in the literature on *D. bipinnatum* Radlk. and they refer to its antimicrobial properties (Santos et al., 2010), anti-inflammatory (de Oliveira et al., 2014) and toxicological analysis (de Azevedo Neta Mahon et al., 2014).

Preliminary phytochemical studies conducted by Santos et al. (2010) reported that the ethanol extract of the leaves and bark of *D. bipinnatum* presented in its composition, a mixture of steroids (β - sitosterol, stigmasterol, campesterol and 3-O- β -D-citostenone) and triterpenoids (cicloeucaleenol and 24-methylene cicloartanol). The standardization of HEDb was previously performed (de Oliveira et al., 2014) by means of phytochemical analysis revealing the presence of flavonoids and tannins as major metabolic classes such as epigallocatechin gallate, catechin, gallic acid, and gallic acid.

Although there are reports involved in the anti-inflammatory action of hydroethanolic extract of stem bark of *D. bipinnatum* (HEDb) by Oliveira et al. (2014), this study aimed to investigate whether the signaling pathways of MAPKs, cyclooxygenase and NF-KB participate in of the anti-inflammatory effect of hydroethanolic extract of *D. bipinnatum* in murine macrophages RAW 264.7 stimulated by LPS.

2. Material and Methods:

2.1. Botanic material

Inner stem bark of *D. bipinnatum* was harvested from Poconé, Mato Grosso, Brazil, coordinates S 15°56'528 and W 05°70'567. The access to the associated traditional knowledge and to genetic patrimony for the purpose of research was authorized by the Council on Genetic Patrimony of the Ministry of Environment (CGEN/MMA) under registry number 045/2009. Botanical identification was done at the Herbario UFMT by Prof. Germano

Guarim Neto and a voucher specimen (no. 20.529) was deposited at the same Herbarium. This plant is not included in the list of endangered Brazilian plants.

2.2 Cell culture

Murine macrophage-like RAW 264.7 cell lines were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro. The cells were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium plus 10% fetal bovine serum), supplemented by penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), under a temperature of 37 °C, atmosphere of 5% of CO₂ and 90 % humidity.

2.4 Drugs and reagents

Bradford reagent, *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, serotype 055:B8), dexamethasone acetate, ethylenediaminetetraacetic acid (sodium-EDTA), bovine serum albumin (BSA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), sodium fluoride, sodium orthovanadate, sodium pyrophosphate cocktail protease inhibitor tablets, N-Acetyl-L-cysteine (NAC), ammonium persulfate, triton X-100 and trizma base were obtained from Sigma-Aldrich (USA). JC-1 (BD™ MitoScreen, Heidelberg, Germany), PE Annexin V Apoptosis Detection Kits (BD Pharmingen™ Heidelberg, Germany), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Invitrogen, USA) and fetal bovine serum (FBS - Cultilab, São Paulo, Brazil). Nitrocellulose membrane, precision plus protein kaleidoscope standards from Bio-rad (Bio-rad Laboratories, Inc.). ECL Prime western blot detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, Brazil). Antibodies used were β-actin (sc-81178), GAPDH (sc-166545), phospho-p38 (sc-398305), phospho-ERK1/2 (sc-7383), phospho-JNK (sc-6254), COX-2 (sc-376861), MKP-1 (sc-271684), NF-κB p65 (sc-56735) and horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (sc-358914) was from Santa Cruz Biotechnology Inc. All reagents and drugs used were of analytical grade.

2.5. Extract preparation

The inner stem bark of *D. bipinnatum* was cleaned, dried at room temperature, and milled in an electric mill (model TE-625 Tecnal, São Paulo, Brazil) with mesh sieve size 40. The dried powder obtained was macerated in 70% hydroethanolic solution (1:3, w/v) for 7 days, filtered and concentrated in a rotary evaporator (Marconi MA 120, São Paulo, Brazil) under reduced pressure of 600 mm Hg at 40°C. The residual solvent was eliminated in an oven at 45°C, for 24 h, obtaining HEDb, which was stored in amber bottle and kept at 4°C. At the time of use, HEDb was dissolved in distilled water to obtain the desired concentration.

2.6 Cell viability assay

Flow cytometry data analysis was performed using the Annexin V-APC kit of BD Pharmingen (BD Biosciences, Heidelberg, DEU) according to the kit manual. In brief, RAW 264.7 cells, of density 3×10^5 cells per dish were plated on a 12-well microplate containing medium (growth control) with/without HEDb at concentrations of 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h, were harvested and washed twice with cold phosphate buffer saline (PBS). Cells were then resuspended in one time binding buffer (0.1 M HEPES, pH 7.4, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) at a concentration of 1×10^6 cells/mL. To 100 μL of this cell suspension, 5 μL Annexin V-APC and 5 μL of 7-amino-actinomycin D (7-AAD; included in the kit) were added and incubated for 15 min in the dark. Then 400 μL of 1X binding buffer was added. Within 1 h FACS analysis was performed at an excitation wavelength of 650 nm. Data were analyzed by using the CellQuest software program (Becton Dickinson, USA). For each sample, 20,000 events were collected. Values of $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ were considered non-cytotoxic (Suffness and Pezzuto, 1990).

2.7 Anti-inflammatory assays

2.7.1 Cytokine quantification in the cell culture

RAW 264.7 cells were pretreated by with or without HEDb (1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$) for 1 h and stimulated by LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h. The levels of cytokines (pg/mL) TNF- α , IL-1 β and IL-10 were determined using ELISA Kit (eBioscience, USA), in accordance with manufacturer's instructions. Microplate reader Multiskan[®] (Thermo Scientific, USA) was used for reading the absorbance.

2.7.2 Measurement PGE₂

RAW 264.7 (5×10^5 cells/well) were seeded onto a 12-well culture plate at 37 °C for overnight in medium. The cells were pre-incubated with different concentrations of HEDb (1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and Indomethacin (15 $\mu\text{g/mL}$) for 1 h and then stimulated for 24 h with or without LPS. The PGE₂ concentration in the culture supernatant was also measured using an enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7.3 Determination of intracellular reactive oxygen species

Flow cytometry data analysis was performed using the molecule 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) freely permeates cells, and following incorporation into cells, is converted into the fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF) by oxidative substances, revealing the intracellular production of redox-active substances. In brief, RAW

264.7 cells, of density 3×10^5 cells per dish were plated on a 12-well microplate containing medium (growth control) with/without HEDb (1, 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and NAC (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h, were harvested and washed twice with cold PBS and incubated with 3 μM DCFH-DA for 30 min at 37°C in the dark. Following washing with cold PBS, the fluorescence was captured using a FACS Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), for each sample, 20,000 events were collected. DCF fluorescence was measured at an excitation wavelength of 488 nm and emission at 515–540 nm. Data were analyzed by using the CellQuest software program (Becton Dickinson, USA).

2.7.4 Detection of mitochondrial membrane potential

Flow cytometry data analysis was performed using the molecular probe JC-1 (BD™ MitoScreen Kit, USA) to detect apoptosis from changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) due to the accumulation of JC-1 aggregates. In brief, RAW 264.7 cells, of density 3×10^5 per dish were plated on a 12-well microplate containing medium (growth control) with/without HEDb with concentration from 1, 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h, were harvested and washed twice with cold PBS. Cells were then resuspended in PBS cold supplemented and containing JC-1 at a concentration of 1×10^6 cells/well and incubated with for 15 min at 37 °C. The cells were washed according to the kit protocol, for each sample, 20,000 events, were acquired on a BD Accuri C6 flow cytometer using the kit template.

2.7.5 Western blot analysis

RAW 264.7 were seeded overnight at a starting density of 2×10^6 cells/mL to a 6-well plate. The cells were incubated in the medium (growth control), HEDb (1, 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h. After, the cells were incubated to LPS challenge to evaluated to response of MAPK (p38, JNK e ERK) and nuclear factor kappa B (NF-KBp65), for Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) for 4 h and 24 h for COX-2. Cells were harvested in ice-cold lysis buffer containing (0.5 mM sodium ortavanadate, 1 mM EDTA, protease inhibitor mixture and phosphate-buffered saline, pH 7.4). The cell lysate was obtained from the supernatant after centrifugation at 14.000 rpm 4° C 30 min. The protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Sigma-Aldrich, USA). Equal amounts of proteins were blotted onto a membrane nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Proteins (40 $\mu\text{g}/\text{lane}$) were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-radLaboratories, Inc.). The transferred proteins were incubated 4 h at 4°C with a dilution of primary antibody for the p-ERK1/2, p-p38, p-JNK, MKP-1, NF-KBp65, COX-2 and β -actin or GAPDH and then washed four times with

Tris-buffered saline (TBS) containing 0.5% Tween-20 (TBS-T, pH 7.4) for 10 min. After washing, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 2 h and again washed four times in TBS-T. Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was used for 2 h at room temperature in 1:10.000 dilutions (Santa Cruz Biotechnology- USA). The membranes were developed with chemiluminescent detection ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences, Brazil). The intensity of each band was quantitatively determined using Chemidoc (Bio-radLaboratories, Inc.) and quantitatively determined using Image J software (<http://rsb.info.nih.gov>).

2.8 Data analysis

The results were expressed as mean \pm standard error medium ($X \pm SEM$). Comparisons between means were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA). When significant, it was followed by multiple comparisons of Student-Newman-Keuls test. P values < 0.05 were considered significant. The assays were performed in triplicate. All values were analyzed with GraphPad Prism[®] software version 5.01. Inc. La Jolla, CA 92037 USA (www.graphpad.com).

3. Results

3.1 HEDb did not alter cell viability

Stimulation of RAW 264.7 cells with LPS (1 / ml) did not affect cell viability as compared to baseline group (80%). Similarly, pretreatment with HEDb (1, 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and NAC (10 mg / ml) did not cause cytotoxicity compared to LPS group (80% of cell viability) (Figure 1A and 1B).

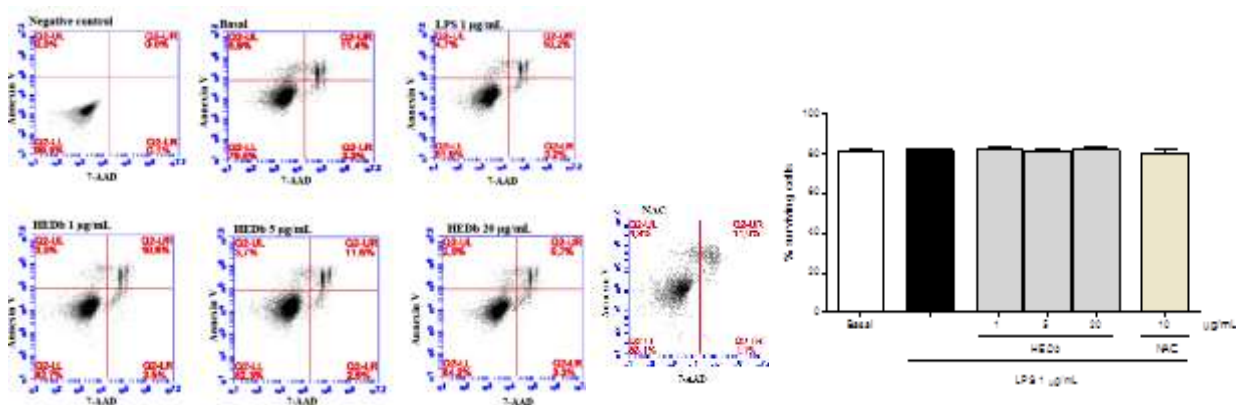


Figure 1. A: Histogram of flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential from LPS induced depolarization in RAW 264.7 macrophages. Q2LL represents viable cells. **B:** Effects of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and N-acetyl cysteine (NAC - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on cell viability of cell RAW 264.7 with the annexin V-APC and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) kit after 24 h of treatments and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells (20,000) were measured in each single experiment.

3.4.3.3 HEDb attenuates LPS-induced IL-1 β and TNF- α production in RAW 264.7 macrophages

The concentration of IL-1 β in the basal group was 8.7 \pm 5.07 pg/mL. The stimulated group, with received LPS presented an increase of 94.8% (p <0.001) in the concentration of IL-1 β when compared to basal group. Pretreatment with HEDb reduced in a dose dependent manner the IL-1 β concentration in the cell supernatant, with the highest inhibitory effect of 61.5% (p <0.001) at the highest concentration tested (20 μ g/mL) (Figure 2).

TNF- α concentration determined in the supernatant of RAW 264.7 cells was 368.0 \pm 150.4 pg/mL. The LPS group showed an increase of 152% (930.2 \pm 258.8, p <0.001) in the concentration of this cytokine, in relation to baseline group (Figure 3).

Pre-treatment with the extract reduces TNF- α concentration only at 20 μ g/mL (27.9%, p <0.05). At 10 μ g/mL of dexamethasone a decrease of 48% (p <0.01) occurred when compared to LPS group.

The IL-10 concentration determined in the supernatant of RAW 264.7 cells was 123.4 \pm 0.81 pg/ml. LPS induction had no effect on the IL-10 levels (p >0.05) in relation to the baseline group. Pretreatment with HEDb (1, 5 and 20 / ml) and 10 μ g/mL dexamethasone did not affect (p >0.05) IL-10 levels in the cell supernatant when compared to cells stimulated with 1 μ g/ml LPS.

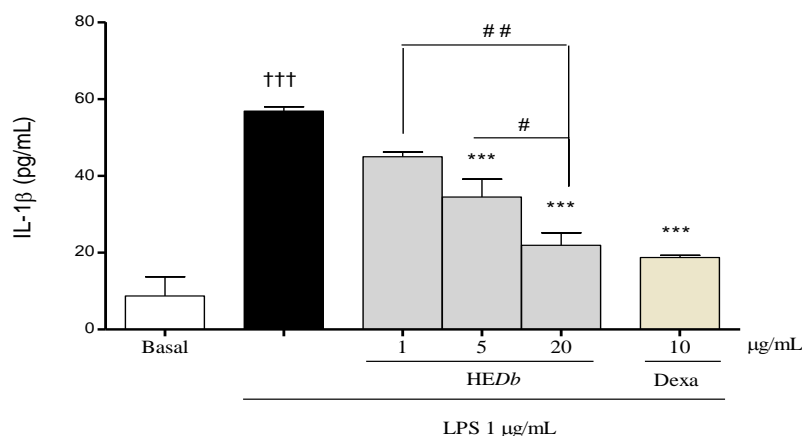


Figure 2. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 μ g/mL), and dexamethasone (Dexa - 10 μ g/mL) for 1 hour before a 24-h incubation with LPS (1 μ g/mL). The concentration of IL-1 β was measured in culture medium using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit. The vertical lines represent S.E.M. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls test. ††† p < 0.001 vs. basal; *** p < 0.001 vs. LPS. # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs. 20 μ g/mL.

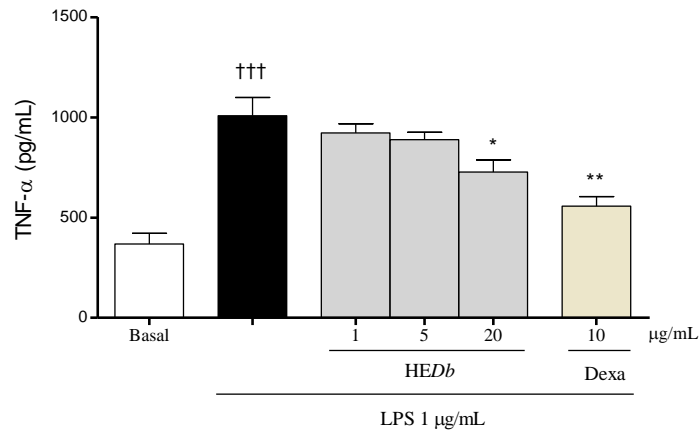


Figure 3. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$), and dexamethasone (Dexa - 10 $\mu\text{g/mL}$) for 1 hour before a 24-hour incubation with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). The concentration of TNF- α was measured in culture medium using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit. The vertical lines represent S.E.M. One-way analysis of variance, followed by Student-Newman-Keuls test. ††† $p < 0.001$ vs. basal; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. LPS.

3.4.3.3 HEDb attenuates LPS-induced PGE₂ production in RAW 264.7 macrophages

The basal concentration of PGE₂ in the culture medium of RAW 264.7 cells was 31.87 ± 3.9 $\mu\text{g/mL}$. LPS treatment significantly increased PGE₂ production and release (94.8%, $p < 0.001$). Pre-incubation with HEDb reduced PGE₂ concentration in culture medium (significant only at 20 $\mu\text{g/mL}$, 61.48%, $p < 0.001$), but not to the basal level, while indomethacin (positive control) decreased PGE₂ to the basal levels (99.6%, $p < 0.001$) (Fig. 4).

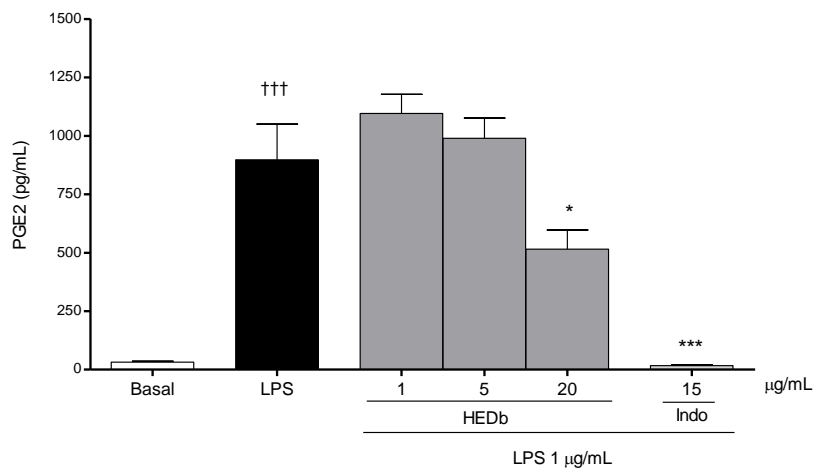
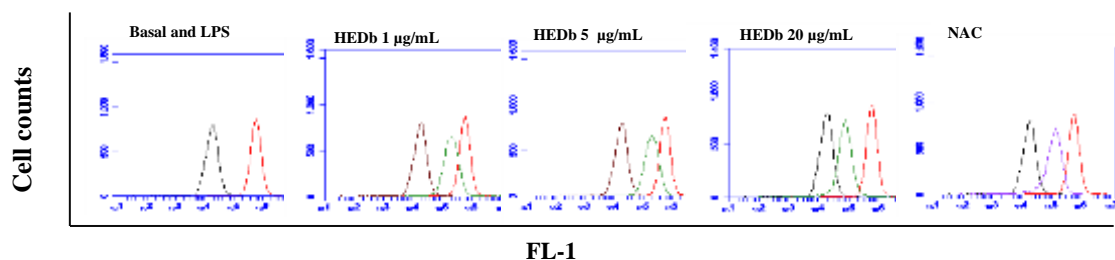


Figure 4. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and indomethacin (Indo - 15 $\mu\text{g/mL}$) for 1h before a 24h incubation with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). The concentration of PGE₂ was measured in culture medium using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit. The vertical lines represent S.E.M. One-way analysis of variance, followed by Student-Newman-Keuls test. ††† $p < 0.001$ vs. basal; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. LPS

3.5.1 HEDb attenuates LPS-induced intracellular ROS production in RAW 264.7 macrophages

The level of ROS in response to LPS was increased by about 248.6% ($p < 0.001$) in relation to baseline group (222.6 ± 66.3). HEDb inhibited in a non-concentration – dependent fashion the ROS production to its highest effect with 20 $\mu\text{g/mL}$ (67.5%, $p < 0.001$). NAC (10 $\mu\text{g/mL}$), the standard used in this assay, inhibited ROS production by 76.8% ($p < 0.001$) compared to the LPS group (Figure 5A and 5B).

A.



B.

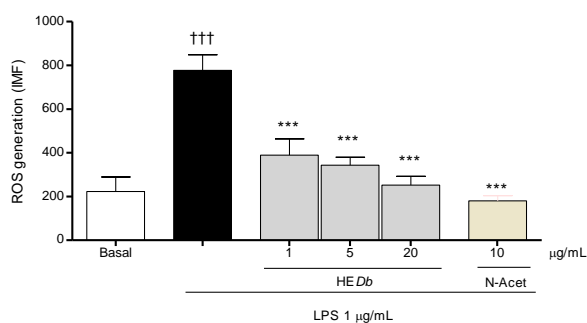


Figure 5. A. Histogram of flow cytometry analysis of ROS production induced by LPS in RAW 264.7 cells. B. Effects of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bispinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$), and N-acetyl cysteine (NAC - 10 $\mu\text{g/mL}$) on lipopolysaccharide (LPS)-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) production. The cells were pretreated for 1 h before 24 h incubation with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). The concentration of ROS was measured in the cells were exposed to 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA - 3 μM) for 30 min. The vertical lines represent S.E.M. One-way analysis of variance, followed by Student-Newman-Keuls test. ††† $p < 0.001$ vs. basal; *** $p < 0.001$ vs. LPS.

3.5. HEDb protects $\Delta\Psi\text{m}$ from LPS induced depolarization in RAW 264.7 macrophages

LPS treatment for 24 h caused a marked increase (19.2%, $p < 0.001$) in mitochondrial membrane depolarization compared to untreated cells (3.1%). All concentrations of HEDb (1; 5 or 20 $\mu\text{g/mL}$) prevented the mitochondrial membrane depolarization induced by LPS, reaching the maximal value with 5 $\mu\text{g/mL}$ ($6.6 \pm 1.0\%$, $p < 0.001$) relative to LPS treated cells ($19.2 \pm 0.2\%$) (Fig. 5A and B).

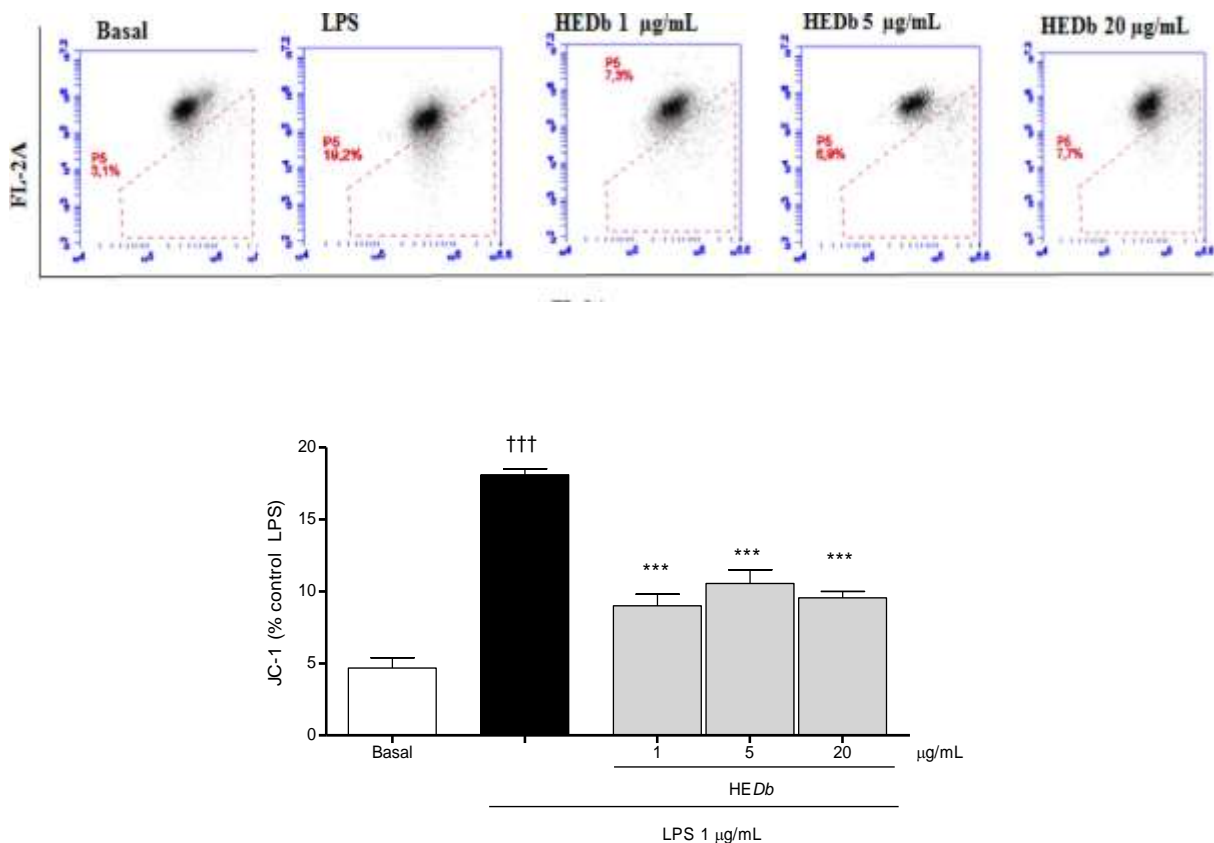


Fig. 6. Histogram of flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential from LPS induced depolarization in RAW 264.7 macrophages (A). Effect of HEDb (1; 5 or 20 µg/mL) on LPS-induced changes of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of RAW 264.7 macrophages (B). The mitochondrial membrane potential was measured by the JC-1 assay for flow cytometry (0.5 µM, 30 min). Mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red/green fluorescence ratio. Results are expressed as mean \pm standard error mean. Statistical significance was evaluated by one-way analysis of variance, followed by Student-Newman-Keuls test. ††† $p < 0.001$ vs. basal; *** $p < 0.001$ vs. LPS.

3.5.3 HEDb inhibits LPS-induced MAPK p-p38 and p-JNK activation in RAW 264.7 macrophages

LPS-stimulation of the RAW cells caused significant increase (94.6%, $p < 0.001$; 72.1%, $p < 0.001$; 60.2%, $p < 0.001$) in the expression of p38-p, p-ERK1 / 2 and p -JNK, respectively, compared to the baseline group. HEDb at the three concentrations tested inhibited in a non-concentration dependent manner the phosphorylation of p-JNK, causing maximum effect at 1 µg/mL (57.6, $p < 0.001$). At 5 and 20 µg/mL HEDb attenuated in a nonconcentrated fashion, the p-p38 phosphorylation, producing maximum effect at 5 µg/mL (52%, $p < 0.001$) when compared with LPS group. None of the three concentrations HEDb tested produced inhibition of p-ERK phosphorylation. The positive controls SB203580 (0.1 mM), PD98025 (10 mM) and SP600125 (10 uM) inhibited P-p38 (86%; $p < 0.001$), p-ERK (72%, $p < 0.05$) and p-JNK ($p < 0.001$) phosphorylation respectively, compared to LPS group (Figure 7, 8 and 9).

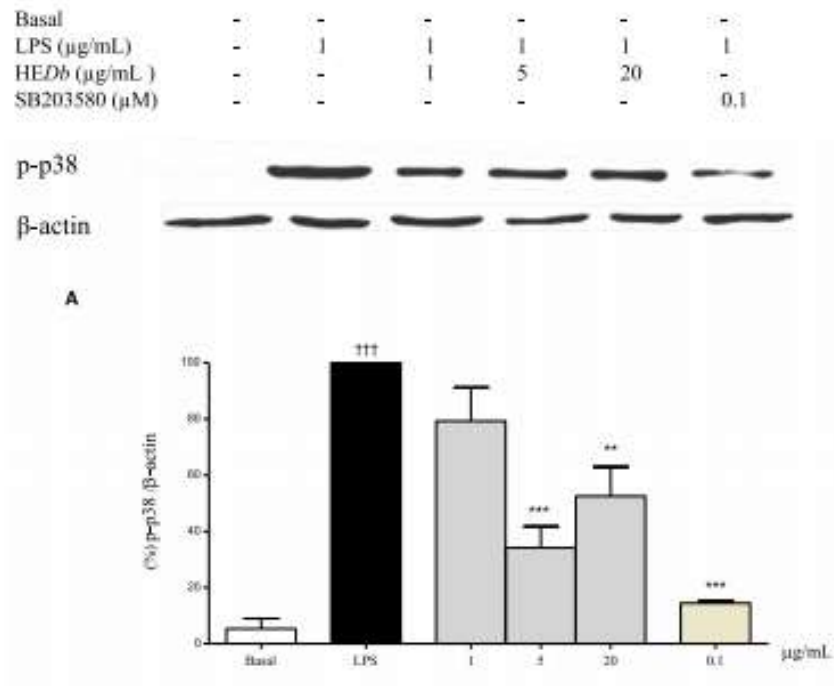


Figure 7. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and positive control SB203580 (0,1 μM) on the levels of p-p38 in RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharides (LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) after 30 min. The p-p38 levels were normalized against β -actin. The relative intensity (%) was calculated by the ratio of p-ERK / β -actin and expressed as percentage inhibition compared to LPS group. Each column represents the mean of 3 independent experiments. The vertical bars indicate S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. †† p <0.01 versus untreated control (baseline) and ** p <0.01, *** p <0.001 versus LPS treated.

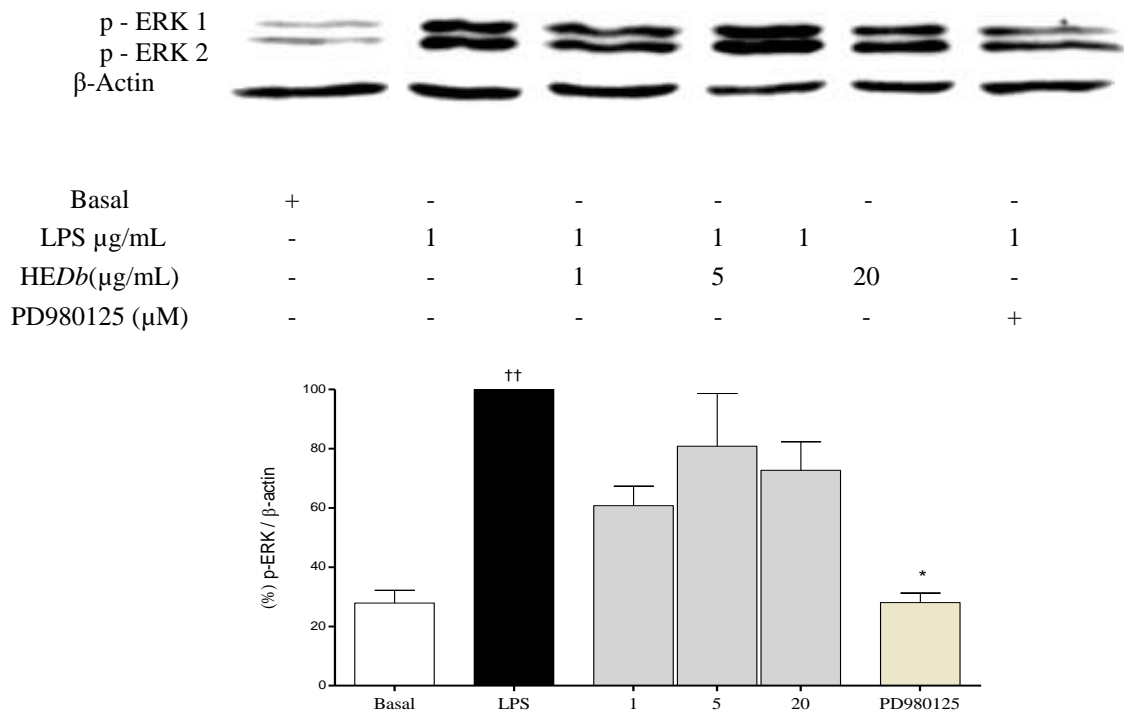


Figure 8. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and positive control (PD980125 - 10 μM) on the levels of p-ERK in lipopolysaccharides -stimulated RAW 264.7 (LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) after 30 min. The p-ERK levels were normalized against β -actin. The relative intensity (%) was calculated by the ratio of p-ERK/ β -actin and expressed as inhibition percentage compared to LPS group. Each column represents the mean of 3 independent experiments. The vertical bars indicate S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. $\dagger\dagger p < 0.01$ versus untreated control (baseline) and $* p < 0.05$ versus treated with LPS.

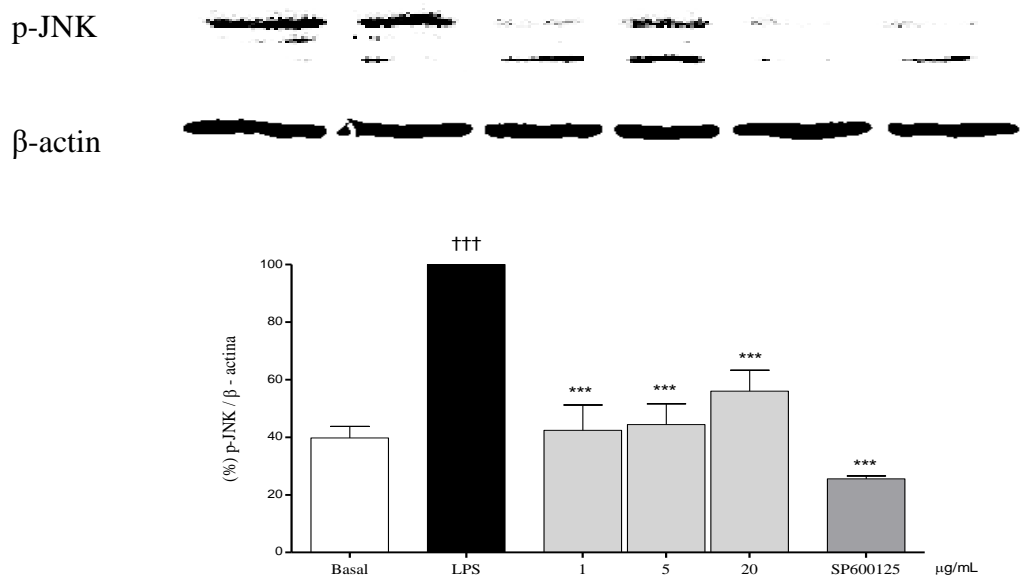


Figure 9. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and positive control SP600125 (20 μM) on the expression of p-JNK in RAW 264.7 cells stimulated with lipopolysaccharides (LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) for 30 min. The relative intensity (%) was calculated by the ratio of p-JNK/ β -actin and expressed as inhibition percentage compared to LPS group. Each column represents the mean of 5 independent experiments. The vertical bars indicate the S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls. $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ versus nontreated control (basal) and $*** p < 0.001$ versus LPS treated.

3.5.4 HEDb inhibits LPS-induced NF- κ Bp65 activation in RAW 264.7 macrophages

LPS promoted activation of NF- κ Bp65 (67%, $p > 0.01$) in RAW 264.7 cells compared to baseline group (33%). Pretreatment with the three concentrations of HEDb inhibited nuclear translocation of NF- κ B to the nucleus, with maximum inhibition of 20 $\mu\text{g/mL}$ (58%,

3.5.4 HEDb inhibits LPS-induced COX-2 activation in RAW 264.7 macrophages

The level of COX-2 in response to LPS was increased by 54% ($p < 0.001$) when compared to the baseline group. At 20 $\mu\text{g/mL}$ HEDb inhibited by 30% ($p < 0.05$) the expression of COX-2. Indomethacin, 10 $\mu\text{g/mL}$, inhibited COX-2 activation by 45% ($p < 0.001$), compared to the LPS group (Figure 11).

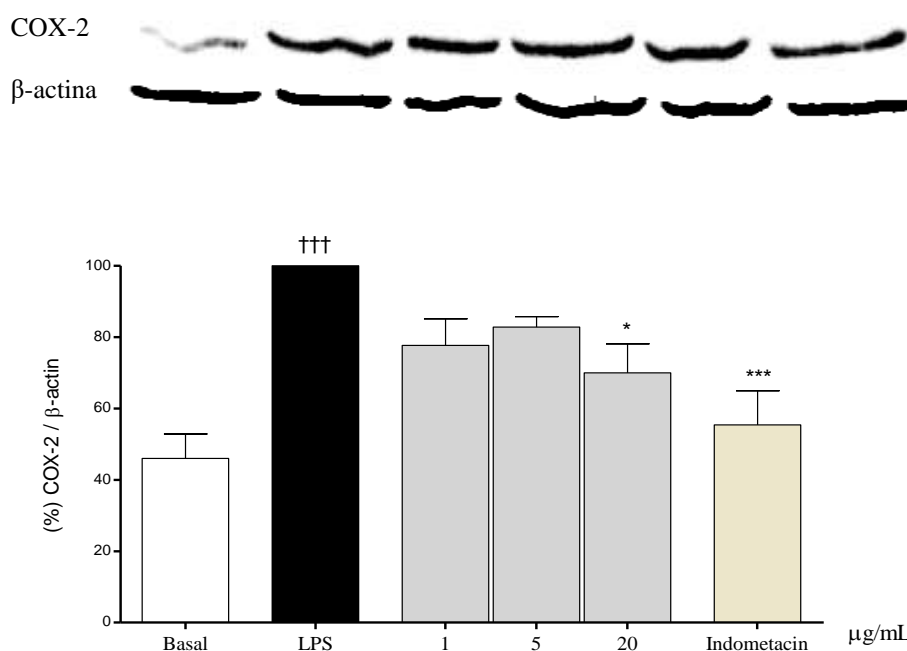
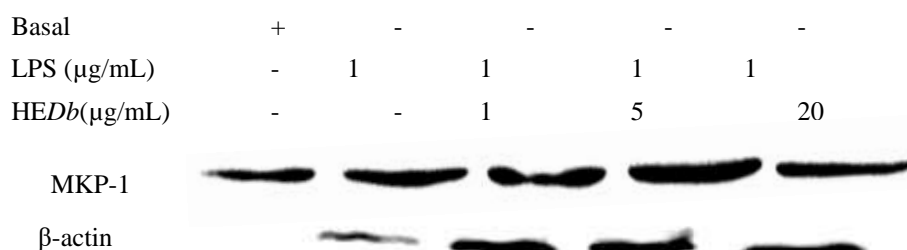


Figure 11. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and indomethacin (Indo, 20 μM) on the concentrations of the cyclooxygenase (COX-2) in lipopolysaccharides (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulated RAW 264.7 cells after 20 h. COX-2 levels were normalized with respect to β -actin. The relative intensity (%) was calculated by the ratio of COX-2 / β -actin and expressed as percentages of inhibition compared to LPS group. Each column represents the mean of 5 independent experiments. The vertical bars indicate the S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. ††† $p < 0.001$ vs. untreated control (baseline), * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. LPS treated.

3.5.5 HEDb induced LPS- inhibited MKP-1 activation in RAW 264.7 macrophages

LPS induced an increase of 80% ($p < 0.05$) in the activation of MKP-1 when compared with the baseline group (20%). Pretreatment with HEDb markedly up-regulated the expression of MKP-1, reaching maximum response with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (171%, $p < 0.001$) compared to the LPS group (Figure 12).



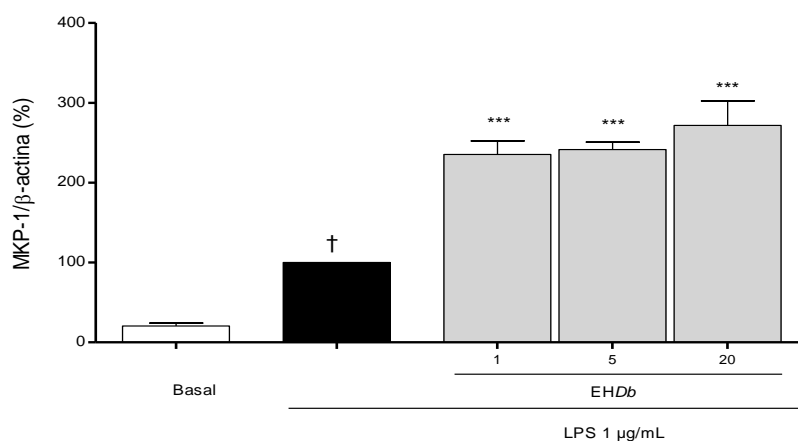


Figure 12. Effect of 70% hydroalcoholic extract of *Dilodendron bipinnatum* inner stem bark (HEDb - 1, 5 and 20 µg/mL) on the expression of MKP-1 lipopolysaccharide-stimulated (LPS, 1 µg/mL) RAW 264.7 cells no tempo de 4 h. the levels of MKP-1 levels were normalized with respect to β-actin. Relative intensity (%) was calculated by the ratio of MKP-1/β-actin and are expressed as percentages of inhibition compared to LPS group. Each column represents the mean of 5 independent experiments. The vertical bars indicate S.E.M. One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. † $p < 0.05$ vs. untreated control (baseline) and *** $p < 0.001$ vs. LPS treated.

4. Discussion

Macrophages play a central role in regulating inflammation and both the innate and adaptive immune responses. To exhibit their functions, macrophages must undergo a series of cellular processes including activation, proliferation, differentiation and cytokine production when stimulated by LPS, representing important targets for anti-inflammatory drugs (Chenga et al., 2014).

This study focused on anti-inflammatory effects of HEDb on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Noncytotoxic concentrations of HEDb (1, 5 and 20 µg/mL) were selected based on Alamar blue assay (Oliveira et al., 2014). In order to verify whether at these concentrations apoptosis and/or necrosis are induced, cell viability tests with Annexin-V and 7-AAD staining were carried out (Zimmermann and Meyer, 2011). In this assay, pretreatment of the RAW 264.7 cells stimulated with LPS with HEDb did not alter cell viability, indicating that the tested concentrations of HEDb did not result in cellular apoptosis and necrosis, corroborating the findings of de Oliveira et al. (2014).

Given that macrophages are the principal immunological cells responsible for host defense, in addition to being the principal target of LPS, the anti-inflammatory effect of HEDb due to the direct effect on the macrophage. We demonstrated that in RAW 264.7 macrophage stimulated with LPS, HEDb significantly reduces the activation of p-p38MAPK, p-JNK, COX-2 and NF-κBp65 protein expressions, generation of ROS and mitochondrial membrane depolarization. Moreover, HEDb caused an increase in the expression of MKP-1 and a reduction in the concentrations of pro-inflammatory cytokines (IL-1β and TNF-α), as

well as PGE₂ in the cell supernatant. No changes were observed in the expression of p-ERK1/2 and IL-10 levels.

The MAPKs p38, JNK and ERK play key roles in inflammatory process. It is reported that blockage of macrophage p38, ERK and JNK pathways causes down regulation of COX-2 expression, TNF- α and IL-1 β production during inflammation (Park et al., 2015).

Because of the broad pro-inflammatory role of MAPKs in several in vitro systems, inhibition of this pathway has been advocated as a novel therapeutic strategy for inflammatory diseases (Guma et al., 2012; Shi et al., 2015; Normam, 2015; Yokota, WANG, 2016).

The direct inhibition of the phosphorylation of p38, JNK and NF- κ B in RAW 264.7 may respond, at least in part, for the anti-inflammatory effect of HEDb previously described by Oliveira et al. (2014), which is independent of ERK 1/2 inhibition.

The MKP-1, a phosphatase that participates in phosphorylation of the three MAPK, particularly p38 and JNK, represents a novel target for anti-inflammatory drugs (Tucsek et al., 2011). It is critically involved in inflammatory signaling of macrophages, and is responsible for switching off pro-inflammatory cytokine production in vitro and in vivo (Bognar et al., 2013). HEDb induces activation of MKP-1 and hence caused inhibition of p38 and JNK activation of pro-inflammatory signaling pathways (Manetsch et al., 2012).

Several studies have reported that LPS activates the MAPK pathways and the translocation of NF-KBp65 fraction to the cell nucleus, which induces the transcription of inflammatory mediators such as IL -1 β , TNF- α and COX-2 (Park et al., 2013).

IL-1 β and TNF- α cytokines are the principal proinflammatory mediators of the macrophages after stimulation with LPS. HEDb at the three concentrations tested inhibited concentration-dependently IL-1 β levels in the cell supernatant, whereas TNF- α concentration was only lowered at the highest concentration. However, no changes were observed in the levels of IL-10 by pre-treatment of RAW 264.7 with HEDb. The reduction in the concentration of these two cytokines in vitro by HEDb is in line with the results in the test of acute peritonitis by LPS in mice (Oliveira et al., 2014), but differ as regards to effect on IL-10 an important pleiotropic immunoregulatory cytokine produced mainly by macrophages and which controls the degree and duration of the inflammatory response. These results indicate that inhibition of IL-1 β and TNF- α by HEDb stems from a direct action on macrophages and that this effect contributes, at least in part, to the anti-inflammatory mechanism of HEDb

It is not known why HEDb increased levels of IL-10 only in vivo. However, some hypotheses may be considered, such as pharmacokinetic interference, neuronal modulations and / or hormonal, communication between different cell types and even release IL-10 by cells other

than macrophages (T and B lymphocytes, dendritic cells, monocytes and mast cells) (Veranth et al., 2006; Trifunovic et al., 2015).

Generation of ROS in large quantities has been implicated in the propagation of inflammation to trigger the release of pro-inflammatory mediators which stimulate the recruitment of additional macrophages to the inflammatory site. It also plays a key role in phagocytosis by macrophages (Ledesma et al., 2009). LPS rapidly stimulates mitochondrial generation and intracytoplasmic ROS in RAW 264.7 cells, resulting in activation of the pathways of MAPKs and cytokine secretion, mainly TNF- α and IL-1 β (Kasahara et al., 2011). HEDb inhibited mitochondrial and intracytoplasmic levels of ROS in RAW 264.7, indicating that the inhibition of ROS is an important part of the anti-inflammatory mechanism of action HEDb.

It is accepted that the expression of pro-inflammatory cytokines depends on COX-2 expression during inflammation (YAMAMOTO, GAYNOR et al, 2001). COX-2 is an inducible isoform of prostaglandin synthase found in activated phagocytes responsible for generating prostanoids during inflammation (Eermert et al., 1998). HEDb inhibited COX-2 expression as well as PGE₂ concentration in the supernatant of RAW 264.7 activated by LPS, suggesting that PGE₂ reduction results from the inhibition of COX-2 and that this pathway plays an important role in anti-inflammatory effect HEDb.

Based on previous and present results, we concluded that the HEDb has a potent anti-inflammatory activity, acting on multiple targets of biological relevance but whose precise mechanistic routes warrant further investigations. However, to our work HEDb seemed to exert its anti-inflammatory effects particularly by augmenting MPK-1 expression and attenuating mitochondrial destabilization, ROS production as well as JNK and p38 MAPKs, resulting eventually in diminished activation of NF- κ B. This in turn downregulated the transactivation of target genes, including IL-1 β and TNF- α , and COX-2 (with consequent reduction of PGE₂) in a model of LPS-activated RAW264.7 cells. Our findings suggest that HEDb provides new insights into a novel mechanism of anti-inflammatory action, thus highlighting its potential as a phytotherapeutic agent.

Acknowledgements

The present research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Pró-Amazônia – Biodiversidade e Sustentabilidade/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support (proc. no. 23038.000731/2013-56), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso

(FAPEMAT – Process no. 157552/2014) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/BIONORTE – Process no. 551737/2010-7).

4. REFERENCES

Bazzoni, F., Tamassia, N., Rossato, M., Cassatella, M. A. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: Lessons from neutrophils. *European Journal Immunology*, v. 40, p. 2360-2368, 2010.

Bellik, Y., Boukrâ, L., Alzahrani, H.A., Bakhotmah, B.A., Abdellah, F., Hammoudi, S.M., Iguer-Ouada, M., 2013. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: An Update. *Molecules*.18, 322-353.

Bieski, I.G.C., Santos, F.R., Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O., 2012. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 1-36.

Bognar, E. Zsolt Sarszegi, Aliz Szabo, Balazs Debreceni, Nikoletta Kalman, Zsuzsanna Tucsek, Balazs Sumegi Ferenc Gallyas Jr. Antioxidant and Anti-inflammatory Effects in RAW 264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol. June 2013, Volume 8, Issue 6, e65355.

Cavaillon, J.M., 1994. Cytokines and macrophages. *Biomedecine pharmacotherapie*.48, 445–53.

Chenga, B. C.Y., Xiao-Qing Maa, Hiu-Yee Kwana, Kai-Wing Tsea, Hui-Hui Caoa, Tao Sua, Xin Shua, Zheng-zhi Wub, Zhi-ling Yua. A herbal formula consisting of *Rosae Multiflorae Fructus* and *Lonicerae Japonicae Flos* inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. v 153, 922-927, 2014.

de Azevedo Neta Mahon CP, Colodel EM, Balogun SO, de Oliveira RG, de Oliveira Martins DT. Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *J Ethnopharmacol*. 155(1):665-71, 2014.

de Oliveira RG, Mahon CP, Ascêncio PG, Ascêncio SD, Balogun SO, de Oliveira Martins DT. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *J Ethnopharmacol*. 2014. 8;155(1):387-95.

Diaz-González, F., Sánchez-Madrid, F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. *Eur. J. Immunol*. 2015. 45: 679-686.

Dzoyem, J.P., Eloff, J.N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 160, 2015, 194-201.

Ermert, L., Ermert, M., Goppelt-Struebe, M., Walmrath, D., Grimminger, F.; Steudel, W.; Ghofrani, H. A.; Homberger, C.; Duncker, H.; Seeger, W. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, v. 18, p. 479-88, 1998.

Gao, Y., Liu, F., Fang, L., Cai, R., Zong, Z. Qi, Y. Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages.

Ginhoux, F.; Schultze, J. L.; Murray, P.J.; Ochando, J.; Biswas, S. K. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol.* v. 17, n. 1, p. 34-40, 2016.

Guma, M., Hammaker, D., Topolewski, K., Corr, M., Boyle, D.L., Karin, M., Firestein, G.S. Pro- and anti-inflammatory functions of the p38 pathway in rheumatoid arthritis: Advantages of targeting upstream kinases MKK3 or MKK6. *Arthritis Rheum.* 64(9): 2887–2895, 2012.

Guo, W., Sun, J., Jiang, L., Duan, L., Huo, M., Chen, N, Zhong, W., Wassy, L., Yang, Z., Feng, H., 2012. Imperatorin attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- κ B and MAPKs activation in RAW 264.7 macrophages. *Inflammation.* 35, 1764-1772.

Hou, X.; Yang, F.; Liu, W.; Fu, Z.; Chen, L.; Li, Z.; Ni, C.; Liu, M.; Guangwen Cao, G. Signaling Pathways that Facilitate Chronic Inflammation-Induced Carcinogenesis. *J Cell Signal* 2015, 1:1.

Hur, S.J., Kang, S.H., Jung, H.S., Kimb, S.C., Jeon, H.S., Kim, I.H., Lee, J.D., 2012. Review of natural products actions on cytokines in inflammatory bowel disease. *Nutrition research.* 32, 801-816.

Kasahara, E, Sekiyama, A, Hori, M, Hara, K, Takahashi N, Konishi M, Sato EF, Matsumoto S, Okamura H, Inoue M. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. *FEBS Lett.* v. 585(14):2263-2268, 2011.

Kaur, N., Chaudhary, J., Jain, A., Kishore, L., 2011. Stigmasterol: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2, 2259-2265.

Kim, J.M., Jung, H.A., Choib, J.S., Lee, N.G., 2010. Identification of anti-inflammatory target genes of *Rhizoma coptidis* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage-like cells. *Journal of Ethnopharmacology.* 130, 354–362.

Lawrence, Toby. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001651.

Lee, Ji Young; Park Wansu. anti-Inflammatory effect of myristicin on RAW 264.7 macrophages stimulated with Polyinosinic-Polycytidylic Acid. *Molecules* 2011, 16, 7132-7142.

Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.* Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 334 p.

Manetsch, M.; Che, W.; Seidel, P.; Chen, Y.; Ammit, A.J. MKP-1: A negative feedback effector that represses MAPK-mediated pro-inflammatory signaling pathways and cytokine secretion in human airway smooth muscle cells. *Cell Signal.* 224 (4): 907-913, 2012.

Maskrey, B.H.; Megson, I.L.; Whitfield, P.D.; Rossi, A.G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 31, n. 5, p. 1001-1006, 2011.

Ministério do Meio Ambiente, MMA. AVALIAÇÃO e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, 2002. 404 p.

Norman P. Investigational p38 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 24, 383-92, 2015.

Park, H.H.; Kim, M.J.; Li, Y.; Park, Y. N.; Lee, J.; Lee, Y.J.; Kim, S.G.; Park, H.J.; Son, J.K.; Chang, H.W.; Lee, E. Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE₂ and cytokine production via NF- κ B and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology* 15, 296-302, 2013.

Park, J.; Min, J.S.; Kim, B.; Chae, U. B.; Yun, J. W.; Choi, M. S.; Kong, I. K.; Chang, K. T.; Lee, D. S. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. *Neurosci Lett.* v. 584, p. 191-196, 2015.

Santos, J.C., Oliveira, C.A.N., Varella, L., Matos, A.P., Terezan, A.P., Leite, A.C., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F., Pirani, J.R., 2010. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). *Química Nova.* 33, 2080-2082.

Shalini, Mani; Yadav, UCS. Production of reactive oxygen species and Its implication in human diseases. *Free Radicals in Human Health and Disease.* pp 3-15. 2015.

Shia, X., Zhenga, Z., Li, J., B, Xiaoa, Z., Qia, W., Zhanga, A., Wua, Q., Fanga, Y. Curcumin inhibits A β -induced microglial inflammatory responses in vitro: Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Neuroscience Letters.* 594 105–110, 2015.

Sinha, M., Lovely Gautam, Prakash Kumar Shukla, Punit Kaur, Sujata Sharma, Tej P. Singh. *Current Perspectives in NSAID-Induced Gastropathy.* Mediators Inflamm. 2013.

Somner, G.V.; Ferrucci, M.S.; Acevedo-Rodríguez, P. *Dilodendron* in Lista de Espécies da Flora do Brasil., Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB020902>>. Acesso em: 15 março 2016.

Veranth, J.M.; Moss, T.A.; Chow, J. C.; Labban, R.; K. Nichols, W. K.; Walton, J.C.; Watson, J. G.; Yost, G.S. Correlation of in vitro cytokine responses with the chemical composition of soil-derived particulate matter. *Environmental Health Perspectives,* v. 114, n. 3, p. 341-349, 2006.

Wancket, L.M.; Frazier b, W.J.; Liu, Y. Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 in immunology, physiology, and disease. *Life Sciences* 90 (2012) 237–248.

Yang, Y.; Kim, S.C.; Yu, T.; Yi, Y.S.; Rhee, M.H.; Sung, G.H.; Yoo, B.C.; Cho, J.Y. Functional Roles of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators of Inflammation*.2014, p. 13.

Yokota, T.; Wang, Y. p38 MAP kinases in the heart. *Gene*. v. 575, p. 369-376. 2016.

Zimmermann, M.; Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes.*Methods Mol Biol*. 740:57-63, 2011.

ARTIGO 2 – a ser submetido na Revista: Journal of Ethnopharmacology (0378-8741), Qualis B1 na área de BIOTECNOLOGIA.

Hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. ameliorates allergic airway inflammation in a murine model of ovalbumin-induced allergic asthma

^a Ruberlei Godinho de Oliveira, ^b Fábio Miyajima, ^a Geovane Roberto de Campos Castilho, ^a Amílcar Sabino Damazo, ^a Domingos Tabajara de Oliveira Martins.

^a Department of Basic Health in Science, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso (UFMT), 2367 Fernando Correa da Costa Avenue, Coxipó, Cuiabá, Mato Grosso, 78060-900, Brazil.

^b Group of Neuropharmacology, Drug Research and Development Center, Federal University of Ceara (NPDM-UFC), Fortaleza-CE, Brazil.

¹Present address: Federal University of Mato Grosso, Av. Fernando Corrêa da Costa, Boa Esperança, Cuiabá, Mato Grosso, 78060-900, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 653615623

E-mail address: taba@terra.com.br (D.T.O. Martins).

Ethnopharmacological relevance: *Dilodendron bipinnatum* Radlk., Sapindaceae, a tree of Pantanal Mato Grosso, is popularly known as ‘mulher-pobre’ (“poor-woman”). The decoction and infusion of its stem bark is colloquially used for treating inflammatory conditions.

Aim of the present study: To evaluate if a 70% hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* stem bark (HEDb) is able to rescue allergic airway inflammation in a murine model of ovalbumin (OVA)-induced allergic asthma (OIAA).

Material and Methods: The inner stem bark powder was macerated in hydroethanolic solution (70% w/v, 1:3) to obtain HEDb. For the induction of asthma by OVA, the modified method of Nader et al. (2012) was employed. On days 1 and 10, the Swiss mice were sensitized by intra-peritoneal injection of OVA (100 µg/mL, 0.2 mL). Between 19 and 24 animals (n=6) were treated (vo) twice a day with vehicle (water), HEDb (20, 100 and 500 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg). The sham group was sensitized and challenged with saline 0.9%. On the 25th day, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected for quantification of total leukocytes, eosinophils and cytokines Th2 (IL-4, IL-5 and IL-13), the lungs was used for histopathological (H&E, PAS and toluidine blue) analysis and serum levels for IgE determination. The anti-inflammatory activity of HEDb was further confirmed by a lipoxygenase (LOX) inhibitory assay.

Results: The OVA group significantly increased the number of total leukocytes, neutrophils, eosinophils and mononuclear cells compared to sham. The HEDb treatment has significantly decreased inflammatory cell accumulation in BALF, reaching its maximum response at 500 mg/kg. Furthermore, the levels of interleukins IL-4, IL-5 and IL-13 in the BALF and IgE in serum, were considerably reduced as compared to the OVA group. In addition, the histopathological examination of the lungs of OVA group showed a significant increase in hemorrhagic damage, mucus, perivascular infiltrates and peribronchial compared to sham ($p < 0.001$). As revealed by histopathological examination, the HEDb at the top two doses has remarkably decreased these four parameters, mucus and mast cells degranulation which was comparable to dexamethasone, achieving its highest response at 500 mg/kg. Interestingly, the HEDb extract displayed substantial anti-inflammatory properties as per its LOX inhibitory activity ($IC_{50}=1.85$ µg/mL), which points for a probable anti-inflammatory-mediated mechanism of action.

Conclusions: HEDb has a significant anti-inflammatory activity by multi-targeted action that ameliorates OIAA in a murine model.

Key words: *Dilodendron bipinnatum* Radlk., asthma, ovalbumin, anti-inflammatory, cytokines.

1. Introduction

Allergic asthma is a complex chronic inflammatory condition with heterogeneous clinical manifestation, including hyper responsiveness of airways with excessive production

of mucus, bronchial obstruction, edema, fibrosis and pulmonary rearrangements given environmental exposure to allergens (Olin and Wechsler, et al., 2014).

These features are largely due to the activation of both the innate and adaptive immune systems, up-regulation of histamine and leukotriene mediators (LTC₄, LTD₄, LTE₄), followed by recruitment of multiple inflammatory cells, particularly eosinophils from the bone marrow to lung tissues (Postma et al., 2015). The severity and spread of asthmatic symptoms are directly related to the functioning of lymphocytes T helper 2 (Th2) that secrete cytokines IL-4 and IL-13, which in turn stimulate the release of IgE by B type cells, as well as IL-5 for the differentiation of eosinophils (Barnes, 2008).

Across the globe it is estimated that approximately 300 million individuals suffer from asthma (Gina, 2017), with 250,000 deaths attributed to the disease every year (WHO, 2017). In Brazil, there are approximately 20 million asthmatics assuming a life time prevalence of 10% (Brasil, 2012), thus accounting for increased morbidity to patients and incrementing burden to the healthcare systems.

Standard therapy for asthma is largely palliative and based on the administration of bronchodilators (β -blockers and muscarinic antagonists), steroidal anti-inflammatories (corticoids inhalers) and leukotriene antagonists, generally providing low therapeutic response and increasing the chance for adverse events. Despite their elevated costs, monoclonal antibodies inhibition of IgE (omalizumab) and anti-cytokines currently represent the best alternative due to their enhanced selectivity, the latter for their increased affinity for the IL-5 (mepolizumab and reslizumab), as well anti-IL-4/13 activity (Liu et al., 2013; Hambly and Nair, 2014; Skloot, 2016; Leung, et al., 2017).

Hence, there have been an increased attention for the use of natural products with a view to confirm their efficacy and safety with numerous studies showing promising results, both *in vivo* e *in vitro* for the treatment of asthma (Wei et al., 2012; Tiwari et al., 2014; Huang et al., 2016; Shergis et al., 2016; Morel et al., 2017).

Dilodendron bipinnatum is a native plant from the Brazilian Pantanal basin and colloquially known as “poor woman”. Its stem bark is processed in the forms of decoction and maceration and historically used by the locals for the treatment of inflammatory conditions (150 mL taken 2-3 times a day for 15-30 days) (Bieski et al., 2012). An ethnopharmacological assessment indicated that to date, there have been no reports of toxicity by the Pantanal dwellers on the use of these preparations. However, formal pharmacological and phytochemical studies with the plant products are scarce with limited toxicological data available (de Azevedo Neta Mahon et al., 2014). Santos et al. (2010) reported that the hydroethanolic extract from the bark stem and leaves of *D. bipinnatum* (HEDb) presented in

its composition a mixture of phytosterols (β -sitosterol, stigmasterol, campesterol and 3-O- β -d-sitostenona) e triterpenes (cycloeucalenol and 24-methylene-cycloartenol). The standardisation of HEDb has recently been carried out and reported by us (de Oliveira et al., 2014), where phytochemical analysis in HPLC revealed significant presence of polyphenolic flavonoids and tannin biomolecules as the major classes of metabolites, which included epigallocatechin gallate (EGCG), catechins, gallic acid and galocatechol, and other antioxidants. In addition to its anti-inflammatory properties (de Oliveira et al., 2014 and Oliveira et al., 2017), an isolated study has also suggested that HEDb also possesses antimicrobial activity (Santos et al., 2010).

In view of the ethnopharmacological relevance and the recognized anti-inflammatory properties of *D. bipinnatum* this study aimed to evaluate its activity in a murine model of ovalbumin (OVA) induced asthma.

2. Material and Methods

2.1. Botanic material

Stem bark of *D. bipinnatum* was harvested at Poconé, Mato Grosso, Brazil, coordinates S 15°56'528 and W 05°70'567. Authorized access to the traditional indigenous knowledge and genetic heritage for the purpose of research was obtained from the Council on Genetic Heritage of the Ministry of Environment (CGEN/MMA) under reference number 045/2009. Botanical identification was performed at the Herbario UFMT by Prof. Dr. Germano Guarim Neto, and an exemplar specimen (n°. 20.529) was deposited at the herbarium. This plant is currently not listed as either threatened, or endangered species in Brazil.

2.3 Drugs and reagents

Aluminum hydroxide [Al(OH)₃], dexamethasone acetate, sodium chloride, hematoxilina and eosin (H&E) and ovalbumin (OVA; chicken egg, grade II and grade V) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) while anti-mouse IL-4, IL-5, IL-13 and IgE ELISA kits were purchased from eBioscience (San Diego, CA, USA).

2.4 Extract preparation

The stem bark of *D. bipinnatum* was cleaned, dried at room temperature, and grinded in an electric mill (model TE-625 Tecnal, São Paulo, Brazil) with mesh sieve size 40. The dried powder thus obtained was macerated in 70% hydroethanolic solution (1:3, w/v) for 7 days, filtered and concentrated in a rotary evaporator (Marconi MA 120, São Paulo, Brazil) under pressure of 600 mm Hg, at 40°C. The residual solvent was eliminated in an oven at 45°C, for 24 h. So, HEDb was obtained, which was stored in an amber bottle, at 4°C. At the time of use, HEDb was dissolved in distilled water to obtain the desired solutions.

2.4 Animals

Male Swiss-Webster mice of 8 – 12 weeks (18 - 22 g), from the Central Animal House of UFMT. The animals were maintained in propylene cages (30 x 20 x13 cm) at 25 ± 1°C with a 12 h light/dark cycle and had free access to standard pellet chow and water. The adopted diet regime for the animals consisted of feed restriction to the period of 9:30 –10:30 h a.m. and 16:00 -17:00 h p.m. Groups of six animals each were used for the experiment. The experimental protocol followed the International Principles for the Biomedical Research Involving Animal (CIOMS/OMS, 1985) and was approved by the Committee on the Use of Animal for Experimentation (CEUA/UFMT) with protocol no. 2318.145490/2016-45.

2.6 Anti-inflammatory assays

2.6.1 Induction of allergic asthma with ovalbumin (OVA)

For the induction of immediate hypersensitivity model in mouse airways, the protocol described by Nader et al. (2012) was employed with slight modifications. On days 1 and 10 mice were sensitized by intraperitoneal injection (200 µL) of a suspension containing OVA (grade V; 100 µg/mL) and Al (OH)₃ (10 µg/mL) in sterile saline solution (0.9%). From days 19 through 24 after the initial sensitization, animals were challenged with aerosolized OVA (grade II; 3% in 0,9% saline) for 20 min daily (once a day) in an enclosed acrylic chamber (25 x 13 x 13 cm) connected to a nebulizer (NEU0003 Soniclear; SP, Brazil) under a continuous flow of aerosol. Animals (n=7/group) sensitized and challenged with OVA, were treated (p.o.) 2 times (2x) daily with either vehicle, HEDb (20; 100 and 500 mg/kg), or dexamethasone as the standard drug (0.5 mg/kg). The animals in sham group (n=6) were sensitized and challenged with 0.9% saline and were treated with the vehicle. On the 25th day, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected for total and differential leukocyte counts, determination of cytokines, as well as blood (serum) for total IgE dosage and lung tissue for histopathological analysis.

2.3.2. Collection of BALF

Twenty-four hours after the last challenge, the animals were killed with overdose of the anesthetic agent (ketamine 200 mg/kg and xylazine 50 mg/kg i.p.), tracheostomized and cannulated (polyethylene tube) to collect BALF, obtained with two consecutive washes (1 mL, each) with phosphate buffered saline (PBS 1x, pH 7.4) plus EDTA (1 mol/L). The volume removed, 0.01 mL was added to 0.390 mL of Turk solution for counting the total number of leukocytes in a Neubauer chamber. The results were expressed as number of total leukocytes ($\times 10^6/\text{mL}$) for each group. Slides were prepared for differential counts with 0.02 mL aliquot of the cell suspension and later stained with InstantProv[®] (NewProv; PR, Brazil). The number of cells determined with the aid of an optical microscope (Nikon, 1000x magnification), with at least 100 cells counted per slide, differentiating cell types: neutrophils, eosinophils, and mononuclear cells (monocytes and lymphocytes).

2.3.4. Cytokines quantification in the BALF

BALF collected was stored in $-80\text{ }^\circ\text{C}$ freezer until the time of assay. Concentrations of IL-4, IL-5 and IL-13 were determined with ELISA kit (eBioscience; San Diego, CA, USA), in accordance with manufacturer's instructions.

2.4.1.3. Serum levels of total IgE

After anesthesia, the inferior vena cava of each animal was punctured, and the blood was collected and centrifuged until sedimentation at $4\text{ }^\circ\text{C}$, before the obtained serum was used to determine the total IgE concentration, using ELISA kits (eBioscience and R&D Systems, respectively), following the manufacturer's instructions.

2.4.1.4. Histological analysis

Following the procedures to collect the BAL, the mice lungs were removed after perfusion with PBS (pH 7.4) plus 1 M EDTA (Sigma), and were then fixed in 10% formalin for 24 hours. The histopathological processing was conducted according to the method described by Queiroz (2014). The paraffin embedded lungs were cut ~~into~~ at $3\text{ }\mu\text{m}$ thickness, stained with hematoxylin and eosin (H&E), Periodic acid-Schiff (PAS) and toluidine blue, and then analyzed in a light microscope. Infiltrated inflammatory cells, edema, mucus production and mast cells were evaluated according to the method of Duan et al. (2004), with adaptations. The evaluation of inflammatory cells in the peribronchial and perivascular regions was based on a score system as follows: 0 = no cells, 1 = some cells, 2 = a ring of cells and one deep layer of cells, 3 = a ring of cells and two to four deep layers of cells, and 4

= a ring of four cells and four deep layers of cells. The following score was used to quantify mucus production or hemorrhagic damage: 0 = no hemorrhagic damage or mucus, 1 = 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, and 4 = 75-100%. The scoring system for edema was as follow: 0 - absent; 1 - mild, presence of disperse erythrocytes in the interstitial space; 2 - mild to moderate, presence of several erythrocytes interstitial; 3 - moderate, increase of capillary lumen and of the interstitial space, high concentration of erythrocytes; 4 - severe, destruction of vessel walls and high concentration of erythrocytes. The following score was used to quantify mast cells 0 - intact mast cells, 1 - 25% degranulated mast cells, 2- 50% degranulated mast cells, 3- 75% degranulated mast cells and 4- 100% degranulated mast cells.

2.7 Lipoxygenase inhibitory assay

The lipoxygenase enzyme inhibitory effect was measured using the Cayman 15-Lipoxygenase inhibitor screening assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). The assay detects and measures the hydroperoxides produced in the lipoxygenation reaction using a purified lipoxygenase (LO). The inhibitory activity of HEDb was tested for 15-LO using the LOX inhibitor screening kit according to the manufacturer's instruction.

2.8 Statistics

The parametric values were expressed as mean \pm SEM, and the nonparametric values were expressed as median (md) and interquartile intervals (Q1; Q3). The one way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the parametric data, followed by Student-Newman-Keuls test, when there was a statistical difference between groups, whereas the Kruskal-Wallis analysis was used, followed by the Dunn's multiple comparison tests, to evaluate the nonparametric data. We assumed 95% of significance with P values < 0.05 considered statistically significant. The GraphPad Prism[®] software version 5.01. Inc. La Jolla, CA 92037 USA (www.graphpad.com) was used.

3. Results

3.1 HEDb reduced airway inflammation in BALF

The OVA group significantly accounted for a 7-fold increase ($p < 0.001$) in the number of total leukocytes compared to sham ($3.25 \pm 0.81 \times 10^6$ cells). Conversely, the treatment with HEDb reduced ($p < 0.001$) the total number of infiltrated leukocytes, with a marked decrease by 74%, using higher dosage (500 mg/kg). In comparison, Dexamethasone,

employed as a standard drug, promoted a reduction of 93% ($p < 0.001$) in the accumulation of leukocytes in the lung (Figure 1).

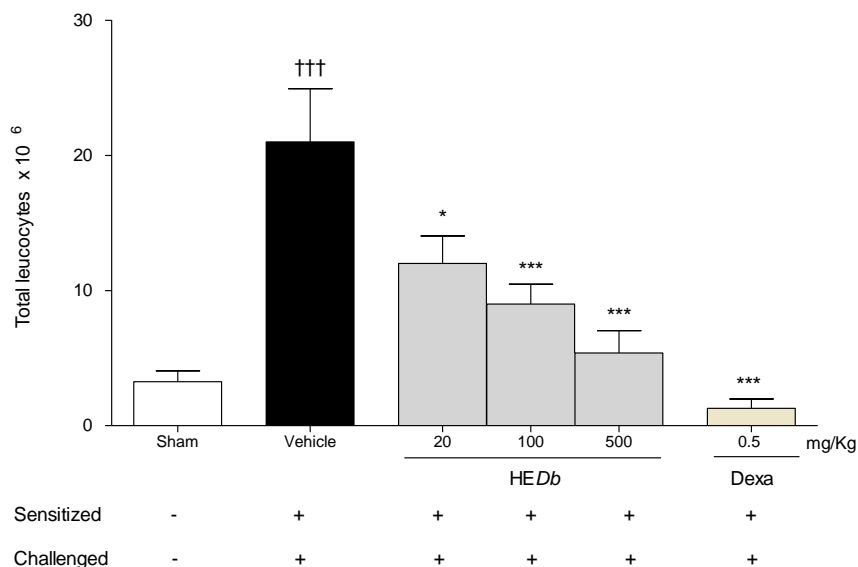


Figure 1 - Effect of oral treatments (2 times daily) with the vehicle, hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb - 20; 100 and 500 mg/kg) and dexamethasone (Dexa, 0.5 mg/kg) on total cells present in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice sensitized (1st and 10th) with ovalbumin (OVA) grade V and aluminum hydroxide (0.1 mg/mL and 10 mg/mL in 0.9% saline i.p., 0.2 mL/animal) and challenged (19th to 24th days) with OVA grade II (3% in saline, nebulization, 20 min daily). The sham group were intraperitoneally injected and intranasally challenged with sterile 0.9% saline instead of OVA, and received orally 0.9% saline instead HEDb. The results were expressed as mean \pm SEM for 6 animals. One way ANOVA, followed by Student- Newman-Keuls. ^{†††} $p < 0.001$ vs. Sham; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** and $p < 0.001$ vs. vehicle.

The total number of, eosinophils, neutrophils, and mononuclear cells present in the BALF of the sham group was $0.17 \pm 0.04 \times 10^6$; $6.24 \pm 0.20 \times 10^6$; $2.34 \pm 0.20 \times 10^6$ cells, respectively. Sensitization and challenge with OVA promoted an increase ($p < 0.001$) of about 28; 8.2 and 6 folds in the number cells, respectively (Figure 2). Treatment with HEDb (20; 100 and 500 mg/kg) reduced leukocyte infiltration at all doses ($p < 0.001$), reaching its highest effect at 500 mg/kg as following: 78.3% for eosinophils, 80.50% for neutrophils and 63.4% for mononuclear cells when compared to the vehicle group. These were comparable to those obtained with 0.5 mg/kg of the standard drug dexamethasone (71.2% of eosinophils, 80.4% of neutrophils and 69.14% of the mononuclear cells) (Fig 2).

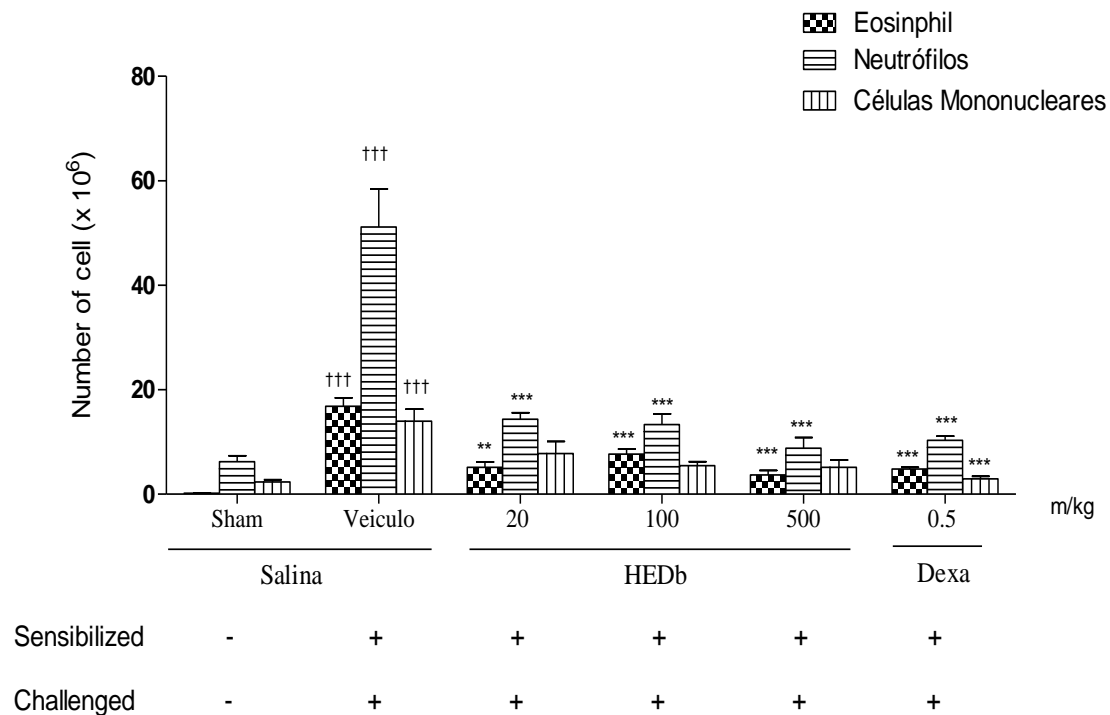
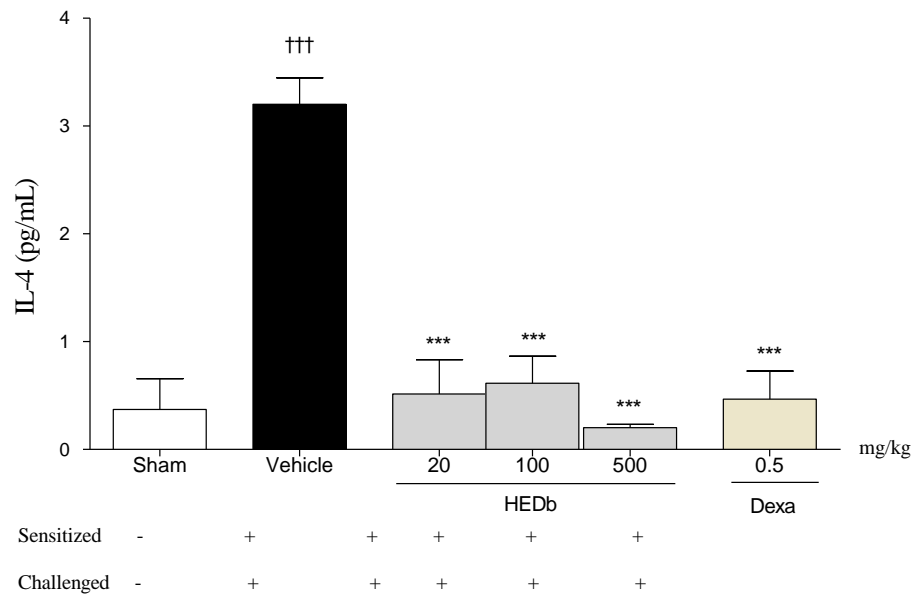


Figure 2 - Effect of oral treatments (2 times daily) with the vehicle, hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb - 20; 100 and 500 mg/kg) and dexamethasone (Dexa - 0.5 mg/kg) on eosinophils, neutrophils, and mononuclear cells present in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice sensitized (1st and 10th) with ovalbumin (OVA) grade V and aluminum hydroxide (0.1 mg/mL and 10 mg/mL in 0.9% saline i.p., 0.2 mL/animal) and challenged (19th to 24th days) with OVA grade II (3% in saline, nebulization, 20 min daily). The sham group were intraperitoneally injected and intranasally challenged with sterile 0.9% saline instead of OVA, and received orally 0.9% saline instead HEDb. The results were expressed as mean \pm SEM for 6 animals. One way ANOVA, followed by Student- Newman-Keuls. $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ vs. Sham; $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$ *** and $p < 0.001$ vs. vehicle.

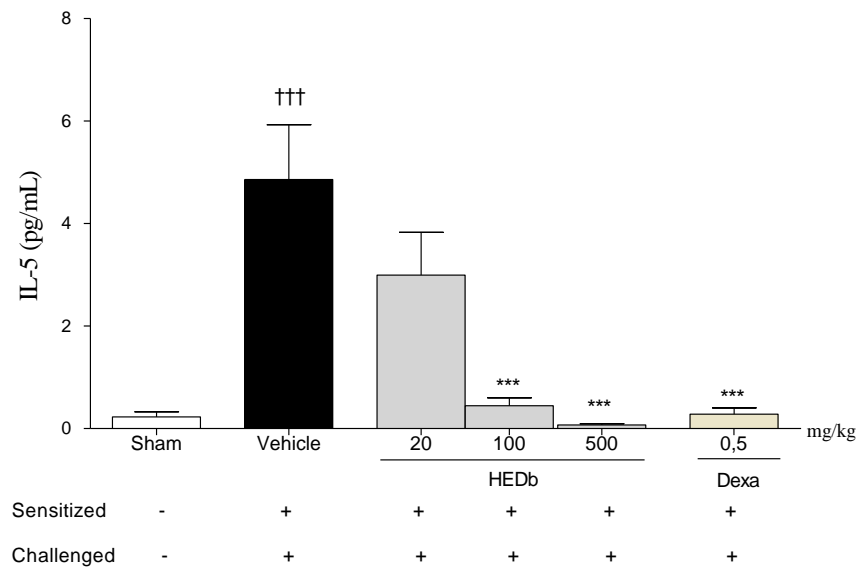
3.2 HEDb attenuates ovalbumin-induced IL-4, IL-5 and IL-13 in the BALF

The sham concentrations of IL-4, IL-5 and IL-13 in the BAL were 0.37 ± 0.28 , 0.23 ± 0.10 and 2.63 ± 0.62 pg/mL, respectively. Following ovalbumin challenge, these values increased by over 8, 2000 and 1000 fold respectively ($p < 0.001$). Pre-treatment with HEDb significantly reduced IL-4 and IL-13 concentrations in the BALF in a dose dependent manner, with the highest inhibitory effect achieved with the highest dosage (93.7 and 86.2%, $p < 0.001$). Similarly, the pre-treatment with the HEDb (100 e 500 μ g/mL) reduced the IL-5 levels by 91.2 and 98%, respectively ($p < 0.001$). Dexamethasone (0.5 mg/kg), decreased levels of IL-4, IL-5 and IL-13 in the BALF fluid by 85.6, 94.4 and 94.1% ($p < 0.001$), respectively.

A



B



C

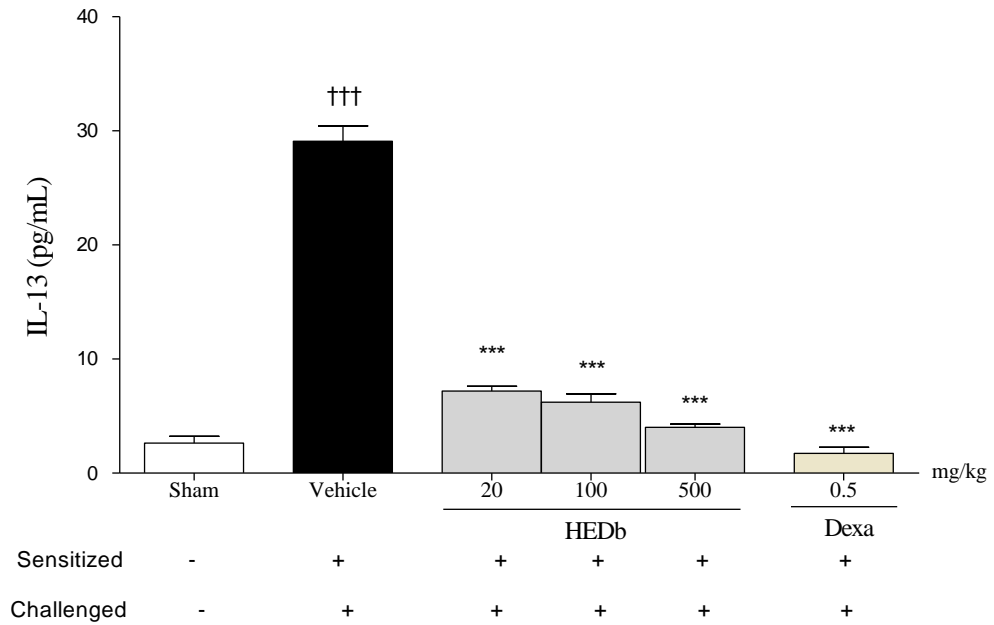


Fig. 3- Effect of oral administration of vehicle (saline), hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb - 20; 100 and 500 mg/kg) and dexamethasone (Dexa, 0.5 mg/kg) on the concentrations of IL-4 (A) IL-5 (B) and IL-13 (C) present in the bronchoalveolar lavage (BALF) of mice sensitized (1st and 10th) with ovalbumin (OVA) grade V and aluminum hydroxide (0.1 mg/mL and 10 mg/mL in 0.9% saline i.p., 0.2 mL/animal) and challenged (19th to 24th days) with OVA grade II (3% in saline, nebulization, 20 min daily). The sham group were intraperitoneally injected and challenged with sterile 0.9% saline via nebulizer instead of OVA, and received orally 0.9% saline instead HEDb. The results were expressed as Mean \pm SEM for 6 animals. One-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls. ††† p < 0.001 vs. Sham; *** p <0.001 vs. vehicle. S-OVA: Sensitization with ovalbumin, C-OVA: Challenge with ovalbumin.

3.3 HEDb inhibited ovalbumin-induced total IgE serum levels

The concentration of IgE present in the serum of the sham group was 2585.4 ± 272.1 pg/mL, whilst sensitization and challenge with OVA induced a 5 fold increase in the IgE levels (p <0.001). The treatment with HEDb at all doses (20, 100 and 500 mg/kg) reduced the concentration of IgE significantly (p <0.001) with dexamethasone (used as positive control) decreasing by 53.6% (p <0.001) (Fig. 4).

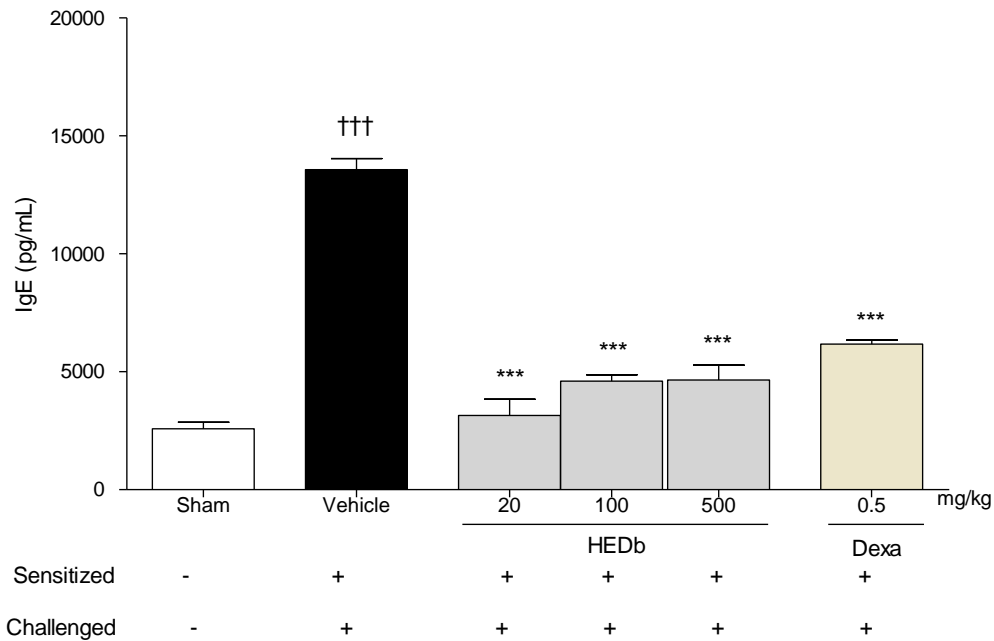


Fig. 4- Effect of oral administration of vehicle (saline), hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb - 20; 100 and 500 mg/kg) and dexamethasone (Dexa - 0.5 mg/kg) on the concentrations of immunoglobulin E (IgE) present in total serum of mice sensitized (1st and 10th) with ovalbumin (OVA) grade V and aluminum hydroxide (0.1 mg/mL and 10 mg/mL in 0.9% saline i.p., 0.2 mL/animal) and challenged (19th to 24th days) with OVA grade II (3% in saline, nebulization, 20 min daily). The sham group was intraperitoneally injected and challenged with sterile 0.9% saline via nebulizer instead of OVA, and received orally 0.9% saline instead HEDb. The results were expressed as mean \pm SEM for 6 animals. One-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls. ††† $p < 0.001$ vs. Sham; *** $p < 0.001$ vs. vehicle. S-OVA: Sensitization with ovalbumin, C-OVA: Challenge with ovalbumin.

3.4 HEDb reduced airway inflammation in the lung tissues

The sensitization and challenge with OVA promoted a significant ($p < 0.001$) increase in edema by 3-fold, a 4-fold perivascular and peribronchial infiltrate when compared to the sham group.

Both concentrations at 100 mg/kg and 500 mg/kg HEDb reduced the leukocyte migration in the peribronchiolar and perivascular regions ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). Similarly, a significant reduction was observed in the hemorrhagic damage at interstitial lung and in the amount of mucus present at the bronchus ($p < 0.001$, for all cases). Overall, HEDb at the dose of 500 mg/kg was as efficient as treatment compared to the standard drug dexamethasone for both parameters tested above (Table 1).

In relation to the mastocyte activity, HEDb at dosages of 100 and 500 mg/kg accounted for a reduction in degranulation, presenting a more intense coloring of cytoplasmic granules with a regular morphology and a lower amount of extrusion granules when compared to the vehicle group (Fig. 5C).

Tabela 1 - Effect of oral administration of vehicle (water), hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb – 20, 100 and 500 mg/kg) and dexamethasone (Dexa, 0.5 mg/kg) on histopathologic scoring of lung tissues of mice subjected to allergic reaction induced by ovalbumin (OVA).

Group (mg/kg) p.o.	Hemorrhagic damage (0-4)	Mucus (0-4)	Perivascular infiltrate (0-4)	Peribronchial infiltrate (0-4)	Total (score 0-16)
Sham	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Vehicle	3,2 ± 0,2 ^{†††}	2,8 ± 0,2 ^{†††}	3,8 ± 0,2 ^{†††}	3,8 ± 0,2 ^{†††}	13,6 ± 0,4 ^{†††}
HEDb 20	2,8 ± 0,2	2,6 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,2 ± 0,2	12,4 ± 0,6
HEDb 100	0,8 ± 0,2 ^{***}	0,8 ± 0,2 ^{***}	2,4 ± 0,3 ^{***}	2,4 ± 0,3 ^{***}	6,4 ± 0,8 ^{***}
HEDb 500	0,6 ± 0,3 ^{***}	0,6 ± 0,3 ^{***}	2,2 ± 0,3 ^{***}	1,6 ± 0,3 ^{**}	5,0 ± 0,8 ^{***}
Dexa 0.5	0,4 ± 0,3 ^{***}	0,4 ± 0,3 ^{***}	1,4 ± 0,3 ^{**}	0,6 ± 0,3 ^{***}	3,0 ± 0,6 ^{***}

The values were expressed as median. Haematoxylin and eosin staining were performed to examine the morphological alterations and PAS staining for mucus evaluation in lung tissues. The scoring system on severity of inflammation was: 1 = few cells; 2 = a discontinuous ring of cells with one cell layer deep; 3 = a ring of cells with one to three cell layers deep; 4 = a ring of cells with more than four cell layers deep. The system adapted to the classification of mucus production or hemorrhagic damage was: 0 = no haemorrhagic damage or mucus, 1 = 25%, 2 = 25–50%, 3 = 50–75%, and 4 = 75%. Kruskal-Wallis test, followed by post-test of Dunn. ^{†††} $p < 0.001$ vs. Sham; ^{**} $p < 0.01$ and ^{***} $p < 0.001$ vs. vehicle.

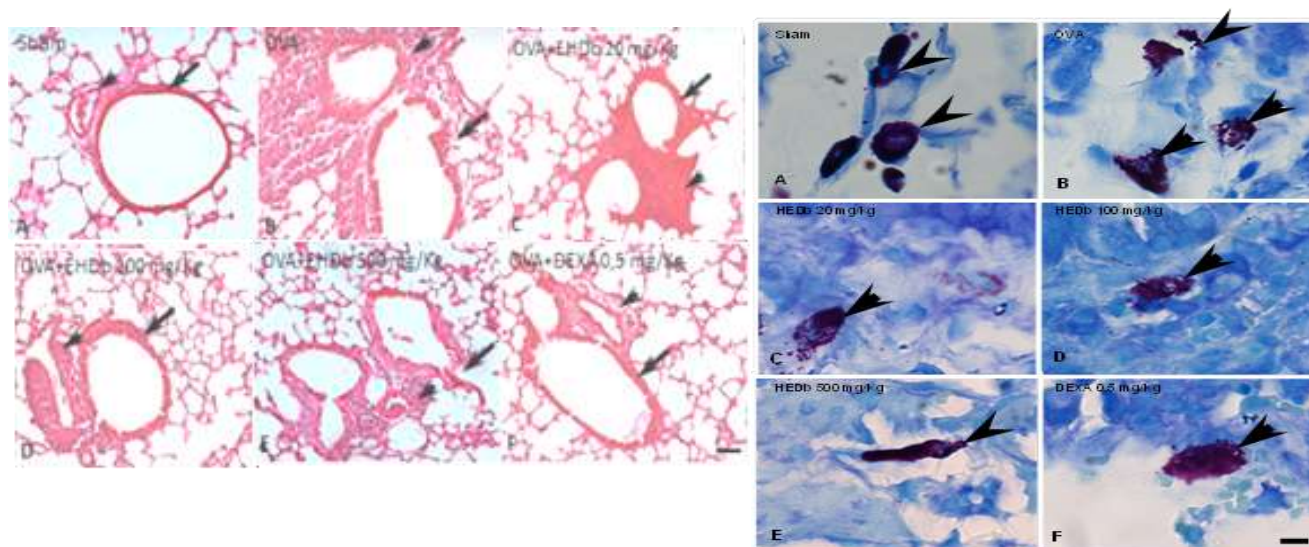


Fig. 5A-C - Photomicrographs show morphology of lung tissues of mice subjected to allergic reaction induced by ovalbumin (OVA). (A) Control animals (sham) showing absence of cellular infiltration in the peribronchial region (arrow) and perivascular (arrowhead). (B) Sensitized and challenged with OVA animal and treated only water 20 (vehicle) showing intense cellular infiltrate (curved arrow) in the peribronchial region (arrow) and perivascular (arrowhead). Also, there is large accumulation of mucus in the bronchial lumen (open arrow). (C-E) Animals orally treated with hydroethanolic extract of the *Dilodendron bipinnatum* (HEDb - 20; 100 and 500 mg/kg), challenged and sensitized with OVA showed a reduced cell infiltrate (curved arrow) in the peribronchial region (arrow) and perivascular (arrowhead). There is no evidence of mucus accumulation in the bronchial lumen. (F) Animals orally treated with dexamethasone (Dexa, 0.5 mg/kg), challenged and sensitized with OVA showed few infiltrated leukocytes (curved arrow) in the peribronchial region (arrow) and perivascular (arrowhead). Absence of mucus in the bronchial lumen, haematoxylin and eosin stains (HE) (A) was used for morphological evaluation, PAS for mucus (B) and toluidine blue for mat cells (C) with 3 mm thick sections; Bar = 50 µm.

3.4 HEDb inhibited production of 15-LOX enzymes *in vitro*

HEDb (1, 5 and 20 µg/mL) exhibited strong LOX inhibitory activity with IC₅₀ around 1.85 µg/mL. As expected, the 15-LO selective inhibitor NDGA at 30 µg/mL completely inhibited lipoxygenase activity.

4. Discussion

Compared to *in vitro* models, experimental murine models of asthma have higher translational potential and have been used for over 100 years to investigate the immunopathology of the disease (Bonamichi-Santos et al., 2015). Mouse models have been of utmost importance in uncovering key inflammatory cell types, cytokines, and pathways in the development and maintenance of allergic asthma (Haspelslagh et al., 2017). The influx of inflammatory cells in the airways, in particular eosinophil infiltration though, contrary to the Th2 bias and eosinophil-dominated bronchial inflammation encountered in most asthmatic subjects, other patients may exhibit neutrophil-predominant asthma subphenotypes, along with Th1 and Th17 cells (Bogaert et al., 2011).

In addition to chronic exposure to environmental triggers, recent insights on host-pathogen interactions have revealed that human microbiome is also an important component in the development of the immune system and allergic reactions. In this ever complex scenario, experimental models of allergic airway disease become increasingly important tools for pharmacological studies and mechanistic understanding of clinical asthma (Reddy, 2012).

To examine the effects of anti-inflammatory airway HEDb, a model of pulmonary inflammation was first established in mice with OVA characterized by an exacerbation of Th2 response (IL-4, IL-5 and IL-13), IgE production and influx of leukocytes (eosinophils, neutrophils and mononuclear cells). Subsequently, the effect of the extract on inflammatory cells present in BALF was assessed by counting the cytological classification and cytokines, and in the lung for histological analyses. In this study, the doses of HEDb employed by our study (20; 100 and 500 mg/kg p.o.) were selected based on previous evidence by Azevedo Neta Mahon et al. (2014) who demonstrated that doses up to 2500 mg/kg in mice did not cause apparent signs of acute toxicity in mice.

Treatment with HEDb significantly inhibited the migration of all inflammatory cells (eosinophils, neutrophils and mononuclear cells) quantified in BALF, confirmed by reduction in the peribronchial and perivascular cellular infiltrate of lung tissues. Indeed, these results

agree with our previous report demonstrating that HEDb is effective in the prevention of leukocyte migration (de Oliveira et al., 2014).

Agra et al. (2016) reported the use of Swiss mice in models of allergic asthma induced by ovalbumin. In these animals, neutrophils predominate in relation to eosinophils (Nader et al., 2012), which in fact occurred in our study, and HEDb reduced levels of eosinophils, neutrophils and mononuclear cells at levels comparable to dexamethasone. This provides further evidence for the anti-inflammatory properties of the extract and relief of typical asthma-related characteristics, such as airway hyper-responsiveness (AHR), eosinophilic-neutrophilic inflammation and tissue remodeling (Daubeuf and Frossard, 2014).

The leucocyte migration induced a release pre-formed cytokines (IL-4, IL-13 and IL-5) and orchestrates the balance of Th1 and Th2 cell responses. Liu et al. (2017) demonstrated that IL-4R can suppress airway inflammation in bronchial asthma by inhibiting the IL-4/STAT6 pathway, whereas IL-5 was identified for its role in eosinophil development, maturation and survival in tissues, which has been related to disease severity and airway eosinophilia (Leung et al., 2017). Recent studies provided a benchmark on the cytokine levels in BALF at both physiological and asthma-induced models (Tiwari et al., 2014; Agra et al., 2016; Huang et al., 2016).

Conversely, the HEDb significantly reduced levels of the IL-4, IL-5 and IL-13 cytokines as well as serum IgE levels of the animals tested, reaching a higher dose effect at 500 mg/kg. Interestingly, corroborating with these findings, the extract also reduced the production of mucus and ameliorated peribronchiolar edema in the lung tissue. All together this supports the fact that the extract acts on multiple pharmacological targets and warrants further pharmacological investigations on its potential therapeutic use and pathophysiology of asthma.

The fingerprint of the extract reported by de Oliveira et al. (2014) indicated the presence of various biomolecules in HEDb, such as gallic acid and epigallocatechin gallate. Bani et al. (2006) reported that the epigallocatechin-3-gallate reduced allergen-induced asthma reactions in animals sensitized; whilst Dorsh et al. (2013) reported anti-asthmatic properties of the gallic acid compounds, which prevented allergen and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction, as well as bronchial hyperactivity.

Moreover, gallic acid has been confirmed to inhibit histamine release, pro-inflammatory cytokines in mast cells (Kim et al., 2006), and Th2 cytokines productions in T cells (Kato et al., 2001). Hence, the anti-inflammatory actions observed with HEDb in our asthma model are greatly attributed to the presence of these compounds.

The Lipoxygenase pathway is another therapeutic point of importance in asthmatic models, which are activated by an *up-regulation* by IL-13 and later that participates in the formation of leukotrienes with bronchoconstricting action (LTC₄), as well as chemotactic for neutrophils (LTB₄) and mast cells (LTD₄). Mast cells sensitized following activation by IgE secrete large amounts of histamine that exacerbate the clinical signs and symptoms of asthma. Mast cells sensitized following activation by IgE secrete large amounts of histamine that exacerbate the clinical signs and symptoms of asthma (Corren, 2013).

Interestingly, the HEDb extract displayed substantial anti-inflammatory properties as per its LOX inhibitory activity (IC₅₀=1.85 µg/mL), which points for a probable anti-inflammatory-mediated mechanism of action.

The HEDb at the three doses tested attenuated mast cell degranulation pathway IL-13 in mice, thus suggesting a direct mast-mediated effect and highlighting an important pathway in the pathophysiology of OVA-induced asthma.

This suggests that the anti-inflammatory mechanisms of HEDb are, at least in part, mediated by its regulation of the Th2 response and inhibition of mast cells in a mouse model of ovalbumin-induced asthma.

CONCLUSION

The results demonstrate for the first time the anti-inflammatory properties of the HEDb in a murine model of asthma, thus highlighting the ethnopharmacological applications of the plant as the same time warranting further investigations on its potential use for the treatment of asthma.

5. Acknowledgements

The present research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Pró-Amazônia – Biodiversidade e Sustentabilidade, process. no. 23038.000731/2013-56), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT – process no. 157552/2014) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/BIONORTE – process no. 551737/2010-7).

6. References

Agra, L.C., Lins, M.P., Marques, P.M., Smaniotto, S., de Melo C.B., Lagente, V., Barreto, E., 2016. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. *Eur J Pharmacol.* 780, 232-42.

- Barnes, P.J., 2008. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 118, 3546-3556.
- Becker, A.B., Abrams, E.M., 2017. Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 17, 99-103.
- Bieski, I.G.C., Rios-Santos, F., De Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O., 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region. (Mato Grosso, Brazil). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, 272749.
- Bogaert, P., Naessens, T., Koker, S., Hennuy, B., Hacha, J., Smet, M., Cataldo, D., Di Valentin, E., Piette, J., Tournoy, K.G., 2011. Grooten J. Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 300, 679-690.
- Bonamichi-Santos, R., Aun, M. V., Agondi, R.C., Kalil, J., Giavina-Bianchi, P. 2015. Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us? *J Immunol Res.* 614758, 1-8.
- Brasil, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012 *J Bras Pneumol.* v. 38, Suplemento 1, p. S1-S46, 2012.
- Corren, J., 2013. Role of interleukin-13 in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 13, 415-420.
- Daubeuf, F., Frossard, N., 2014. Eosinophils and the ovalbumin mouse model of asthma. *Methods Mol Biol.* 1178, 283-293.
- De Azevedo Neta Mahon, C.P., Colodel, E.M., Balogun, S.O., De Oliveira, R.G., Martins, D.T.O., 2014. Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *J Ethnopharmacol.* 155, 665-671.
- De Oliveira, R.G., de Campos Castilho, G.R., da Cunha, A.L., Miyajima, F., de Oliveira Martins, D.T., 2017. *Dilodendron bipinnatum* Radlk. inhibits pro-inflammatory mediators through the induction of MKP-1 and the down-regulation of MAPKp38/JNK/NF- κ B pathways and COX-2 in LPS-activated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 202, 127-137.
- De Oliveira, R.G., Mahon, C.P., Ascêncio, P.G.; Ascêncio, S.D., Balogun, S.O. Martins, D.T.O., 2014. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *J Ethnopharmacol.* 155, 387-395.
- Dorsch, W., Bittinger, M., Kaas, A., Müller, A., Kreher, B., Wagner, H., 1992. Antiasthmatic effects of *Galphimia glauca*, gallic acid, and related compounds prevent allergen- and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol.* 97, 1-7.
- Duan, W., Chan, J.H.P, Wong CH, Leung BP., WongWSF., 2004. Anti-inflammatory Effects of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Inhibitor U0126 in an Asthma Mouse Model. *J Immunol.* 172, 7053-7059.
- Gentry, A.H., Steyermark, J, 1987. A revision of *Dilodendron* (Sapindaceae). *Ann Mo Bot Gard.* 74, 533-538.

- Hambly, N., Nair, P., 2014. Monoclonal antibodies for the treatment of refractory asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 20, 87-94.
- Haspeslagh, E., Debeuf, N., Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2017. Murine Models of Allergic Asthm. of the series *Inflammation Methods in Molecular Biology*, 1559, 121-136,
- Huang, C.Q., Li, W., Wu, B., Chen, W.M., Chen, L.H., Mo, G.W., Zhang, Q.F., Gong, L., Li, J., Zhang, H.C., Zhu, H.M., Zeng, Q.Z., 2016. *Pheretima aspergillum* decoction suppresses inflammation and relieves asthma in a mouse model of bronchial asthma by NF- κ B inhibition. *J Ethnopharmacol.* 189, 22-30.
- Kato, K., Yamashita S., Kitanaka, S., Toyoshima, S., Zasshi, Y., 2001. Effect of gallic acid derivatives on secretion of Th1 cytokines and Th2 cytokines from anti CD3-stimulated spleen cells. *Int J Immunopharmacol.* 24, 451-457.
- Kim, S.H., Jun, C.D., Suk, K., Choi, B.J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.Y., Kim, D.K., Shin, T.Y., 2006. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol Sci.* 91, 123-131.
- Leung, E., Al Efraij, K., FitzGerald, J.M., 2017. The safety of mepolizumab for the treatment of asthma. *Expert Opin Drug Saf.* 16, 397-404.
- Michalany, J. 1998. *Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico.* 3ª ed. São Paulo: Editora Michalany Ltda.
- Morel, L.J., Azevedo, B.C., Carmona, F., Contini, S.H., Teles, A.M., Ramalho, F.S., Bertoni, B.W., de Castro França, S., Borges M.C., Pereira, A.M., 2017. A standardized methanol extract of *Eclipta prostrata* (L.) L. (Asteraceae) reduces bronchial hyperresponsiveness and production of Th2 cytokines in a murine model of asthma. *J Ethnopharmacol.* 198, 226-234.
- Nader, M.A., El-Awady, M.S., Shalaby, A.A., El-Agamy, D.S. 2012. Sitagliptin exerts anti-inflammatory and anti-allergic effects in ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 385, 909-919.
- Olin, J.T., Wechsler, M.E., 2014. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. *BMJ.* 349, g5517.
- Postma, D.S., Rabe, K.F., 2015. The asthma-COPD Overlap Syndrome. *N Engl J Med.* 373, 1241-1249.
- Queiroz, C.J., Nakata, C.M., Solito, E., Damazo, A.S., 2014. Relationship between HPV and the biomarkers annexin A1 and p53 in oropharyngeal cancer. *Infect Agent Cancer.* 21; 9-13.
- Reddy, A.T., Lakshmi, S.P., Reddy, R.C., 2012. Murine Model of Allergen Induced Asthma. *Journal Vis Exp.* 63, 3771.
- Santos, J.C., Oliveira, C.A.N., Varella, L., Matos, A.P., 2010. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). *Quim. Nova.* 33, 2080-2082.
- Shergis, J.L., Wu, L., Zhang, A.L., Guo, X., Lu, C., Xue, C.C., 2016. Herbal medicine for adults with asthma: A systematic review. *J Asthma.* 53, 650-659.

Skloot, G.S., 2016. Asthma phenotypes and endotypes: a personalized approach to treatment. *Curr Opin Pulm Med.* 22, 3-9.

Somner, G.V., Ferrucci, M.S., Acevedo-Rodríguez, P., 2016. *Dilodendron* in Lista de Espécies da Flora do Brasil., Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB020902>>. Acesso em: 15 março 2016.

Tiwari, M., Dwivedi, U.N., Kakkar, P., 2014. *Tinospora cordifolia* extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol.* 153, 326-37.

Wei, D., Ci, X., Chu, X., Wei, M., Hua, S., Deng, X., 2012. Hesperidin suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model. *Inflammation.* 35, 114-121.

ARTIGO 3 – a ser submetido na Revista NATURAL PRODUCT RESEARCH (1478-6419), Qualis B2 na área de BIOTECNOLOGIA.

Chemical characterization of the inner stem bark hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. and evaluation of the cytotoxic potential and anti-inflammatory activity of 3-O- β -glucopyranosyl- β -sitosterol and 3-O- β -glucopyranosyl-stigmasterol

Karoline C. Lima¹, Domingos Tabajara O. Martins², Ruberlei G. Oliveira², Eduarda Pavan², Lorena S. R. Martelli¹, Leila B. Pacheco¹, Virgínia C. da Silva¹, Tereza A. N. Ribeiro¹, Mário G. De Carvalho³, Paulo T. de Sousa Jr^{1*}

¹Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Correa da Costa, no. 2367, Boa Esperança, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

²Área de Farmacologia, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Correa da Costa, no. 2367, Boa Esperança, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.

³Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.

* CONTACT: Paulo T. de Sousa Jr: pauloteixeiradesousa@gmail.com

ABSTRACT

Phytochemical investigation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* led to the identification of β -sitosterol (**1**), stigmasterol (**2**) and campesterol (**3**), in mixture, namely **ST** mixture, as well as another mixture, namely **SAP** mixture, containing 3-O- β -glucopyranosyl- β -sitosterol (**4**) and 3-O- β -glucopyranosyl-stigmasterol (**5**), and the isolate epicatechin (**6**). Their structures were determined by spectrometric analysis. The safety profile of the mixture **SAP** was evaluated on RAW 264.7 cells, using the alamar blue[®] assay and **SAP** exhibited no cytotoxic effects on the RAW 264.7 cells. The anti-inflammatory activity of **SAP** is related to its ability to modulate the production of NO and LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage and reduced total leukocytes migration at all doses tested in LPS-induced peritonitis ($p < 0.001$).

KEYWORDS: *Dilodendron bipinnatum*, 3-O- β -glucopyranosyl- β -sitosterol, 3-O- β -glucopyranosyl-stigmasterol, cytotoxicity, phytochemistry. anti-inflammatory.

1. Introduction

Dilodendron bipinnatum Radlk. belongs to the Sapindaceae Family, which comprises more than 141 genera and 1900 species (Silva et al. 2013). It is a native and non-endemic tree (5 – 10 m high) that occurs in all the regions of Brazil, except the south, being in the phytogeographical domains of Amazon, Pantanal, Cerrado and Atlantic Forest. It is popularly known in Brazil as “mulher-pobre”, “maria-pobre”, or “farinha-seca”, among others. The macerate or decoction obtained from the stem bark is popularly used in Brazilian folk medicine to treat mainly uterine inflammation, low back pains and bone fractures (Bieski et al., 2012).

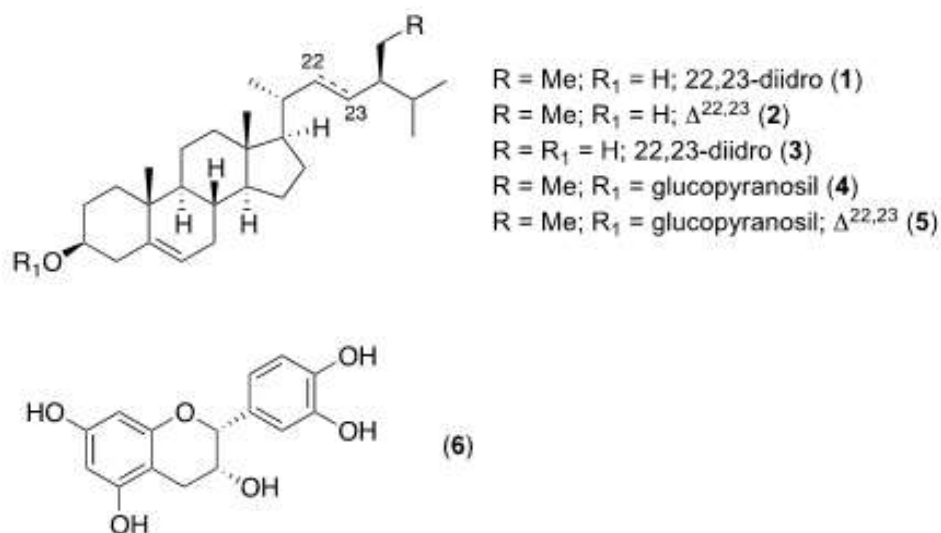
In previous studies, the *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity (Oliveira et al., 2014; 2017) as well as the antimicrobial activity (Santos et al., 2010) have been reported to the hydroethanolic extract of *D. bipinnatum* as well as the identification of β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, sistotenone (mixture), 3-*O*- β -glucopyranosyl- β -sitosterol, cycloeucalenol and 24-methylenecycloartenol, from the ethanolic extract of branches and leaves of this specie. Gallic acid, epigallocatechin and epigallocatechin gallate have been isolated from the inner stem bark hydroethanolic extract of *D. bipinnatum* (Oliveira et al., 2014).

This study describes the identification of β -sitosterol (1), stigmasterol (2), campesterol (3) in mixture (ST), as well as 3-*O*- β -glucopyranosyl- β -sitosterol (4) and 3-*O*- β -glucopyranosyl-stigmasterol (5) in mixture (SAP), and the isolate epicatechin (6) from the hydroethanolic extract of *D. bipinnatum* stem bark as well as the investigation of the anti-inflammatory activity of SAP, using experimental models.

2. Results and discussion

2.1. Identification of compounds

Phytochemical investigation of the inner stem bark hydroethanolic extract of *D. bipinnatum* (HEDb) led to the identification of six compounds. Their structures were determined by NMR (1D and 2D) data, CG-MS, as well as comparisons with literature as β -sitosterol (1), stigmasterol (2) and campesterol (3) as a mixture [ST mixture (38 mg); Kojima et al. 1990]; 3-*O*- β -glucopyranosyl- β -sitosterol (4) and 3-*O*- β -glucopyranosyl-stigmasterol (5) [SAP mixture (67 mg); Saxena et al. 2014; El-Askary et al. 2014] and the flavonoid epicatechin (6) (53.5 mg). The spectrometric data are available in the supplementary material (Fig. S1–S7).



2.2. Anti-inflammatory activity SAP in LPS-induced peritonitis in mice

The model of lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis was used to access the anti-inflammatory activity of the **SAP**, using the **HEDb** as guide. The group sham presented $10.8 \pm 0.64 \times 10^6$ total leukocytes in the intraperitoneal cavity. Intraperitoneal injection of 250 ng from LPS (0.2 mL/cavity) in mice of the vehicle group caused a significant increase (118.8%, $p < 0.001$) of the migration of leukocytes to the peritoneal cavity, relative to the sham group (Fig. S8). Pre-treatment with the **HEDb** caused reduction of leukocyte migration in 34.5% ($p < 0.01$), with the highest dose (100 mg/kg). The pre-treatment with the **SAP** (0.8; 4 and 20 mg/kg p.o.) caused reduction in leukocyte migration at all doses (45% $p < 0.001$) compared to vehicle group, while the pre-treatment with 0.5 mg/kg dexamethasone, standard drug for this test, inhibited leukocytes migration 50.8 % ($p < 0.001$) relative to the group challenged with LPS (Fig. S8).

During the development of the inflammatory process, the first cells to arrive at the inflammatory site are neutrophils, followed by macrophages (Pinho et al., 2011). The results indicated that both **HEDb** and **SAP** inhibited the inflammation by reducing leucocyte migration and suggest the direct participation of **SAP** in the anti-inflammatory action of the **HEDb**.

2.3 SAP doesn't alter cell viability

The result showed that **SAP** did not alter the cellular viability of RAW 264.7 macrophages ability to reduce alamar blue[®], with IC₅₀ value $> 40 \mu\text{g/mL}$ after 24 h exposure, indicating that **SAP** presented no cytotoxicity in this cells. Doxorubicin, the standard agent used gave which was highly cytotoxic at 24 h with IC₅₀= $0.3 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ (Fig. S9).

2.4 SAP inhibits NO production

The basal NO₂⁻ concentration in non-stimulated RAW 264.7 cells was 0.2 ± 0.12 μM. The vehicle group, which was stimulated with 0.5 μg/mL of LPS, presented increases of 95.7% (*p* < 0.001) in the NO₂⁻ concentration, compared to the basal group. Pre-treatment with **SAP** (0.2; 2 and 20 μg/mL) inhibited in a non-dependent way, in about 78 % for three concentrations (*p* < 0.001) the nitrite levels in the cellular supernatant by stimulated by LPS, in comparison to vehicle group (Fig. S10). L-NAME (2.69 μg/mL), the standard drug used in the assay, inhibited nitrite production by 79.4% and 57.9% in the LPS respectively, compared to the vehicle group (*p* < 0.001).

Studies performed by **Oliveira et al., (2014)** showed that the anti-inflammatory activity of **HEDb** is independent of the NO pathway, showing also a direct effect on ROS inhibition of LPS-stimulated RAW cells. These results suggest that **SAP** anti-inflammatory action, depends at least in part, on inhibition of NO and this effect may be related to the inhibition of ROS production (**Joo et al., 2014**).

Funding

The authors are grateful to INCT-Áreas Úmidas/CNPq/PPP (process no. 573990/2008-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Pró-Amazônia - process no. 23038.000731/2013-56), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT – process no. 157552/2014) for the scholarships and financial support.

REFERÊNCIAS

- Arora B, Bhadauria P, Tripathi D, Sharma A. 2012. *Sapindus emarginatus*: Phytochemistry & Various Biological Activities. Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences. 2:250-257.
- Bieski IGC, Rios-Santos F, De Oliveira RM, Espinosa MM, Macedo M, Albuquerque UP, Martins, DTO. 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region. (Mato Grosso, Brazil). Evid Based Complement Alternat Med. 2012, 272749.
- Branco, A., Pizzolatti, M. 2002. HRGC and HRGC-MS in the analysis of the chemical constituents isolated from hexanic extract of *Sebastiania argutidens* (Euphorbiaceae). Química Nova. 25(1):15-19
- Cunha TM, Rosalen, PL. 2016. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. Sci Rep. 6: 36401.

De Oliveira RG, de Campos Castilho GR, da Cunha AL, Miyajima F, de Oliveira Martins DT. 2017. *Dilodendron bipinnatum* Radlk. inhibits pro-inflammatory mediators through the induction of MKP-1 and the down-regulation of MAPKp38/JNK/NF- κ B pathways and COX-2 in LPS-activated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 202, 127-137.

De Oliveira, RG., Mahon, CP, Ascêncio PG, Ascêncio SD, Balogun SO, Martins DTO., 2014. Evaluation of anti-Inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. *J Ethnopharmacol.* 155, 387-395.

El-Askary HI. 2005. Terpenoids from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. *Molecules.* 10:971-977.

Joo, S. J.; Park, H. J.; Park, J. H.; Cho, J. G.; Kang, J. H.; Jeong, T. S.; Kang, H. C.; Lee, D. Y.; Kim, H. S.; Byun, S. Y.; Baek, N. I. 2014. Flavonoids from *Machilus japonica* Stems and Their Inhibitory Effects on LDL Oxidation. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 16418-16429.

Kojima H, Sato N, Hatano A, Ogura H. 1990. Sterol Glucosides from *Prunella vulgaris* *Phytochem.* 29:2351-2355.

Ma Z, Zhang X, Cheng L, Zhang P. 2009. Three lignans and one coumarinolignoid with quinone reductase activity from *Eurycorymbus cavaleriei*. *J. for the Study of Medicinal Plants.* 80:320-326.

Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z., 1997. Assessment of the alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Methods* 204:205–208.

Pinho BR, Sousa C, Valentão P, Andrade PB. 2011. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One.* 6:1–8.

Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal.* Corumbá: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1994.

Santos JC, Oliveira CAN, Varella L, Matos AP, Terezan AP, Leite AC, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MFGF, Pirani JR. 2010. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). *Quím. Nova.* 33:2080–2082

Saxena VK, Albert S. 2005. β -Sitosterol-3-O- β -D-xylopyranoside from the flowers of *Tridax procumbens* Linn. *J. Chem. Sci.* 117:263-266.

Silva KF, Ferrucci MS, Groppo M. *Bol. Bot. Univ. São Paulo, São Paulo-SP,* 2013,1,99-100p.

Sudjaroen Y, Hull WE, Erben G, Wurtele G, Changbumrung S, Ulrich CM, Owen R W. 2012. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour) seeds. *J. of The Phytochemical Society of Europe*. 77:226-237.

Suffness M, Pezzuto JM 1990. Assays Related to Cancer Drug Discovery. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Hostettmann K (Ed), London, pp. 71–133.

Wabo HK, Chabert P, Tane P, Noté O, Tala MF, Peluso J, Muller C, Kikuchi H, Oshima Y, Lobstein A. 2012. Labdane-type diterpenes and flavones from *Dodonaea viscosa*. *J. for the Study of Medicinal Plants*. 83:859-863.

Yu L, Wang X, Wei X, Wang M, Chen L, Cao S, Kang N, Qiu F. 2012 Triterpenoid saponins from *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and their inhibitory activity on human cancer cell lines. *J. for Research at the Interface of Chemistry and Biology*. 22:5232-5238.

Zhang LB, Jun J, Lei C, Wang HY, Zhao QS, Hou AJ. 2012. Isoprenylated Flavonoid and Adipogenesis-Promoting Constituents of *Dodonaea viscosa*. *J. Nat. Prod*. 75:699-706.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

1. Experimental

1.1 General

Infrared spectra were recorded on the Vertex 70 Bruker spectrometer using KBr pellets. GC-MS were obtained on Shimadzu CGMS 5050. NMR spectra were measured on a Bruker TopSpin 500 NMR spectrometer using TMS as internal standard. Column chromatography (CC) was performed using silica gel 70-230 mesh (Merck Co.), Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Fractions were monitored in silica-gel plates 60 F254 (Macherey-Nagel). The solvents used in the extraction and chromatography procedures were of ACS grade (Vetec).

GC-MS were performed on a Shimadzu CGMS 5050 chromatograph, employing DB5 (30m/0,25mm) column (JW); injector temperature I= 330 °C; detector temperature D= 340 °C; flux: 1mL; Injection volume: 1 µL; temperature and pressure ramp: 200 °C, 1 min (110.5 KPa), with increments of 40 °C till 260 °C (pressure= 132.9 KPa), remaining 1 min, then with 40 °C increments till 300 °C (pressure= 147.7 KPa), remaining 1 min, then 40 °C increments till 335 °C (pressure= 160.6 KPa), remaining 13,56 min, with 20 min total running time, using helium gas.

1.2 Plant Material

The inner stem bark of *Dilodendron bipinnatum* were collected in Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso state, Brazil, in March 2013 (S15 59.944 W56 27.980). The plant collection was authorized by the Chico Mendes Institute of Biodiversity Conservation (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMbio), authorization no. 14360, while access to the associated traditional knowledge and to genetic patrimony for the purpose of research was authorized by the Council on Genetic Patrimony of the Ministry of Environment (CGEN/MMA) under registry number 045/2009 A voucher specimen (41454) is available at the UFMT central Herbarium (Cuiabá, Mato Grosso State, Brazil).

1.3 Extraction, identification and isolation

The inner stem barks (2.85 kg) of *D. bipinnatum* were separately pulverized and extracted with EtOH-H₂O (7:3) by maceration at room temperature. The extract solutions were concentrated by rotary evaporator at 45°C, affording **HEDb** (519.10 g; 18.2%). Part of **HEDb** (479 g) was suspended in MeOH-H₂O (7:3; 700 mL) and extracted with hexane (3x700 mL), CHCl₃ (3x700 mL) and EtOAc (3 x 800 mL), affording **FHex** (45.87 g; 9.6 %), **FCHCl₃** (15.10 g; 3.2%), **FEtOAc** (146.67 g; 30.7%). **FHex** (1.10 g) was fractionated by silica gel

column chromatography (CC) using gradient mixtures of hexane, CH₂Cl₂ and EtOAc as mobile phase, to afford 8 fractions (**A**₁–**A**₈). Fraction **A**₄ afforded a white and amorphous powder (38 mg) of the **ST** mixture of steroids β-sitosterol (**1**), stigmasterol (**2**) and campesterol (**3**), as well as three other unidentified compounds, as shown by CG analysis (Fig. S3). **FCHCl**₃ (3.57 g) was submitted to CC on silica gel in gradient mixtures of CHCl₃, EtOAc and MeOH, to afford 8 fractions (**B**₁–**B**₈). Fraction **B**₇ afforded a white powder (67 mg; 0,013 %) of the **SAP** mixture containing 3-*O*-β-glucopyranosyl-β-sitosterol (**4**) and 3-*O*-β-glucopyranosyl-stigmasterol (**5**). **F**EtOAc (47.43 g) was subjected to silica gel CC using gradient mixtures of CHCl₃, EtOAc and MeOH, to afford 6 fractions (**C**₁–**C**₆). Fraction **C**₃ was fractionated using gradient mixtures of CHCl₃, EtOAc and MeOH, to produce 7 fractions (**C**_{3a} – **C**_{3g}). Fraction **C**_{3a} (53.5 mg) resulted in epicatechin (**6**).

The structures of the compounds (**1**), (**2**) and (**3**), identified from the **ST** mixture, were elucidated by ¹³C NMR comparing with literature data (Kojima et al, 1990). IR spectra presented signals at 3420 cm⁻¹ (ν_{OH}), 2940 cm⁻¹ and 2850cm⁻¹ (ν_{CH₂-CH₃}), 1680 cm⁻¹ (ν_{C=C}), 1470 cm⁻¹ (ν_{C-H}), and 1050 cm⁻¹ (ν_{C-O}). CG analysis (Fig. S3 B) presented three main peaks at at Rt = 6.58 min. (**3**), Rt = 6.66 min (**2**) and Rt = 6.84 min (**1**) with shoulders at Rt = 6.61 min, 6.71 min and 6.88 min, pointing out to the presence of three other unidentified compounds. MS spectra (Fig. S4) presented molecular ion peaks at *m/z* 414, *m/z* 412 and *m/z* 400, corresponding to compounds (**1**), (**2**) and (**3**) respectively. The MS fragmentation pattern for compounds (**1**)-(**3**) is in agreement with the literature (Branco and Pizzolatti, 2002).

The IR spectrum of the **SAP** mixture [compounds (**4**) and (**5**)] presented bands at 3410 cm⁻¹ (ν_{OH}) g, 2910-2850 cm⁻¹ (ν_{CH₂-CH₃}), 1630 cm⁻¹ (ν_{C=C}), and 1068 cm⁻¹ (ν_{C-O}), confirming the presence of the main functional groups. ¹³C and ¹H NMR analyses (Fig. S5-S6) allowed the elucidation of the structure of compounds (**4**) and (**5**) and are supported by ¹³C NMR literature data. Compound (**6**) was identified as the flavonoid epicatechin, after IR, ¹H NMR and ¹³C (Fig. S7) analyses fully supported by literature data (JOO et al., 2014).

1.4 Animals

Male Swiss mice (25–30 g) were used for the studies. Animals were maintained in propylene cages at 26 ± 1 °C in a 12 h dark/12 h light cycle, with free access to standard laboratory chow and water. Groups of six to eight animals were used for each experiment. The experimental protocol followed the International Principles for the Biomedical Research Involving Animal (CIOMS/OMS, 1985) and was approved by the Committee on the Use of Animal for experimentation (CEUA/UFMT) under process no. 23108.015729/13-0.

1.5 Peritonitis induced by lipopolysaccharide

In order to evaluate the effect of **HEDb** and **SAP** on leukocyte recruitment into the peritoneal cavity, the mice were orally pre-treated, with vehicle (0.9% saline solution), **HEDb** (20 and 100 mg/kg) and **SAP** (0.8; 4 and 20 mg/kg) or dexamethasone (0.5 mg/kg). After 1 h, LPS (250 ng/cavity/0.2 mL), of *Escherichia coli* dissolved in sterile saline solution was administered intraperitoneally. Six hours after the intraperitoneal injection of LPS, mice were anesthetized with 180 mg/kg ketamine and 30 mg/kg xylazin by intraperitoneal (ip.) route and the cells in the peritoneal cavity were collected through injection of 3 mL saline solution containing EDTA. The abdomen was slightly massaged and the cell suspension was aspirated using a syringe. The peritoneal lavage collected was used for leucocyte cell counting in Neubauer chamber (**Cunha et al., 1989; Orlandi et al., 2011**).

1.6 Cell culture

Murine macrophage-like RAW 264.7 cell lines were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ- Code 0212). The cells were maintained in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium plus 10% fetal bovine serum), supplemented by penicillin (100U/mL) and streptomycin (100 µg/mL), under a temperature of 37 °C, and atmosphere of 5% of CO₂ and 90% humidity.

1.7 Cell viability assay

This assay was performed by adopting the alamar blue[®] assay (**Nakayama et al., 1997**), with few changes (Oliveira et al., 2014). RAW 264.7 cells of density 2×10^4 cells/well were plated in 96-well plates in 200 µL of DMEM and treated with/without **SAP** (40 - 0.625 µg/mL, serial dilution) at the same conditions. Doxorubicin (58 - 0.0058 µg/mL) was used as a positive control, while some wells had the same amount of medium as the negative control. After 24 h of the incubation, the treatments were removed and 200 µL of 10% alamar blue[®] (resazurin) was added to each well and incubated again for 5 h. The conversion of resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) to resorufin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) by the cells was measured by fluorescence at 540 nm (oxidized state) and at 620 nm (reduced state) using microplate spectrophotometer (Multiskan EX, Thermo Scientific, Tewksbury, Massachusetts, USA). The cell viability was expressed as inhibitory concentration at 50% inhibition (IC₅₀ ± SEM). IC₅₀ values > 30 µg/mL was considered non-toxic to cells for mixture and IC₅₀ values > 4 µg/mL for pure substance (**Suffness and Pezzuto, 1990**).

1.8 Nitrite determination

Nitrite (NO_2^-) was used as an indicator of nitric oxide (NO) production in the culture medium. NO_2 released in the culture medium was measured according to the Griess reaction (**Oliveira et al., 2014**). In summary, RAW cells $264.7 (1.0 \times 10^6 \text{ cells/dish})$ were plated in a 24-well plate overnight. Cells were pre-treated with **SAP** (0.2; 2 and 20 $\mu\text{g/mL}$) for 1h, and incubated at 37 °C and 5 % CO_2 . Next, the cells were stimulated with LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, in the presence or absence of **SAP** under the same condition. L-NAME (2.69 $\mu\text{g/mL}$), a specific inhibitor of iNOS, was used as a positive control. For negative control, the same amount of medium was used in the microplate well. Supernatant from cell culture was measured for nitrite concentration and 100 μL of it was mixed with the same volume of Griess reagent for 10 min at room temperature. Absorbance (540 nm) was measured using a microplate reader and nitrite concentration was determined using a standard curve of sodium nitrite prepared in RPMI-1640 exempt of phenol red.

LIST OF FIGURES

Figure S1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the mixture of **1**, **2** and **3**.

Figure S2. DEPTQ-NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of the mixture of **1**, **2** and **3**.

Figure S3 - **A)** Gas chromatogram of compounds (**1**), (**2**) and (**3**); **B)** expansion of the gas chromatogram (6.2 – 7.3 min) of (**1**), (**2**) and (**3**).

Figure S4 – Mass spectra: **A.** compound (**1**); **B.** compound (**2**) and **C.** compound (**3**)

Figure S5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500 MHz, CDCl_3) of the mixture of **4** and **5**.

Figure S6. DEPTQ-NMR spectrum (125 MHz, CDCl_3) of the mixture of **4** and **5**.

Figure S7. DEPTQ-NMR spectrum (125 MHz, $\text{MEOH-}d_4$) of **6**.

Figure S8. Effect of oral administration of the vehicle (0.1 mL/10 g), **HEDb** (20 and 100 mg/kg), **SAP** (0.8; 4 and 20 mg/kg) and dexamethasone (Dexa-0.5 mg/kg) on total number of leukocytes present in the peritoneal lavage of male mice with lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis (250 ng/0.2mL/cavity). The sham group received vehicle (water, 0.1 mL/10 g, p.o.) and intraperitoneal injection of sterile 0.9% saline (0.1 mL/10 g). Each column represents a mean of 7-8 animals. The vertical lines represent SEM. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman–Keuls test. $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ vs. sham; $^{***}p < 0.001$ vs. vehicle.

Figure S9. Cell viability curve of RAW 264.7 cells exposed to varying concentrations of **SAP** mixture (40 - 0.312 $\mu\text{g/mL}$) and doxorubicin (58 – 0.0058 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, expressed as minimum inhibitory concentration 50% (IC_{50}).

Figure S10. Effect of treatment of **SAP** mixture (0.2; 2 and 20 $\mu\text{g/mL}$) and methyl ester of NG-nitro-L-arginine (L-NAME – 10 mM) on the nitrite (NO_2^-) production quantified in the supernatants of macrophages RAW 264.7 stimulated with lipopolysaccharide (LPS - 0.5 $\mu\text{g/mL}$) after 24 h of induction. The cells were stimulated with LPS (0.5 $\mu\text{g/mL}$) or without stimulation (basal). Concentrations of NO_2^- were expressed as mean \pm SEM for two independent experiments in triplicate. Statistical analysis used was one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test. $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ vs. basal; $^{***}p < 0.001$ vs. LPS.

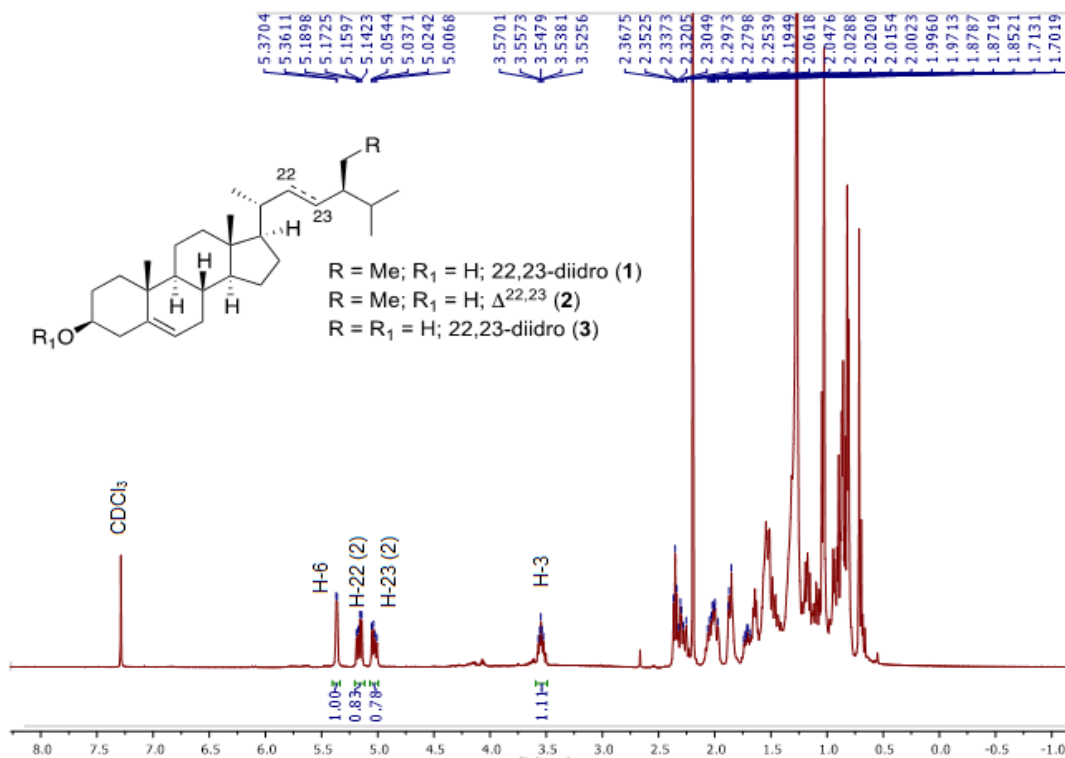


Figure S1. ¹H-NMR spectrum (500 MHz, CDCl₃) of the mixture of **1**, **2** and **3**.

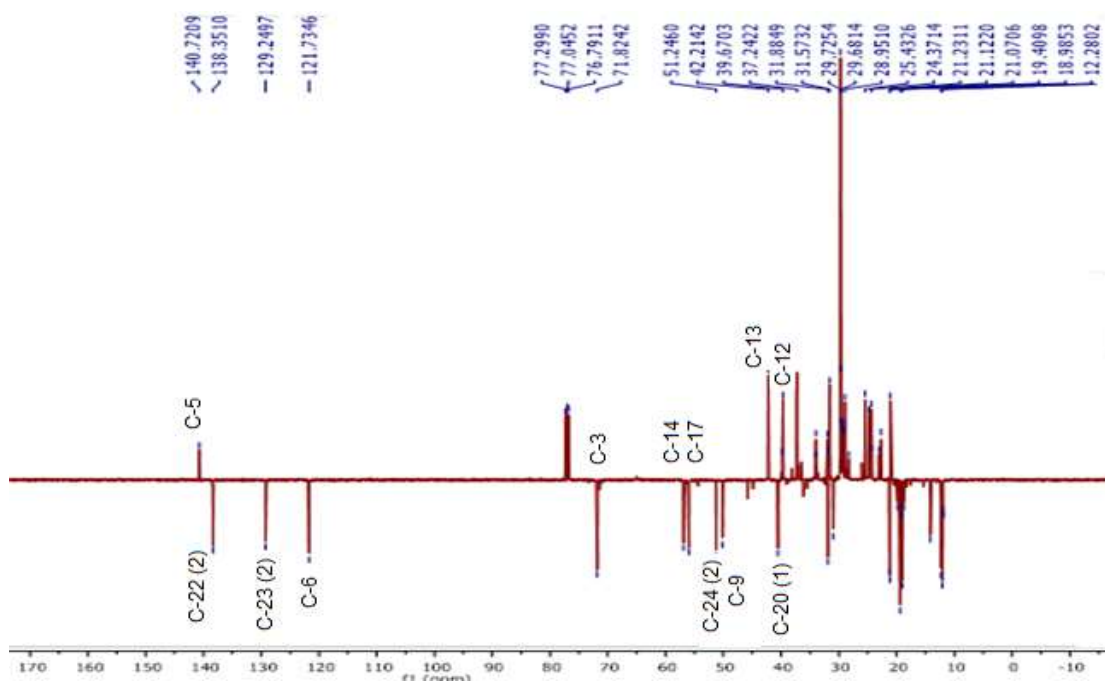


Figure S2. DEPTQ-NMR spectrum (125 MHz, CDCl₃) of the mixture of **1**, **2** and **3**.

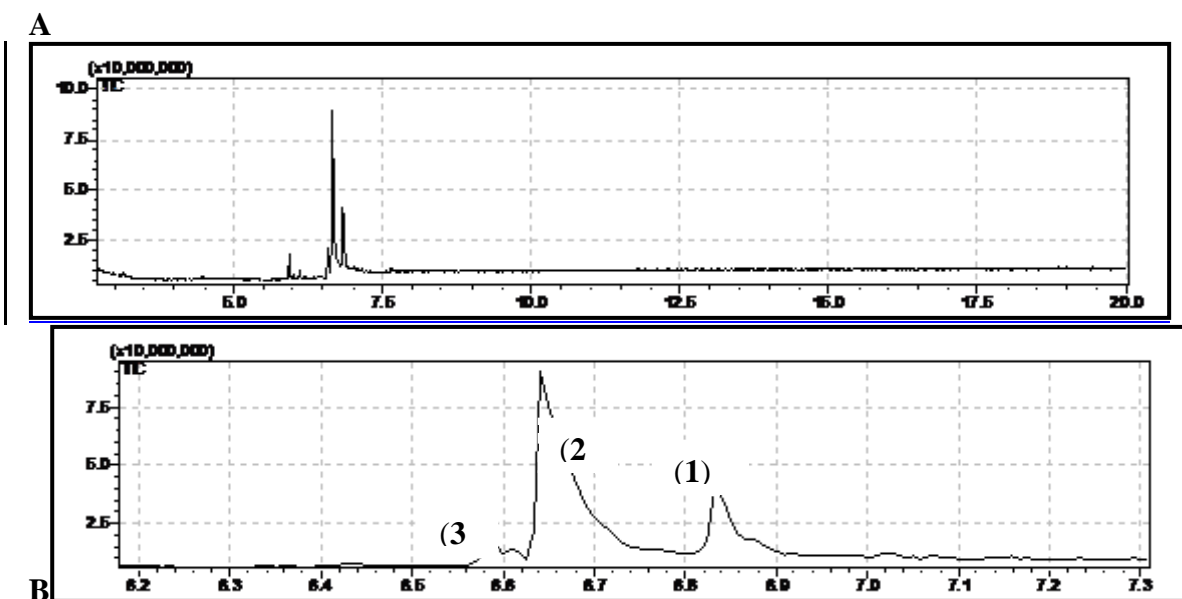
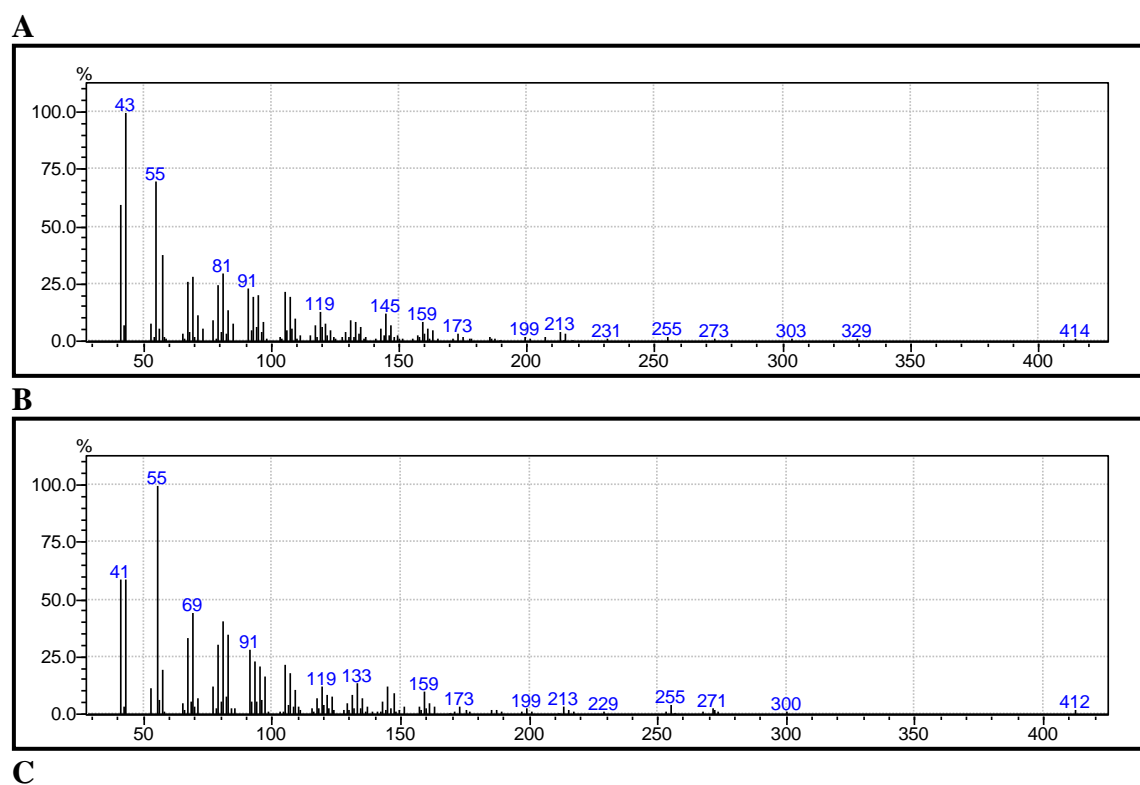


Figure S3 - **A**) Gas chromatogram of compounds **(1)**, **(2)** and **(3)**; **B**) expansion of the gas chromatogram (6.2 – 7.3 min) of **(1)**, **(2)** and **(3)**



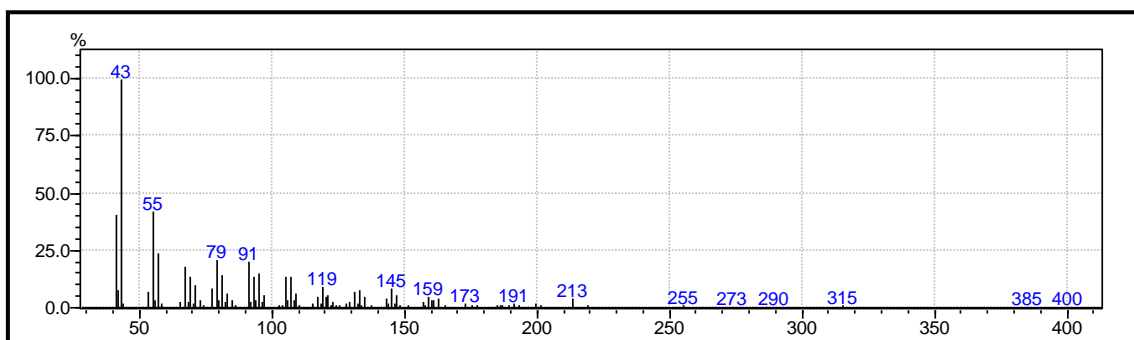


Figure S4 – Mass spectra: A. compound (1); B. compound (2) and C. compound (3)

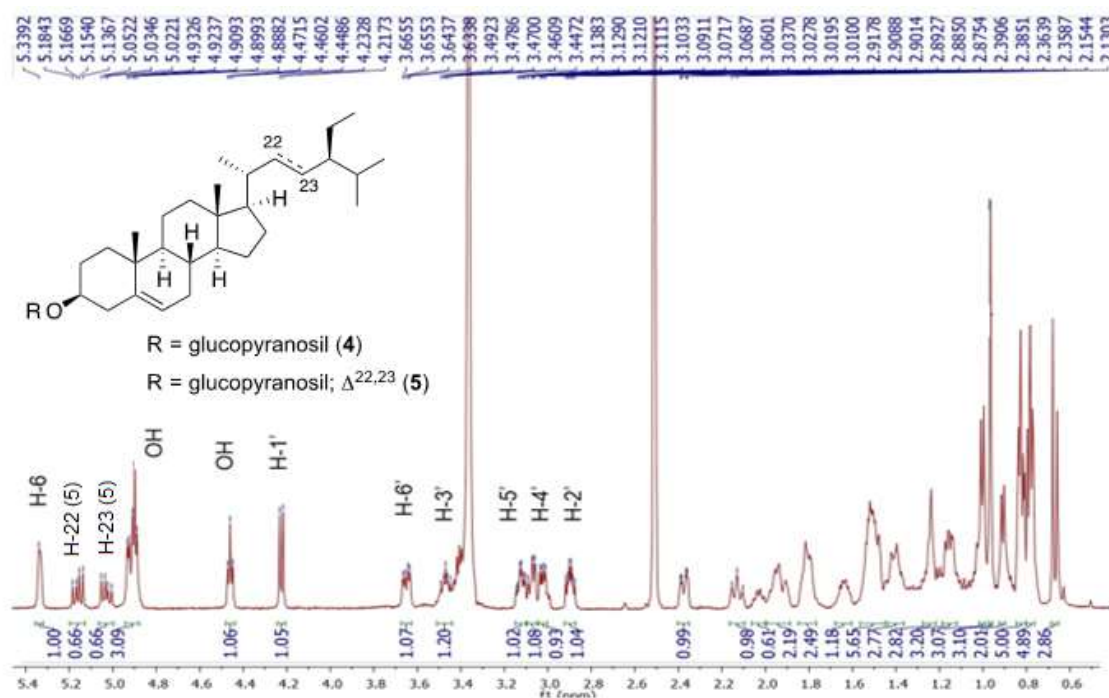


Figure S5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of the mixture of **4** and **5**.

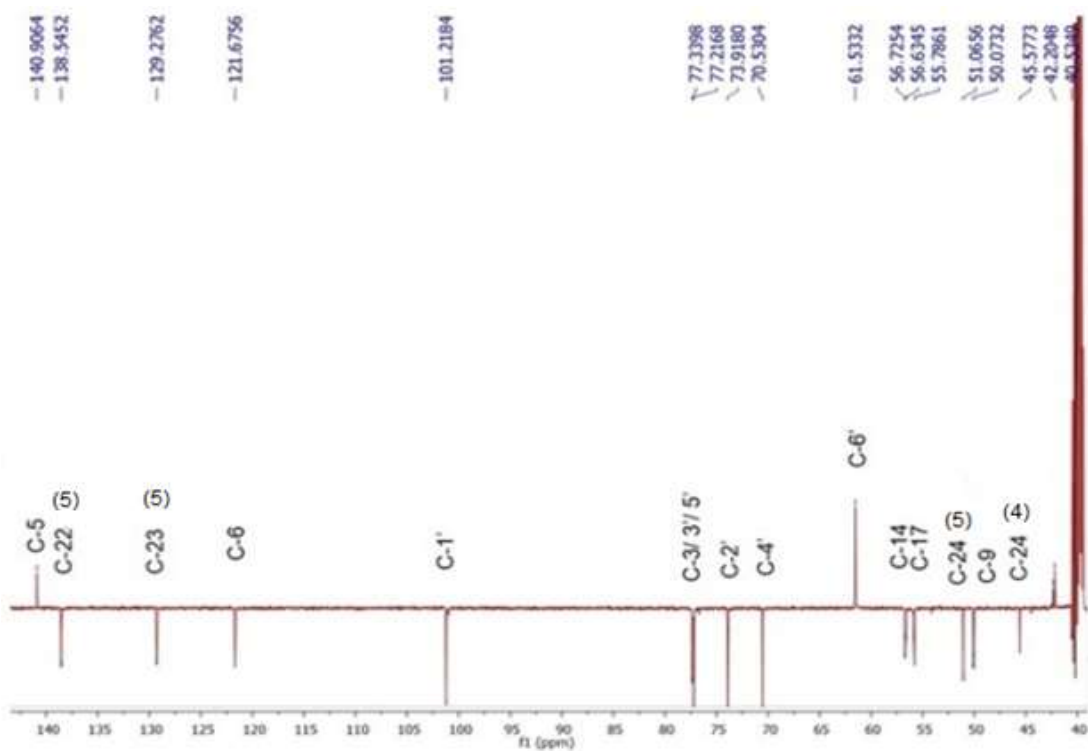


Figure S6. DEPTQ-NMR spectrum (125 MHz, DMSO- d_6) of the mixture of **4** and **5**.

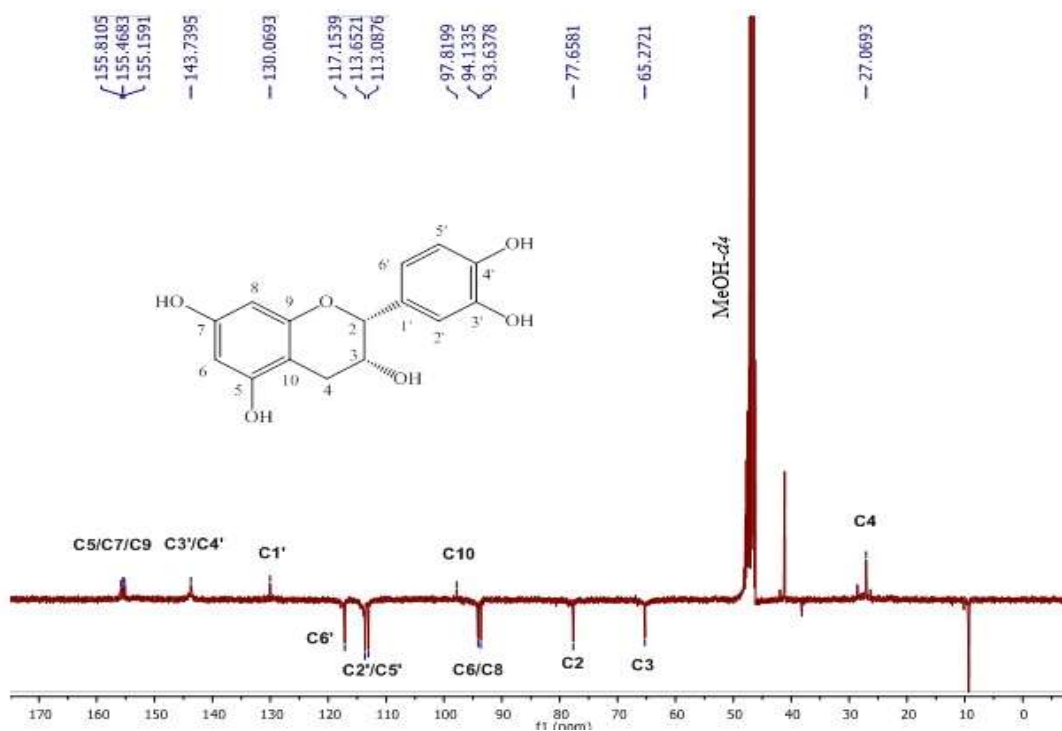


Figure S7. DEPTQ-NMR spectrum (125 MHz, MeOH- d_4) of **6**

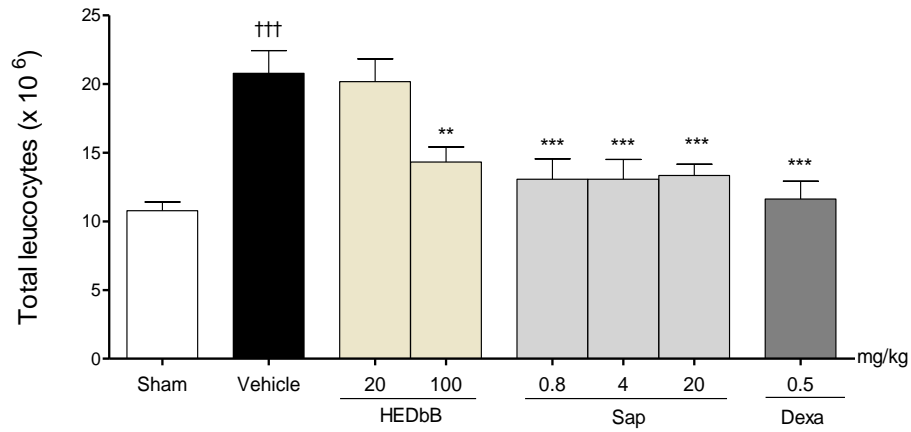


Figure S8. Effect of oral administration of the vehicle (0.1 mL/10 g), of **HEDb** (20 and 100 mg/kg), **SAP** (0.8; 4 and 20 mg/kg) and dexamethasone (Dexa-0.5 mg/kg) on total number of leucocytes present in the peritoneal lavage of male mice with lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis (250 ng/0.2mL/cavity). The sham group received vehicle (water, 0.1 mL/10 g, p.o.) and intraperitoneal injection of sterile 0.9% saline (0.1 mL/10 g). Each column represents a mean of 7-8 animals. The vertical lines represent SEM. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls test. ††† $p < 0.001$ vs. sham; *** $p < 0.001$ vs. vehicle.

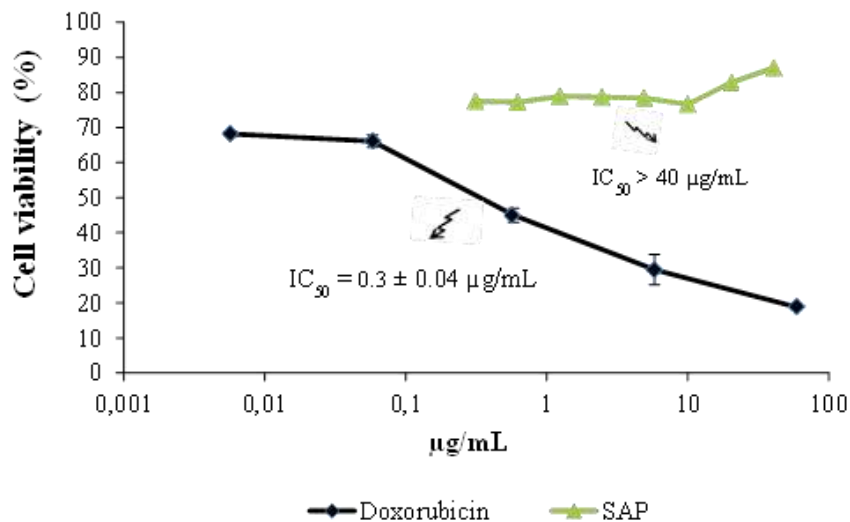


Figure S9. Cell viability curve of RAW 264.7 cells exposed to varying concentrations of **SAP** mixture (40 - 0.312 µg/mL) and doxorubicin (58 - 0.0058 µg/mL) for 24 h, expressed as minimum inhibitory concentration 50% (IC₅₀).

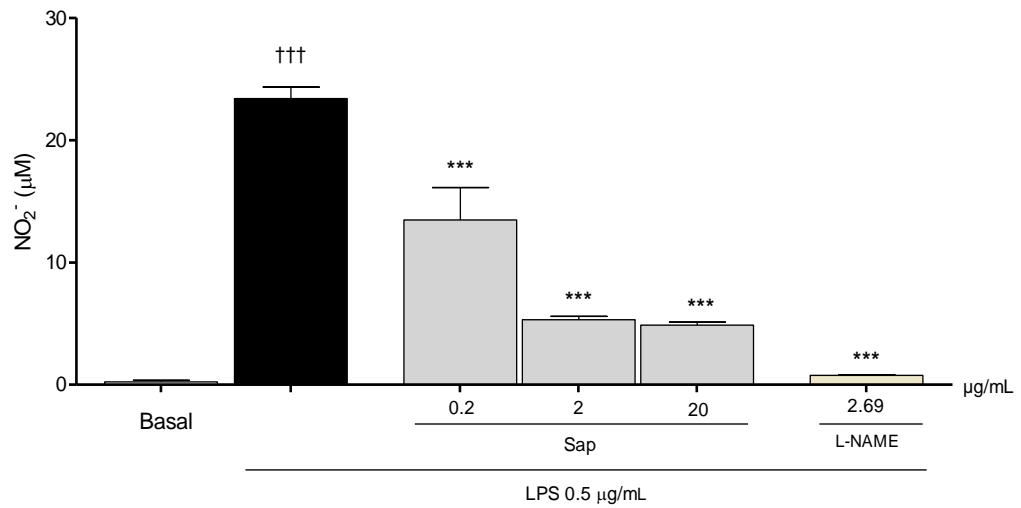


Figure S10. Effect of treatment with **SAP** mixture (0.2; 2 and 20 µg/mL) and methyl ester of NG-nitro-L-arginine (L-NAME – 10 mM) on the nitrite (NO₂) production quantified in the supernatants of macrophages RAW 264.7 stimulated with lipopolysaccharide (LPS - 0.5 µg/mL) after 24 h of induction. The cells were stimulated with LPS (0.5 µg/mL) or without stimulation (basal). Concentrations of NO₂ were expressed as mean ± SEM for two independent experiments in triplicate. Statistical analysis used was one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls test. †††p < 0.001 vs. basal; ***p < 0.001 vs. LPS.

5. CONCLUSÕES

Com base no exposto, conclui-se que o EHDb apresenta potente atividade anti-inflamatória, atuando em múltiplos alvos. O EHDb exerceu efeito anti-inflamatório, em parte, induzindo a ativação de MPK-1 e atenuando a desestabilização mitocondrial, a produção de ROS, bem como JNK e MAPK p38 resultando, eventualmente, na ativação diminuída do NF- κ B, com *downregulating* desse modo a transativação de genes alvo, tais como TNF- α e IL-1 β , e COX-2 (e consequente Redução de PGE2) em macrófagos murinos RAW 264.7 ativada por LPS. Por conseguinte, os nossos resultados sugerem que a EHDb apresenta um novo mecanismo de ação anti-inflamatória com destaque potencial como fitoterápico.

Os resultados aqui apresentados demonstram pela primeira vez a atividade anti-inflamatória de EHDb num modelo murino de asma alérgica, apoiando assim os usos etnofarmacológicos da planta. Sugerindo que o mecanismo anti-inflamatório do extrato, pelo menos em parte, é devido a um efeito inibitório sobre a resposta Th2 na asma induzida por ovalbumina em camundongos.

6. REFERÊNCIAS

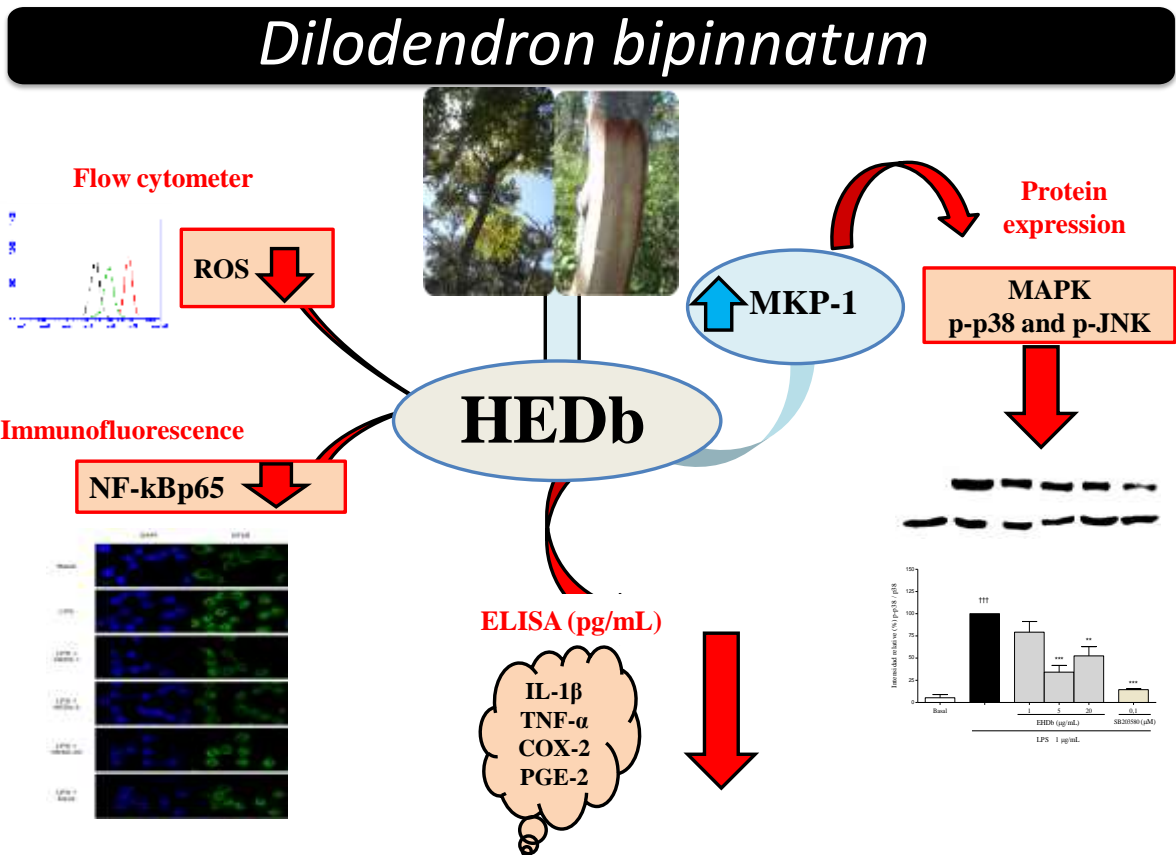
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Reviter; 2003 p. 302.
- ANTUS, C.; RADNAI, B.; DOMBOVARI, P.; FONAI, F.; AVAR, P.; MATYUS, P.; RACZ, B.; SUMEGI, B.; VERES, B. Anti-inflammatory effects of a triple-bond resveratrol analog: structure and function relationship. **Eur J Pharmacol**.v. 748, p. 61-67, 2015.
- APU, A.P.; BHUYAN, S. H.; PROVA, S. S.; MUHI, A. Anti-inflammatory activity of medicinal plants native to Bangladesh: a review. **J App. Pharm Sci**, v. 02; p. 07-10. 2012.
- ARTHUR, J. S.; LEY, C. Mitogen activated protein kinases in innate immunity. **Nat Rev Immunol**. v. 13, p. 679–692, 2013.
- ASHKENAZIA, S.; PLOTNIKOV, A.; BAHAT, A.; BEN-ZEEV, E.; WARSZAWSKI, S.; DIKSTEIN, R.A novel allosteric mechanism of NF- κ B gimerization and DNA binding targeted by an anti-Inflammatory drug. **Mol Cell Biol**. v. 36, p. 1237-1247, 2016.
- ASTOLFI, A., IRACI, N.; SABATINI, S.; BARRECA, M. L.; CECCHETTI, V. p38 α MAPK and Type I Inhibitors: binding site analysis and use of target Ensembles in virtual screening. **Molecules**. v. 20, n. 9, 2015.
- BELLIK, Y.; BOUKRAË, L.; HASAN A. ALZHRANI, H. A.; BAKHOTMAH, B. A.; ABDELLAH, F.; SI M. HAMMOUDI, S. M.; OUADA, M. I. Molecular mechanism underlying anti-Inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Mol**, v. 18, p. 322-353, 2013.
- BIESKI, I. G.; RIOS-SANTOS F.; DE OLIVEIRA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U. P.; MARTINS, D. T. O. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region. (Mato Grosso, Brazil). **Evid Based Complement Alternat Med**. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1480, de 31 de dezembro de 1990.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Edital nº 1/SCTIE/MS. 2014. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=48&data=24/10/2014>> Acessado em: mar. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.
- BUBICI, C.; PAPA, S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. **Br J Pharmacol**. v. 171, p. 24-37, 2014.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).**Braz Med Biol Res**. v. 33, n, 2, 179-89, 2000.
- CAMARGO, F. F.; SOUZA, T. R.; COSTA, R. B. Etnoecologia e etnobotânica em ambientes de Cerrado no Estado de Mato Grosso.**Interações (Campo Grande)**.v. 15, n.2, 2014.
- CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.**Microbiol Mol Biol Rev**. v. 75, p. 50-83, 2011.
- COHEN, S. B. Targeting the B Cell in Rheumatoid Arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. v. 24, p. 553-563, 2010.
- COMALADA, M.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. MKP-1: A critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation. **Eur J Immunol**. v. 42, p. 1938-1948, 2012.
- CONFORTI, F.; MENICHINI, F. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors.**Curr Med Chem**. v.18, p. 1137-1145, 2011.
- DA SILVA, A.O.; ALVES, A.D.; ALMEIDA, D.A.T; BALOGUN, S.O.; DE OLIVEIRA, R.G.; AGUIAR, A.A.; SOARES, I.M.; MARSON-ASCÊNCIO, P.G.; ASCÊNCIO, S.D.;

- MARTINS, D.T.O. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg. **J Ethnopharmacol**, v. 154, p. 319-329, 2014.
- DE ALMEIDA, D.A.T.; ROSA, S.I.G.; DA CRUZ, T.C.D.; PAVAN, E; DAMAZO, A.S.; SOARES, I.M.; ASCÊNCIO, S.D; MACHO, A.; MARTINS, D.T.O. *Mandevilla longiflora* (Desf.) Pichon improves airway inflammation in a murine model of allergic asthma. **J Ethnopharmacol**, v. 200, p. 51-59, 2017.
- DE AZEVEDO NETA MAHON, C. P.; COLODEL, E. M.; BALOGUN, S. O.; DE OLIVEIRA, R. G.; MARTINS, D.T.O. Toxicological evaluation of the hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **J Ethnopharmacol**. v. 155, n. 1, p. 665-671, 2014.
- DE MORAIS LIMA, G.R.; MONTENEGRO, C.A.; DE ALMEIDA, C.L.F.;ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L.M. Database survey of anti-inflammatory plants in south America: a review. **Int. J. Mol. Sci.** v. 12, p. 2692-2749, 2011.
- DE OLIVEIRA, R. G.; MAHON, C. P.; ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D.T.O. Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk. **J Ethnopharmacol**. v. 155, p. 387-395, 2014.
- DÍAZ-GONZALEZ, F.; SANCHEZ-MADRID, F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. **Eur J Immunol**. v. 45, p. 679–686, 2015.
- DIKSHIT P, CHATTERJEE M, GOSWAMI A, MISHRA A, JANA NR. Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. **J Biol Chem**. v. 281, p. 29228-2935, 2006.
- DIRSCH, V. M.; GERBES, A. L.; VOLLMAR, A. M. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappaB. **Mol Pharmacol**. v, 53, p. 402-407, 1998.
- DZOYEM, J. P.; ELOFF, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **J Ethnopharmacol**. v. 160, p. 194-201, 2015.
- FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **An Acad Bras Cienc**. v. 81, p. 207-216, 2009.
- FERREIRA, S.H. (Org.), Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: **An Acad Bras Cienc**, 1998, 131 p. FIGUEIRA, D. G. História: volume único, S.P: Ática, 2005.
- FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, p. 551-67, 2016.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, p. 1871–1875, 2001.
- GAMBLE, C.; MCINTOSH, K.; SCOTT, R.; HO, K. H.; PLEVIN, R.; PAUL, A. Inhibitory kappa B kinases as targets for pharmacological regulation. **Br. J. Pharmacol**. v. 165, p. 802-819, 2012.
- GAUTAM, R.; JACHAK, S. M.Recent Developments in anti-InflammatoryNatural Products.**Med Res Rev**, v. 29, p. 767-820, 2009.
- GENTRY, A.H.; STEYERMARK, J.A Revision of *Dilodendron* (Sapindaceae).**Ann Mo Bot Gard**.v. 74, p. 533-538, 1987.
- GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines.**Adv Pharmacol Sci**. 9130979. 2016.
- GHOSH, S.; HAYDEN. M. S. New regulators of NF-κB in inflammation.**Nat Rev Immunol**. v. 8, p. 837-848, 2008.
- GINHOUX, F.; SCHULTZE, J. L.; MURRAY, P.J.; OCHANDO, J.; BISWAS, S. K.New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function.**Nat Immunol**. v. 17, p. 34-40, 2016.
- GUPTA, S. C.; SUNDARAM, C.; REUTER, S.; AGGARWAL, B. B. Inhibiting NF-κB activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1799, p. 775-787, 2010.

- HAEGGSTRÖM, J. Z.; FUNK, C. D. Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. **Chem. Rev.** v. 111, p. 5866–5898, 2011.
- HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol.** v. 8, p. 218-230, 2008.
- HOU, X. L.; TONG, Q.; WANG, W. Q.; SHI, C. Y.; XIONG, W.; CHEN, J.; LIU, X.; FANG, J. G. Suppression of inflammatory responses by dihydromyricetin, a flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via inhibiting the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways. **J Nat Prod.** v. 24, p. 1689-1696, 2015.
- INDO, H. P.; HAWKINS, C. L.; NAKANISHI, I.; MATSUMOTO, K. I.; MATSUI, H.; SUENAGA, S.; DAVIES, M. J.; CLAIR, D. K.; OZAWA, T.; MAJIMA, H. J. Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Activation of Cellular Signals, Molecules, and Function. **Handb Exp Pharmacol.** p. 1-18, 2017.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. **Science.** v. 327, p. 291-295, 2010.
- KALUDERCIC, N.; DESHWAL, S., DI LISA, F. Reactive oxygen species and redox compartmentalization. **Front Physiol.** v. 5, p. 285, 2014.
- KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochim Biophys Acta.** v. 1754, p. 253-262, 2005.
- KASAHARA, E.; SEKIYAMA, A.; HORI, M.; HARA, K.; TAKAHASHI, N.; KONISHI, M.; SATO, E. F.; MATSUMOTO, S.; OKAMURA, H.; INOUE, M. Mitochondrial density contributes to the immune response of macrophages to lipopolysaccharide via the MAPK pathway. **FEBS Lett.** v. 585, p. 2263-2268, 2011.
- KHORASANIZADEH M.; ESKIAN M.; GELFAND E. W.; REZAEI, N. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma. **Pharmacol Ther.** pii: S0163-7258(17)30038-4. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.
- KIM, J. M.; JUNG, H. A.; CHOI, J. S.; LEE, N. G. Identification of anti-inflammatory target genes of *Rhizoma coptidis* extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 murine macrophage-like cells. **J Ethnopharmacol.** v. 130, 354–362, 2010.
- KIM, Y.S.; YOUNG, M.R.; BOBE, G.; COLBURN, N.H.; MILNER, J.A. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. **Cancer Prev. Res.** v. 2, p. 200–208, 2009.
- LANGIER, S.; SADE, K.; KIVITY, S. Regulatory T cells: The suppressor arm of the immune system. **AutoimmunReviews.** v. 10, p. 112–115, 2010.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 1, p. 1651, 2009.
- LEDESMA, B. H.; HSIEH, C. C.; DE LUMEN, B. O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 390, p. 803-808, 2009.
- LEE, I. T.; SHIH, R. H.; LIN, C. C.; CHEN, J. T.; YANG, C. M. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. **Cell Commun Signal.** v. 10, p. 1-15, 2012.
- LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E. T.; WANG, H.; YANG, X. F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **J Hematol Oncol.** v. 6, p. 1-19, 2013.
- LIASKOU, E.; WILSON, D. V.; OO, Y. H. Innate Immune Cells in Liver Inflammation. **Mediators of Inflammation.** v. 2012, p. 1-21, 2012.
- MACHADO, A.; FREITAS, A.; SALES-PERES, S. H. Atividade anti-inflamatória de produtos naturais em odontologia: uma revisão sistemática. Natural products anti-inflammatory activity in dentistry: a systematic review. **Rev Fitos.** v. 10, p. 47-58, 2016.

- MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M.; SILVA, A. C. Medicinal plants RENISUS with potential anti-inflammatory: systematic review in three scientific databases. **Rev Fitos**. v. 9, p. 129-144, 2015.
- MASKREY, B. H.; MEGSON, I. L.; WHITFIELD, P.D.; ROSSI, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 31, p. 1001-1006, 2011.
- MATO GROSSO. Proposta para o programa estadual de fitoterápicos, plantas medicinais e aromáticas com fins terapêuticos e alimentares. SETEC/SES/EMPAER. 2005.
- MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive oxygen species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxid Redox Signal**. v. 20, p. 1126-1167, 2014.
- MOON, D. O.; CHOI, Y. H.; KIM, N. K.; PARK, Y. M.; KIM, G. Y. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Int Immunopharmacol*, v.7, p. 506–514, 2007.
- NETO, G. G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. Notas etnobotânicas de Sapindaceae Jussieu. **Acta Bot. Bras.**, v. 14, n. 3, p. 327-334, 2000.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v.75, p.311-335, 2012.
- OMS - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005. Ginebra, 2002a.66 p.
- PARK, H. H.; KIM, M. J.; LI, Y.; PARK, Y. N.; LEE, J.; LEE, Y. J.; KIM, S. G.; PARK, H. J.; SON, J. K.; CHANG, H. W.; LEE, E. Britanin suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and cytokine production via NF- κ B and MAPK inactivation in RAW 264.7 cells. **Int Immunopharmacol**. v. 15, p. 296-302, 2013.
- PARK, J.; MIN, J.S.; KIM, B.; CHAE, U. B.; YUN, J. W.; CHOI, M. S.; KONG, I. K.; CHANG, K. T.; LEE, D. S. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. **Neurosci Lett**. v. 584, p. 191-196, 2015.
- QANDIL, A. M. Prodrugsof Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), More Than Meets the Eye: A Critical Review. **Int. J. Mol. Sci**. v. 13, 2012.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-13, 2001.
- RBG KEW. The State of the World's Plants Report – 2016. Royal Botanic Gardens, Kew.
- RECIO, M. C.; ANDÚJAR, I.; RÍOS, J. L. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. **Curr Med Chem**, v. 19, p. 2088-2103, 2012.
- REIS, S. M.; MORANDI, P. S.; OLIVEIRA, B.; OLIVEIRA, E. A.; VALADÃO, M. B. X.; MARIMON, B. S.; MARIMON-JUNIOR, B. H. Influência do sombreamento no desenvolvimento inicial e eficiência no uso de nutrientes de *Dilodendron bipinnatum* Radkl (Sapindaceae). **Scient Forestal**, v. 43, p.581-590, 2015.
- ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O USO TERAPÊUTICO DA FLORA NA HISTÓRIA MUNDIAL. **HOLOS**. vol. 1, 31, 2015.
- ROSA, S.I.G.; RIOS-SANTOS, F., BALOGUN, S.O.; DE ALMEIDA, D.A.T.; DAMAZO, A.S.; D.A.; CRUZ, T.C.D.; PAVAN, E.; BARBOSA, R.D.S.; ALVIM, T.D.C.; SOARES, I.M.; ASCÊNCIO, S.D.; MACHO, A.; MARTINS, D.T.O. Extract from *Echinodorus scaber* Rataj leaves inhibits inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. **J Ethnopharmacol**. V. 203, p. 191-199, 2017.
- ROY, P. K.; RASHID, F.; BRAGG, J., IBDAH, J. A. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**. v. 14, p. 200-202, 2008.
- SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, C. A. N.; VARELLA, L.; MATOS, A. P. Constituintes químicos e atividade antimicrobiana dos extratos de *Dilodendron bipinnatum* (Sapindaceae). **Quim. Nova**. v. 33, p. 2080-2082, 2010.
- SHAH, B. N.; SETH, A. K.; MAHESHWARI, K. M. A review on medicinal plants as a source of anti-inflammatory agents. **Res J of Med Plant**, v. 5, p. 101-115, 2011.

- SOMNER, G. V.; FERRUCCI, M. S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. *Dilodendron* in Lista de Espécies da Flora do Brasil., **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB020902>>. Acesso em: 15 março 2016.
- SOMNER, G.V.; FERRUCCI, M.S.; ROSA, M.M.T. Sapindaceae: Dilodendron. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; GIULIETTI, A.M.; MARTINS, S.E. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo, SP: Instituto de Botânica, FAPESP, p.208-209, 2009.
- SON, Y.; CHEONG, Y.K.; KIM, N.H.; CHUNG, H.T.; KANG, D.G; PAE, H. O. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? **J Signal Transduct.**v. 2011, p. 792639, 2011.
- SUN, L.; YE, R. D. Role of G protein-coupled receptors in inflammation.**Acta Pharmacol Sin.** v. 33, p. 342-350, 2012.
- SUN, P.; ZHOU, K.; WANG, S.; L. I. P.; CHEN, S.; LIN, G.; ZHAO, Y.; WANG, T. Involvement of MAPK/NF- κ B signaling in the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in experimental colitis by chronic vagus nerve stimulation. **PLoS One.** v. 8, 2013.
- TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science.** v. 339, p. 166-172, 2013.
- TAKADA, Y.; BHARDWAJ, A.; POTDAR, P.; AGGARWAL, B. B. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. **Oncogene.** v. 23, p. 9247-9258, 2004.
- TANNAHILL, G. M.; CURTIS, A. M.; ADAMIK, J. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . **Nature.** v. 496, p. 238-242, 2013.
- TSATSANIS, C.; ANDROULIDAKI, A.; VENIHAKI, M.; MARGIORIS, A. N. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2.**Int J Biochem Cell Biol.** v. 38, p. 1654-1661, 2006.
- UMEZAWA, K. Inhibition of tumor growth by NF- κ B inhibitors.**Cancer Sci.** v. 7, p. 990–995, 2006.
- VISHAL, V.; GANESH, N.S.; MUKESH, G.; RANJAN, B. A review on some plants having anti-inflammatory activity. **The J Phytopharmacol.** v. 3, p. 214-221, 2014.
- VLADIMER, G. I.; MARTY-ROIX, R.; GHOSH, S.; WENG, D.; LIEN, E. Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. **Curr Opin Microbiol.** v. 16, p. 23-31, 2013.
- VOLLMER, T.R.; STOCKHAUSEN, A.; ZHANG, J. Z. Anti-inflammatory effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, is partially mediated by MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1). **J Biol Chem.** v. 287, p. 35212-35221., 2012.
- WANCKET, L. M.; FRAZIER, J.W.; LIU, Y. Mitogen-activated protein kinase (MKP)-1 in immunology, physiology, and disease.**Life Sci.** v. 90, p. 237–248, 2012.
- WEST, A.; PHILLIP, G. S.; SANKAR, G. Mitochondria in Innate Immune Responses.**Nat Rev Immunol.** v. 11, p. 389–402, 2011.
- WHITE, E.S.; MANTOVANI, A.R. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. **J Pathol.** v. 229, p. 141–144, 2013.
- YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer.**J Clin Invest.** v. 107, 135-142, 2001.
- YEOM, M.; KIM, J. H.; MIN, J. H.; HWANG, M. K.; JUNG, H. S.; SOHN, Y. Xanthii fructus inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK. **J Ethnopharmacol.** v. 176, p. 394-401, 2015.
- YOKOTA, T.; WANG, Y. p38 MAP kinases in the heart.**Gene.** v. 575, p. 369-376. 2016.



Research Paper

Evaluation of anti-inflammatory activity of hydroethanolic extract of *Dilodendron bipinnatum* Radlk

Ruberlei Godinho de Oliveira^a, Clarisse Pinto Azevedo Neto Mahon^a,
Poliana Guerino Marson Ascêncio^b, Sérgio Donizeti Ascêncio^b,
Sikiru Olaitan Balogun^a, Domingos Tabajara de Oliveira Martins^{a,*}

^a Department of Basic Health Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Correa da Costa, no. 2367, Caxipó, Boa Esperança, Cuiabá 79060-900, Mato Grosso, Brazil

^b Natural Products Research Laboratory, Faculty of Medicine, Federal University of Tocantins (UFT), Av. NS15, Palmas 77020-210, Tocantins, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2014

Received in revised form

17 May 2014

Accepted 23 May 2014

Available online 12 June 2014

Keywords:

Dilodendron bipinnatum

Secondary metabolites

HPLC fingerprint

Mechanism of action

Inflammation

Chemical compounds studied in this article:

Gallic acid (PubChem CID: 370)

(+)-catechin (PubChem CID: 9064)

(-)-epigallocatechin gallate

(PubChem CID: 65064)

(-)-gallicocatechin (PubChem CID: 65084)

lambda Carrageenan

(PubChem CID: 11966249)

Dexamethasone acetate

(PubChem CID: 5702036)

N-omega-Nitro-L-arginine methyl ester

hydrochloride (PubChem CID: 135193)

Doxorubicin (PubChem CID: 31703)

indomethacin (PubChem CID: 3715)

Alamar Blue (PubChem CID: 11077)

lipopolysaccharide (PubChem CID:

53481793)

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Dilodendron bipinnatum* Radlk. (Sapindaceae), popularly known as "mulher-pobre", is a native tree of the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. The stem bark of *Dilodendron bipinnatum* is used by the population, in the forms of decoction and maceration in the treatment of inflammatory conditions. There is no information in the literature demonstrating the anti-inflammatory activity of *Dilodendron bipinnatum* and its respective mechanism of action. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory activity and mechanism of action of the hydroethanolic extract of the stem bark of *Dilodendron bipinnatum* (HEDb) using *in vivo* and *in vitro* experimental models.

Materials and methods: The stem bark of *Dilodendron bipinnatum* was macerated in 70% hydroethanolic solution (1:3, w/v) for 7 days, filtered, concentrated on a rotary evaporator and the residual solvent removed in oven at 40 °C, thus obtaining HEDb. Cytotoxicity of HEDb in RAW 264.7 was assessed by the Alamar blue assay. *in vivo* anti-inflammatory activity of HEDb was evaluated with carrageenan and dextran-induced paw edemas and lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis in mice. Effects of HEDb on the inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) and IL-10 concentrations in the peritoneal fluid were evaluated using commercial ELISA kits. The *in vitro* anti-inflammatory activity was evaluated using RAW 264.7 cells stimulated with LPS and/or INF- γ , while a Griess method was employed to determine nitric oxide (NO) concentrations in the peritoneal lavage and in the supernatants of RAW 264.7 cells. Preliminary phytochemical analysis was carried out using classical methods and secondary metabolites detected on HEDb were analyzed and confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** HEDb showed very low cytotoxicity with $IC_{50} > 200 \pm 0.38 \mu\text{g/mL}$. HEDb effectively inhibited paw edema by carrageenan in the 2nd hour at 20 mg/kg (36%, $p < 0.001$), and by dextran in the 1st hour at 100 mg/kg (46%, $p < 0.01$), after induction with the phlogistic agents. Furthermore, HEDb reduced total leukocytes and neutrophils migration at all doses tested producing maximum effect at 20 mg/kg (45% and 64%, $p < 0.001$ respectively). HEDb also attenuated increases in the concentrations of the pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and increased the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in the peritonitis model. However, it had no effect on NO production in activated RAW 264.7 cells. Preliminary phytochemical analysis revealed the presence of phenolic compounds, chalcones, flavones, flavonones, flavonoids, saponins and coumarins. HPLC analyses identified some tannins, with epigallocatechin gallate being the major compound.

Conclusions: Our findings provide evidence for the popular use of the stem bark of *Dilodendron bipinnatum* in inflammation. Its anti-inflammatory action was due, at least in part, to the inhibition of cell migration, of the inflammatory mediators and Th1 cytokines and an increase in Th2 cytokines, without affecting NO pathway. It can be suggested that tannins account at least in part for the anti-inflammatory activity of HEDb.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.145490/2016-45, sobre “Avaliação do efeito do extrato hidroetanólico da entrecasca de *Dilodendron bipinnatum* Radlk. em modelos de inflamação intestinal e asma induzida por ovoalbumina”, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. DOMINGOS TABAJARA OLIVEIRA MARTINS/Ruberlei Godinho de Oliveira & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **19/05/2016**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.145490/2016-45, entitled “Evaluation of the effect of hydroethanol extract bast *Dilodendron bipinnatum* Radlk. in models of intestinal inflammation and asthma induced by ovoalbumin”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **May 19, 2016**.

Cuiabá-MT, 19 de maio de 2016.


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

**1.2. Da representatividade da petição**

Levando em conta os dados de produção apresentados pela petionária relativos às empresas Cooperdisc Editorial Log Ltda. e NovoDisc Mídia Digital Ltda., observou-se que a produção da Videolar equivale a 75% da produção nacional CD-R e a 100% da produção nacional de DVD-R, no período de julho de 2006 a junho de 2007. Assim, considerou-se que a petição foi apresentada pela indústria doméstica, nos termos do inciso III do art. 3º do Decreto nº 1.488, de 1995.

1.3. Da Abertura

Tendo sido apresentados indícios suficientes de que o surto de importações resultou em ameaça de prejuízo grave à indústria doméstica, a Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) iniciou a investigação destinada a averiguar a necessidade de aplicação de medidas de salvaguarda às importações brasileiras de mídias ópticas graváveis uma única vez, por intermédio da publicação, no Diário Oficial da União (D.O.U.) de 5 de setembro de 2008, da Circular SECEX nº 63, de 4 de setembro de 2008.

1.4. Da notificação de abertura e do envio de questionários

Foram notificadas da abertura da investigação e receberam cópia da Circular SECEX e dos respectivos questionários as partes interessadas identificadas, produtores nacionais e importadores.

Nos termos do § 2º do art. 3º do Decreto nº 1.488, de 1995, o Ministério das Relações Exteriores foi também informado a respeito do início da investigação, de modo que esse Ministério pudesse transmitir as informações pertinentes ao Comitê de Salvaguardas da Organização Mundial de Comércio (OMC).

1.5. Da investigação in loco

Foi realizada investigação in loco na empresa Videolar, a fim de verificar a veracidade das informações prestadas em resposta ao questionário e suas complementações, obter maior detalhamento dos dados e do processo produtivo do produto investigado. A investigação in loco ocorreu do dia 27 a 30 de abril de 2008. Em linhas gerais, foi constatada a veracidade das informações apresentadas.

1.6. Da audiência

Foi realizada audiência nos termos do § 3º do art. 3º do Decreto nº 1.488, de 1995, para tratar dos temas propostos pelas empresas Multimix S/A, Elgin Componentes da Amazônia Ltda., Elgin Industrial da Amazônia Ltda., Golden Distribuidora Ltda., Rio Branco Comércio e Indústria de Papéis Ltda. e Braimex Comércio, Imp. e Exp. de Equipamentos.

2. Do produto**2.1. Do produto investigado**

O produto investigado são as mídias ópticas graváveis uma única vez importadas, utilizadas para o armazenamento de áudio, vídeo, programas para computadores, documentos, jogos, imagens digitais e outros tipos de dados (CD-R e DVD-R).

Segundo informações juntadas aos autos do processo, o CD-R é, usualmente, vendido nas seguintes embalagens: estojo plástico transparente unitário (Slim Box), estojo plástico transparente para 50 discos - pino com 50 (Box 50); envelope em papel cartão unitário; e caixa impressa em papel cartão - pack com 10 estojos (Slim Box). Por sua vez, o DVD-R é usualmente comercializado nas seguintes embalagens: estojo plástico transparente unitário (Slim Box); estojo plástico transparente para 25 discos - pino com 25 (Box 25); e estojo plástico transparente para 50 discos - pino com 50 (Box 50).

2.2. Do produto fabricado no Brasil

Segundo a Videolar, os CD-R e os DVD-R, fabricados no Brasil, são mídias ópticas graváveis também utilizadas para armazenamento de áudio, vídeo, programas para computadores, documentos, jogos, imagens digitais e outros tipos de dados. As embalagens utilizadas para comercialização dos CD-R e DVD-R são basicamente as mesmas utilizadas na comercialização do produto importado.

2.3. Da similaridade dos produtos

Constatou-se, com base nas informações prestadas no curso da investigação sobre o produto importado e o produto doméstico, que ambos são produzidos a partir das mesmas matérias-primas, possuem as mesmas características, prestando-se às mesmas aplicações e destinando-se ao mesmo mercado, sendo inclusive comercializados em embalagens semelhantes. Assim, os CD-R e os DVD-R produzidos no Brasil foram considerados similares às mídias ópticas graváveis uma única vez importadas.

3. Da definição de indústria doméstica

De acordo com o item III do art. 3º do Decreto nº 1.488, de 1995, definiu-se como indústria doméstica, para fins de análise da existência de prejuízo grave ou de ameaça de prejuízo grave, as linhas de produção de CD-R e DVD-R da Videolar S.A.

4. Da evolução imprevisível das circunstâncias

Por ocasião da conclusão das negociações tarifárias que levaram à assinatura do Acordo de Marraqueche não havia, no Brasil, indústria que pudesse ser afetada pelas importações de CD-R e DVD-R. A luz dessas explicações foi caracterizada a evolução imprevisível das circunstâncias.

5. Do prejuízo grave

Com vistas a analisar a existência de ameaça de prejuízo grave, foram considerados cinco períodos de doze meses, definidos como segue: P1 (julho de 2003 a junho de 2004); P2 (julho de 2004 a junho de 2005); P3 (julho de 2005 a junho de 2006); P4 (julho de 2006 a junho de 2007); e P5 (julho de 2007 a junho de 2008).

5.1. Das importações

O total das importações do produto investigado (exclusive MERCOSUL) elevou-se sucessivamente até P4. De P1 para P2, verificou-se aumento de 42,0%; de P2 para P3, de 78,0%; e de P3 para P4, de 64,8%. De P4 para P5, entretanto, esse total recuou 9,5%. Isso não obstante, de P1 para P5, observou-se crescimento de 276,8%.

Em relação ao valor CIF, as importações do produto investigado (exclusive MERCOSUL) apresentaram a mesma tendência observada quanto ao volume importado. De P1 para P2, o valor CIF total das importações brasileiras de CD-R e DVD-R cresceu 114,3%; de P2 para P3, 241,2%; de P3 para P4, 95,7%. De P4 para P5, entretanto, houve retração do valor CIF, de 12,0%. Isso não obstante, a elevação verificada em todo o período investigado alcançou 1.158,7%.

O preço médio ponderado das importações do produto investigado (exclusive MERCOSUL), por sua vez, foi crescente. Com efeito, de P1 para P2, houve crescimento de 50,9%, tendo sido constatadas novas elevações de P2 para P3 (91,7%) e de P3 para P4 (18,8%). De P4 para P5, o preço médio manteve-se praticamente estável. Considerados os períodos extremos da investigação, P1 e P5, o preço médio cresceu 234,0%.

Durante o período investigado, efetivamente constatou-se o crescimento das importações, em termos absolutos. Registre-se, que não obstante a significativa participação das importações no consumo nacional aparente, que atingiu 91,1% em P3, observou-se movimento declinante dessa participação de P3 até P5, quando chegou a 69,7%.

Ainda que as importações representem parcela expressiva da produção nacional de mídias ópticas graváveis uma única vez, constatou-se redução das importações em relação à produção nacional.

5.2. Dos indicadores de desempenho da indústria doméstica

No que diz respeito à indústria doméstica, verificou-se aumento de participação de suas vendas internas sobre o consumo nacional aparente, de 8,9%, em P3, para 27,5%, em P5. Vale registrar que enquanto as vendas da indústria doméstica cresceram 1.071,5%, de P1 para P5, o consumo cresceu 373,7%.

Foi constatado aumento significativo de capacidade instalada, em mais de 1.000%, principalmente em razão da instalação das linhas de DVD-R, a partir de P3. A produção da indústria doméstica foi também crescente, tendo registrado elevação de 1.131,8%, de P1 para P5. Mesmo com o aumento significativo da capacidade instalada, seu grau de ocupação chegou a 95,1%, em P5.

Verificou-se, também, queda contínua na relação estoques finais e produção, qual seja, os estoques representaram parcela cada vez menor da produção da indústria doméstica.

O número de empregados foi crescente de P1 até P5, tendo a produção por empregado evoluído neste intervalo.

A receita líquida obtida com as vendas de CD-R e DVD-R registrou crescimento de 330,1%. Os preços médios, por outro lado, foram declinantes, passaram de R\$ 1,07/unidade, em P1, para R\$ 0,39/unidade, em P5. Essa queda esteve, em parte, relacionada ao declínio dos custos de produção.

Deve-se registrar que, segundo a petionária, é comportamento natural a queda de preços em produtos de tecnologia, cujo ciclo de vida é reduzido, diante da introdução no mercado de produtos mais modernos.

Comparando-se os preços médios com os custos totais, observou-se que os resultados foram deteriorados de P1 até P4, quando a indústria doméstica registrou prejuízo. De P4 para P5, entretanto, o preço médio voltou a superar o custo de produção.

Essa tendência foi também constatada no que diz respeito à Demonstração de Resultados. A indústria doméstica apresentou margens declinantes de P1 até P4, mas logrou recuperar-se de P4 para P5.

Quanto ao fluxo de caixa, constatou-se crescimento contínuo e significativo do saldo final, o que se deve ao aumento de capital investido nas linhas de CD-R e de DVD-R. A taxa de retorno de investimentos, não obstante a variação de comportamento, também apresentou sinais de recuperação de P4 para P5.

No que tange ao efeito das importações sobre os preços da indústria doméstica, constatou-se subotação, porém, em níveis declinantes de P1 até P5, já que a redução do preço do produto importado foi significativamente inferior à redução do custo e do preço da indústria doméstica.

A luz de todos os elementos analisados, não se pode afirmar que as importações de CD-R e DVD-R ameaçam causar prejuízo grave à indústria doméstica, e que, não ficou demonstrada, nos termos da legislação em vigor, deterioração geral significativa da situação, ao contrário, a maior parte dos indicadores demonstrou evolução positiva, e aqueles que não apresentaram denotaram recuperação.

É importante lembrar que a conclusão alcançada por ocasião da análise pertinente à abertura da investigação considerou que os elementos apresentados pela Videolar denotavam indícios suficientes de ameaça de prejuízo grave, ante ao declínio, particularmente observado, no que diz respeito às margens bruta, operacional, operacional líquida e ao retorno de investimentos. Porém, constatou-se, com as informações trazidas aos autos no curso da investigação, recuperação dos indicadores da indústria doméstica, além do declínio das importações de P4 para P5. Assim, não restou comprovada a existência de ameaça de prejuízo grave.

6. Da relação causal

Considerando não ter sido constatada a existência de ameaça de prejuízo grave à indústria doméstica em decorrência do aumento das importações, não foi realizada análise de nexo de causal.

7. Do potencial exportador

Sobre o potencial exportador, não obstante as alegações da indústria doméstica de que as exportações dos países que já amornaram seus investimentos em mídias ópticas graváveis uma única vez se destinaram ao Brasil, os dados apresentados pela Videolar não corroboraram tal entendimento. Ao contrário, atestaram que a demanda global de CD-R e de DVD-R manteve-se praticamente estável ao longo do período considerado e que a produção global de DVD-R tende a declinar.

8. Do compromisso de ajuste

Considerando não ter sido constatada a existência de ameaça de prejuízo grave à indústria doméstica em decorrência do aumento das importações, não foi realizada análise do plano de ajuste apresentado pela indústria doméstica.

9. Da conclusão

Constatou-se que o crescimento das importações não ameaça causar prejuízo grave à indústria doméstica, razão pela qual propõe-se o encerramento da investigação sem aplicação de medida.

Ministério do Meio Ambiente**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO****DELIBERAÇÃO Nº 247, DE 24 DE SETEMBRO DE 2009**

O MINISTRO DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE, faz saber que o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético-CGEN, no uso das competências que lhe foram conferidas pela Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, e pelo Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, tendo em vista o disposto no art. 13, inciso III, e no art. 14 do seu Regulamento Interno, Anexo publicado por meio da Portaria nº 316, de 25 de junho de 2002, e considerando as informações constantes do Processo nº 02000.000289/2009-39, resolve:

Art. 1º Conceder à Universidade Federal do Mato Grosso-UFMT, CNPJ 33.004.540/0001-00, a Autorização nº 045/2009 para acesso ao conhecimento tradicional associado junto a 37 (trinta e sete) comunidades do Distrito de Nossa Senhora Aparecida do Chumbeo, no município de Poconé, MT, a saber: 1. Barrerinha; 2. Coenambo; 3. Imbé; 4. Campina da Pedra; 5. Rodete; 6. Campina II; 7. Mundo Novo; 8. Furnas I; 9. Furnas II; 10. Salobra; 11. Ze Alves; 12. Canto do Agostinho; 13. Santa Helena; 14. Os Cagados; 15. Varzea Bonita; 16. Chumbo; 17. Figueiras; 18. Bahia do Campo; 19. São Benedito; 20. Agrovila; 21. Sanderia; 22. Misandouro; 23. Varzea; 24. Carreão; 25. Deus Amado; 26. Sangradouro; 27. Resqueiro; 28. Casfara; 29. Urbamba; 30. Ramos; 31. Sete Porcos; 32. Ceu Azul; 33. Passagem de Carro; 34. Capão Verde; 35. Morro Cortado; 36. Varal e 37. Agroana, para a finalidade de pesquisa científica, de acordo com os termos do projeto intitulado "Levantamento etnofarmacológico de plantas medicinais do Distrito de Nossa Senhora Aparecida do Chumbeo, Poconé - MT", sob a coordenação do pesquisador Dr. Domingos Tebejara Oliveira Martins, observado o disposto no art. 16 da Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, no art. 8º do Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, e na Resolução CGEN nº 05, de 28 de junho de 2003.

Art. 2º A Universidade Federal do Mato Grosso e os pesquisadores vinculados ao projeto obrigam-se a incluir nos resultados da pesquisa, em quaisquer meios que esta venha a ser divulgada, a informação da origem do conhecimento tradicional associado e a advertência de que o acesso às informações disponibilizadas nos resultados para as finalidades de bioprospeção e desenvolvimento tecnológico necessitam da obtenção de Anuência Prévia específica e da assinatura de Contrato de Reparação de Benefícios junto às comunidades envolvidas e da autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético.

Art. 3º As informações contidas no Processo nº 02000.000289/2009-39, embora não transcritas aqui, são consideradas partes integrantes deste documento.

Art. 4º Esta Deliberação entra em vigor na data de sua publicação.

CARLOS MINC

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS**RETIFICAÇÃO**

Na Instrução Normativa nº 25, de 1º de setembro de 2009, publicada no DOU nº 168, de 2 de setembro de 2009, seção I, pág. 88, onde se lê "Considerando o Decreto-lei nº 271, de 28 de fevereiro de 1967, que dispõe sobre a proteção e estímulo à pesca e a Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, que dispõe sobre a proibição da pesca de espécies em período de reprodução e das outras providências", Leia-se: "Considerando a Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009, que dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca".

Ao art. 10, acrescente-se: "Parágrafo único Excusam-se desta permissão o piaçu (Leporinus macrocephalus); Acrescente-se, ainda: "Art. 17. Revoga-se a Instrução Normativa nº 194, de 2 de outubro de 2008".

Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão**GABINETE DO MINISTRO****PORTARIA Nº 360, DE 22 DE OUTUBRO DE 2009**

O MINISTRO DE ESTADO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO, no uso de suas atribuições e tendo em vista a competência que lhe foi conferida pelo art. 11 do Decreto nº 6.944, de 21 de agosto de 2009, resolve:

Art. 1º Autorizar a nomeação de trzentos candidatos aprovados no concurso público para o cargo de agente administrativo da Carreira da Previdência, Saúde e Trabalho - CPST, para o Quadro de Pessoal do Ministério do Trabalho e Emprego, autorizado pela Portaria MP nº 238, de 30 de julho de 2008, conforme discriminado no Anexo.

Parágrafo único. A nomeação dos candidatos aprovados deverá ocorrer a partir de novembro de 2009.

Art. 2º O provimento dos cargos no quantitativo previsto no art. 1º está condicionado:

I - à existência de vagas na data da nomeação; e
II - à declaração do respectivo ordenador de despesa, quando do provimento dos referidos cargos, sobre a adequação orçamentária e financeira da nova despesa, à Lei Orçamentária Anual e sua com-