

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Camila Camponogara Dalla Pozza

Tabernaemontana catharinensis APRESENTA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE DERMATITE DE
CONTATO IRRITANTE EM CAMUNDONGOS

Santa Maria, RS
2017

Camila Camponogara Dalla Pozza

***Tabernaemontana catharinensis* APRESENTA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA
TÓPICA EM MODELOS DE DERMATITE DE CONTATO IRRITANTE EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS
2017

Camila Camponogara Dalla Pozza

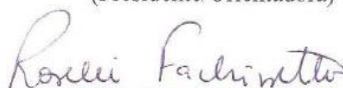
Tabernaemontana catharinensis APRESENTA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA
TÓPICA EM MODELOS DE DERMATITE DE CONTATO IRRITANTE EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do título de **Mestre em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 2 de fevereiro de 2017:



Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)



Maria Fernanda de Paula Werner, Dra. (UFPR)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que iluminou e guiou os meus caminhos, sempre para que o melhor acontecesse.

À minha orientadora Sara Marchesan de Oliveira primeiramente pela oportunidade de participar dos estudos do LabNeuro durante minha graduação e, agora no mestrado. Por estar sempre disponível para sanar quaisquer dúvidas, pela excelente orientação e pelo exemplo de profissional e pessoa que demonstra para todas suas alunas.

À minha família, por ser minha base, meu alicerce não somente nos momentos de glória, mas também nos de dificuldades. À minha mãe, Rejane do Carmo Bevilacqua Camponogara, minha guerreira, meu exemplo de caráter e de mãe, agradeço por sempre ter acreditado e apoiado os meus sonhos, e por não me fazer desistir nos primeiros obstáculos encontrados. Ao meu irmão, Daniel Camponogara Dalla Pozza, pela ajuda, paciência, amor e carinho em todos os momentos. À minha vó, Ladir Maria Bevilacqua Camponogara, por ser também meu alicerce, pelas palavras amigas e confortantes, pela ajuda e dedicação durante minha trajetória.

A todos meus colegas e amigos do LabNeuro obrigada pela ótima convivência e pelos bons momentos passados juntos. Em especial, ao meu grupo de pesquisa, Indiara, Natháli, Evelyne, Susana, Maria Fernanda e Gabriela pela amizade, parceria e espírito de união.

Agradeço, ainda, à Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica e aos órgãos de fomento pela oportunidade.

E por fim, agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram não somente para a realização deste trabalho, mas também para meu crescimento profissional e pessoal. Muito Obrigada!!

RESUMO

***Tabernaemontana catharinensis* APRESENTA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA EM MODELOS DE DERMATITE DE CONTATO IRRITANTE EM CAMUNDONGOS**

AUTORA: Camila Camponogara Dalla Pozza
ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

Tabernaemontana catharinensis A. DC (família Apocynaceae) é popularmente conhecida como cobrina e utilizada na forma de infusão das folhas como anti-inflamatório, antídoto para mordeduras de cobras, contra picadas de insetos, entre outras aplicações. Estes efeitos são decorrentes de uma diversidade de constituintes químicos já identificados nas diversas partes da planta. Entretanto, nenhum estudo foi realizado a fim de comprovar sua atividade anti-inflamatória tópica em doenças inflamatórias cutâneas. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (Processo número 23081.018655/2014-91 e 5199270616/2016). Para avaliar estes efeitos, foram realizados modelos agudos de dermatite de contato irritante (DCI) induzido por cinamaldeído (4 µg/orelha), capsaicina (200 µg/orelha), ácido araquidônico (2000 µg/orelha), fenol (10% v/v/orelha) e óleo de cróton (1000 µg/orelha) e, um modelo crônico induzido pela aplicação tópica repetida de óleo de cróton utilizando camundongos Swiss machos (25-30g). Avaliamos: 1) o efeito tópico do extrato bruto das folhas (0,0001-10 µg/orelha) de *T. catharinensis* (EBTc) no modelo agudo de DCI induzido por diferentes agentes irritantes; 2) o efeito tópico das frações isoladas (diclorometano, n-butanol e acetato de etila) do EBTc (0,0001-10 µg/orelha) e formulações em gel do EBTc (0,001-3%; 0,15 g/orelha) em um modelo agudo de DCI induzido por óleo de cróton; 3) o efeito do tratamento repetido com o EBTc (10 µg/orelha) em um modelo crônico de DCI induzido por óleo de cróton. Estes efeitos foram avaliados sobre parâmetros inflamatórios como edema de orelha e infiltração de células polimorfonucleares. Além disso, avaliamos o efeito tópico do EBTc sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias (MIP-2, IL-1β e TNF-α), o envolvimento da via de transcrição do NF-κB e do receptor de glicocorticoide no seu efeito anti-inflamatório, bem como o desenvolvimento de toxicidade pelo tratamento tópico repetido (14 dias) do EBTc. O EBTc inibiu o edema de orelha agudo induzido por cinamaldeído, capsaicina, ácido araquidônico, fenol e óleo de cróton com dose inibitória 50% (DI₅₀) de 0,061 (0,02-0,2); 0,37 (0,21-0,67); 0,002 (0,0008-0,003); 0,0009 (0,0005-0,002) e 0,006 (0,003-0,013) µg/orelha, respectivamente, e uma inibição máxima (I_{máx}) de 100% (10 µg/orelha) no modelo de DCI induzido por cinamaldeído, ácido araquidônico, fenol e óleo de cróton e 75±6% (10 µg/orelha) na DCI induzida por capsaicina. EBTc (0,0001-10 µg/orelha) reduziu significativamente a infiltração de células polimorfonucleares (verificados através da atividade da mieloperoxidase-MPO e análise histológica), bem com os níveis de citocinas pró-inflamatórias (MIP-2, IL-1β e TNF-α) induzidos por todos os agentes irritantes avaliados. As frações diclorometano, n-butanol e acetato de etila reduziram o edema de orelha com uma DI₅₀ de 0,061 (0,03-0,136); 0,002 (0,0006-0,005) e 0,001 (0,0004-0,004) µg/orelha e uma I_{máx} de 85±4%, 83±6% e 86±6% (10 µg/orelha), respectivamente, enquanto a formulação em gel de EBTc reduziu o edema de orelha em 96±3% (3%; 0,15 g/orelha). Ainda, todos esses tratamentos reduziram a infiltração de células polimorfonucleares. A aplicação repetida de EBTc (10 µg/orelha) também reduziu o edema de orelha induzido pela administração repetida de óleo de cróton a partir do 1º dia de tratamento, com I_{máx} de 66±6% (9º dia de experimento), assim como a infiltração de células polimorfonucleares. O tratamento tópico com EBTc reduziu todos os parâmetros inflamatórios avaliados por um mecanismo dependente do receptor de glicocorticoide, mas independente da via de transcrição NF-κB, sem causar efeitos adversos, uma vez que o tratamento repetido com EBTc não alterou parâmetros comportamentais e bioquímicos avaliados. Nosso estudo sugere que formulações contendo *T. catharinensis* podem ser eficazes como um anti-inflamatório tópico para o tratamento da DCI.

Palavras-chave: Edema de orelha. Cobrina. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

***Tabernaemontana catharinensis* PRESENTS TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY ON IRRITANT CONTACT DERMATITIS MODELS IN MICE**

AUTHOR: Camila Camponogara Dalla Pozza

ADVISER: Sara Marchesan de Oliveira

Tabernaemontana catharinensis A. DC (Apocynaceae family) is popularly known as cobrina and used on leaf infusions form as an anti-inflammatory, antidote to snake bites, against insect bites, among other applications. These effects are due to a diversity of chemical constituents already identified in several parts of the plant. However, no study was performed to confirm its topical anti-inflammatory activity in inflammatory skin diseases. All procedures were approved by Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process number 23081.018655/2014-91 and 5199270616/2016). To evaluate this effect, were performed acute irritant contact dermatitis (ICD) models induced by cinnamadehyde (4 µg/ear), capsaicin (200 µg/ear), arachidonic acid (200 µg/ear), phenol (10% v/v/ear) and croton oil (1000 µg/ear) and a chronic ICD model induced by croton oil repeated applications using male Swiss mice (25-30g). We assessed: 1) The topical effect of *T. catharinensis* leaves crude extract (CETc) (0.0001-10 µg/ear) on acute ICD models induced by different irritant agents; 2) The topical effect of CETc isolated fractions (dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate) (0.0001-10 µg/ear) and CETc gel formulations (0.001-3%; 0.15g/ear) in an acute ICD model induced by croton oil; 3) The topical effect of CETc repeated treatment (10 µg/ear) in a chronic ICD model croton oil-induced. These effects were evaluated through inflammatory parameters as ear edema and polymorphonuclear cells infiltration. Moreover, we assessed the CETc topical effect on pro-inflammatory cytokines (MIP-2, IL-1β and TNF-α), the NF-κB transcription pathway and glucocorticoid receptor involvement on its anti-inflammatory effect, as well as the toxicity development by CETc repeated (14 days) topical treatment. The CETc inhibited the acute ear edema induced by cinnamaldehyde, capsaicin, arachidonic acid, phenol and croton oil with an inhibitory dose 50% (ID₅₀) of 0.061 (0.02-0.2); 0.37 (0.21-0.67); 0.002 (0.0008-0.003); 0.0009 (0.0005-0.002) and 0.006 (0.003-0.013) µg/ear, respectively, and a maximum inhibition (I_{máx}) of 100% (10 µg/ear) in the ICD model induced by cinnamaldehyde, arachidonic acid, phenol and croton oil and 75±6% (10 µg/ear) in the ICD induced by capsaicin. CETc (0.0001-10 µg/ear) significantly reduced the polymorphonuclear cells infiltration (verified by myeloperoxidase - MPO activity and histological analysis), as well as pro-inflammatory cytokines levels (MIP-2, IL-1β and TNF-α) induced by all irritant agents evaluated. The dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate fractions decreased the ear edema with an ID₅₀ of 0.061 (0.03-0.136); 0.002 (0.0006-0.005) and 0.001 (0.0004-0.004) µg/ear and an I_{máx} of 85±4%, 83±6% e 86±6% (10 µg/ear), respectively, while the CETc gel formulation reduced the ear edema in 96±3% (3%; 0.15 g/ear). Furthermore, all these treatments decreased the polymorphonuclear cells infiltration. The CETc (10 µg/ear) repeated application also reduced the ear edema induced by croton oil multiple administration from 1st day of treatment, with an I_{máx} de 66±6% (9th day of experiment) even as the polymorphonuclear cells infiltration. The CETc topical treatment reduced all inflammatory parameters evaluated by glucocorticoid receptor-dependent mechanism, but NF-κB transcription pathway-independent, without causing adverse effects, since the CETc repeated treatment did not alter behavioral and biochemical parameters evaluated. Our study suggests that formulations containing *T. catharinensis* can be effective as a topical anti-inflammatory to treating of ICD.

Keywords: Ear edema. Cobrina. Anti-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não Esteroidal
AMP	Petídeo Antimicrobiano
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Proteína Ativadora-1
CD	Célula Dendrítica
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CL	Célula de Langerhans
COX	Ciclo-oxigenase
DCA	Dermatite de Contato Alérgica
DCI	Dermatite de Contato Irritante
DETC	Célula T Epidermal Dendrítica
EC	Estrato Córneo
ERG	Elemento de Reposta ao Glicocorticoide
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FATE	Fator de Ativação de Timócitos Derivados da Epiderme
g	Gramas
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GR	Receptor de Glicocorticoide
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon-Gama
JAM	Molécula de Adesão Juncional
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
MIP-2	Proteína Inflamatória de Macrófago
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NK1	Neurocinina 1
PG	Prostaglandina
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
RESINUS	Relação das Espécies Vegetais de Interesse do SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
TFG-β	Fator de Transformação de Crescimento
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
T_{reg}	Célula T Reguladora
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular-1
μg	Micro grama
μL	Micro litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 PELE: FUNÇÃO E ESTRUTURA.....	14
3.1.1 Queratinócitos.....	17
3.1.2 Células dendríticas.....	18
3.1.3 Macrófagos.....	20
3.1.4 Mastócitos.....	21
3.1.5 Células T residentes.....	21
3.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	22
3.3 DERMATITE DE CONTATO.....	26
3.3.1 Dermatite de Contato Irritante (DCI).....	27
3.4 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA.....	33
3.4. <i>Tabernaemontana catharinensis</i>	38
4 MANUSCRITO CIENTÍFICO	41
5 CONCLUSÃO	95
6 PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXO A	112
ANEXO B	113

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, estando exposta a diversos perigos presentes no ambiente, tais como substâncias com potencial irritante e/ou alérgenos, micro-organismos, além de injúrias físicas, requerendo, dessa forma, realizar inúmeras funções a fim de restaurar a homeostasia (DI MEGLIO et al., 2011). A pele serve como uma barreira física e bioquímica ativa, atuando como uma área sensorial, auxiliando no controle e manutenção da temperatura corporal, reduzindo a perda de água transepidermal e exercendo a primeira linha de defesa imunológica contra infecções a qual protege tecidos mais profundos do corpo, uma vez que mantém um sistema bem coordenado entre células epiteliais e imunes (DI MEGLIO et al., 2011; PASPARAKIS et al., 2014).

A habilidade da pele em realizar suas diversas funções está intimamente relacionada à sua estrutura, a qual está subdividida em três componentes: a epiderme, a derme e a hipoderme. O tecido epidérmico é formado por melanócitos, queratinócitos, células de Merkel (função sensorial) e células imunes, como células de Langerhans e linfócitos T e pelo estrato córneo (EC) que é a camada mais externa da pele (DI MEGLIO et al., 2011). O EC é rico em queratina e células mortas, que servem como uma barreira física contra a entrada de substâncias químicas e micro-organismos, além de evitar a perda de água transepidermal, o que permite a manutenção da hidratação da pele (PROKSCH et al., 2008; CLARK, 2010). As camadas subjacentes (células nucleadas) ao EC também colaboram na função de barreira física, sendo que os queratinócitos requerem atenção especial, uma vez que eles estabelecem a comunicação entre os sinais provenientes do ambiente com as células imunitárias da pele, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL (interleucina)-1 α , IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α . Nessa perspectiva, muitas cascatas de sinalização pró-inflamatórias são ativadas na epiderme de indivíduos com doença inflamatória de pele, sugerindo que a presença e a atividade dos queratinócitos têm um papel chave na regulação da homeostase imune e iniciação da inflamação da pele (PASPARAKIS et al., 2014).

A camada dérmica é rica em matriz extracelular, contendo fibras, como colágeno e elastina e células como fibroblastos, linfócitos T, células dérmicas, células Natural Killer, mastócitos e macrófagos, além da presença de vasos sanguíneos e linfáticos. Ainda, a epiderme e a derme estão fixadas a uma camada composta por tecido adiposo (hipoderme) a qual colabora nos processos de termorregulação corporal (JENKINS et al., 2011; ST JOHN et al., 2011; SENESCHAL et al., 2012; DI MEGLIO et al., 2011). A manutenção da homeostase imune depende de um equilíbrio afinado e interações bem-reguladas entre os diferentes tipos

celulares dos compartimentos da pele e, um desequilíbrio pode contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias de pele. Além disso, anormalidades imunológicas também podem causar alterações e perda da integridade da barreira funcional da pele, sendo bastante característicos como eventos primários de diversas doenças inflamatórias de pele, tais como psoríase, dermatite de contato alérgica (DCA) e dermatite de contato irritante (DCI) (FEINGOLD et al., 2007; PROKSCH et al., 2008; YEOM et al., 2012; HORINOUCI et al., 2013).

A DCI é considerada a doença inflamatória de pele mais comum desencadeada pela ativação da imunidade inata resultante do contato direto da pele com substâncias irritantes sem qualquer processo anterior de sensibilização. Ao contrário, a DCA necessita primeiramente de uma sensibilização ao contato de irritantes para o posterior desenvolvimento das lesões inflamatórias de pele (KARLBERG et al., 2008; LANDECK et al., 2012; LEE et al., 2013). A DCI é uma reação complexa modulada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos, cabe ressaltar a idade, o sexo e a região do corpo acometida, bem como a predisposição genética, na qual está relacionada a mutações em genes que codificam estruturas importantes da pele e/ou citocinas que regulam os processos imunes e inflamatórios de pele, resultando em uma variável suscetibilidade a DCI (LANDECK et al., 2012; LEE et al., 2013).

A formação de eritema, descamação e endurecimento da pele, sinais resultantes do contato com agentes irritantes, pode estar associado à presença de polimorfismos na posição-308 do gene de TNF- α , gerando uma mudança na região promotora que regula a produção dessa citocina. Indivíduos com essa transição apresentam uma maior resposta neurosensorial (na face e mãos, principalmente) a substâncias comuns como ácido lático e água, quando comparado a indivíduos normais (DAVIS et al., 2010). Além disso, pacientes com dermatite atópica tem aproximadamente quatro a cinco vezes maior risco a desenvolver DCI. A dermatite atópica é caracterizada pela função de barreira cutânea comprometida, níveis de ceramidas (lipídios de membrana) reduzidos e aumento da permeabilidade de barreira, mesmo sem a exposição de agentes danosos a pele. Um dos possíveis fatores, presentes em cerca de 20 a 30% dos pacientes com dermatite atópica, seria a redução dos níveis da proteína epidermal filagrina, causada por mutações (com perdas funcionais) no gene dessa proteína (DAVIS et al., 2010; VISSER et al., 2013).

A filagrina é uma importante proteína para a estrutura, função e hidratação do estrato córneo, sendo a principal contribuinte para formação da barreira cutânea. Níveis reduzidos de filagrina podem levar ao aumento da penetração de agentes irritantes e/ou alérgenos através

da pele. Entretanto, a excessiva exposição ambiental a irritantes e/ou alérgenos, não só no local de trabalho, mas também em ambiente domiciliar, pode até mesmo ocultar o papel da suscetibilidade genética em estudos epidemiológicos. Dessa forma, a exposição a fatores de risco (exógenos) permanecem como o principal fator causador da DCI, e fatores intrínsecos como mutações nos genes da filagrina e TNF- α apenas modificam o risco a desenvolver a DCI (VISSER et al., 2013). Por outro lado, os fatores extrínsecos incluem as características inerentes a cada irritante, o volume de exposição, a concentração e a duração da exposição ao irritante (LEE et al., 2013).

Devido sua característica multifatorial, a DCI é desencadeada, primeiramente, pela perda da integridade da barreira funcional da pele, através do contato dos agentes irritantes com a pele (EBERTING, 2014; PINTO et al., 2015). Quando em contato com a pele, os agentes irritantes ocasionam dano às membranas celulares dos queratinócitos, com consequente liberação de mediadores pró-inflamatórios. Por conseguinte, haverá o desenvolvimento e amplificação dos sinais inflamatórios, tais como a formação de eritema, edema, hiperproliferação epidermal e infiltrados de células inflamatórias, consistindo principalmente em monócitos e neutrófilos, sendo esse o tipo de leucócito mais predominante nas lesões da pele e que desempenha um importante papel na inflamação cutânea (HAUGE et al., 2012; LEE et al., 2013; YEOM et al., 2012; PIANA et al., 2016).

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa contra agentes agressores, infiltrando o tecido lesado através da quimiotaxia induzida por citocinas pró-inflamatórias liberadas após a agressão tecidual (Singer et al., 2004; KOBAYASHI, 2008; ENDO et al., 2016). Quando presentes no tecido danificado, os neutrófilos promovem a fagocitose de microorganismos invasores, além de executar um sistema conhecido como explosão respiratória, o qual é dependente de espécies reativas de oxigênio. Esse processo sob ação subsequente da NADPH oxidase, óxido nítrico sintase e da superóxido dismutase, culminará na geração de substratos (peróxido de hidrogênio) para a enzima mieloperoxidase (MPO). A MPO, por sua vez, é encontrada em grânulos azurófilos dos neutrófilos e produz um forte oxidante, a partir de peróxido de hidrogênio e íons cloreto, o ácido hipocloroso, um potente microbiocida, e um importante indicador de infiltração de neutrófilos no tecido (HAMPTON et al., 1998; KLEBANOFF et al., 2013; ENDO et al., 2016).

A produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, tanto pelas células inflamatórias quanto pelos queratinócitos, é um dos maiores mecanismos para o surgimento das reações inflamatórias de pele. Nesse sentido, vale ressaltar que algumas citocinas pró-inflamatórias como, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 são de especial interesse na DCI

podendo ser produzidas através da ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, o Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), e/ou proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), além de serem superexpressas em lesões inflamatórias características da doença. Em decorrência dos processos inflamatórios instalados na pele haverá, portanto, o desenvolvimento dos sinais clínicos da doença tais como, prurido, pele seca e escamosa, e formação de lesões eritemato-papulosas (PASPARAKIS, 2012; YEOM et al., 2012; LEE et al., 2013).

Vários agentes terapêuticos, incluindo anti-inflamatórios esteroidais como os glicocorticoides tópicos e anti-inflamatórios não esteroidais, estão disponíveis para suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios, como um tratamento contra a iniciação e progressão das dermatites de contato. Entretanto, o uso prolongado desses agentes terapêuticos carece em termos de efetividade e, ainda, ocasionam o desenvolvimento de efeitos adversos, além de efeito rebote (glicocorticoides), esse cerca de 4-10 dias após o término abrupto do tratamento, manifestado através de características clínicas como prurido intenso, secura e sensação de queimação (SCHACKE et al., 2009; ROTH, 2012; YEOM et al., 2012; UNZUETA; VARGAS, 2013; XIAO et al., 2015). Nessa perspectiva, a pesquisa por terapias farmacológicas mais efetivas e seguras torna-se necessária, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos com a doença.

Uma interessante e promissora alternativa é uso de produtos naturais, uma vez que uma ampla variedade desses já vem sendo comprovados para o tratamento de doenças de pele (HORINOUCI et al., 2013; XU et al., 2014; PINTO et al., 2015; PIANA et al., 2016). A biodiversidade brasileira juntamente com o interesse e conhecimento científico crescente na área de plantas medicinais pode criar condições que permitam investir na busca de potenciais fármacos de origem vegetal bem como o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que permitiria a comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; KINGSTON, 2011).

Tabernaemontana catharinensis A. DC (Apocynaceae) é uma planta comumente encontrada na Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e na região sul do Brasil, sendo popularmente conhecida como “cobrina”, “jasmim” ou “leiteira-dois-irmãos”. A infusão das folhas dessa espécie é utilizada popularmente para tratar picadas de insetos, aliviar a dor de dente, como antídoto para mordedura de cobras, como anti-inflamatório e como vermífugo (BOLIGON; ATHAYDE, 2012; BOLIGON et al., 2015). Vários constituintes fitoquímicos (alcaloides indólicos, triterpenóides, ácido fenólicos, flavonoides, taninos, esteroides e saponinas), presentes nos extratos (etanólico ou aquoso), frações (acetato de etila, n-butanol,

diclorometano e clorofórmica) e no óleo essencial da espécie, já foram identificados em diferentes partes da planta, como as cascas do caule, raiz, folhas, frutos e ramos (PEREIRA et al., 2008; GOMES et al., 2009; BOLIGON; ATHAYDE, 2012; BOLIGON et al. 2013; PIANA et al., 2014; BOLIGON et al., 2015; BRUM et al., 2016). Estudos farmacológicos com extrato bruto, frações, óleos essenciais e compostos isolados obtidos de diferentes partes da planta sugerem que esta apresenta diferentes atividades biológicas, como ação antioxidante, como antídoto ao veneno de cobra, antibacteriana, antiviral, antitumoral e analgésica (VERONESE et al., 2005; GOMES et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011; BOLIGON et al., 2013; PIANA et al., 2014; BOLIGON et al., 2015).

Dentre os alcaloides indólicos majoritários de *T. catharinensis*, encontrados em extratos das folhas e ramos, destacam-se a voacangina e coronaridina, os quais estudos indicam que esses compostos fitoquímicos são os principais responsáveis pelos efeitos farmacológicos de *T. catharinensis* (PEREIRA et al., 2005; VERONESE et al., 2005; SOARES et al., 2007; PEREIRA 2008; GOMES et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011; BOLIGON et al., 2015). Além disso, a presença de flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides na espécie também contribuem para os seus efeitos biológicos, especialmente atuando como anti-inflamatório, antioxidante e analgésico (GOMES et al., 2009; RATHEE et al., 2009; SILVA et al., 2011; CHIBLI et al., 2014; BOLIGON et al., 2015, BRUM et al., 2016; FURTADO et al., 2016).

Embora a *T. catharinensis* seja utilizada popularmente no tratamento de problemas e lesões de pele, até o momento, não existem estudos que comprovem, cientificamente, sua efetividade como agente anti-inflamatório tópico no tratamento da dermatite de contato irritante. Desta forma, a avaliação do efeito anti-inflamatório tópico das folhas de *T. catharinensis* terá por finalidade justificar o uso popular dessa espécie por via tópica no tratamento de processos inflamatórios cutâneos, e demonstrar o potencial do extrato bruto desta planta como uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, como a dermatite de contato irritante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial anti-inflamatório tópico das folhas de *T. catharinensis* em modelos de dermatite de contato irritante em camundongos, bem como os possíveis alvos farmacológicos envolvidos na atividade anti-inflamatória tópica dessa planta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a estabilidade química e física de géis contendo *T. catharinensis*;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório tópico de *T. catharinensis* em modelos agudos de inflamação de pele;
- Verificar o potencial anti-inflamatório tópico de *T. catharinensis* em um modelo crônico de inflamação de pele;
- Investigar o potencial anti-inflamatório tópico de *T. catharinensis* sobre parâmetros inflamatórios de infiltração leucocitária e níveis de citocinas pró-inflamatórias;
- Verificar o possível envolvimento da via de transcrição NF- κ B e do receptor de glicocorticoide na atividade anti-inflamatória tópica de *T. catharinensis*;
- Verificar o possível desenvolvimento de toxicidade após o tratamento tópico repetido de *T. catharinensis* através de parâmetros bioquímicos e comportamentais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PELE: FUNÇÃO E ESTRUTURA

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, constitui a interface entre corpo e o meio ambiente, estando constantemente exposta a diversos riscos, tais como, patógenos, traumas mecânicos e substâncias diversas (solventes e detergentes) com potencial irritante e/ou alérgenos. Por ser a interface entre corpo e o meio ambiente, a pele realiza inúmeras tarefas a fim de manter a homeostasia do órgão e garantir a integridade do corpo humano (PASPARAKIS et al., 2014). Dentre suas funções, a pele atua como a primeira linha de defesa contra agentes agressores, desde que se apresente de uma forma íntegra, ela torna-se uma barreira física e química efetiva, a qual evita a penetração percutânea de microorganismos, toxinas, substâncias químicas e radiação solar e ionizante, bem como a perda de água transepidermal, o que garante uma adequada hidratação da pele. Além disso, a pele fornece uma área sensorial-receptiva, atua na termorregulação corporal e promove a síntese de vitaminas e hormônios (BANGERT et al., 2011; DI MEGLIO et al., 2011).

A multiplicidade de funções realizadas pela pele na sua forma intacta está intimamente relacionada a sua estrutura juntamente a um sistema bem coordenado entre as células epiteliais e imunes presentes nos diferentes compartimentos da pele. A pele é composta por dois principais compartimentos, a epiderme e a derme, ancoradas por uma camada subcutânea de tecido adiposo. A epiderme e a derme são preenchidas por uma variedade de tipos celulares, que em conjunto, atuam majoritariamente na proteção e defesa do órgão, embora a evidência de recentes estudos que apontam que a flora microbiana normal da pele (bactéria, fungos, vírus e parasitas) também possa colaborar na defesa contra infecções cutâneas e na cicatrização de feridas (HEATH; CARBONE, 2013).

A camada epidérmica pode ser subdividida em epiderme folicular e epiderme interfolicular. As diferenças funcionais entre esses compartimentos epiteliais no que diz respeito a imunidade da pele ainda não está totalmente compreendida. Entretanto, existe diferenças específicas quanto ao tipo de células imunes encontradas nestes dois compartimentos bem como diferenças relativas as espécies (roedores e humanos). Dessa forma, é importante atentar-se a estas diferenças ao interpretar os processos inflamatórios/imunes de pele de roedores em relação aos mecanismos que conduzem as patologias cutâneas em humanos (DI MEGLIO et al., 2011; MALISSEN et al., 2014).

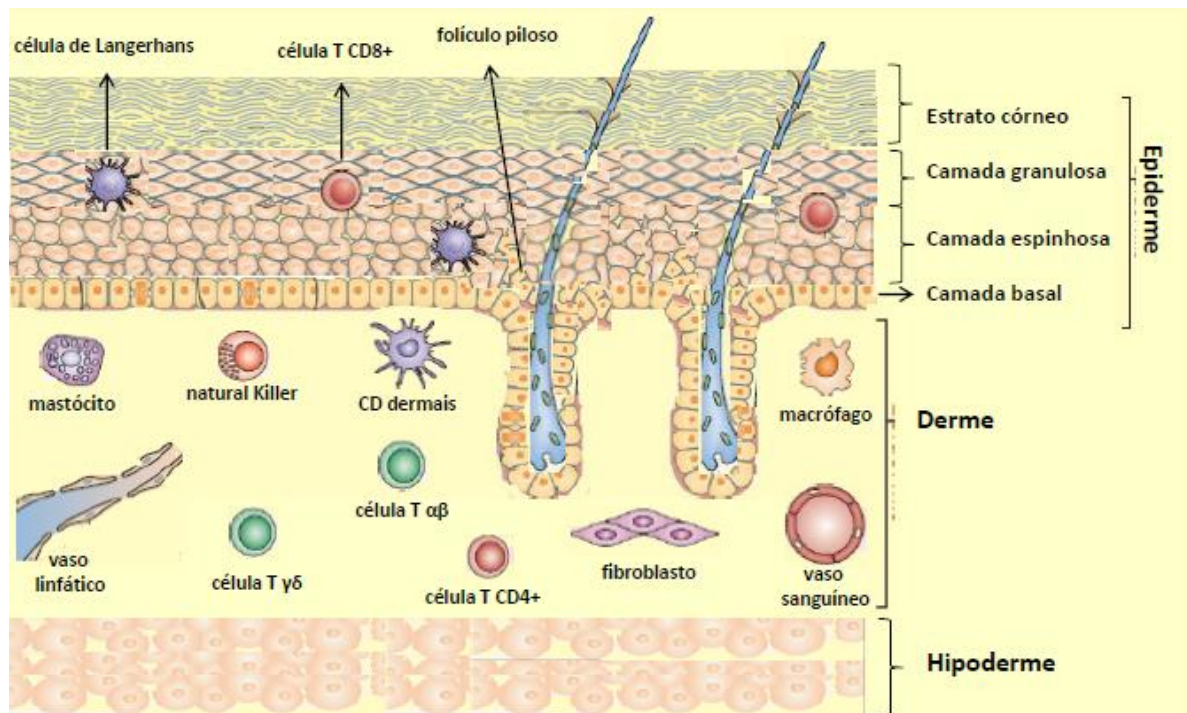
Em contraste aos roedores, os humanos apresentam uma maior proporção de epiderme interfolicular, a qual é composta pela camada basal, espinhosa, granulosa e camada córnea. Na camada inferior encontra-se a camada basal, responsável pela constante renovação das células da epiderme, a qual é composta por uma única linha de células epidérmicas indiferenciadas, denominadas queratinócitos basais. Estas células se dividem com frequência e passam para a próxima camada, a camada espinhosa, iniciando um processo de maturação. Nesta camada, as células mudam sua forma (de colunar a poligonal) e iniciam a síntese de queratina. A camada seguinte, a granulosa, é composta principalmente pelos queratinócitos, consideradas as principais e mais abundantes células da pele. A camada mais externa, denominada de camada córnea, é resultante da última etapa de diferenciação dos queratinócitos, sendo compostas por células anucleadas e desprovidas de organelas, os corneócitos (NESTLE et al., 2009; HEATH; CARBONE, 2013).

Os corneócitos (camada córnea) são ligados entre si pelos corneodesmosomos e carregados com filamentos de queratina, rodeados por um envelope lipídico e protéico (filagrina e involucrina). A filagrina agrega os filamentos de queratina em feixes apertados, estabilizando a camada córnea. Juntas, elas constituem cerca de 80-90% da massa protéica da epiderme. A importância da filagrina e involucrina na homeostasia da barreira epidermal é indicada em modelos de doenças cutâneas em roedores e humanos, e sua deficiência está relacionada com defeitos na barreira cutânea e ao desenvolvimento de dermatites e psoríase (PROKSCH et al., 2008; LIN et al., 2015). A camada córnea juntamente com as junções intercelulares da camada granulosa forma uma efetiva e protetora barreira cutânea. O rompimento desta barreira por mudanças na composição lipídica/protéica e diferenciação epidermal, pelo contato com substâncias irritantes e/ou alérgenos, ou anormalidades na interação entre as células (imunes e não imunes) da pele contribuem no desenvolvimento de infecções e de patologias cutâneas de cunho inflamatório e/ou imune (NESTLE et al., 2009; YEOM et al., 2012; DAINICHI et al., 2014).

Como mencionado acima, a epiderme é composta por diversos tipos celulares, entre eles os queratinócitos que são as células epidérmicas mais abundantes. Além dos queratinócitos, também estão presentes nesta camada os melanócitos, as células de Merkel (função sensorial) e uma variedade de células imunes, como as células de Langerhans (células dendríticas epidermais- CD), células T $\alpha\beta$, células T $\gamma\delta$ (células T epidermais dendríticas, DETCs); encontradas em maior proporção em roedores do que em humanos) e células T CD8⁺ (encontradas na camada basal e espinhosa) (NESTLE et al., 2009; DI MEGLIO et al., 2011; MACLEOD; HAVRAN, 2012; PASPARAKIS et al., 2014).

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, que embora não se apresente em camadas celulares como na epiderme, estruturalmente é o compartimento mais complexo da pele, uma vez que possui uma maior diversidade celular. Em contraste a roedores, a camada dérmica humana é mais espessa. Esta camada é rica em matriz extracelular, composta por fibras de colágeno e elastina as quais são em grande parte produzidas pelos fibroblastos ali presentes. Essa matriz, tanto em humanos quanto em roedores, é intercalada com uma série de estruturas como vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e uma diversificada rede celular, constituída por macrófagos, mastócitos, células dendríticas dermais, células T CD4⁺, células linfoides inatas e células natural killer. Na pele humana, a derme dispõe-se através de invaginações sobre a epiderme, ao contrário da pele de roedores, na qual a junção epiderme-derme é plana, exceto quando os folículos pilosos interceptam a epiderme (HEATH; CARBONE, 2013). Os folículos pilosos que são estruturas contínuas da epiderme (epiderme intrafolicular) penetram profundamente a derme. A epiderme circundante ao folículo é constituída principalmente por queratinócitos, mas também por células de Langerhans. A pele de roedores apresenta um número maior de folículos comparada a de humanos. Dessa forma, a proporção de epitélio interfolicular é muito maior em pele de roedores do que em humanos. A principal função dos folículos pilosos é a produção de fios de cabelo, mas também contribuí para termorregulação corporal, atividade sensorial da pele, camuflagem e dispersão do suor, sebo e feromônios. Além disso, sua importância relativa na imunidade da pele ainda não está completamente elucidada. Entretanto, evidências recentes mostram que diferentes regiões dos folículos pilosos podem expressar uma variedade de quimiocinas, influenciando no tráfego de células imunes e controlando o acúmulo perifolicular de macrófagos, células dendríticas dermais e mastócitos (SCHNEIDER; ULLRICH, 2009; NAGAO et al., 2012; MALISSEN et al., 2014; PASPARAKIS et al., 2014).

Figura 1 – Estrutura e componentes celulares da pele de humanos.



Fonte: Adaptado de Nestle et al., 2009; Pasparakis et al., 2014.

3.1.1 Queratinócitos

Os queratinócitos compreendem cerca de 80% do total de células epidérmicas e estabelecem a interface entre os sinais vindos do meio ambiente com as células residentes do sistema imune inato da pele, tais como CD, mastócitos e macrófagos. O envolvimento destas células no sistema imune da pele foi primeiramente evidenciado através da descrição de uma citocina derivada dos queratinócitos, o fator de ativação de timócitos derivados da epiderme (FATE). Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que a comunicação dos queratinócitos com as células imunes residentes da pele ocorre através da produção de uma variedade de citocinas/fatores envolvidos em processos inflamatório/imunes, incluindo IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, fator estimulador de colônias de macrófago-granulócitos (GM-CSF) e TNF- α , bem como pela expressão de receptores para diversas citocinas/quimiocinas (SAUDER et al., 1982; LISBY; BAADSGAARD, 2010; PASPARAKIS et al., 2014).

Além disso, em superfícies epiteliais danificadas, os queratinócitos são uma fonte importante de peptídeos antimicrobianos (AMPs), como β -defensinas e catelicidinas. Os AMPs têm a função de proteger o organismo contra a entrada de agentes patogênicos, promovem o recrutamento de células imunes e modulam a produção de citocinas derivadas de

células T. O importante papel dos AMPs na defesa cutânea é evidenciado nas dermatites e psoríase, onde encontram-se altos níveis de β -defensinas e catelicidinas na pele de pacientes acometidos por essas patologias, visto por uma maior susceptibilidade a infecções virais e bacterianas (LAI; GALLO, 2009; DI MEGLIO et al., 2011).

Muitas cascatas de sinalização pró-inflamatórias podem ser ativadas na epiderme pelos queratinócitos, culminando com o aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), moléculas de adesão celular, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e AMPs. A expressão dessas moléculas juntamente com produção e liberação de citocinas/fatores quimiotáticos, demonstram o papel chave dos queratinócitos na regulação da homeostasia imune, bem como na iniciação e manutenção dos processos inflamatórios de pele (LISBY; BAADSGAARD, 2010; BANGERT et al., 2011).

3.1.2. Células Dendríticas

As células dendríticas da pele são classificadas de acordo com sua localização pelos compartimentos da pele. As células Langerhans são as principais CD situadas na epiderme, enquanto as células dendríticas dermais residem na derme, logo abaixo da junção epiderme-derme, estendendo-se por toda a camada (NESTLE et al., 2009).

3.1.2.1 Células de Langerhans (CL)

As CL compreendem cerca de 2-5 % da população total de células epidérmicas. Estas células estão localizadas constitutivamente na região suprabasal da epiderme, regularmente espaçadas pelos queratinócitos, sendo capazes de projetar seus dendritos até a camada córnea sem violar a integridade desta (HEATH; CARBONE, 2013; KUO et al., 2013). As CL comunicam-se com os queratinócitos através de interações que envolvem a molécula de adesão E-caderina (caderina 1). Estas células podem separar-se dos queratinócitos através de sua capacidade em reduzir a expressão da E-caderina. Dessa forma, estas células mudam de um estado sésil a um estado móvel, o que as permite atravessar a membrana basal e atingir a derme, penetrar nos vasos linfáticos dérmicos e chegar aos nódulos linfáticos (KONRADI et al., 2014; Hieronymus et al., 2015).

Atrelado a esse mecanismo, está a capacidade bem reconhecida das CL como apresentadoras de antígenos, uma vez que essas estão entre as primeiras CD ao entrar em contato com antígenos lipídicos e fragmentos microbianos para apresentação às células T

efetoras. Além disso, são reportadas as funções das CL na ativação de células T residentes da pele (células T CD8⁺), embora os mecanismos de interação entre essas células ainda não estão totalmente elucidados, e também na diferenciação de células T CD4⁺ em células Th2. As CL também são reportadas pela sua atividade imunossupressora, tanto pela indução da depleção de células T efetoras quanto pela ativação das células T reguladoras (T_{reg}), residentes da pele (SHKLOVSKAYA et al., 2011; AGUERO et al., 2012; SENESCHAL et al., 2012). Além de sua função na apresentação de antígenos às células T, as CL também são capazes de secretar diversas citocinas, tais como, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α . Assim, juntamente aos queratinócitos, as CL promovem a indução de respostas imunitárias primárias na pele, apresentando um papel chave no desenvolvimento das dermatites de contato (irritante e alérgica) e da psoríase (LISBY; BAADSGAARD, 2010; OUWEHAND et al., 2011; YOSHIKI et al., 2014).

3.1.2.2 Células dendríticas dermais

As células dendríticas dermais são majoritariamente de origem mieloide e expressam CD1c (marcador de superfície das CD dermais). Estudos apontam que a co-expressão de CD1c e CD11c torna-se um marcador útil para diferenciar este tipo celular de macrófagos. Na camada dérmica da pele humana são encontrados três subtipos de CD CD1c: CD CD1a⁻CD14⁻, CD1a⁺CD14⁻ e CD1a⁻CD14⁺, diferindo-se quanto as suas funcionalidades. Em estudos recentes foram identificadas CD CD141⁺ (equivalentes as CD CD103⁺ em roedores). Particularmente, este último subgrupo de CD apresenta um papel imunológico bem definido, no que se refere às respostas das células T CD8⁺ e a imunidade viral. Dentre suas funções, estas células capturam células mortas, expressam moléculas de reconhecimento direto de patógenos virais ou outras moléculas intracelulares, direcionam a diferenciação de células T às células Th1 e são eficientes apresentadoras de antígenos para as células T CD4⁺ e CD8⁺ (CHU et al., 2011; HANIFFA et al., 2012; TAN et al., 2015).

Além disso, além de serem efetivas apresentadoras de antígenos às células T, quando as CD dermais são ativadas elas também secretam citocinas/quimiocinas, contribuindo para erradicar agentes patogênicos, porém podem promover uma resposta inflamatória tecidual persistente. Ainda, a pele de pacientes acometidos por uma doença inflamatória crônica de pele apresenta um acúmulo de diferentes tipos CD, revelando sua participação e regulação nos processos inflamatórios de pele (CHU et al., 2011; PASPARAKIS et al., 2014).

3.1.3 Macrófagos

Os macrófagos são células fagocíticas do sistema imune inato presentes na derme. Sob condições inflamatórias, estas células podem migrar para os nódulos linfáticos (exceto em roedores), porém sua capacidade de apresentação de antígenos é baixa, comparadas às células dendríticas. Sua diversidade de funções é essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase imune, reparo tecidual e detecção precoce de microorganismos invasores na pele. Os macrófagos podem ser ativados por uma variedade de estímulos durante uma resposta imune. Embora a fagocitose possa fornecer o estímulo antigênico inicial, sua atividade pode ser aumentada através da secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T, como o interferon (INF)- γ , sendo uma das citocinas mais potentes na ativação dos macrófagos (NESTLE et al., 2009; SIEWEKE; ALLEN, 2013; MALISSEN et al., 2014).

A ativação desse tipo celular promove a produção e liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e IL-27, podendo essas induzir o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de células inflamatórias ao tecido. Além disso, citocinas anti-inflamatórias também podem ser produzidas pelos macrófagos, como IL-10 e fator de transformação do crescimento (TFG)- β (ABTIN et al., 2014; DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; LACY; STOW, 2015).

O ambiente e a diversidade de sinais polarizam a funcionalidade dos macrófagos. A exposição de citocinas provindas de células Th1, como IFN- γ e TNF- α , bem como lipopolissacarídeo (LPS) promovem o desenvolvimento fenotípico de macrófagos ativado classicamente (M1; pro-inflamatórios). Em suma, esse fenótipo secreta citocinas pró-inflamatórias, promove o desenvolvimento de células T e liberam altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Como resultado, os macrófagos M1 medeiam a destruição de patógenos e promovem o recrutamento de células natural Killer e células T, contribuindo nos processos agudos e crônicos de inflamação de pele (MOSSER; EDWARDS, 2008; DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Em contraste, os macrófagos regulatórios M2, induzidos por citocinas anti-inflamatórias, bem como por glicocorticoides, secretam IL-10 e TFG- β , tendo um papel essencial na resolução da inflamação de pele (MANTOVANI et al., 2013)

3.1.4 Mastócitos

Os mastócitos são células derivadas da medula-óssea que residem na maioria dos tecidos adjacentes aos vasos sanguíneos. São consideradas as principais células efetoras da hipersensibilidade imediata, devido a presença de um grande número de mediadores pró-inflamatórios pré-formados e armazenados nos seus grânulos citoplasmáticos, liberados após o contato dessas células com antígenos. Apresenta um importante papel na defesa antiviral do hospedeiro e erradicação de parasitas, uma vez que contribui para uma resposta imune inata eficaz para a eliminação de patógenos, através do recrutamento de células natural Killer (BANGERT et al., 2011; ST JOHN et al., 2011)

Na pele, os mastócitos apresentam uma importante contribuição na cicatrização de feridas. Assim como os macrófagos, estas células apresentam atividade pró-inflamatória, no qual contribuem para o processo inflamatório de pele, promovendo a expansão de células TCD4⁺ e CD8⁺, e anti-inflamatória, suprimindo a inflamação de pele através da produção de IL-2, IL-10 e acúmulo de células T_{reg} (HERSHKO et al., 2011; PASPARAKIS et al., 2014).

3.1.5 Células T residentes

O clássico conceito de vigilância imunológica da pele consiste na recirculação de células imunes, consideradas as principais efetoras do sistema imune da pele. Durante uma resposta imune primária, diferentes antígenos podem ser levados pelas CD da pele até os nódulos linfáticos e serem, portanto, apresentados às células T (naive). Após o reconhecimento dos antígenos, as células T naive podem se diferenciar em células T efetoras ou em células T de memória. As células T efetoras migram dos vasos linfáticos para a corrente sanguínea atingindo a pele (principalmente no sítio de exposição do patógeno), exercendo ação citotóxica ou auxiliadora (através da produção de citocinas), a fim de erradicar o agente patogênico. Após o pico da resposta imune durante a fase efetora (cerca de 12 horas para as células T CD8⁺ e 24 horas para as células T CD4⁺), estas células desaparecem pela corrente sanguínea e uma segunda classe de células T, as de memória, predomina. Embora as células T de memória apresentem menores funções efetoras, quando re-expostas a algum antígeno, essas células podem vigorosamente se proliferar e diferenciar em células T efetoras (CLARK, 2010; MARTINS; REIS, 2011).

Até recentemente, acreditava-se que as células T migravam para a pele (ou a outros tecidos) somente em condições de inflamação ativa. Entretanto, sabe-se que a pele saudável

contém mais de 2×10^{10} células T de memória residentes, as quais representam mais que duas vezes o número total de células T presentes no sangue. Isso demonstra a capacidade das células T residentes da pele em fornecer, por si só, um ambiente suficiente para o desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias de pele, mesmo na ausência de células T recirculantes (NESTLE et al., 2009; PASPARAKIS et al., 2014).

A pele contém dois subconjuntos de células T residentes, as células de memória $CD8^+$ e as células de memória e também recirculantes $CD4^+$. O primeiro subtipo celular é encontrado principalmente na camada basal e suprabasal da epiderme e em proximidade com as células de Langerhans. Atuam como “células assassinas” através da liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzulina. Já as células T $CD4^+$ são preferencialmente encontradas na derme e apresentam a capacidade de recircular através do sangue. Quanto a sua função “helper”, e por produzir diferentes citocinas, essas são classificadas em Th1, Th2 ou Th17, todas possuindo papéis de importância na patogênese de doenças inflamatórias de pele (BANGERT et al., 2011; JIANG et al., 2012; BROMLEY et al., 2013; LEE et al., 2016).

Além disso, a pele humana contém um grande número de células T $\alpha\beta$ (memória), enquanto roedores apresentam na sua maioria células T $\gamma\delta$ (em pequeno número em humanos), essas consistindo de ambos subtipos $CD4^+$ e $CD8^+$, uma vez que estabelecem ações auxiliares e citotóxicas, respectivamente. Além disso, cerca de 5-10% das células T residentes da pele, consistem de células T_{reg} , essas envolvidas na supressão da ativação, produção de citocinas e proliferação de outras células T (CLARK, 2010). Dessa forma, a proliferação local de células T_{reg} na pele suprime respostas autoimunes e inflamatórias de pele. Ademais, diversos estudos têm fornecido evidências que suportam o papel chave das células T residentes da pele na patogênese de diversas doenças cutâneas, como psoríase e dermatites (MACLEOD; HAVRAN, 2012; KABASHIMA, 2013; EL MALKI et al., 2013; MABUCHI et al., 2013).

3.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma reação de proteção ao organismo após invasão de microorganismos ou lesões geradas ao tecido. As respostas inflamatórias locais e sistêmicas visam neutralizar invasores, reparar e regenerar o tecido danificado e, no caso de infecção, estabelecer uma memória imunológica, uma vez que existindo a possibilidade de reexposição ao agente invasor, o indivíduo apresente uma defesa imunológica mais rápida e específica (SERHAN, 2014; FULLERTON; GILROY, 2016).

Há dois mil anos atrás, Celsius definiu a inflamação como envolvendo a formação dos quatro sinais cardinais: calor, rubor (vermelhidão), tumor (inchaço) e dor. Posteriormente (1858), Virchow descreveu o quinto sinal cardinal “*Functio Laesa*” ou perda da função do membro afetado, resultado do processo doloroso e edematogênico gerado no local lesado (CHIU et al., 2012). Entretanto, a dor vinha sendo caracterizada somente como um sintoma e não como parte integrante na geração da inflamação, uma vez que o sistema nervoso e o imunológico periférico eram tradicionalmente tidos como sistemas independentes. No entanto, hoje se sabe que a ativação do sistema nervoso foi reconhecida como parte integrante da inflamação. O Sistema Nervoso Periférico (SNP) modula direta e ativamente a imunidade inata e adaptativa, de tal forma que os sistemas imunológico e nervoso podem ter uma função protetora integrada na defesa do hospedeiro e da resposta à lesão tecidual (CHIU et al., 2012).

Além disso, a transdução dos estímulos externos nocivos é instantânea e mais rápida do que a mobilização das células do sistema imune inato. Dessa forma, O SNP torna-se o primeiro sistema responsável na defesa do hospedeiro. Tecidos que são altamente expostos ao ambiente externo, incluindo a pele, são altamente inervados por fibras nervosas sensoriais periféricas (PETERS et al., 2006). Nessa perspectiva, qualquer estímulo nocivo ao tecido ativará as fibras nervosas sensoriais periféricas levando a liberação de neuropeptídeos como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), resultando no processo conhecido como inflamação neurogênica (PETERS et al., 2006; CHIU et al., 2012).

Nesse processo, os neuropeptídeos promovem não somente alterações vasculares, mas também atuam diretamente na ativação de células da imunidade inata (células dendríticas e mastócitos) e adaptativa (linfócitos T) (MIKAMI et al., 2011; ROCHLITZER et al., 2011). A SP desenvolve um rápido eritema, edema, resultantes do aumento da permeabilidade venular (via ativação de receptores de neurocinina-1 (NK1), presentes nas células endoteliais), além de promover a degranulação de mastócitos. Já o CGRP promove dilatação arteriolar (PETERS et al., 2006). Dessa maneira, a inflamação neurogênica contribui para a proteção do local lesionado, facilitando a cicatrização fisiológica das lesões e contribuindo para a defesa imunológica contra patógenos, via ativação e recrutamento de células imunes ao local afetado (CHIU et al., 2012).

A resposta inflamatória aguda é um complexo de eventos altamente coordenados envolvendo alterações fisiológicas, celulares e moleculares. Esta fase é dividida em duas etapas: iniciação e resolução (SERHAN, 2014; FULLERTON; GILROY, 2016). Na etapa de iniciação, sinais nocivos estimulam as células residentes (macrófagos, células dendríticas, mastócitos, fibroblastos, linfócitos) do tecido lesado a produzirem e liberarem mediadores

inflamatórios solúveis, incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, aminas vasoativas e eicosanoides (prostaglandinas). Esses mediadores promovem a ativação das células endoteliais da microvasculatura circundante ao tecido lesado (VESTWEBER, 2015; FULLERTON; GILROY, 2016).

As alterações vasculares, realizadas pela inflamação neurogênica são intensificadas durante essa fase e, incluem o aumento do fluxo sanguíneo local e o extravasamento de um fluido rico em proteínas plasmáticas com conseqüente formação de edema, resultantes do processo de vasodilatação. Esses eventos vasculares estimulam o fornecimento de leucócitos para o tecido lesado e cria uma matriz provisória nesse tecido (presença do exsudato) para suportar a entrada das células inflamatórias (POBER; SESSA, 2007).

Além disso, a ativação das células endoteliais desencadeia uma cascata de eventos que permite que os leucócitos circulantes reconheçam o endotélio vascular no tecido inflamado e interajam com a parede do vaso sanguíneo, através de uma série de passos conhecidos como captura, rolamento, adesão, rastreamento para locais de saída e transmigração, através das barreiras das células endoteliais, pericitos e da membrana basal (VESTWEBER, 2015).

Esses processos são auxiliados pela interrelação de mediadores inflamatórios e diversas moléculas de adesão, incluindo as selectinas presentes sobre os leucócitos (L-selectinas) e sobre as células endoteliais (E-selectina e P-selectina), as integrinas que provocam a adesão firme entre os leucócitos ativados e as células endoteliais por ligação aos seus ligantes, incluindo a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), entre outras (VAN BUUL; HORDIJK, 2007; SUNDD et al., 2012). As quimiocinas e outros agentes quimiotáticos, gerados pelas células endoteliais ou originados das células inflamatórias, são apresentados na superfície das células do endotélio a fim de desencadear a ativação do rolamento de leucócitos. Durante esse processo, as selectinas são expressas na superfície das células endoteliais (E-selectina e P-selectina) e dos leucócitos (L-selectinas), fornecendo uma base molecular para que essas células inflamatórias reconheçam as células endoteliais do tecido inflamado, além de proporcionar um mecanismo de ancoragem de baixa afinidade e captura destes leucócitos à superfície das células endoteliais (VESTWEBER, 2015).

Além disso, os agentes quimiotáticos também estimulam o processo de adesão (ligação de alta afinidade) dessas células inflamatórias às células endoteliais, através da ativação de integrinas leucocitárias. Essa classe de moléculas de adesão liga-se a ICAM-1 e VCAM-1, expressas nas células endoteliais. Essa interação medeia uma adesão firme entre essas células, além de permitir o rastejamento dos leucócitos na superfície luminal dos vasos

sanguíneos, até que esses encontrem um local de saída adequado para transmigrarem para o tecido lesado (HERTER; ZARBOCK, 2013; PARK et al., 2015). Os leucócitos levam até 15-20 minutos para superar a membrana basal endotelial, levando um acúmulo transitório de leucócitos entre as células endoteliais e a membrana basal (VESTWEBER, 2015).

A captura, rolamento, aderência e rastreamento são passos sucessivos bem caracterizados de interações entre os leucócitos e células endoteliais a fim de que os leucócitos encontrem um local de saída adequado para transmigrarem para o tecido lesado. Embora, o processo de migração ainda não esteja totalmente compreendido (VESTWEBER, 2015), algumas moléculas de adesão juncional (JAM) medeiam esse processo, incluindo JAMA (endotélio e leucócitos), JAMB e JAMC (endotélio). Essas moléculas favorecem a diapedese leucocitária de modo paracelular, através da ligação com as integrinas expressas pelos leucócitos (WEBER et al., 2007). O recrutamento de neutrófilos depende da JAMA e JAMAC, embora em alguns modelos inflamatórios em camundongos deficientes de JAMA, a infiltração neutrofílica foi reduzida (KHANDOGA et al., 2005; WEBER et al., 2007; VESTWEBER, 2015).

A principal função da inflamação é eliminar os agentes invasores e remover o tecido danificado, restabelecendo a homeostasia tecidual. A ação de células fagocíticas (neutrófilos, monócitos e macrófagos) é crucial para a eliminação efetiva de patógenos e detritos celulares (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010). Durante a fase de iniciação da resposta inflamatória aguda, os neutrófilos são os primeiros tipos de células inflamatórias a infiltrar no tecido danificado. São poderosas células efetoras que medeiam a lesão tecidual através de fagocitose, liberação de citocinas inflamatórias, proteases, e outros fatores contidos nos grânulos citoplasmáticos (degranulação) e pela geração de EROs (OLIVEIRA et al., 2016).

A enzima mieloperoxidase representa cerca de 5% da proteína total neutrofílica e constitui o principal conteúdo presente nos grânulos azurófilos da célula. Essa enzima funciona como um eficiente sistema microbiocida empregado pelos neutrófilos, ação essa dependente da formação de EROs (KLEBANOFF et al., 2013; ENDO et al., 2016). Durante o processo de fagocitose, os neutrófilos aumentam seu consumo de oxigênio, sistema denominado de explosão respiratória. A enzima NADPH oxidase (presente na membrana celular dos neutrófilos) é a responsável pelo alto consumo de oxigênio, com formação do ânion superóxido. A ação sucessiva da enzima superóxido dismutase, fornecerá o substrato (peróxido de hidrogênio, H_2O_2) para a MPO, a qual juntamente com a presença de íons cloreto, gerará um potente agente oxidante com propriedades microbiocida, o ácido hipocloroso (KLEBANOFF et al., 2013). Entretanto, uma ativação e infiltração neutrofílica

em excesso no tecido lesado poderá progredir para a cronificação da inflamação, limitando o reparo tecidual e acarretando em perda funcional do tecido (OLIVEIRA et al., 2016).

Durante a fase de iniciação da inflamação aguda o local inflamado (onde estão presentes leucócitos infiltrados e ocorre formação de edema) torna-se o “campo principal” de atuação do processo resolutivo, esse considerado a segunda fase da inflamação aguda. Lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas, coletivamente denominados de mediadores pro-resolução especializados, executam sinais para finalizar a resposta inflamatória aguda. Esses sinais incluem captação das citocinas pró-inflamatórias, remoção de agentes invasores, interrupção da infiltração neutrofílica e fagocitose e apoptose de neutrófilos pelos macrófagos (eferocitose) (SERHAN, 2014).

Entretanto, a falha desses processos resolutivos ou a ativação persistente da resposta imune poderá resultar em inflamação excessiva, desenvolvendo um processo crônico (POBER; SESSA, 2007; SERHAN, 2014). Nessa fase, além de neutrófilos e macrófagos, também há a presença de linfócitos T caracterizando um processo crônico. Os macrófagos contribuem para a consequência final da inflamação crônica, a qual é representada pela fibrose e consequente perda da funcionalidade tecidual (FERRERO-MILIANI et al., 2007).

Diversas doenças inflamatórias de pele, incluindo a psoríase e a dermatite de contato, estão associadas com um desequilíbrio das respostas imunes, levando ao desenvolvimento de processos inflamatórios crônicos de pele (DAVIS et al., 2010; WULLAERT et al., 2011; YOSHIKI et al., 2014).

3.3 DERMATITE DE CONTATO

A dermatite de contato designa-se em um processo inflamatório de pele resultante da exposição de irritantes ou alérgenos de baixo peso molecular, dotados de propriedades pró-inflamatória e antigênica (BONNEVILLE et al., 2007). A DCI é uma reação inflamatória localizada ocasionada pelo contato direto com agentes (químicos ou físicos) irritantes e desencadeada pela ativação da imunidade inata, sem qualquer processo de sensibilização. Ao contrário, a DCA é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo IV, mediada pelas células T (BONNEVILLE et al., 2007; EBERTING, 2014). Ambas as dermatites de contato apresentam características clínicas e histopatológicas similares, o que dificulta sua diferenciação. Na DCI, usualmente as lesões de pele são bastante demarcadas e confinadas somente na região de contato ao agente irritante, enquanto na DCA, as lesões são menos circundadas e mais disseminadas. Além disso, a distribuição, localização e cronologia de

exposição aos agentes são fatores importantes que auxiliam no processo de diferenciação entre DCI e DCA (EBERTING, 2014).

Pacientes com DCI são mais suscetíveis ao desenvolvimento da DCA, uma vez que a imunidade inata já se encontra ativada pelo agente irritante e é requerida também para as reações imunes alérgicas. Portanto, quando o contato com um alérgeno é precedido por um agente irritante, e a imunidade inata já se encontra ativada, o desenvolvimento da DCA ocorre de forma mais rápida e exarcebada (GITTLER et al., 2013).

3.3.1 Dermatite de Contato Irritante (DCI)

A DCI tem sido definida como uma reação inflamatória de pele ocasionada pelo contato direto a vários estímulos externos (físicos e químicos). A epidemiologia da dermatite de contato revela que cerca de 80% dos casos é caracterizado como uma DCI, sendo somente 20% definida como DCA (EBERTING, 2014). Sua alta prevalência está intimamente relacionada a sua característica multifatorial. Dentre os fatores exógenos cabe ressaltar as características químicas e físicas inerentes de cada agente irritante (peso molecular, estado de ionização e solubilidade), a exposição dos agentes irritantes na pele (volume, concentração, tempo e duração de exposição) e fatores físicos e/ou ambientais, tais como temperatura, umidade, radiação ultravioleta, fricção e oclusão, aspectos que juntos contribuem para a penetração dos agentes irritantes na pele e desenvolvimento das reações inflamatórias (SLODOWNIK et al., 2008; LISBY; BAADSGAARD, 2010).

Além de fatores exógenos, os fatores endógenos influenciam na susceptibilidade a DCI. Dentre esses, destacam-se a idade, sexo, região anatômica do corpo, doenças de pele anteriores ou pré-existentes. Ademais, embora a capacidade de diferentes agentes irritantes induzirem reações clínicas diferentes tem sido relatada a variabilidade interindividual como um limiar no desenvolvimento das reações irritantes presentes na pele. As principais classes de agentes irritantes que frequentemente promovem as reações inflamatórias na pele incluem detergentes (sabão), solventes, óleos, poeira, borracha, fibras, ácidos, álcalis e água (SLODOWNIK et al., 2008; LISBY; BAADSGAARD, 2010; SEYFARTH et al., 2011).

O espectro das reações irritantes inclui reação irritante subjetiva, DCI aguda, DCI aguda retardada, DCI crônica e dermatite tipo queimadura química. O primeiro tipo de reação é caracterizado pela falta de manifestação clínica visível. Como forma de diagnóstico relata-se a sensação de “picada” ou queimação, ocasionado logo após a exposição (segundos a minutos) ao agente químico (geralmente produtos químicos contendo surfactantes). As

diferenças interindividuais estão bem correlacionadas com o desenvolvimento desse tipo de reação. Já a DCI aguda e DCI aguda retardada resulta-se de uma única exposição a substância irritante, porém na DCI aguda retardada, os sinais clínicos são gerados entre 8-24 horas após a exposição inicial, enquanto na DCI aguda as reações tornam-se visíveis minutos a horas após a exposição ao agente irritante. Embora ocorra variação quanto ao aparecimento dos sinais cutâneos, a DCI aguda e DCI aguda retardada compartilham os mesmos sinais clínicos, nos quais podem variar em um leve eritema e ressecamento da região acometida da pele como uma evidente reação inflamatória com edema, ardor, coceira, formação de vesículas e necrose local. As manifestações clínicas frequentemente desaparecem cerca de dias a semanas após o contato com o agente irritante (SLODOWNIK et al., 2008; LISBY; BAADSGAARD, 2010; SEYFARTH et al., 2011).

Já o contato cumulativo ou repetido com agentes, incluindo água, detergentes, solventes orgânicos, óleos, ácidos, álcalis, agentes oxidantes, calor, frio ou fricção (microtrauma) levam ao desenvolvimento da DCI crônica. É o tipo mais prevalente de DCI, marcada por uma persistente dermatite, caracterizada clinicamente pelo ressecamento da pele, eritema, descamação, fissuras, vesiculação (menor grau) e hiperqueratose, não sendo seguidos imediatamente após a exposição. Esse tipo de dermatite frequentemente desenvolve-se nas mãos (dermatite ocupacional). Embora ocorra a remoção da exposição ao agente irritante, as reações clínicas podem durar por anos. E, por último, o contato com agentes irritantes também levam ao desenvolvimento da dermatite tipo queimadura química, na qual as reações são induzidas por substâncias altamente alcalinas ou ácidas. A reação inflamatória desenvolve-se dentro de minutos e, frequentemente, manifesta-se com eritema, vesiculação e formação de áreas necrosadas, podendo levar a destruição do tecido mesmo por uma curta exposição ao agente irritante (ENGLISH et al., 2009; LISBY; BAADSGAARD, 2010; SEYFARTH et al., 2011).

3.3.1.1 Patogênese da DCI

As primeiras evidências sobre a patogênese da DCI definiam-na como uma reação não específica e não imunológica da pele frente ao contato com agentes irritantes. Entretanto, atualmente, sabe-se que o sistema imune inato desempenha um papel chave no desenvolvimento e manutenção das reações irritantes da pele. Isso tem sido verificado em estudos usando modelos experimentais em animais e humanos que a DCI é um processo

complexo envolvendo a integração de diversos tipos celulares e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (YEOM et al., 2012; LEE et al., 2013; PINTO et al., 2015).

A integridade da barreira epidermal desempenha um importante papel na interação e resposta ao contato com substâncias irritantes. Como consequência a essa exposição, está a perturbação da barreira cutânea, na qual relaciona-se intimamente às características intrínsecas de cada agente irritante. O dano na barreira epidermal facilita a penetração desses agentes e leva a ativação da imunidade inata e ao subsequente desenvolvimento das reações inflamatórias locais na pele. A interrupção de uma barreira cutânea íntegra ocasiona a ativação de queratinócitos, os quais desempenham um importante papel na indução das mudanças imunológicas observadas na DCI. O efeito dos agentes irritantes sobre os queratinócitos varia de acordo com a exposição destes. Substâncias ácidas ou alcalinas geralmente ocasionam necrose dos queratinócitos. Já a aplicação de óleo de cróton gera uma considerável espongiose (edema intercelular). Assim, mudanças específicas nos queratinócitos podem ser observadas dependendo do agente irritante exposto a pele (FLUHR et al., 2008; EBERTING, 2014).

A ativação dos queratinócitos leva a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias bem como a regulação de moléculas de superfície celular. Dentre as citocinas pró-inflamatórias primárias produzidas pelos queratinócitos, encontram-se a IL-1 α (forma majoritária da IL-1) e TNF- α , responsáveis pela iniciação da cascata inflamatória. Dentre suas funções, essas citocinas estimulam continuamente a produção de IL-1 β , GM-CSF, IL-6 e IL-8 (proteína inflamatória de macrófago, MIP-2, em roedores) CCL5, CCL2 e CCL20, tanto pelos próprios queratinócitos (efeito autócrino), quanto por células presentes na derme (efeito parácrino), bem como induzem outras células (efeito parácrino) ou até mesmo os próprios queratinócitos (efeito autócrino) a liberarem IL-1 α e TNF- α . Além de suas atuações na regulação de citocinas, a IL-1 α e TNF- α também promovem um aumento da expressão de ICAM-1, bem como moléculas do MHC classe II (LISBY; BAADSGAARD, 2010; GITTNER et al., 2013; LEE et al., 2013).

As citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão produzidas pelos queratinócitos, através da ativação de fatores de transcrição (NF- κ B e AP-1) e (MAPKs), juntamente em combinação com E-selectinas nas células endoteliais, contribuem para a ativação de CD e células T, bem como para a quimiotaxia e consequente acúmulo de células T, monócitos e neutrófilos na pele. Esses eventos sequenciais contribuem para a manutenção e amplificação da inflamação cutânea (LISBY; BAADSGAARD, 2010; HOU et al., 2015; Sidiqqi et al., 2016).

Além da participação dos queratinócitos na DCI, estudos revelam que as CL (CD da epiderme) podem migrar para a derme e, assim, atingir nódulos linfáticos, após a exposição de agentes irritantes a pele, embora a imunidade adaptativa não esteja envolvida na patogênese da DCI. Entretanto, o envolvimento dessas células ainda não está totalmente claro, porém estudos apontam que sua migração para derme deve-se a produção de IL-1 α e TNF- α pelos queratinócitos após a exposição ao agente irritante. Além disso, outros estudos revelam uma redução do número de CL na epiderme, e um aumento dessas nos nódulos linfáticos. O significado dessa migração não é totalmente claro, embora estudos apontem como um mecanismo de escape para proteger as CL de uma possível morte celular pela toxicidade causada pelos agentes irritantes (OUWEHAND et al., 2010; OUWEHAND et al., 2011, LEE et al., 2013).

As células T infiltrantes também são encontradas na DCI, embora seu papel ainda não esteja completamente entendido. São encontradas, principalmente células T do tipo CD4⁺, pertencentes à subpopulação Th1. Essas células ativadas liberam citocinas inflamatórias, sendo observados níveis aumentados de INF- γ e IL-2 na pele de pacientes com DCI. Na DCA, as células T induzem a liberação de citocinas e quimiocinas pelos queratinócitos e intensificam sua interação com essas células de forma dependente das ICAM-1. Entretanto, ainda não está elucidado se na DCI as células T exercem um mecanismo similar ao que ocorre na DCA (LISBY; BAADSGAARD, 2010; LEE et al., 2013; WANG et al., 2015).

Embora alguns aspectos na patogênese da DCI ainda precisam ser elucidados, crescentes estudos têm sido implementados quanto à multiplicidade de mediadores inflamatórios e tipos celulares (imune e não imune) envolvidos na DCI, bem como a variabilidade interindividual nos níveis de citocinas presentes ou produzidas. Essas evidências contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos e diferenças entre a DCI e DCA, bem como na melhor escolha terapêutica.

3.3.1.2 Tratamento farmacológico

A multiplicidade de cascatas inflamatórias (células e mediadores inflamatórios) envolvidas nas doenças inflamatórias pode ser antagonizada e/ou neutralizada a fim de conter o processo inflamatório. Muitos agentes anti-inflamatórios podem exercer suas ações através do antagonismo (via receptores) de mediadores pró-inflamatórios endógenos, bem como na redução dos níveis desses mediadores, tanto pela inibição de enzimas chave na produção dessas, quanto a nível de regulação transcricional. Dentre os princípios básicos para a

efetividade terapêutica destacam-se alguns aspectos principais, tais como, o alvo terapêutico o qual deve estar próximo da fase de iniciação da doença, sendo um ponto regulatório chave ou a etapa limitante da via inflamatória e deve ser único ao processo de doença a fim de evitar efeitos adversos a outros processos fisiológicos. A inibição de enzimas envolvidas nas cascatas inflamatórias, e a regulação da expressão de citocinas pro-inflamatórias representam estratégias efetivas para o tratamento da inflamação e para a prevenção de doenças inflamatórias (SIMMONS, 2006; AHN et al., 2010).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os glicocorticoides são os principais agentes terapêuticos utilizados no tratamento de condições inflamatórias. Os AINEs são um grupo diverso de fármacos com atividade anti-inflamatória, além de analgésica e antipirética. O efeito farmacológico dos AINEs ocorre pela inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e consequente redução de eicosanoides, como as prostaglandinas (PGs). Sua ação anti-inflamatória é decorrente da redução da produção de PGs vasodiladoras (PGE₂ e PGI₂), com consequente redução indireta do edema (BACCHI et al., 2012). Os eicosanoides são produzidos por todos os tipos celulares da pele (através das COX cutâneas) e contribuem para as respostas inflamatórias do tecido. A PGE₂ é um dos principais eicosanoides cutâneos produzidos pelos queratinócitos e fibroblastos dermais. Ela exibe uma potente atividade pró-inflamatória, proliferativa e também modula a imunossupressão. Embora sejam altamente utilizados na clínica e apresentam eficácia comprovada, o uso dos AINEs de forma prolongada e/ou inadequada pode levar ao aparecimento de efeitos adversos, envolvendo o sistema cardiovascular, sistema gastrointestinal e renal (BACCHI et al., 2012; CONAGHAM, 2012; NICOLAOU, 2013; UNZUETA; VARGAS, 2013).

Um entendimento detalhado dos mediadores envolvidos no processo inflamatório cutâneo se faz importante para o direcionamento da correta terapia farmacológica. Uma vez que os eicosanoides cutâneos estejam envolvidos nos processos inflamatórios de pele, os AINEs tornam-se relevantes escolhas para tratamento dessas condições inflamatórias (PASSOS et al., 2013; CHIBLI et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2016).

Além disso, outras moléculas anti-inflamatórias não esteroidais têm merecido destaque no tratamento das dermatites de contato. Uma dessas é o 18β-ácido glicirretínico, um metabólito do ácido glicirrízico, considerado um potente agente no tratamento da dermatite de contato devido sua atividade antialérgica e anti-inflamatória, esta similar aos glicocorticoides. O ácido glicirrízico é o principal componente do alcaçuz (derivado da raiz da *Glycyrrhiza uralensis*). O alcaçuz é amplamente utilizado na medicina popular em muitos países asiáticos

e europeus. Além disso, seu principal componente tem sido alvo de investigação médica para o tratamento de diversas doenças (WANG et al., 2011, Elberting, 2014).

Estudos *in vitro*, revelaram que o 18 β -ácido glicirretínico atenua a produção excessiva de óxido nítrico, PGE₂ e EROs, além de inibir a atividade do NF- κ B. Ademais, o tratamento com 18 β -ácido glicirretínico, pode estender a efetividade dos glicocorticoides (utilizados topicamente em associação), permitindo tanto a redução da dose e tempo de tratamento, quanto uma maior segurança terapêutica com o uso de glicocorticoides (WANG et al., 2010; Elberting, 2014).

A niacinamida é uma forma ativa da vitamina B3 e também tem sido benéfica no tratamento de diversas doenças inflamatórias de pele, uma vez que possui uma variedade de efeitos anti-inflamatórios, incluindo a inibição da quimiotaxia de leucócitos e degranulação de mastócitos. Além disso, a niacinamida aumenta a espessura da epiderme, devido a capacidade de produção de lipídios de membrana, como ceramidas, ácido graxos livres e colesterol (estrato córneo e queratinócitos), favorecendo a redução da perda de água transepidermal. O uso tópico de niacinamida torna-se benéfico para a função de barreira da pele, reduzindo a propensão em desenvolver uma DCI frente a exposição a um agente irritante (MOHAMMED et al., 2013; Elberting, 2014).

Outra classe de anti-inflamatórios, sendo os mais prescritos e efetivos no tratamento de condições inflamatórias, são os glicocorticoides (anti-inflamatórios esteroidais). Especialmente na dermatologia, a identificação de glicocorticoides com atividade preferencialmente local conduziu melhorias no índice terapêutico (taxa de efetividade/efeito adverso). Um exemplo disso são o furoato de mometasona e o aceponato de metilprednisolona, os quais potencialmente inibem citocinas pró-inflamatórias locais e são clinicamente mais efetivos, além de apresentarem raros efeitos adversos sistêmicos. Embora os glicocorticoides apresentem comprovada efetividade, deve-se atentar aos riscos de um tratamento contínuo à vista do provável aparecimento de efeitos adversos sistêmicos e tópicos, bem como o desenvolvimento de efeito rebote (glicocorticoides tópicos) após o término do tratamento (SCHACKE et al., 2009; XIAO et al., 2015).

A interrupção súbita do uso de glicocorticoides após um longo período de tempo pode provocar sintomas denominados "respostas rebote". Nenhum padrão de diagnóstico ainda foi estabelecido para esta condição. Entretanto, a história de uso prolongado de glicocorticoides locais, juntamente com as características clínicas desenvolvidas (prurido intenso, secura e sensação de queimação) cerca de 4-10 dias após o término abrupto do tratamento, tornam-se

suficientes para o diagnóstico de efeito rebote dependente de glicocorticoides (XIAO et al., 2015; LEE et al., 2016).

Existem diversos mecanismos pelos quais os glicocorticoides reduzem a inflamação. Os glicocorticoides são moléculas pequenas e hidrofóbicas capazes de atravessar as membranas das células alvo e ligar-se aos receptores de glicocorticoide (GR). Os GR residem no citoplasma, associados a um complexo proteico que fornece um estado conformacional favorável a ligação de ligantes (glicocorticoides). Após a ligação com glicocorticoides, o complexo proteico se dissocia do receptor, permitindo a translocação do novo complexo glicocorticoide-GR para o núcleo. No núcleo, o complexo glicocorticoide-GR são reconhecidos e ligam-se a sequências específicas do DNA, denominados de elementos de respostas aos glicocorticoides (ERGs) (NIXON et al., 2013; Elberting, 2014).

Ao se ligar ao DNA, o complexo glicocorticoide-GR pode exercer a ativação de genes (transativação), codificando nesse caso moléculas anti-inflamatórias, como IL-10, mas também reprimir a transcrição gênica (transrepressão). Nesse caso, a ligação direta ao DNA ocorre através ERG negativos (região promotora dos genes). Entretanto, na ausência de genes responsivos ao glicocorticoide, a repressão gênica pode decorrer através do antagonismo de fatores de transcrição pró-inflamatórios, como NF- κ B e proteína ativadora (AP)-1, regulando a expressão de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, COX-2, ICAM-1 e óxido nítrico sintase. Além disso, os glicocorticoides também suprimem a expressão de genes que codificam IL-2, IL-4, IL-15, IL-17 e IFN- γ nas células T (DINARELLO, 2010; NIXON et al., 2013).

Embora os anti-inflamatórios convencionais tenham sua efetividade comprovada cientificamente, alternativas terapêuticas que sejam eficazes ao mesmo tempo seguras precisam ser desenvolvidas, e a fitoterapia pode ter esse potencial.

3.4 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA

O uso de plantas medicinais para a cura e tratamento de doenças acompanha a sociedade humana desde os primórdios de sua existência. Os primeiros registros de fitoterápicos datam na China (3000 a.C.), quando o imperador chinês criou o primeiro herbário, consistindo em 365 ervas medicinais e venenos utilizados na época. Muitas das drogas clinicamente utilizadas derivadas de produtos naturais foram originárias não só de espécies microbianas, como é o caso de alguns antimicrobianos (Penicilina G), mas também derivadas de espécies vegetais, tais como a morfina, vimblastina, vincristina, paclitaxel e

entre outros (KINGSTON, 2011). A maioria dos analgésicos utilizados atualmente na clínica foi descoberta de forma empírica ou tiveram seu uso baseado na medicina popular. Exemplos clássicos são a morfina e a codeína, alcaloides derivados do ópio e extraídos dos frutos imaturos da papoula (*Papaver somniferum*). Outro exemplo é o ácido acetilsalicílico, fármaco sintetizado a partir da salicina, produto isolado das cascas do salgueiro (*Salix alba*) (Duarte, 2005; MAHDI et al., 2006). A partir do século XIX, com o advento da revolução industrial e tecnológica atrelado ao avanço da química combinatória, desencadeou a produção acelerada de novos medicamentos a partir de drogas sintéticas, uma vez que os médicos passavam a priorizar a prescrição destes tipos de medicamentos, colocando a fitoterapia em segundo plano terapêutico (CALIXTO et al., 2003; FRANÇA et al., 2008). No Brasil, a utilização de ervas medicinais tem como base as práticas indígenas, influenciadas pela cultura africana e portuguesa (Rezende e Cocco, 2002; FRANÇA et al., 2008).

Entretanto, devido aos efeitos adversos e ao alto custo dos medicamentos convencionais, aliado ao fato da utilização popular na profilaxia/tratamento de diversas doenças, a fitoterapia vem novamente ganhando destaque, comprovando, através de estudos científicos, a ação terapêutica de diversas plantas medicinais utilizadas popularmente, tornando-as potenciais alternativas na terapêutica de diversas doenças (FRANÇA et al., 2008; KLEIN et al., 2009; AL-SAYED; EL-NAGA, 2015; MENDES et al., 2016).

É notável a importância histórica do uso de plantas em saúde no Brasil, especialmente na área farmacêutica. No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos remonta a partir de 1981, através da Portaria nº. 212, de 11 de setembro (Ministério da Saúde), a qual define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Ao longo dessa trajetória, várias políticas envolvendo plantas medicinais e fitoterápicos foram implantadas, destacando-se a Resolução nº. 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual visava atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos, feitas anteriormente pela Resolução nº. 17/2000 da ANVISA (BRASIL 2000; 2004; 2011). Nesse período, o Acheflan[®], um anti-inflamatório tópico desenvolvido a partir da planta medicinal brasileira *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae), foi o primeiro fitoterápico desenvolvido no Brasil (Aprovado pela ANVISA, em 2004) e produzido pela indústria farmacêutica brasileira Aché Laboratórios (CALIXTO, 2005). Durante este período, e, juntamente com advento do registro desta nova classe de medicamentos, a ANVISA definiu o fitoterápico como um produto obtido de matéria-prima ativa vegetal ou de seus derivados, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico. O fitoterápico pode ser simples,

quando o princípio ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o princípio ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014). Já os fármacos ou princípios farmacologicamente ativos são compostos caracterizados quimicamente cuja ação farmacológica é conhecida e responsável pelos efeitos terapêuticos do medicamento (BRASIL, 2000).

O fortalecimento deste segmento industrial pode criar condições que permitam investir na exploração da biodiversidade brasileira para busca de potenciais fármacos de origem vegetal bem como o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que somado a uma considerável base técnico-científica na área, permitiria a comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; KINGSTON, 2011). Além disso, não só no Brasil, mas também mundialmente, há um interesse e conhecimento científico crescente na área de plantas medicinais e fitoterápicos, sendo atestado pela quantidade de trabalhos científicos produzidos pelos pesquisadores da área, durante os últimos anos (KLEIN et al., 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012; TREVISAN et al., 2012; PIANA et al., 2013; SILVA et al., 2013; TRIVELLATOGRASSI et al., 2013; WALKER et al., 2013; SILVA et al., 2014; PIANA et al., 2016; BRUM et al., 2016).

O interesse por plantas medicinais destinadas à área farmacêutica pode seguir dois caminhos, podendo estes estar associados entre si. Um desses seria o isolamento do princípio ativo (fármaco), a partir de vegetais, e, posteriormente, poderia-se estabelecer a síntese química deste fármaco, abandonando a extração vegetal e tornando a origem natural do isolamento do fármaco como curiosidade histórica. Por outro lado, tem-se a alternativa em utilizar plantas inteiras ou extratos padronizados das mesmas. Nesse caso, não haveria isolamento de um fármaco da planta e, sua atividade biológica ocorreria pela ação conjunta dos diversos princípios farmacologicamente ativos presentes na planta (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Tal interesse pela pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos torna-se resultado de diversos fatores, como o elevado custo da assistência médica privada e dos medicamentos convencionais, alternativas terapêuticas que sejam mais seguras e efetivas e pela precariedade da assistência prestada pelos serviços públicos de saúde (KLEIN et al., 2009; AKINDELE et al., 2015). Nas últimas décadas, esforços têm sido feitos no Brasil a fim de estimular estudos científicos com plantas medicinais, promover a capacitação qualificada de pesquisadores na área e introduzir alternativas terapêuticas a partir de fontes naturais nos cuidados básicos de saúde. No entanto, somente em 2006, o governo brasileiro juntamente com o Ministério da

Saúde definiram políticas que foram consideradas um marco para a indústria de plantas medicinais e fitoterápicos (CARVALHO et al., 2011).

O Decreto nº 5813/2006 dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, na qual proporciona a população brasileira ao acesso seguro, bem como o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, com a perspectiva de ampliação das ações terapêuticas, integralização e melhoria da atenção à saúde aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, essa política visa estimular o desenvolvimento e consumo dos fitoterápicos através do incentivo ao cultivo, formação técnico-científica, promovendo a interação entre setor público e privado, universidades, centros de pesquisas na área de plantas medicinais e desenvolvimentos de fitoterápicos (BRASIL, 2006a).

Além disso, no mesmo ano, o Ministério da Saúde implementou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, publicada na forma da Portaria Ministerial nº 971/2006, cuja implantação envolve justificativas de natureza política, técnica, econômica, social e cultural. Essa política tem por finalidade incorporar experiências que já vem sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, dentre as quais destacam-se aquelas do âmbito da Medicina Tradicional Chinesa-Acupuntura, da Homeopatia, da Medicina Antroposófica e da Fitoterapia. Ainda, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS corrobora para a integralidade da atenção à saúde, requerendo a interação das ações e serviços existentes no SUS (BRASIL, 2006b).

Com políticas criadas visando estimular a pesquisa, desenvolvimento e consumo de fitoterápicos, a ANVISA, por meio da Farmacopeia Brasileira, elaborou o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Resolução nº 60/2011), dando suporte às práticas de manipulação e dispensação de fitoterápicos nos Programas de Fitoterapia no SUS. Nesse formulário, estão registradas informações sobre a forma correta e padronizada de preparo e restrições de uso de cada espécie, sendo requisitos de qualidade definidos nas normas específicas para farmácias de manipulação e farmácias vivas. Além disso, há estudos científicos de todas as formulações incluídas no formulário e um histórico de utilização nos serviços de fitoterapia no país. Das formulações apresentadas de espécies vegetais e formas farmacêuticas comuns, fez-se uma seleção dando preferência para a relação de espécies vegetais de interesse do SUS (RENISUS) (BRASIL, 2011).

A implantação do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira levantou considerações em torno do processo de registro de fitoterápicos no Brasil, o que culminou

com a publicação pela ANVISA da Resolução nº 26/2014, na qual restabelece os requisitos para registros, renovação de registro de medicamento fitoterápico e para uma nova classe criada, o Produto Tradicional Fitoterápico. A diferença entre medicamentos fitoterápicos e o Produto Tradicional Fitoterápico é que o primeiro deverá passar por testes clínicos para avaliação de segurança e eficácia, e a nova classe será autorizada por meio da demonstração do uso seguro por um longo período, com base em dados da literatura científica, sem a comprovação adicional de testes de eficácia e segurança (BRASIL, 2014).

Ainda assim, na tentativa de reduzir as lacunas no que se refere às práticas fitoterápicas no Brasil e contribuir com a fitoterapia racional, a ANVISA elaborou o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (Resolução nº 84/ 2016), uma espécie de farmacopeia e bulário, na qual visa orientar a prescrição de plantas medicinais e também de fitoterápicos, baseados em evidências científicas, que poderão ajudar na conduta terapêutica do profissional prescritor. O documento contém 28 monografias, sendo que 17 destas estão listadas na RENISUS. A ideia é que esta lista seja expandida, uma vez que se têm listado no SUS 71 espécies vegetais de interesse. Cada monografia conta com a identificação botânica (família), nomenclatura popular, parte utilizada (órgão vegetal), indicações terapêuticas, contraindicações, efeitos adversos, interações medicamentosas, formas farmacêuticas, vias de administração e posologia (dose/intervalo), tempo de utilização, superdosagem, prescrição e informações sobre segurança e eficácia (BRASIL, 2016).

Ao longo da trajetória, várias políticas envolvendo plantas medicinais e fitoterápicos foram implementadas, contribuindo de certa forma, no crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e dos respectivos extratos na terapêutica. De fato, isso vem auxiliando aos cuidados primários de saúde, uma vez que essas alternativas terapêuticas tornam-se um complemento compatível com a medicina convencional (BRASIL, 2011; FIRMO et al., 2011).

Entretanto, antes de serem utilizadas pela população é necessário que as plantas medicinais passem por processos a fim de garantir segurança em relação a efeitos tóxicos, como também, a existência de ensaios farmacológicos e experimentação clínica que demonstrem eficácia para este tipo de medicamento. Para que isso ocorra de forma correta e, principalmente segura, é necessário a pesquisa científica, buscando conhecer a química, toxicologia e farmacologia das plantas medicinais e princípios ativos sem desconsiderar o conhecimento popular (FIRMO et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

Apesar da crescente busca pela integralização das plantas medicinais e fitoterápicos na terapêutica, os estudos científicos acerca dessas áreas ainda são precários no Brasil, sendo

necessário pesquisas que enriqueceriam o conhecimento e fortaleceriam o uso da fitoterapia como uma alternativa terapêutica na profilaxia/tratamento de diversas doenças (SANTOS et al., 2011).

3.4.1 *Tabernaemontana catharinensis*

A espécie *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. pertence à família Apocynaceae, contendo atualmente cerca de 255 gêneros e 3.700 espécies, sendo a família mais representativa das Angiospermas (MATOZINHOS; KONNO, 2011). As plantas desta família situam-se no território brasileiro desde a Região Amazônica até o Sul do Brasil, principalmente em regiões de vegetação de Mata Atlântica (BARTH; LUZ, 2008). As espécies da família Apocynaceae apresentam inúmeras propriedades farmacológicas devido à profusão de metabólitos secundários, entre esses glicosídeos cardiotônicos, alcaloides e terpenóides, (GOMES et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011; LIM et al., 2009).

Um dos gêneros da família Apocynaceae, a *Tabernaemontana*, compreende cerca de 110 espécies, sendo que 44 dessas espécies estão presentes na América. A presença de compostos ativos como, alcaloides indólicos e triterpenoides pentacíclicos, já são bem descritas, uma vez que cerca de 240 diferentes bases estruturais já foram documentadas (PEREIRA et al., 2008; LIM et al., 2009; BOLIGON et al., 2015). Esses tipos de compostos são responsáveis pelas diversas atividades farmacológicas dessas espécies, tais como, antileishmania, tripanocida, antioxidante, antibacteriana, antitumoral, analgésica e anti-inflamatória (ALMEIDA et al., 2004; MEDEIROS et al., 2007; SOARES et al., 2007; PANDEY; NEGI, 2016).

Dentre as espécies existentes no Brasil e, utilizadas popularmente destaca-se a *Peschiera catharinensis*, atualmente reclassificada como *Tabernaemontana catharinensis* (PEREIRA et al., 2005). Segundo Koch & Rapini (2011), *T. catharinensis* é nativa, mas não endêmica, com ampla distribuição geográfica no Brasil, incluindo Nordeste (Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro), e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Em relação à descrição botânica, *T. catharinensis* são arbustos, medindo aproximadamente 3,5 metros de altura, tronco irregular revestido por casca grossa e suberosa. Suas folhas são simples, glabras, com seiva leitosa (látex) opostas e ovais, medindo entre 5-8 cm de comprimento, e os frutos carnosos e deiscentes (ARTICO et al., 2010; GUIDOTI et al., 2015).

Figura 2 – *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae).



Fonte: Laboratório de Manejo Florestal da Unicentro, 2016.

A *T. catharinensis* é popularmente conhecida como “cobrina”, “leiteira de dois irmãos” ou “jasmine”, sendo utilizada na medicina popular na forma de chá ou infusão como anti-inflamatório, picadas de insetos, antídoto para mordeduras de cobras, tratamento de verrugas, herpes, contra infecção nos olhos e unhas e tratamento de gonorreia e diarreia (BATINA et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; MEDEIROS et al., 2011). Vários constituintes fitoquímicos (alcaloides indólicos, triterpenóides, ácido fenólicos, flavonoides, taninos, esteroides e saponinas), presentes nos extratos (etanólico ou aquoso), frações (acetato de etila, n-butanol, diclorometano e clorofórmica) e no óleo essencial da espécie, já foram identificados em diferentes partes da planta, como as cascas do caule, raiz, folhas, frutos e ramos (PEREIRA et al., 2008; GOMES et al., 2009; BOLIGON; ATHAYDE, 2012; BOLIGON et al. 2013; PIANA et al., 2014; BOLIGON et al., 2015; BRUM et al., 2016).

A diversidade de constituintes químicos identificados em extratos de várias partes da planta denota a variedade de efeitos etnofarmacológicos já descritos e comprovados da espécie, tais como anti-inflamatório, antídoto contra veneno de cobras (*Bothrops jararacuçu* e *Crotalus durissus terrificus*), antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, analgésico, hipoglicemiante, antileishmania e antiviral (BATINA et al., 2000; VERONESE et al., 2005; SOARES et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; MEDEIROS et al., 2011; PIANA et al., 2014; BOLIGON et al., 2015; LEHMANN et al., 2015; BRUM et al., 2016).

Dentre os alcaloides indólicos majoritários de *T. catharinensis*, encontrados em extratos das folhas e ramos, destacam-se a voacangina e coronaridina (PEREIRA et al., 2006; SOARES et al., 2007). Além disso, Soares e colaboradores (2007) identificaram também a

presença de outros alcaloides, incluindo voacristina, voacristina-hidroxiindolenina, voacangina-hidroxiindolenina e 3-hidroxi-coronaridina. Estudos revelam que esses alcaloides indólicos apresentam inúmeras atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, analgésica, antídoto para mordedura de cobras (gênero *Crotalus*) e anti-inflamatória, sendo dessa forma, os principais constituintes responsáveis pelos efeitos farmacológicos de *T. catharinensis* (PEREIRA et al., 2005; VERONESE et al., 2005; PEREIRA 2008; GOMES et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011; BOLIGON et al., 2015).

Além disso, a presença de flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides na espécie também contribuem para os seus efeitos biológicos, especialmente atuando como anti-inflamatório, antioxidante e analgésico (GOMES et al., 2009; RATHEE et al., 2009; SILVA et al., 2011; CHIBLI et al., 2014; BOLIGON et al., 2015, BRUM et al., 2016; FURTADO et al., 2016). Já tem sido reportado que os efeitos biológicos de algumas espécies de plantas, incluindo propriedades anti-inflamatórias, pode ser atribuída pelo sinergismo de diversos compostos fitoquímicos presentes em seus extratos brutos, incluindo ácidos fenólicos, triterpenoides, alcaloides, esteróis e flavonoides (AFZAL et al., 2012; BELLIK et al., 2013; CHIBLI et al., 2014).

Dessa maneira, considera-se importante a identificação e quantificação dos constituintes fitoquímicos responsáveis pelas atividades etnofarmacológicas presentes no extrato bruto das espécies em estudo, a fim de comprovar cientificamente o uso comum das plantas na medicina popular (BOLIGON et al., 2013). Apesar da *T. catharinensis* ter sido submetida a diversos estudos farmacológicos na qual ratificaram seu uso popular, até o momento, nenhum estudo foi realizado a fim de comprovar a atividade anti-inflamatória tópica dessa planta e justificar o seu uso pela população no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas.

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

A metodologia, os resultados e a discussão inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico. O manuscrito está disposto na mesma forma a qual foi submetido à revista Journal of Dermatological Science.

The screenshot shows the user interface for the Journal of Dermatological Science submission system. At the top, there is a header with the journal title, Elsevier logo, and user information (Sara Oliveira). Below the header is a navigation bar with 'Home' and 'Reports' tabs. The main content area is titled 'My Author Tasks' and features a 'Start New Submission' button and a link to view submissions with a final decision. Below this, there is a section titled 'My Submissions with Journal (1)' which contains a table with one submission entry.

My Submissions with Journal (1)	
Tabernaemontana catharinensis leaves presents topical anti-inflammatory activity on different irritant contact dermatitis models in mice	DESC_2017_26
Current status: With Editor (13/Jan/2017)	Article Type: Research Paper
	Initial submission : 13/Jan/2017

***Tabernaemontana catharinensis* leaves presents topical anti-inflammatory activity on different irritant contact dermatitis models in mice**

Camila Camponogara^a, Indiará Brusco^a, Mariana Piana^b, Aline Augusti Boligon^b, Daniela Almeida Cabrini^c, Gabriela Trevisan^d, Cássia Regina Silva^e, Juliano Ferreira^f, Sara Marchesan Oliveira^{a*}

^a*Laboratory Neurotoxicity and Psychopharmacology, Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

^b*Phytochemical Research Laboratory, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.*

^c*Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil*

^d*Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.*

^e*Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil*

^f*Department of Pharmacology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil*

*Corresponding author: Sara Marchesan Oliveira

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Zipcode: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil, Phone: +55 3220-8053, email: saramarchesan@hotmail.com.

Financial support

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (process number 401437/2014-0), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (Brazil) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul—FAPERGS (process number 16/2551-0000281-9). We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Text word count: 8003

Number of references: 102

Number of tables: 4

Number of figures: 12

Abbreviations

ICD –irritant contact dermatitis; PMN – polymorphonuclear; MPO – myeloperoxidase; MIP-2 – macrophage inflammatory protein 2; IL - interleukin; TNF- α - tumor necrosis factor alpha; NF- κ B-factor nuclear kappa B; ID₅₀ – inhibitory dose 50%; MAPK – mitogen activated protein kinases; TcE – *T. catharinensis* crude extract; HTAB – hexadecyltrimethylammoniumbromide; TMB - tetra-methylbenzidine; HC-030031 - 1, 2, 3, 6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[4-(1-methylethyl)phenyl]-2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamide,2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4 isopropylphenyl) acetamide; SB-366791 - 4'-Chloro-3-methoxycinnamanilide; PMSF – phenylmethanesulfonylfluoride; EDTA – diaminoethanetetraacetic; BSA - acid serum albumin; AA – arachidonic acid; ALT - alanine aminotransferase; AST - aspartate aminotransferase; s.c. – subcutaneous; SEM - standard error of mean; E_{max} – maximum effect; TPA - 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; PKC - protein kinase C; PLA₂- phospholipase A₂; AP-1 - activating protein-1

Abstract

Background: *T. catharinensis* is popularly known as snake skin and used in the folk medicine as anti-inflammatory to treat cutaneous skin disorders. However, no study was performed proving its topical anti-inflammatory activity.

Objective: Investigate the topical anti-inflammatory activity of *T. catharinensis* leaves on different irritant contact dermatitis (ICD) models in mice.

Methods: The ICD acute model was induced by unique application of irritant agents (cinnamaldehyde, capsaicin, phenol, arachidonic acid (AA), or croton oil). The ICD chronic model was induced by croton oil repeated application (nine days). The *T. catharinensis* treatments (crude extract, fractions and gel formulations) were topically applied immediately after of irritant agents application in ICD models evaluated. We assessed the accelerated stability of *T. catharinensis* gels through organoleptic characteristics and viscosity analysis, pH measurement and caffeic acid quantification. *In vivo* tests we evaluated ear edema (increase ear thickness) and from ear tissue samples: polymorphonuclear (PMN) cells infiltration; pro-inflammatory cytokines levels; mechanism of anti-inflammatory action to *T. catharinensis* crude extract (TcE). The possible toxicity development by TcE topical treatment (14 days) was assessed.

Results: TcE inhibited the acute ear edema induced by cinnamaldehyde, capsaicin, AA, phenol, or croton oil of potent and dependent dose-manner as well as reduced chronic ear edema croton oil-induced. TcE also reduced the pro-inflammatory cytokines (MIP-2, IL-1 β e TNF- α) levels irritant agents-induced. TcE gels did not presented significantly changes chemical and physical during the days evaluated. Furthermore, TcE fractions (dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate) and TcE gels also were able to reduce the ear edema induced by croton oil. All *T. catharinensis* treatments reduced the PMN cells infiltration in acute and chronic ICD models and TcE reduced the epidermal hyperplasia, evaluated during chronic ICD model. TcE topical treatment reduced all inflammatory parameters evaluated by glucocorticoid receptor dependent pathway, but independent of NF- κ B transcription factor pathway. Besides, TcE topical treatment showed to be more potent and safer than dexamethasone.

Conclusion: The results confirm the topical popular use of *T. catharinensis* in cutaneous inflammatory process treatment and demonstrate the TcE potential to develop a promising topical anti-inflammatory agent.

Keywords: *T. catharinensis*; snake skin; irritant agents; Ear edema; Anti-inflammatory.

1. Introduction

The skin is the main protective physical barrier against chemical and physical injuries, microorganisms or others noxious agents from external environment and have a crucial role in the immune system[1–3]. The skin protective functions is due its keratinized epidermal permeability barrier and by the presence of several cellular types presents in the epidermis and dermis[4–6]. Nevertheless, an inappropriate skin immunological activity may alter functional skin barrier and leads to the pathogenesis of a wide range of skin inflammatory disorders[7–9].

The irritant contact dermatitis (ICD) is considered the most common inflammatory and occupational skin disorder and results of the innate immunity activation in response to direct contact with irritants agents without prior sensitization[10–12]. The ICD causes chronic perturbations of the skin barrier integrity, which results in dry and scaly skin, vesicles formation, itch and chronic inflammation[13–15]. The inflammatory process is characterized by edema, erythema, trafficking and expansion of immune cells and inflammatory infiltrate, consisting of mast cells and leukocytes, such as neutrophils[16–19].

Several pro-inflammatory cytokines are released by infiltrating inflammatory cells and epidermal cells in the ICD, such as TNF- α , IL-1 MIP-2 (IL-8) and are involved in cutaneous inflammation and may be produced by factor nuclear kappa B (NF- κ B) and mitogen activated protein kinases (MAPK) pathway excessive activation[20–25].

It is widely recognized that the modulation of the production and release of inflammatory mediators may be a way used to treat skin inflammatory diseases[26–29]. Although, the current therapeutic agents such as glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs are employed to treat skin disorders, they promote adverse effects that limit their long-term use, involving cardiovascular, gastrointestinal and renal, as well as, skin problems by glucocorticoids treatments like hypopigmentation, tuning, dryness, itching and burning. Thus, there is unceasing demand for new anti-inflammatory agents to treat skin inflammatory diseases more effective and with improved therapeutic window[30–35].

In this context, plant extracts and natural products remain as potential alternative to development new safer and more effective topical anti-inflammatory drugs[36–40]. *Tabernaemontana catharinensis* A. DC (Apocynaceae family) is found in countries of South America such as Brazil. It is popularly known as “leiteira de dois irmãos” (milkweed), “jasmim” jasmine, “cobrina” or “casca de cobra” (snakes kin). In folk medicine, the leaves tea or infusion of this species is commonly used to treat insect bites, to relieve toothache, as an antidote for bites of snakes, anti-inflammatory and anthelmintic[41,42].

Pharmacological studies with crude extract, fractions, isolated compounds and essential oils obtained from plant suggest different biological activities, such as antioxidant, as an antidote to snake venom, antibacterial, antiviral, antitumor and analgesic[43–48]. Although *T. catharinensis* is popularly used to treat skin lesions, until now there are no studies that scientifically prove its possible effectiveness as a topical anti-inflammatory agent for irritant contact dermatitis. Thus, we investigated the topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* crude extract (TcE) leaves, as possible irritant contact dermatitis treatment in different skin inflammation models in mice. Second, we also evaluate the *T. catharinensis* effectiveness as topical anti-inflammatory in an acute irritant contact dermatitis model induced by croton oil, using different fractions TcE-isolated and semisolid formulation (TcE gels), since the properties of the hydrogels such as the good spreadability, biocompatibility, and biodegradability define a good strategy to develop drug delivery systems intended for treatment of skin disorders.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Hematoxylin-eosin and paraffin were purchased from Merk (Darmstadt, Germany). Croton oil, hexadecyltrimethyl ammoniumbromide (HTAB), tetra-methylbenzidine (TMB), 1,2,3,6-tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[4-(1-methyl)phenyl]-2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamide (HC-030031), 4'-chloro-3-methoxycinnamanilide (BB-366791), dexamethasone, indomethacin, tween 20, tween 80, phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), diaminoethanetetraacetic acid (EDTA), serum albumin (BSA), acetonitrile, mifepristone and caffeic acid were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). Isoflurane (Baxter, São Paulo, Brazil), sodium acetate, acetone, absolute ethanol, acetic acid, formaldehyde (all from Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used. Nipagin® (Belga), Natrosol® QP 400 H (Farmaquímica), and Germal® (Delaware) were purchased from local suppliers.

Enzyme-linked immunoassays for IL-1 β , TNF- α or MIP-2 measurement were purchased from Peprotech (São Paulo, Brazil) and the colorimetric kits for alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glucose, urea, or creatinine were purchased from Labtest (Minas Gerais, Brazil).

2.2 Plant material and extractions

T. catharinensis leaves were collected in Bossoroca (Rio Grande do Sul State of Brazil) in January of 2014 (coordinates 28°65'93" S and 55°01'27" W). A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 12355. The leaves (1580.02 g) were dried and powdered in a knife mill, this material was macerated at room temperature with 70% ethanol for ten days with daily shake-up, and this solvent was renewed twice. After filtration the hydroalcoholic extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol, taken to complete dryness, obtained the crude extract.

2.3 *T. catharinensis* gels

The gels were prepared with Natrosols® 2.8 %; EDTA 0.10 %; Nigagin® 0.25 %; Germals® 0.25%; distilled water (q.s.p) and TcE in the concentrations of 3%. Briefly, the EDTA, Nipagin and distilled water were placed in a mortar to heat to 65 °C in hot plate. After the Natrosol was incorporated and then cool down to 40 °C, Germal and TcE were added previously dissolved in distilled water. The homogenization was performed with a pestle

during the whole process[19,49]. The base gel (without extract) was use in the group vehicle. The dexamethasone gel (0.5%) was used as positive control.

2.4 Accelerated stability study of *T. catharinensis* gel

The accelerated stability tests were conducted following the Guide of Stability to Cosmetic Products[50], with modifications. Organoleptic tests, measurements of pH, viscosity and quantification by HPLC of caffeic acid were the parameters analyzed in the gel containing 3% of TcE. In this evaluation three batches of each sample were stored and analyzed in triplicate at low temperature ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$), room temperature ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) and high temperature ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$). All tests (organoleptic, pH, viscosity, and quantification of caffeic acid) were performed at zero time, 7, 15, 30, 60, and 90 days after the gel preparation.

2.4.1 Organoleptic characteristics

The evaluations of the organoleptic characteristics were performed considering any change of color, smell and appearance. The samples were evaluated at the same temperature, lighting and packaging conditions.

2.4.2 Measurements of pH

One gram of each formulation was weighed and diluted with distilled water to 10 mL [49]. After it was homogenized, the pH measurements of the samples were performed at $25\pm 5^{\circ}\text{C}$ with a potentiometer (Digimed-DM-22), Digicrom Analytical, previously calibrated with buffer solutions of pH 4.0 and 7.0.

2.4.3 Viscosity analysis

The viscosity measurements were carried on viscometer (Brookfield DV-II Pro) with rotation of 20 rpm. This assay was performed on the samples at low temperature ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$), room temperature ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$) and high temperature ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) and the results were expressed in viscosity reduction (%).

2.4.4 Quantification of caffeic acid in *T. catharinensis* gels

High performance liquid chromatography (HPLC) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software. In

the formulations was quantified caffeic acid, major compound of the TcE previously described by Boligon et al. [42]. The gels were solubilized according with Piana et al. [49] method and carried out under isocratic conditions using a Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm particle size diameter particles; the mobile phase was solvent A = water:acetic acid (98:2, v/v) and solvent B = acetonitrile. The gradient program was started with 95% of A and 5% of B until 2 min and changed to obtain 25%, 40%, 50%, 60%, 70% and 80% B at 10, 20, 30, 40, 50 and 80 min, respectively, following the method described by [42]. The flow rate was 0.6 mL/min, injection volume was 40 µL and detection was performed at 327 nm.

2.5 Animals

Male adult Swiss mice (25-30 g) were kept at 22±2°C (60-80% humidity) under a 12 h/ light-dark cycle and with standard laboratory food and water *ad libitum*. The animals were habituated to the room experimental at least 1h before the experiments. All experiments were carried out between 8:00 a.m. and 5:00 p.m. and were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy) and all procedures were approved by Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process number 23081.018655/2014-91 and 5199270616/2016). The behavioral studies followed the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines [51] and the number of animals used in each experimental group was described in the figures and tables captions. After all *in vivo* procedures the animals were euthanized through intraperitoneal application of thiopental sodium (100 mg/kg) and lidocaine (10 mg/mL) until there is no corneal reflex. After that, the cervical dislocation was performed to ensure the euthanasia of animals. Animals were randomly assigned in different treatment groups and behavioral evaluations were performed blindly with respect to drug administration. The number of animals and intensity of stimuli was the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of treatments.

2.6 *In vivo* experimental design

2.6.1 *Treatments*

The TcE, fractions TcE-isolated and TcE gel formulations, the irritants agents and positive controls (dexamethasone, indomethacin, HC-030031 and SB-366791) were topically applied on the right ear of each mouse.

2.6.2 *Ear edema measurement*

Skin inflammation was induced by topical application of different irritants agents and the inflammatory process was assessed through ear edema formation. At the end of the stipulated period of exposure to each of irritants agents, the ear edema was quantified by the increase in ear thickness after the inflammatory stimuli. Ear thickness was evaluated before and at the edema maximal response for each irritant agent application using a digital micrometer (Digimess) in animals anesthetized with isoflurane [19,52]. The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges. The ear thickness was expressed in μm . To minimize variation, a single investigator performed the measurements throughout each experiment.

2.6.2.1 Arachidonic acid, cinnamaldehyde, capsaicin and phenol-induced acute ear edema

Acute skin inflammation was induced by single topical administration in the right mice ear of the following irritants agents (diluted in 20 μL acetone): arachidonic acid (AA; 100 $\mu\text{g}/\text{ear}$); cinnamaldehyde (4 $\mu\text{g}/\text{ear}$); capsaicin (200 $\mu\text{g}/\text{ear}$) and phenol 10% (v/v)[52,53]. The right ears were topically treated with 20 μL of TcE(0.0001-10 $\mu\text{g}/\text{ear}$ to AA, cinnamaldehyde and phenol) and (0.1- 10 $\mu\text{g}/\text{ear}$ to capsaicin) or with indomethacin 2000 $\mu\text{g}/\text{ear}$ (positive control to AA), HC-030031 36 $\mu\text{g}/\text{ear}$ (positive control to cinnamaldehyde), SB-366791 36 $\mu\text{g}/\text{ear}$ (positive control to capsaicin), or dexamethasone 100 $\mu\text{g}/\text{ear}$ (positive control to phenol). The treatments were also dissolved in acetone and applied immediately after the administration of irritants substances. The ear edema measurement was performed at 1h after AA and phenol, and 30 min after capsaicin and cinnamaldehyde application [8,52,53].

2.6.2.2 Croton oil-induced acute ear edema

Acute inflammation was induced by single topical application using 20 μL of croton oil (1000 $\mu\text{g}/\text{ear}$) in acetone in the right mice ear. Treatments were carried out dissolved in

acetone or gels formulations. The TcE or fractions TcE-isolated (dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate) (0.0001-10 µg/ear) and dexamethasone (positive control, 100 µg/ear) were dissolved in 20 µL acetone. Moreover, the TcE (0.01-3%) and dexamethasone 0.5% (positive control) were also incorporated in gel formulation (15 mg/ear) before its application. The treatments were performed immediately after administration of croton oil. The ear thickness was measured before and at 6h after the application of croton oil. Six hours after croton oil administration, the animals were euthanized and ear biopsies were taken for further analysis [19,54].

2.6.2.3 Croton oil-induced chronic ear edema

The chronic inflammation model was induced by multiple topical applications of croton oil (400 µg/ear) dissolved in acetone to the right ear, for nine alternated days. The TcE (10 µg/ear) and dexamethasone (100 µg/ear) were topically applied to each right ear (20 µL/ear) twice daily, starting on the fifth day until the ninth day of the experiment. The ear thickness was measured daily before or after treatment. At the last day of the trial the animals were euthanized and ear biopsies were taken for further analysis [8,55].

2.6.2.4 IL- β , TNF- α and MIP-2-induced acute ear edema

Acute inflammation was induced by single topical application of cytokines IL-1 β , TNF- α , or MIP-2 (10 ng/ear; 20 uL) in acetone in the right ear of mice. The TcE (10 µg/ear) was applied immediately after the cytokines administration. The ear edema measurement was performed at the time of greater edematogenic effect of the cytokines (at 1 h), as verified by previous studies. After 6 h of the cytokines application the animals were euthanized and ear samples were removed to evaluate myeloperoxidase (MPO) activity.

2.6.3 *Assessment of leukocyte infiltration*

2.6.3.1 Measurement of MPO activity

MPO is an enzyme found in cells of myeloid origin and has been used as a biochemical marker of polymorphonuclear (PMN) leukocyte and its activity is directly related to the amount neutrophil infiltrated in the injured tissue. MPO activity was determined as described previously [19,56]. After 6h (acute irritant contact dermatitis models) or 9th (final day of experiment; chronic irritant contact dermatitis model) of irritant agents application or irritants agents plus treatments administration was evaluated the MPO enzyme activity in the

ear samples. Tissue samples were homogenized with motor-driven homogenizer in acetate buffer (8 mM, pH 5.4) containing HTAB. The results were expressed as optical density (OD)/mL of sample [54].

2.6.3.2 Histology

Separate groups of mice were used to evaluate histological changes in animal's ear 6 h (acute irritant contact dermatitis models) or 9th (final day of experiment; chronic irritant contact dermatitis model) after irritant agents application or irritant agents plus treatments. Mice were euthanized and the right ear were removed and fixed in an alfac solution (16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40% and acetic acid. Each sample was embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m and stained with hematoxylin-eosin. A representative area was selected for qualitative and light microscopic with a 20x and 40x objectives to assess the inflammatory cellular response and to measure the epidermal thickness (μ m)[19,55,56]. To minimize a source of bias, the investigator did not know the group that they were analyzing.

2.6.4 Measurement of IL- β , TNF- α and MIP-2 levels

Six hours after topical irritant agents application, the animals were euthanized and the ear tissue was removed and placed in an 80 mM PBS (pH 7.4) solution containing: 0.5% Tween 20, 0.1 mM PMSF, 2mM EDTA and 0.1 % BSA. The tissue was homogenized, centrifuged at 16,000 xg at 4 °C for 10 min [57]. The supernatant obtained was used to determine the IL- β , TNF- α and MIP-2 levels using an enzyme-linked immunoassay kits (Peprotech, Brasil), according to the manufacturer's specifications. Using a curve plotted from standard solutions to each cytokine, the results were expressed as ng cytokine/mg protein.

2.6.5 Action mechanism of *T. catharinensis*

2.6.5.1 Western blot analysis

To verify the possible *T. catharinensis* involvement on NF- κ B transcription factor activation the ear tissues underwent to the acute topical application of croton oil and treatments, and 6h after the croton oil application the ear tissues were removed and evaluated by Western blot analyses. This analysis was carry out as described previously, with some modifications [58]. β -actin served as a loading control and anti-NF- κ B p65 phospho polyclonal primary antibody was used (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

The results were normalized to control group (anti-NF-kB) densitometry values and expressed as the relative amount of NF-kB p65 expression in comparison to naïve ears.

2.6.5.2 Anti-inflammatory activity of *T. catharinensis* by glucocorticoid receptors

To evaluate whether topical anti-inflammatory activity of *T. catharinensis* involves the glucocorticoid receptors, the animals were pre-treated with mifepristone (50 mg/kg, s.c), dissolved from 10% ethanol in saline, 15 min prior of the TcE (10 µg/ear) or dexamethasone (100 µg/ear) topical application. Ear thickness was determined before and 6 hours after the croton oil single application [59,60].

2.6.6 Assessment of possible adverse effects of *T. catharinensis*

2.6.6.1 Physical and behavioral toxicity parameters

Separate animals groups were topically treated every day for 14 days consecutive with TcE (10 µg/ear), dexamethasone (100 µg/ear) or acetone (vehicle; 20 µL/ear). The animals were kept in normal eating conditions (without hydro or food restriction). During trial, behavioral (irritability, salivation and tremors), physical (hair appearance, body and organ weight and gastric lesion), water and food consumption changes and body temperature and ear erythema formation, using a numerical score from 0 to 3, according the erythema severity [61,62].

2.6.6.2 Biochemical markers toxicity

The ALT and AST activities and glucose, urea and creatinine levels are used as indicators of liver, kidney and pancreas injury, respectively. Fourteenth day of the experiment, the animals were euthanized and blood samples were collected by cardiac punch. The AST, ALT activities and the glucose, urea and creatinine serum levels were assessed spectrophotometrically using Labtest® kits, according to the manufacture's specifications (LabtestDiagnostica, Brazil).

2.6.6.3 Open-field and rotarod test

Fourteenth day of experiment, to evaluate the possible nonspecific muscle relaxant or sedative effects of the treatments we examined spontaneous and forced motor coordination at the open-field and rotarod test, respectively [63]. In the open-field test, the open field apparatus consisted of a box, measuring (28x18x12 cm) with a floor that was divided into 15 identical areas. The animals were transferred to the apparatus and observed for 5 min. The

number of areas crossed with all paws (crossings) and the number of rearing responses were recorded. For rotarod test, the animals were in an apparatus (3.7 cm in diameter, 8 rpm) and were subjected to the rotarod. The number of falls from the apparatus was recorded for duration of 240s.

2.7 Statistic analysis

The results are presented as mean \pm standard error of mean (S.E.M) with exception of the inhibitory dose 50% (ID_{50}) values (dose required to reduce the responses of the treated groups by 50% relative to the control group), which are reported as geometric means plus their respective 95% confidence limits. The maximum inhibitory effect was calculated based on the response of the control groups. The statistical significance between the groups was assessed by one or two-way (repeated measures) analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Newman-Keuls or Bonferroni test. The $P < 0.05$ values denote significant difference between groups. All tests were carried out using GraphPad 5.0 Software (San Diego, CA, USA), and Image J software (epidermal thickness measure and PMN cells count). No statistical methods were used to predetermine sample sizes, but our sample sizes are similar to those reported in previous publications in the field.

3. Results

3.1 Accelerated stability study

No changes related to color, smell and appearance was detected in the TcE gels. The gels showed stable with respect to pH values (Table 1), these values remained between 5.42 and 5.02 at low temperature, 5.41 and 4.96 at room temperature and 5.41 and 4.87 at high temperature. Meanwhile, there was a loss of viscosity during the study in relation to time zero, this fact was expected, especially in the gels submitted to higher temperatures. Until 90 days, the loss of viscosity was $24.46 \pm 0.003\%$, $43.64 \pm 0.01\%$ and $65.4 \pm 0.03\%$ to low, room and high temperatures, respectively (Table 1).

In relation to quantity of the caffeic acid in the gels during the study, there was a relevant stability of this compound mainly of the gels subjected to low and room temperature, with degradation of only $7.89 \mu\text{g/g}$ (approximately 15%) and $8.88 \mu\text{g/g}$ (approximately 17%) at the end of the study, respectively, while, in high temperatures, there was a degradation of $10.91 \mu\text{g/g}$ (approximately 21%) at the same time of analysis (Table 2).

3.2 Effect of TcE on arachidonic acid, cinnamaldehyde, capsaicin and phenol-induced acute ear edema

To evaluate the effect of topical TcE application on acute skin inflammation *in vivo*, we performed the contact dermatitis model induced by different irritants agents. Topical application of the irritants agents promoted an increase in ear thickness when evaluated at 1h after the induction with phenol or AA and 30 min after cinnamaldehyde or capsaicin application presenting a maximum effect (E_{max}) of 114 ± 11 , 137 ± 13 , 129 ± 6 and $127 \pm 12 \mu\text{m}$ for AA, cinnamaldehyde, capsaicin and phenol, respectively. On the other hand, topical application of vehicle (acetone) alone did not change ear thickness (E_{max} of $23 \mu\text{m}$). However, TcE treatment caused a dose-dependent inhibition on irritants agents-induced ear edema when compared with control (only irritant agents) group. The TcE reduced ear edema at doses of 0.001 - $10 \mu\text{g/ear}$ for mice topically administered with AA (Fig. 1A), cinnamaldehyde (Fig. 2A) and phenol (Fig. 3A) with an ID_{50} value of 0.002 (0.0008 - 0.003) $\mu\text{g/ear}$, 0.061 (0.02 - 0.2) $\mu\text{g/ear}$ and 0.0009 (0.0005 - 0.002) $\mu\text{g/ear}$ and a maximum inhibition of 100% (at $10 \mu\text{g/ear}$), respectively. On the other hand, for mice topically administered with capsaicin, the TcE was able to decrease ear edema at doses of 0.1 - $10 \mu\text{g/ear}$ an ID_{50} value of 0.37 (0.21 - 0.67) $\mu\text{g/ear}$ and a maximum inhibition of $75 \pm 6\%$ (at $10 \mu\text{g/ear}$) (Fig. 4A). Indomethacin, HC-030031,

dexamethasone and SB-366791, used as positive controls, inhibited irritants agents-induced acute ear edema in 100% for indomethacin, HC-030031, and dexamethasone, or in $54\pm 6\%$ for SB-366791 (Fig. 1A, 2A, 3A and 4A).

To investigate the TcE effect on neutrophil infiltration, MPO activity was assessed. The irritants agents induced an increase on MPO activity when compared with vehicle and naïve group and TcE was able to reduce in a dose-dependent manner the neutrophil infiltration when compared with control group. The TcE decreased MPO activity at doses of 0.001-10 $\mu\text{g}/\text{ear}$ for mice topically administered with AA (Fig. 1B), cinnamaldehyde (Fig. 2B) and phenol (Fig. 3B) with a maximum inhibition of 100%, $96\pm 2\%$ and $87\pm 8\%$ (at 10 $\mu\text{g}/\text{ear}$), respectively. All the same, for mice topically administered with capsaicin, TcE decrease ear edema at doses of 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{ear}$ with a maximum inhibition of $48\pm 7\%$ (at 10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) (Fig. 4B). Moreover, indomethacin, HC-030031, dexamethasone and SB-366791 reduced neutrophil infiltration in $54\pm 5\%$, $42\pm 8\%$, $48\pm 4\%$ and $80\pm 4\%$, respectively (Fig. 1B, 2B, 3B and 4 B).

The development of the inflammatory reaction induced by irritants agents and the effect of TcE topical application was confirmed through histological changes in the ear tissue. Histological analysis of the ear tissue 6h after irritant agents application revealed a marked increase in the ear thickness, with clear evidence of edematous ears and inflammatory cells infiltration when compared with naïve group. Both events were remarkably reduced with TcE treatment (10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) in comparison to the irritant agents group and its effect was comparable to the positive controls (indomethacin, HC-030031, dexamethasone and SB-366791) (Fig. 1C, 2C, 3C and 4C). Moreover, the presence of inflammatory cells was also assessed quantitatively (Fig. 1D, 2D, 3D and 4D).

3.3 Effect of TcE, fractions TcE-isolated and TcE gel formulations on croton oil-induced acute ear edema

To advance the study of the topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis*, mice were topically treated with TcE, fractions TcE-isolated (dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate) dissolved in acetone or TcE incorporated in gel formulations. For this, we used well described croton oil-induced acute skin inflammation model. A single topical application of croton oil generated an increase in the ear thickness with an E_{max} of $144\pm 7 \mu\text{m}$ when measured at 6 h after its administration while topical application of vehicle (acetone) alone did not change significantly ear thickness. The TcE and fractions TcE-isolated (0.001-10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) reduced dose-dependent manner croton oil-induced acute ear edema, with an ID_{50} value of

0.006 (0.003-0.013), 0.061 (0.03-0.136), 0.002 (0.0006-0.005) and 0.001 (0.0004-0.004) $\mu\text{g}/\text{ear}$ and a maximum inhibition of 100%, 85 \pm 4 %, 83 \pm 6 % and 86 \pm 6 % to TcE and dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate fractions (at 10 $\mu\text{g}/\text{ear}$), respectively, when compared with the control (croton oil) group. Dexamethasone dissolved in acetone, used as positive control, inhibited croton oil-induced acute ear edema in 100% (Fig. 5A, 6A, 7A and 8A). Furthermore, the TcE gel (0.01-3%; 15 mg/ear) promoted a dose-dependent inhibition of ear acute edema induced by croton oil with a maximum inhibition of 96 \pm 3% (at 3%; 15 mg/ear), while dexamethasone gel reduced ear edema in 77 \pm 3% (Fig. 9 A).

We assessed the MPO activity at 6h after the croton oil single topical application which caused an increase neutrophil infiltration in the ear tissue when compared with the naïve group. TcE and its fractions dissolved in acetone (0.001-10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) decreased MPO activity with a maximum inhibition of 94 \pm 3%, 88 \pm 3%, 73 \pm 11% and 93 \pm 4% (at 10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) to TcE, dichloromethane, n-butanol and ethyl acetate fractions, respectively. Dexamethasone reduced the neutrophil infiltration in 100% (Fig. 5B, 6B, 7B and 8B). Moreover, TcE gel formulation reduced MPO activity in 61 \pm 9% while dexamethasone gel inhibited in 56 \pm 8% when compared with the control group (Fig. 9 B). Besides, histological analysis was performed and we observed that at 6h after croton oil administration the sections ears markedly showed ear edema and inflammatory cells infiltration when compared with the naïve group. The TcE and fractions TcE-isolated (10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) and TcE gel formulations (3%; 15 mg/ear) reduced both events when compared to control group and its effect was comparable to the dexamethasone (Fig. 5C, 6C, 7C, 8C and 9 C). Inflammatory cells on the ears sections were measured quantitatively (Fig. 5D, 6D, 7D, 8D and 9 D).

3.4 Effect of TcE on croton-oil-induced chronic ear edema

Since several skin diseases are considered chronic inflammatory disorders, we mimic a skin chronic inflammatory process to evaluate the anti-inflammatory effect of TcE in an ear edema model induced by repeated applications of croton oil. The multiple croton oil applications increased ear edema that stabilized on the 3rd day of application up to the last day of experiment (9th day), including also a significant increase and MPO activity assessed on the last day when compared with the vehicle group. Starting on the 5th day of experiment, topical TcE treatment decreased all parameters evaluated. The TcE (10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) reduced ear edema from first day of treatment, with a maximum inhibition of 66 \pm 6 % at the last day of experiment. The treatment also reduced MPO activity in 58 \pm 14% when compared with the croton oil plus vehicle group at the last day of experiment. Dexamethasone revealed an ear

edema inhibition from the first day of treatment and reduced MPO activity with a maximum inhibition of $70\pm 5\%$ and $84\pm 4\%$, respectively, at the last day of experiment (Fig. 10A and B). Moreover, we assessed histological changes on the ear tissue after chronic croton oil application. The repeated croton oil administration generated an intense ear edema, increased epidermal thickness (acanthosis) and inflammatory cells migration when compared with the vehicle group. The TcE and dexamethasone reduced these inflammatory parameters in comparison with croton oil plus vehicle group (Fig. 10 C). Epidermal thickness and inflammatory cells infiltration was analyzed quantitatively and presented in conformity with prior results (Fig. 10 D and 10 E).

3.5 Effect of TcE on cytokines-induced acute ear edema

T. catharinensis was effective in decreasing cytokines levels and inflammatory parameters (edema and neutrophil infiltration). The single topical application of IL-1 β , TNF- α and MIP-2 increased ear edema in 122 ± 5 , 125 ± 9 and 110 ± 11 μm , respectively, when compared with the vehicle (acetone) group. Moreover, all cytokines increased the MPO activity when compared with the naïve group. The TcE (10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) treatment significantly reduced ear edema with a maximum inhibition of $31\pm 10\%$ to MIP-2, $44\pm 6\%$ to TNF- α and $53\pm 8\%$ to IL-1 β and MPO activity in $62\pm 8\%$ to MIP-2, $10\pm 6\%$ to TNF- α and $38\pm 13\%$ to IL-1 β (data not shown).

3.6 Effect of TcE on IL-1 β , TNF- α and MIP-2 levels

Once *T. catharinensis* was effective in reducing inflammatory parameters, we investigated its effect on cytokines levels induced by different irritant agents. A single application of irritant agents increased the cytokines (IL-1 β , TNF- α and MIP-2) levels assessed at 6h after its topical applications when compared with the vehicle group. The TcE (10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) inhibited the increase of cytokines levels induced by different irritants agents (control groups), with a maximum inhibition of $98\pm 1\%$ to MIP-2, $67\pm 3\%$ to TNF- α and $96\pm 2\%$ to IL-1 β when induced by AA, $60\pm 7\%$ to MIP-2, $97\pm 1\%$ to TNF- α and $77\pm 9\%$ to IL-1 β when induced by croton oil, $91\pm 3\%$ to MIP-2, $71\pm 4\%$ to TNF- α and $78\pm 1\%$ to IL-1 β when induced by capsaicin, $64\pm 14\%$ to MIP-2, $36\pm 10\%$ to TNF- α and $54\pm 7\%$ to IL-1 β when induced by cinnamaldehyde and $80\pm 16\%$ to MIP-2, $86\pm 4\%$ to TNF- α and $93\pm 3\%$ to IL-1 β when induced by phenol (Table 3).

3.7 Evaluation of NF- κ B pathway in the TcE anti-inflammatory effect

In resting cells, NF- κ B dimers are kept inactive by association with inhibitory proteins of the I κ B family. Upon stimulation, I κ B kinase phosphorylates I κ B proteins, triggering their ubiquitination and proteasomal degradation, which allows NF- κ B dimers to accumulate in the nucleus and activate gene transcription [64]. To investigate the involvement of NF- κ B pathway regulation on TcE treatment, NF- κ Bp65 phosphorylated levels on ear tissue homogenates were analyzed. The croton oil induced a six fold increase in the NF- κ B p65 phosphorylation levels in ear tissues when compared with naïve and acetone. Although dexametasone treatment was able to prevent this increase in 84 \pm 6%, TcE treatment did not prevented croton oil induced NF- κ B increased expression (Fig. 11).

3.8 Evaluation of glucocorticoid-like effect of TcE

In other attempt to verify a possible TcE action mechanism, mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, was applied before treatments. Pre-treatment with mifepristone promoted no change on acute ear edema croton oil-induced. Moreover, only topical TcE and dexamethasone application inhibited the ear edema when compared with croton oil group. However, the mifepristone pre-treatment prevented the topical inhibitory effect of TcE and dexamethasone on ear edema, when compared to group treated with only TcE or dexamethasone, respectively (Fig. 12).

3.9 Effect of TcE on development of possible adverse effects

We also evaluated the development of possible adverse effects caused by TcE after 14 days of topical treatment. TcE does not cause body weight alterations of animals, while the dexamethasone caused a reduction of 21 \pm 3 % (P<0.001) of body weight of the animals, when compared with the vehicle group. Neither TcE nor dexamethasone promotes macroscopic changes or significant difference in liver, kidney and pancreas relative weights when compared with the vehicle group. However, dexamethasone only decreased spleen relative weight in 57 \pm 5% (P<0.01) in comparison with the vehicle group. Moreover, only dexamethasone topical treatment led a reduction in the water (30%) and feed (33%) consumption when compared with the vehicle group. During the experiment, TcE application did not generate behavioral and physical changes. On the other hand, dexamethasone caused hair appearance changes of the mice when compared with vehicle group. According with erythema score, the TcE did not promoted ear erythema formation (numerical score of zero) during 14 days. The TcE or dexamethasone administration did not induce significant mucosal

gastric lesion since presented similar scores to the vehicle group, corresponding to 0.0 (0.0-1.0), 0.0 (0.0-0.5) and 0.0 (0.0-1.0) lesion scores/stomach, respectively. Besides that, the animals treated with TcE or dexamethasone did not present body temperature changes when compared with the vehicle group (data not shown).

To investigate if *T. catharinensis* alters spontaneous and forced locomotor activity of animals we performed the open-field and rotarod tests, respectively. Neither TcE nor dexamethasone alter the number of falls in the rotarod test (data not shown) and number of crossings or rearing responses in the open-field test (Table 4) when compared with the vehicle group. Furthermore, biochemical markers toxicity were analyzed through AST and ALT activity and glucose, urea and creatinine levels evaluation. The TcE did not alter none biochemical parameter evaluated whereas dexamethasone caused an increase in glucose levels when compared with the vehicle group (Table 4).

4. Discussion

Irritant contact dermatitis is a nonimmunologic inflammatory reaction triggered by a toxic insult to epidermal cells, mostly keratinocytes. The irritant substances cause a local skin inflammation and penetrate the outer layer of the skin [65]. Irritancy may result from disruption of the lipid bilayers of the epidermis that lead to excessive water loss and skin penetration by the irritant itself. Thus, perturbation of the skin barrier is thereby implicated in many skin diseases and thought to be a major player in the induction of irritant contact dermatitis [66,67].

The application of ear edema models in mice induced by different irritant agents has been widely used to identify the probable topical anti-inflammatory effect of the substances or natural products in different studies and suggest their possible mechanisms of action[2,68]. In the present investigation, we verified that *T. catharinensis* presented topical anti-inflammatory effect in irritant contact dermatitis models induced by irritant agents, sustaining its traditional use in folk medicine as topical anti-inflammatory in the cutaneous inflammatory disorders treatment. Furthermore, this anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* seems to be glucocorticoid receptor-dependent. Moreover, *T. catharinensis* proved to be safe, since did not promote adverse effects after its repeated application.

Plants can be an important source of biologically active natural products and are considered a promising avenue for drug discovery which involves a multidisciplinary approach combining botanical, ethnobotanical, phytochemical and biological technique[60,69].The basic idea is to use medicinal plants to develop the standardized phytomedicines (phytotherapics or herbal medicine) with proved efficacy (assessed by both pre-clinical and clinical studies), safety and high quality [70]. Different combinations of substances are essential for the biological activity of phytochemicals. The pharmacological action of herbal medicines can be due to the synergy between several phytochemicals compounds present in plants extracts, but not only by majority phytochemical component of the plant[71].

Moreover, the search for new anti-inflammatory agents from the huge array of medicinal plant resources is intensifying. In this perspective, previous studies already identified the HPLC profile of crude extract and fractions of *T. catharinensis* leaves which presents flavonoids (rutin, quercetin and kaempferol), indolic alkaloids and phenolic acids (gallic, caffeic and chlorogenic) [42,46]. It is well established the anti-inflammatory activity of these compounds, including in cutaneous inflammation [32,69,72–75].

In the first step we evaluated the efficacy of the TcE (dissolved in acetone) in acute skin inflammation models. TcE presented potent topical anti-inflammatory activity against different irritant agents (capsaicin, cinnamaldehyde, AA, phenol and croton oil), confirming reports of the folk medicine.

Acute inflammatory responses involve complex molecular, cellular and physiological alterations. It begins with local haemodynamic events associated with production of soluble mediators (chemokines, cytokines and eicosanoids) by resident cells in the damaged tissue, with consequent edema formation and infiltration of leukocytes in the injured tissue [9,55]. The topical application of the different irritant agents increased all inflammatory parameters evaluated (edema, leukocytes infiltration and cytokines levels) in the inflamed skin from animals ears. Increased skin thickness is a parameter indicative of edema formation and swelling within the dermis and it is often the first hallmark to subsequent steps on local inflammation[27]. As first evidence, the TcE reduced the ear edema induced by irritant agents. These findings demonstrate the relevant topical anti-edematogenic effect of TcE in different acute irritant contact dermatitis models and indicate a possible application as an herbal medicine to be used on skin inflammatory disease in humans.

Furthermore, inflammatory skin diseases are characterized by intense neutrophil infiltration. The PMN cells do not appear in unperturbed skin, but constitute the first defense line to emerge during the skin inflammation [7,8,76]. MPO enzyme activity is considered as a direct marker of neutrophil infiltration and its inhibition is an indicator of anti-inflammatory action [19,54]. In our results, it was evidenced that TcE decreased the MPO activity, indicating a possible reduction in neutrophil infiltration during the skin inflammation. Moreover, the histological analysis confirmed that TcE and the positive controls (HC-030031, SB-366791, indomethacin, and dexamethasone) reduced the PMN influx in the mice ear tissue.

Inflammation is implicated in the pathogenesis of ICD. The production of pro-inflammatory cytokines by keratinocytes in response a skin barrier disruption is the onset to develop ICD [15,77]. It has become quite clear that exposure to various irritants exerts toxic effects on keratinocytes, activating innate immune system with release of TNF- α , IL-1 β , IL-8, and IL-6. In turn, the cytokines activate Langerhans cells, dermal dendritic cells and endothelial cells which contribute to inflammatory cells recruitment, including neutrophils and lymphocytes which further, amplify the inflammatory cascade[78,79].

TNF- α and IL-1 β not only amplify the inflammatory cascade and cause inflammatory injury but also it recruit neutrophils to the damaged tissue[23]. Neutrophils are one of the

cellular source of MIP-2, a functional homolog of human IL-8, besides also to secrete TNF- α and IL-1 β . Moreover, TNF- α , IL-1 β and MIP-2 may modulate recruitment of additional neutrophils during skin inflammation[80,81]. According these evidences we verified that TcE reduced the MIP-2, TNF- α and IL-1 β levels in acute skin inflammation models induced by irritant agents which explains its effects on infiltration of inflammatory cells and thus on edema.

The first step to irritant contact dermatitis development is the contact of the irritant agents and consequent disruption of skin barrier. This event promotes the activation of resident cells (keratinocytes) leading a production and release of pro-inflammatory mediators. It results in the edema development and migration of PMN leucocytes to damage tissue [53,66]. The TcE treatment reduced these inflammatory parameters in all skin inflammation models studied. Clinically several therapies have been developed to treat various skin inflammatory diseases[62,82,83]. However, it focus is mainly on the inhibition of one specific cytokine [27,83].

Thus, treatments that act in multiple cytokines pathways would be better therapies for skin disorders. Together our results demonstrate that *T. catharinensis* could be a potent and effective treatment of skin inflammatory conditions, such as irritant contact dermatitis, since not only reduced the edema and inflammatory cells infiltration but also the multiple cytokines release.

Since the TcE presents topical anti-inflammatory effect in acute irritant contact dermatitis models, the second step was to evaluate whether TcE incorporated in gel formulations exert anti-inflammatory action in an acute irritant contact dermatitis model induced by croton oil. Firstly, we evaluated the TcE gel stability, since incompatibilities may occur between the excipients and the active principle, mainly after the addition of plants extract. It is important to know about the relationship between extract substances and formulation excipients, since the instability of the gel preparation modifies requisites, such as quality, efficacy and safety and this is not desired[49].

After the incorporation of TcE in the gels, the pH values were stable and compatible with the physiological pH value (4.6-5.8) [84].The slight pH reduction (below of skin pH value; 5,5) of the TcE gel may be favorable in the healing process, since the acid mantle has a number of functions, including antimicrobial defense and restriction of inflammation by inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines[85].The temperature is one of the most important factors that affects or interferes with the viscosity of a formulation or system, as well as the different molecules present in the extract[49]. Additionally, the high temperature

condition caused higher percentage of reduction of the viscosity when compared with low and room temperature, but not its suitable spreadability. Recently, Piana et al. [49] showed a decrease in viscosity of the gel after incorporation of *Viola tricolor* crude extract when submitted to high temperature, especially after the 60 days. Our results on stability studies corroborate with those found by Piana et al. [49].

Furthermore, a small degradation of the phytochemical marker was verified as indicative factor of formulation stability reduction. The phytochemical marker (caffeic acid) showed adequate stability during the 90 days of the study, mainly in low and room temperature, while that the greater degradation occurred in high temperature. The degradation of compounds can have occurred due to association of large amount of water in gels formulations submitted to high temperatures which promotes an extensive hydrolysis reaction, contributing to the active substances degradation[49]. Moreover, the temperature has a strong influence on polyphenols stability[86].

Ear edema induced by croton oil is a method widely used to evaluate the skin inflammatory process and to identify potentials anti-inflammatory agents to treat skin disorders [87]. Several different pathways are stimulated by croton oil and anti-inflammatory drugs with distinct action mechanisms may respond effectively to this model [12,88].

Croton oil is an irritant agent which contains phorbol esters, mainly the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), which is a potent activator of the protein kinase C (PKC). It activates both enzymatic groups, such as MAPK and phospholipase A₂ (PLA₂) as transcription factor NF- κ B and the activating protein-1 (AP-1), being essentials for the activation of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , TNF- α , MIP-2, and consequent maintenance of skin inflammation [12,78,89,90].

Croton oil single application promotes an acute inflammatory process characterized by vasodilatation, edema and PMN leucocytes infiltration. Furthermore, skin neutrophil accumulation plays a critical role in cutaneous inflammation disorders, such as irritant contact dermatitis [19,55,91]. Here, we observed that the TcE gel reduced both edema and neutrophil infiltration (measure by MPO activity and confirmed by histological procedure). Thus, our results demonstrated that TcE has topical anti-inflammatory effect even when prepared in a gel formulation with greater effectiveness than dexamethasone gel.

The phytochemical profile of *T. catharinensis* leaves is widely known and due to its great diversity of bioactive constituents, the topical anti-inflammatory activity of TcE may be attributed to synergism between diverse anti-inflammatory compounds. Studies have reported that the presence of flavonoids, phenolic acids, alkaloids and terpenoids may synergistically

act as anti-inflammatory [25,69,74]. Moreover, the interaction of the activities of compounds found in plant extracts may result in the potentiation of the activity of each compounds by the others [87].

We evaluated the anti-inflammatory effect of different fractions isolated from TcE leaves to determine if some majority chemical constituents present them would be mostly responsible for the topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis*. Our results showed similar anti-inflammatory activities of the fractions TcE-isolated. It corroborates its effect is assigned to synergism between the chemical compounds of *T. catharinensis* or by the presence of phenolic acids (gallic, phenolic and chlorogenic acids) or total alkaloids since its constituents are expressively presents in all fractions of *T. catharinensis* evaluated[42].

We also verified the topical anti-inflammatory effect of TcE in a chronic irritant contact dermatitis model induced by croton oil. The multiple topical application of croton oil is a tool to assess the response of anti-inflammatory and anti-proliferative compounds on an established chronic inflammatory skin process, characterized by edema, intense neutrophilic infiltration, T cells (CD4⁺ and CD8⁺) migration and hyperproliferative epidermis (acanthosis)[2,8]. The TcE inhibited the ear edema and MPO activity induced by multiple application of croton oil, demonstrating to be also useful in the suppression of already installed inflammation. The histological analyses of ear tissue sections obtained from chronic model confirmed the anti-inflammatory effect of TcE, since it demonstrated reduction of dermis thickness (edema), epidermal hyperplasia (keratinocytes hyperproliferation) and leukocytes infiltration.

These findings provide better understanding of the possible pharmacological mechanisms of *T. catharinensis* used for the treatment of inflammatory skin diseases. Since effective in acute and chronic skin inflammation models croton oil-induced, it suggests that anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* may be due to different mechanisms. To explore the underlying mechanisms by which the *T. catharinensis* exhibits its topical anti-inflammatory effect, we evaluated its influence on the NF-κB pathway inhibition.

The NF-κB pathway may be activated in response to a variety of factors, including pro-inflammatory cytokines, pathogens, oxidative stress, and growth factors, antigen receptors, MAPK and others kinases [92,93]. Its activation and consequent translocation to the nucleus is responsible to control several pro-inflammatory mediators, such as MIP-2, TNF-α, IL-1β, IL-6, and others [22,80,94].

Regarding this, an effective blockade of this inflammatory pathway might be an essential target for the development of therapeutic agents. The topical treatment with TcE,

evaluated in a croton oil-induced acute irritant contact dermatitis model, did not prevent the activation of NF- κ B pathway. Taken together, this results suggest that amelioration of croton oil-induced irritant contact dermatitis by *T. catharinensis* might be, at least in part, due inhibition of cytokines release or production, but in NF- κ B-independent manner [8,12,27,95].

There is a growing search for new topical anti-inflammatory agents more effective and safer than the topical anti-inflammatory drugs currently used. In this context, plants-related compounds and extracts represent a promising alternative for the treatment acute and chronic inflammatory skin disorders [96,97]. Here, we also observed that the pre-treatment with the glucocorticoid receptor antagonist mifepristone prevented the inhibitory effect of TcE and dexamethasone on ear edema croton oil-induced. It suggests that TcE exerts a glucocorticoid-like effect. The interaction with glucocorticoid receptors explains both topical anti-inflammatory and antiproliferative effects of TcE, since glucocorticoids are commonly used as antiproliferative and anti-inflammatory agents in cutaneous inflammatory disorders therapy.

Several therapeutic agents including topical glucocorticoids and non-steroid anti-inflammatory drugs are available for suppressing the production of pro-inflammatory mediators as a treatment against the initiation and progression of contact dermatitis, but these agents often lack durable effect and its uncontrolled use are associated with adverse effects local and systemic development, such as skin problems[31,33,96].

Moreover, plants used as alternative therapeutic to several diseases, including skin inflammatory diseases, can also cause health problems if they are indiscriminately used and without pharmacological or toxicity accurate information [98,99]. Although the effectiveness is proven, their safety might also be established. The topical anti-inflammatory treatment with TcE proved to be safe. Here, we observed that the TcE did not change in body and vital organs weight, suggesting the lack toxic effect in this respect. However, the treatment with dexamethasone reduced the spleen and body weight. Reductions in body weight gain and internal organ weights are simple and sensitive indices of toxicity after exposure to toxic substances[100].

Furthermore one of the most common adverse effects of traditional NSAIDs is the induction of peptic ulcers[101]. The topical application of TcE did not caused gastric mucosal damage and did not alter the parameters biochemical (ALT and AST activities and creatinine, urea and glucose levels) and locomotors (rotarod and open-field test). However, the dexamethasone treatment increase the glucose levels, since it alters the carbohydrates metabolism, due insulin resistance, hyperinsulinemia and hyperglycemia induction [102].

Although the topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* to be glucocorticoid receptors-dependent, it proved to be more potent and safer than dexamethasone glucocorticoid, since TcE did not present the same adverse effects caused by dexamethasone.

5. Conclusion

Knowing the popular use of *Tabernaemontana catharinensis* as a topical treatment for skin problems and lesions, and based on preliminary study about its anti-inflammatory activity, it possible sustain its folk usage, since *T. catharinensis* reduced inflammatory parameters in acute and chronic irritant contact dermatitis models without cause adverse effects.

Our results suggest that formulations containing *T. catharinensis* can be effective as a topical anti-inflammatory to treat skin disorders. However, it is necessary to investigate others possible action mechanism by which *T. catharinensis* crude extract exerts its topical anti-inflammatory effect.

Acknowledgments

We thank the professor of the Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry (Federal University of Santa Maria), Vera Morsh, for loaning equipments. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (process number 401437/2014-0), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (Brazil) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul—FAPERGS (process number 16/2551-0000281-9). We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

Author Contributions

Participated in research design: C.C., J.F., S.M.O.

Conducted experiments: C.C., I.B., C.R.S., S.M.O.

Plant material and extractions, gels preparation, accelerated stability study, data analysis, writing and discussion of these: M.P., A.A.B.

Performed data analysis: C.C., C.R.S., S.M.O.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: C.C., I.B., C.R.S., D.A.C., G.T., J.F., S.M.O.

All the authors reviewed the manuscript.

References

- [1] E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen, The skin: An indispensable barrier, *Exp. Dermatol.* 17 (2008) 1063–1072. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
- [2] R.A. Saraiva, M.K.A. Araruna, R.C. Oliveira, K.D.P. Menezes, G.O. Leite, M.R. Kerntopf, J.G.M. Costa, J.B.T. Rocha, A.R. Tom??, A.R. Campos, I.R.A. Menezes, Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents, *J. Ethnopharmacol.* 136 (2011) 504–510. doi:10.1016/j.jep.2010.07.002.
- [3] M. Pasparakis, I. Haase, F.O. Nestle, Mechanisms regulating skin immunity and inflammation., *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 289–301. doi:10.1038/nri3646.
- [4] P. Di Meglio, G.K. Perera, F.O. Nestle, The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function, *Immunity.* 35 (2011) 857–869. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.003.
- [5] A. Nicolaou, Eicosanoids in skin inflammation, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 88 (2013) 131–138. doi:10.1016/j.plefa.2012.03.009.
- [6] B. Malissen, S. Tamoutounour, S. Henri, The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin., *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 417–28. doi:10.1038/nri3683.
- [7] C. Bangert, P.M. Brunner, G. Stingl, Immune functions of the skin, *Clin. Dermatol.* 29 (2011) 360–376. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.01.006.
- [8] C.D.D.S. Horinouchi, D.A.G.B. Mendes, B.D.S. Soley, E.F. Pietrovski, V.A. Facundo, A.R.S. Santos, D.A. Cabrini, M.F. Otuki, *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent, *J. Ethnopharmacol.* 145 (2013) 311–319. doi:10.1016/j.jep.2012.10.064.
- [9] J.N. Fullerton, D.W. Gilroy, Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier, *Nat. Rev. Drug Discov.* advance on (2016). doi:10.1038/nrd.2016.39.
- [10] D. Slodownik, A. Lee, R. Nixon, Irritant contact dermatitis: A review, *Australas. J. Dermatol.* 49 (2008) 1–11. doi:10.1111/j.1440-0960.2007.00409.x.
- [11] M.J. Visser, L. Landeck, L.E. Campbell, W.H.I. McLean, S. Weidinger, F. Calkoen, S.M. John, S. Kezic, Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis, *Br. J. Dermatol.* 168 (2013) 326–332. doi:10.1111/bjd.12083.
- [12] N.D.C.C. Pinto, D.C. Machado, J.M. da Silva, J.L.M. Conegundes, A.C.M. Gualberto, J. Gameiro, L. Moreira Chedier, M.C.M.N. Castañon, E. Scio, *Pereskia aculeata* miller

- leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis., *J. Ethnopharmacol.* 173 (2015) 330–337. doi:10.1016/j.jep.2015.07.032.
- [13] F. Seyfarth, S. Schliemann, D. Antonov, P. Elsner, Dry skin, barrier function, and irritant contact dermatitis in the elderly, *Clin. Dermatol.* 29 (2011) 31–36. doi:10.1016/j.clindermatol.2010.07.004.
- [14] L. Landeck, M. Visser, S. Kezic, S.M. John, Impact of tumour necrosis factor-?? polymorphisms on irritant contact dermatitis, *Contact Dermatitis.* 66 (2012) 221–227. doi:10.1111/j.1600-0536.2011.02045.x.
- [15] M. Yeom, S.H. Kim, B. Lee, J.J. Han, G.H. Chung, H.D. Choi, H. Lee, D.H. Hahm, Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear, *J. Dermatol. Sci.* 67 (2012) 101–110. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.05.009.
- [16] S. Meller, A.I. Lauerma, F.M. Kopp, F. Winterberg, M. Anthoni, A. Müller, M. Gombert, A. Haahtela, H. Alenius, J. Rieker, M.C. Dieu-Nosjean, R.C. Kubitzka, E. Gleichmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik, B. Homey, Chemokine responses distinguish chemical-induced allergic from irritant skin inflammation: Memory T cells make the difference, *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (2007) 1470–1480. doi:10.1016/j.jaci.2006.12.654.
- [17] K. Ouwehand, R.J. Scheper, T.D. De Gruijl, S. Gibbs, Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 2026–2034. doi:10.1002/eji.200940150.
- [18] E. Hauge, H. Christiansen, C. Rosada, E. De Darkó, T.N. Dam, K. Stenderup, Topical valrubicin application reduces skin inflammation in murine models, *Br. J. Dermatol.* 167 (2012) 288–295. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10964.x.
- [19] M. Piana, C. Camponogara, A.A. Boligon, M.M. Machado, T.F. De Brum, S.M. Oliveira, L. De Freitas Bauermann, Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves, *J. Ethnopharmacol.* 179 (2016) 16–21. doi:10.1016/j.jep.2015.12.036.
- [20] P. Cohen, Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 309–315. doi:10.1038/nrd773.
- [21] S. Ghosh, M.S. Hayden, New regulators of NF-kappaB in inflammation., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 837–848. doi:10.1038/nri2423.
- [22] M. Guma, D. Stepniak, H. Shaked, M.E. Spehlmann, S. Shenouda, H. Cheroutre, I. Vicente-Suarez, L. Eckmann, M.F. Kagnoff, M. Karin, Constitutive intestinal NF-κB

- does not trigger destructive inflammation unless accompanied by MAPK activation., *J. Exp. Med.* 208 (2011) 1889–900. doi:10.1084/jem.20110242.
- [23] L.W. Soromou, N. Chen, L. Jiang, M. Huo, M. Wei, X. Chu, F.M. Millimouno, H. Feng, Y. Sidime, X. Deng, Astragalin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF- κ B signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 (2012) 256–261. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.005.
- [24] G.F. Passos, R. Medeiros, R. Marcon, A.F.Z. Nascimento, J.B. Calixto, L.F. Pianowski, The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 698 (2013) 413–420. doi:10.1016/j.ejphar.2012.10.019.
- [25] F. Siddiqui, S. Naqvi, L. Abidi, S. Faizi, Lubna, L. Avesi, T. Mirza, A.D. Farooq, *Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 182 (2016) 221–234. doi:10.1016/j.jep.2016.02.016.
- [26] Y.F. Xian, Q.Q. Mao, S.P. Ip, Z.X. Lin, C.T. Che, Comparison on the anti-inflammatory effect of Cortex *Phellodendri Chinensis* and Cortex *Phellodendri Amurensis* in 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate- induced ear edema in mice, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 1425–1430. doi:10.1016/j.jep.2011.08.014.
- [27] G. Kalyan Kumar, R. Dhamotharan, N.M. Kulkarni, M.Y.A. Mahat, J. Gunasekaran, M. Ashfaque, Embelin reduces cutaneous TNF- α level and ameliorates skin edema in acute and chronic model of skin inflammation in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 662 (2011) 63–69. doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.037.
- [28] B.S. Simpson, X. Luo, M. Costabile, G.E. Caughey, J. Wang, D.J. Claudie, R.A. McKinnon, S.J. Semple, Polyandric acid A, a clerodane diterpenoid from the australian medicinal plant *dodonaea polyandra*, attenuates pro-inflammatory cytokine secretion in vitro and in vivo, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 85–91. doi:10.1021/np400704b.
- [29] Y.-C. Oh, Y.H. Jeong, W.-K. Cho, J.-H. Ha, S.-J. Lee, J.Y. Ma, Inhibitory Effects of *Epimedium* Herb on the Inflammatory Response In Vitro and In Vivo, *Am. J. Chin. Med.* 43 (2015) 953–968. doi:10.1142/S0192415X1550055X.
- [30] S.H. Roth, Coming to terms with nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy, *Drugs.* 72 (2012) 873–879. doi:http://dx.doi.org/10.2165/11633740-000000000-00000.
- [31] A. Unzueta, H.E. Vargas, Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced hepatotoxicity, *Clin. Liver Dis.* 17 (2013) 643–656. doi:10.1016/j.cld.2013.07.009.
- [32] K.M. Lim, S.J. Bae, J.E. Koo, E.S. Kim, O.N. Bae, J.Y. Lee, Suppression of skin

- inflammation in keratinocytes and acute/chronic disease models by caffeic acid phenethyl ester, *Arch. Dermatol. Res.* 307 (2015) 219–227. doi:10.1007/s00403-014-1529-8.
- [33] X. Xiao, H. Xie, D. Jian, Y. Deng, X. Chen, J. Li, Rebounding triad (severe itching, dryness and burning) after facial corticosteroid discontinuation defines a specific class of corticosteroid-dependent dermatitis, *J. Dermatol.* 42 (2015) 697–702. doi:10.1111/1346-8138.12877.
- [34] S. Bacchi, P. Palumbo, A. Sponta, M.F. Coppolino, Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : A Review, (2012) 52–64.
- [35] J. Lee, Y.Y. Choi, M.H. Kim, J.M. Han, J.E. Lee, E.H. Kim, J. Hong, J. Kim, W.M. Yang, Topical Application of *Angelica sinensis* Improves Pruritus and Skin Inflammation in Mice with Atopic Dermatitis-Like Symptoms, *J Med Food.* 19 (2016) 98–105. doi:10.1089/jmf.2015.3489.
- [36] R. Medeiros, M.F. Otuki, M.C.W. Avellar, J.B. Calixto, Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Eur. J. Pharmacol.* 559 (2007) 227–235. doi:10.1016/j.ejphar.2006.12.005.
- [37] B. Ibrahim, A. Sowemimo, A. Van Rooyen, M. Van De Venter, Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae), *J. Ethnopharmacol.* 141 (2012) 282–289. doi:10.1016/j.jep.2012.02.032.
- [38] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, *J. Nat. Prod.* 75 (2012) 311–335. doi:10.1021/np200906s.
- [39] Y. Pyee, H.J. Chung, T.J. Choi, H.J. Park, J.Y. Hong, J.S. Kim, S.S. Kang, S.K. Lee, Suppression of inflammatory responses by handelin, a guaianolide dimer from *chrysanthemum boreale*, via downregulation of NF-kappaB signaling and pro-inflammatory cytokine production, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 917–924. doi:10.1021/np4009877.
- [40] X.L. Hou, Q. Tong, W.Q. Wang, C.Y. Shi, W. Xiong, J. Chen, X. Liu, J.G. Fang, 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.* 78 (2015) 1689–1696. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00275.
- [41] A.A. Boligon, M. Athayde, Phytochemical and Investigation and Cytotoxic Properties

- of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Cultivated in Brazil, *Res. J. Phytochem.* 6 (2012) 127–131.
- [42] A.A. Boligon, M. Piana, T.F. Kubiça, D.N. Mario, T.V. Dalmolin, P.C. Bonez, R. Weiblen, L. Lovato, S.H. Alves, M.M.A. Campos, M.L. Athayde, HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC, *J. Appl. Biomed.* 13 (2015) 7–18. doi:10.1016/j.jab.2014.01.004.
- [43] E.L.G. Veronese, L.E. Esmeraldino, A.P.F. Trombone, A.E. Santana, G.H. Bechara, I. Kettelhut, A.C.O. Cintra, J.R. Giglio, S. V. Sampaio, Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae), *Phytomedicine.* 12 (2005) 123–130. doi:10.1016/j.phymed.2003.07.010.
- [44] R.C. Gomes, A.C. Neto, V.L. Melo, V.C. Fernandes, G. Dagrava, W.S. Santos, P.S. Pereira, L.B. Couto, R.O. Belebony, Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Tabernaemontana catharinensis*, *Pharm. Biol.* 47 (2009) 372–376. doi:10.1080/13880200902753239.
- [45] M.R.F. Medeiros, L.A. de M. Prado, V.C. Fernandes, S.S. Figueiredo, J. Coppede, J. Martins, G.M.L. Fiori, N.M. Martinez-Rossi, R.O. Belebony, S.H.T. Contini, P.S. Pereira, A.L. Fachin, Antimicrobial activities of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*., *Nat. Prod. Commun.* 6 (2011) 193–196.
- [46] A.A. Boligon, R.B. de Freitas, T.F. de Brum, M. Piana, B.V. Belke, J.B.T. da Rocha, M.L. Athayde, Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC, *Free Radicals Antioxidants.* 3 (2013) 77–80. doi:10.1016/j.fra.2013.05.007.
- [47] M. Piana, A.A. Boligon, T.F. De Brum, M. Zadra, B. V. Belke, A.L.F. Froeder, J.K. Frohlich, L.T. Nunes, L. Pappis, A.A. Boligon, M.L. Athayde, Phytochemical analysis and antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches, *An. Acad. Bras. Cienc.* 86 (2014) 881–888. doi:10.1590/0001-3765201420120020.
- [48] E. da Silva Brum, L. da Rosa Moreira, A.R.H. da Silva, A.A. Boligon, F.B. Carvalho, M.L. Athayde, R. Brandão, S.M. Oliveira, *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice, *J. Ethnopharmacol.* 191 (2016) 115–124. doi:10.1016/j.jep.2016.06.036.
- [49] M. Piana, M.A. Silva, G. Trevisan, T.F. De Brum, C.R. Silva, A.A. Boligon, S.M.

- Oliveira, M. Zadra, C. Hoffmeister, M.F. Rossato, R. Tonello, L.V. Laporta, R.B. De Freitas, B.V. Belke, R. Da Silva Jesus, J. Ferreira, M.L. Athayde, Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study, *J. Ethnopharmacol.* 150 (2013) 458–465. doi:10.1016/j.jep.2013.08.040.
- [50] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, 2004.
- [51] J.C. McGrath, G.B. Drummond, E.M. McLachlan, C. Kilkenny, C.L. Wainwright, Editorial: Guidelines for reporting experiments involving animals: The ARRIVE guidelines, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 1573–1576. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00873.x.
- [52] C.R. Silva, S.M. Oliveira, M.F. Rossato, G.D. Dalmolin, G.P. Guerra, A.D.S. Prudente, D.A. Cabrini, M.F. Otuki, E. André, J. Ferreira, The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice, *Life Sci.* 88 (2011) 1077–1087. doi:10.1016/j.lfs.2011.03.017.
- [53] F.S. Ferreira, S. V. Brito, R.A. Saraiva, M.K.A. Araruna, I.R.A. Menezes, J.G.M. Costa, H.D.M. Coutinho, W.O. Almeida, R.R.N. Alves, Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*, *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 514–520. doi:10.1016/j.jep.2010.05.041.
- [54] T.F. de Brum, C. Camponogara, R. da Silva Jesus, B.V. Belke, M. Piana, A.A. Boligon, F.B. Pires, S.M. Oliveira, M.B. da Rosa, L. de Freitas Bauermann, Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves, *J. Ethnopharmacol.* 193 (2016) 60–67. doi:10.1016/j.jep.2016.07.075.
- [55] M. Adami, A. da S. Prudente, D.A.G.B. Mendes, C.D. da S. Horinouchi, D.A. Cabrini, M.F. Otuki, Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions, *J. Dermatol. Sci.* 66 (2012) 127–135. doi:10.1016/j.jdermsci.2012.02.015.
- [56] S.M. Oliveira, C.R. Silva, A.P. Wentz, G.R. Paim, M.S. Correa, H.G. Bonacorso, A.S. Prudente, M.F. Otuki, J. Ferreira, Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1- tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124 (2014) 396–404. doi:10.1016/j.pbb.2014.07.005.
- [57] C.I.B. Walker, G. Trevisan, M.F. Rossato, C.R. Silva, F. V. Pinheiro, C. Franciscato, E. Tatsch, M.B. Moretto, M.D. Silva, M.P. Manfron, R. Noal Moresco, A.R.S. Santos,

- M.E. Pereira, J. Ferreira, Antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* on acute and chronic pain models in mice, *J. Ethnopharmacol.* 149 (2013) 685–693.
doi:10.1016/j.jep.2013.07.027.
- [58] C.R. Silva, S.M. Oliveira, C. Hoffmeister, V. Funck, G.P. Guerra, G. Trevisan, R. Tonello, M.F. Rossato, J.B. Pesquero, M. Bader, M.S. Oliveira, J.J. McDougall, J. Ferreira, The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents., *Ann. Rheum. Dis.* 75 (2014) 260–8. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205739.
- [59] C.J. Whelan, S.C. Hughes, G.P.A. Wren, Inhibition of some aspects of acute inflammation of guinea-pig lung by intraperitoneal dexamethasone and mifepristone: Demonstration of agonist activity of mifepristone in the guinea-pig, *Inflamm. Res.* 44 (1995) 131–138. doi:10.1007/BF01782024.
- [60] D.A.G.B. Mendes, B.D.S. Soley, A.D.S. Prudente, G. Sponchiado, B.G.A. Ferreira, M.C. dos Santos, A.S.M. de Andrade, C.D.M. Amorim, T.M.B. Bresolin, C. Meyre-Silva, K.C. Zuffellato-Ribas, J. Assreuy, M.F. Otuki, D.D.A. Cabrini, Hydroalcoholic extract of *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax displays potent anti-inflammatory activities through a glucocorticoid receptor-dependent pathway, *Phytomedicine.* 23 (2016) 1610–1620. doi:10.1016/j.phymed.2016.10.003.
- [61] A.R.H. Da Silva, L.D.R. Moreira, E.D.S. Brum, M.L. De Freitas, A.A. Boligon, M.L. Athayde, S.S. Roman, C.M. Mazzanti, R. Brandão, Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice, *J. Ethnopharmacol.* 153 (2014) 908–916. doi:10.1016/j.jep.2014.03.063.
- [62] J.K. Laihia, P. Taimen, H. Kujari, L. Leino, Topical cis-urocanic acid attenuates oedema and erythema in acute and subacute skin inflammation in the mouse, *Br. J. Dermatol.* 167 (2012) 506–513. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11026.x.
- [63] G. Trevisan, M.F. Rossato, C.I.B. Walker, S.M. Oliveira, F. Rosa, R. Tonello, C.R. Silva, P. Machado, A.A. Boligon, M.A.P. Martins, N. Zanatta, H.G. Bonacorso, M.L. Athayde, M.A. Rubin, J.B. Calixto, J. Ferreira, A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors, *Neuropharmacology.* 73 (2013) 261–273. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.06.011.
- [64] M.S. Hayden, A.P. West, S. Ghosh, NF- κ B and the immune response, *Oncogene.* 25 (2006) 6758–6780. doi:10.1038/sj.onc.1209943.
- [65] K. Ouwehand, D. Oosterhoff, M. Breetveld, R.J. Scheper, T.D. de Gruijl, S. Gibbs,

- Irritant-induced migration of Langerhans cells coincides with an IL-10-dependent switch to a macrophage-like phenotype., *J. Invest. Dermatol.* 131 (2011) 418–425. doi:10.1038/jid.2010.336.
- [66] S. Lisby, O. Baadsgaard, Mechanisms of Irritant Contact Dermatitis, in: J.J. Duus, P.J. Frosch, J.-P. Leppoittevin (Eds.), *Contact Dermatitis*, 5^a ed, 2010: pp. 69–82.
- [67] C.L. Eberting, Irritant Contact Dermatitis: Mechanisms to Repair, *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* 5 (2014) 4–11. doi:10.4172/2155-9554.1000246.
- [68] M.A. Phanse, M.J. Patil, K. Abbulu, P.D. Chaudhari, B. Patel, In-vivo and in-vitro screening of medicinal plants for their anti-inflammatory activity: An overview, *J. Appl. Pharm. Sci.* 2 (2012) 19–33. doi:10.7324/JAPS.2012.2704.
- [69] Y. Bellik, L. Boukraâ, H.A. Alzahrani, B.A. Bakhotmah, F. Abdellah, S.M. Hammoudi, M. Iguer-Ouada, Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update., *Molecules.* 18 (2012) 322–353. doi:10.3390/molecules18010322.
- [70] J.B. Calixto, Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2005) 131–134. doi:10.1016/j.jep.2005.06.004.
- [71] Y. Bellik, S.M. Hammoudi, F. Abdellah, M. Iguer-ouada, L. Boukraâ, Phytochemicals to Prevent Inflammation and Allergy, (2012) 147–158.
- [72] S.J. Hwang, Y.-W. Kim, Y. Park, H.-J. Lee, K.-W. Kim, Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells., *Inflamm. Res.* 63 (2014) 81–90. doi:10.1007/s00011-013-0674-4.
- [73] M. Tsang, D. Jiao, B. Chan, K.-L. Hon, P. Leung, C. Lau, E. Wong, L. Cheng, C. Chan, C. Lam, C. Wong, Anti-Inflammatory Activities of Pentaherbs Formula, Berberine, Gallic Acid and Chlorogenic Acid in Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation, *Molecules.* 21 (2016) 519. doi:10.3390/molecules21040519.
- [74] L.A. Chibli, K.C.M. Rodrigues, C.M. Gasparetto, N.C.C. Pinto, R.L. Fabri, E. Scio, M.S. Alves, G. Del-Vechio-Vieira, O. V. Sousa, Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 154 (2014) 330–338. doi:10.1016/j.jep.2014.03.035.
- [75] A. Pandey, P.S. Negi, Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Neolamarckia cadamba*: A review, *J. Ethnopharmacol.* 181 (2016) 118–135. doi:10.1016/j.jep.2016.01.036.
- [76] T. Németh, A. Mócsai, The role of neutrophils in autoimmune diseases, *Immunol. Lett.* 143 (2012) 9–19. doi:10.1016/j.imlet.2012.01.013.

- [77] H.Y. Lee, M. Stieger, N. Yawalkar, M. Kakeda, Cytokines and chemokines in irritant contact dermatitis, *Mediators Inflamm.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/916497.
- [78] H. Tian, Y. Matsuo, A. Fukunaga, R. Ono, C. Nishigori, J. Yodoi, Thioredoxin ameliorates cutaneous inflammation by regulating the epithelial production and release of pro-inflammatory cytokines, *Front. Immunol.* 4 (2013) 1–12. doi:10.3389/fimmu.2013.00269.
- [79] J.K. Gittler, J.G. Krueger, E. Guttman-Yassky, Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2013) 300–313. doi:10.1016/j.jaci.2012.06.048.
- [80] W.Y. Chen, Y.C. Huang, M.L. Yang, C.Y. Lee, C.J. Chen, C.H. Yeh, P.H. Pan, C.T. Horng, W.H. Kuo, Y.H. Kuan, Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation, *Int. Immunopharmacol.* 22 (2014) 409–413. doi:10.1016/j.intimp.2014.07.026.
- [81] D. Endo, T. Saito, Y. Umeki, K. Suzuki, Y. Aratani, Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils, *Inflamm. Res.* 65 (2016) 151–159. doi:10.1007/s00011-015-0899-5.
- [82] C.Y. Wang, T.C. Kao, W.H. Lo, G.C. Yen, Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppression of NF- κ B through PI3K p110 α and p110 β inhibitions, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7726–7733. doi:10.1021/jf2013265.
- [83] T. Ishida, S. Nishiumi, T. Tanahashi, A. Yamasaki, A. Yamazaki, T. Akashi, I. Miki, Y. Kondo, J. Inoue, S. Kawauchi, T. Azuma, M. Yoshida, S. Mizuno, Linoleoyl ethanolamide reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 699 (2013) 6–13. doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.030.
- [84] M.A. Silva, G. Trevisan, J.Z. Klafke, M.F. Rossato, C.I.B. Walker, S.M. Oliveira, C.R. Silva, A.A. Boligon, F.C. Flores, C.D.B. Silva, M.L. Athayde, J. Ferreira, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats, *J. Ethnopharmacol.* 146 (2013) 393–401. doi:10.1016/j.jep.2012.12.055.
- [85] T.W. Prow, J.E. Grice, L.L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E.M.T. Wurm, C. Yoong, T.A. Robertson, H.P. Soyer, M.S. Roberts, Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 470–491.

- doi:10.1016/j.addr.2011.01.012.
- [86] J.R. Vergara-Salinas, M. Vergara, C. Altamirano, Á. Gonzalez, J.R. Pérez-Correa, Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: Chemical and biological antioxidant activity, *Food Chem.* 171 (2015) 62–69.
doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.094.
- [87] M.F. Otuki, D.A. Cabrini, H.H. Moresco, P. Imazu, C.D. Da Silva, E.F. Pietrovski, D.A.G.B. Mendes, A.D.S. Prudente, M.G. Pizzolatti, I.M.C. Brighente, Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2011 (2011). doi:10.1093/ecam/nej026.
- [88] R. Garg, A.G. Ramchandani, G.B. Maru, Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin, *Carcinogenesis.* 29 (2008) 1249–1257.
doi:10.1093/carcin/bgn114.
- [89] D. Mittal, F. Saccheri, E. Vénéreau, T. Pusterla, M.E. Bianchi, M. Rescigno, TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells., *EMBO J.* 29 (2010) 2242–2252. doi:10.1038/emboj.2010.94.
- [90] E.H. Ahn, D.W. Kim, H.W. Kang, M.J. Shin, M.H. Won, J. Kim, D.J. Kim, O.S. Kwon, T.C. Kang, K.H. Han, J. Park, W.S. Eum, S.Y. Choi, Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice, *Toxicology.* 276 (2010) 192–197.
doi:10.1016/j.tox.2010.08.004.
- [91] S. Boller, C. Soldi, M.C.A. Marques, E.P. Santos, D.A. Cabrini, M.G. Pizzolatti, A.R. Zamprônio, M.F. Otuki, Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 262–266. doi:10.1016/j.jep.2010.05.001.
- [92] V. Muthusamy, T.J. Piva, The UV response of the skin: A review of the MAPK, NF- κ B and TNF signal transduction pathways, *Arch. Dermatol. Res.* 302 (2010) 5–17. doi:10.1007/s00403-009-0994-y.
- [93] J. Tilstra, A. Robinson, J. Wang, NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice, *J.* 122 (2012). doi:10.1172/JCI45785.most.
- [94] M. Pasparakis, Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases., *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 778–788.
doi:10.1038/nri2655.
- [95] H. Wang, J. -x. Zhang, S. -l. Li, F. Wang, W. -s. Zha, T. Shen, C. Wu, Q. -x. Zhu, An

- Animal Model of Trichloroethylene-Induced Skin Sensitization in BALB/c Mice, *Int. J. Toxicol.* 34 (2015) 442–453. doi:10.1177/1091581815591222.
- [96] Y.Y. Sung, A.Y. Lee, H.K. Kim, Forsythia suspensa fruit extracts and the constituent matairesinol confer anti-allergic effects in an allergic dermatitis mouse model, *J. Ethnopharmacol.* 187 (2016) 49–56. doi:10.1016/j.jep.2016.04.015.
- [97] A.A. Furtado, M. Torres-Rêgo, M.C.J.S. Lima, M.A.O. Bitencourt, A.B. Estrela, N. Souza da Silva, E.M. da Silva Siqueira, J.C. Tomaz, N.P. Lopes, A.A. Silva-Júnior, S.M. Zucolotto, M.F. Fernandes-Pedrosa, Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 192 (2016) 225–235. doi:10.1016/j.jep.2016.07.048.
- [98] R.Q. Moraes-Souza, T.S. Soares, N.O.L. Carmo, D.C. Damasceno, K.E. Campos, G.T. Volpato, Adverse effects of *Croton urucurana* B. exposure during rat pregnancy, *J. Ethnopharmacol.* (2016). doi:10.1016/j.jep.2016.10.061.
- [99] M.M. Machado, L.F.S. De Oliveira, L. Zuravski, R.O. De Souza, P. Fischer, J.A. Duarte, M.O. Rocha, C.M. Güz, A.A. Boligon, M.L. Athayde, Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes, *An. Acad. Bras. Cienc.* 88 (2016) 17–28. doi:10.1590/0001-3765201520140076.
- [100] O.O. Adeyemi, A.J. Akindele, K.I. Nwumeh, Acute and subchronic toxicological assessment of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) aqueous leaf extract, *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 3 (2010) 1–11.
- [101] E. Al-Sayed, R.N. El-Naga, Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide, *Phytomedicine.* 22 (2015) 5–15. doi:10.1016/j.phymed.2014.10.002.
- [102] R.N. Chibbar, S. Ganeshan, M. Baga, R.L. Khandelwal, Colin Wrigley, *Carbohydrate Metabolism*, 53 (2004) 168–179. <http://www.sciencedirect.com/science/article/B7GGJ-4DP5M0M-4B/2/6b4487f120809ff70ce7f9e4729c59f3>.

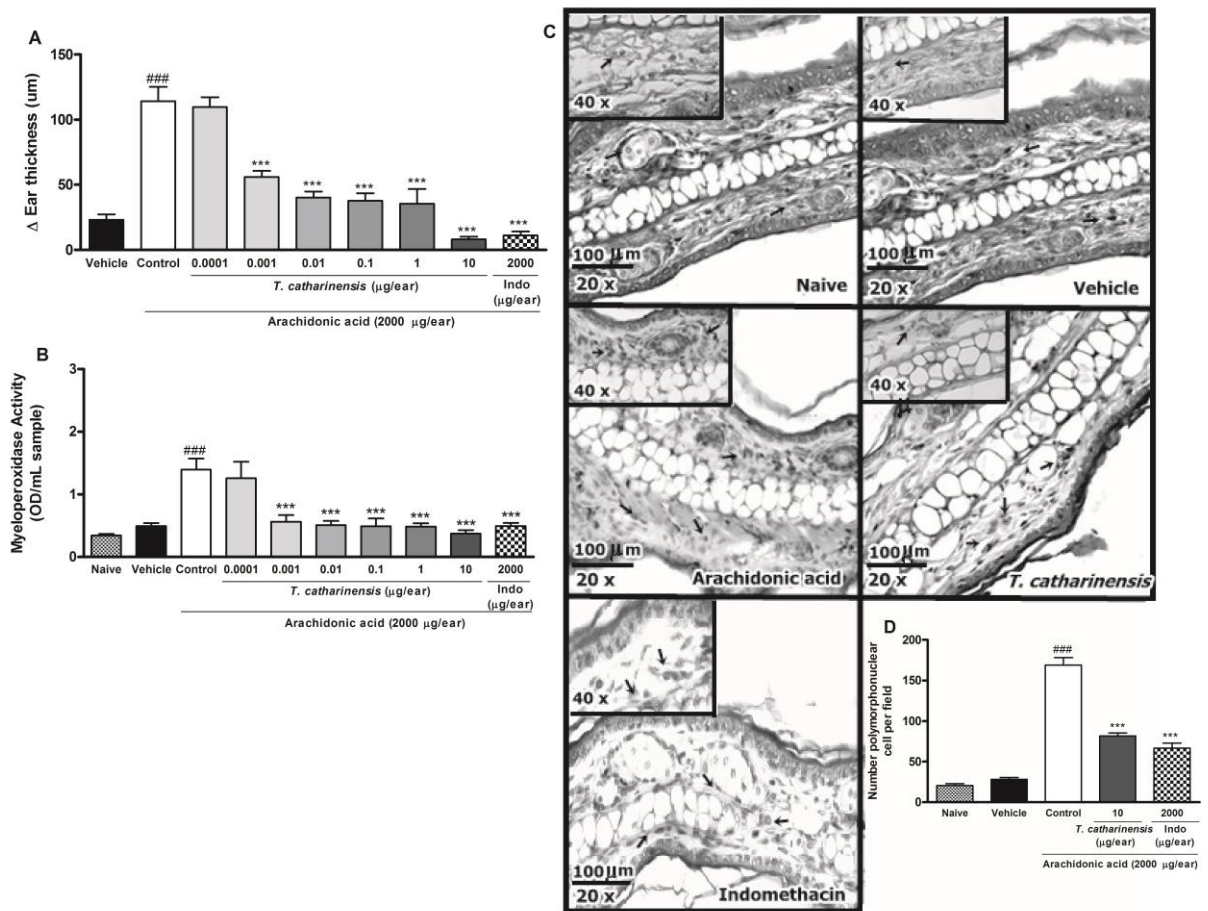


Fig 1. Topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* (TcE) and Indomethacin (Indo) on irritant contact dermatitis arachidonic acid-induced. The anti-inflammatory effect of TcE and Indomethacin (Indo) was assessed on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with arachidonic acid. Ear edema and MPO activity were measured at 1 and 6 h after arachidonic acid application, respectively. The TcE (0.0001 – 10 μg/ear) or Indo (2000 μg/ear) were applied immediately after arachidonic acid administration. Histological changes of TcE were observed in a 10 μg/ear dose. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with control, vehicle or naive group. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

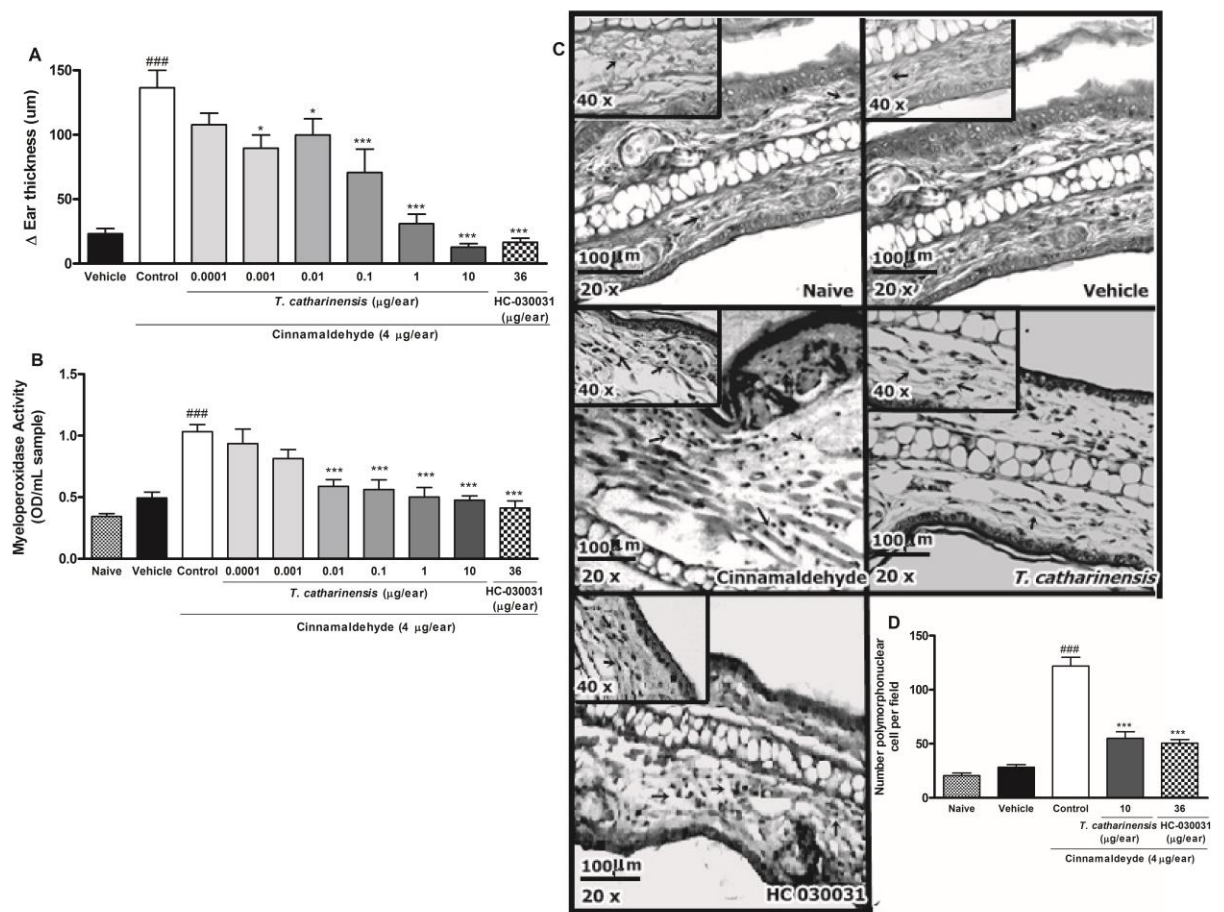


Fig 2. Topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* (TcE) and HC-030031 on irritant contact dermatitis cinnamaldehyde-induced. The TcE and HC-030031 anti-inflammatory effect was assessed through acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with cinnamaldehyde. Ear edema and MPO activity were measured at 0.5 and 6 h after cinnamaldehyde application, respectively. The TcE (0.0001-10 μg/ear) or HC-030031 (36 μg/ear) were applied immediately after cinnamaldehyde administration. Histological changes of TcE were observed in a dose of 10 μg/ear. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with control, vehicle or naive group. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ^{*} P<0.05, ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

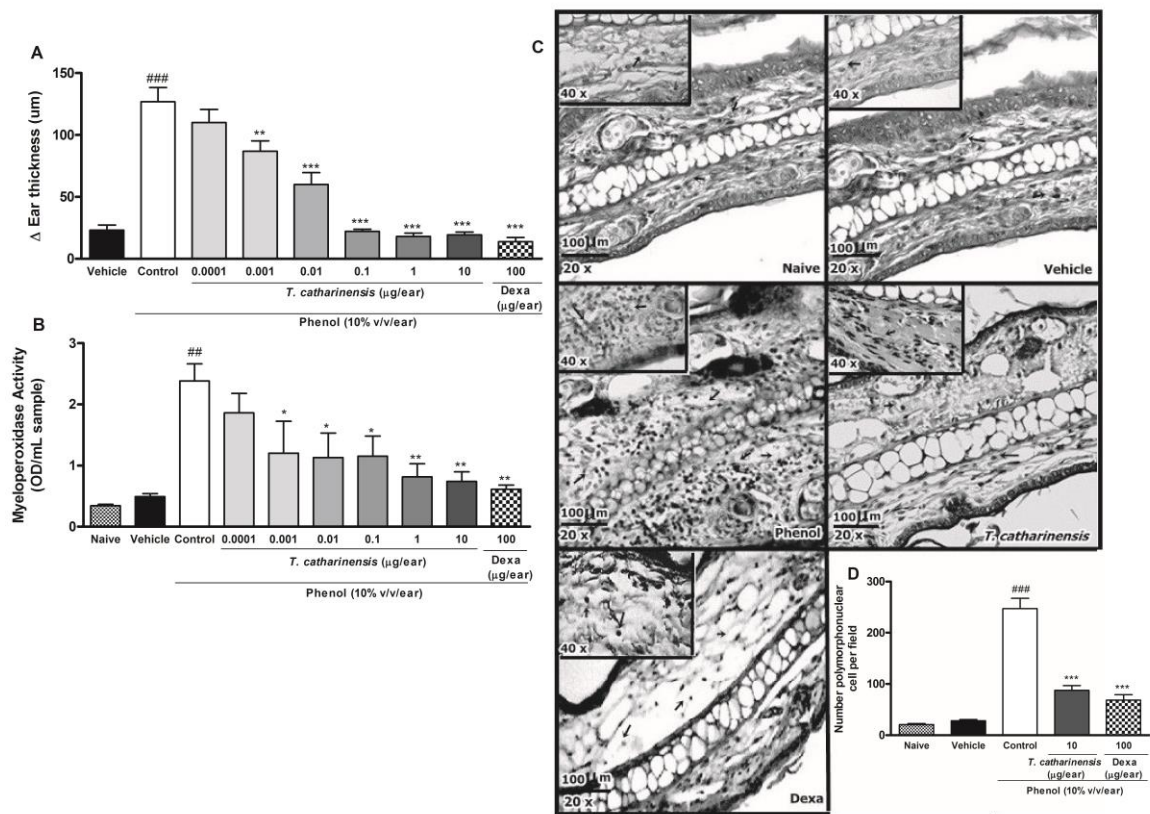


Fig 3. Topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* (TcE) and dexamethasone (Dexa) on irritant contact dermatitis phenol-induced. The TcE and dexamethasone (Dexa) anti-inflammatory effect was assessed through acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with phenol. Ear edema and MPO activity were measured at 1 and 6 h after phenol application, respectively. The TcE (0.0001-10 µg/ear) and Dexa (100 µg/ear) were applied immediately after phenol application. Histological changes of TcE were observed in a dose of 10 µg/ear. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with control, vehicle or naive group. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle group (A), ^{##}P<0.001 when compared with the naive group (B); *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

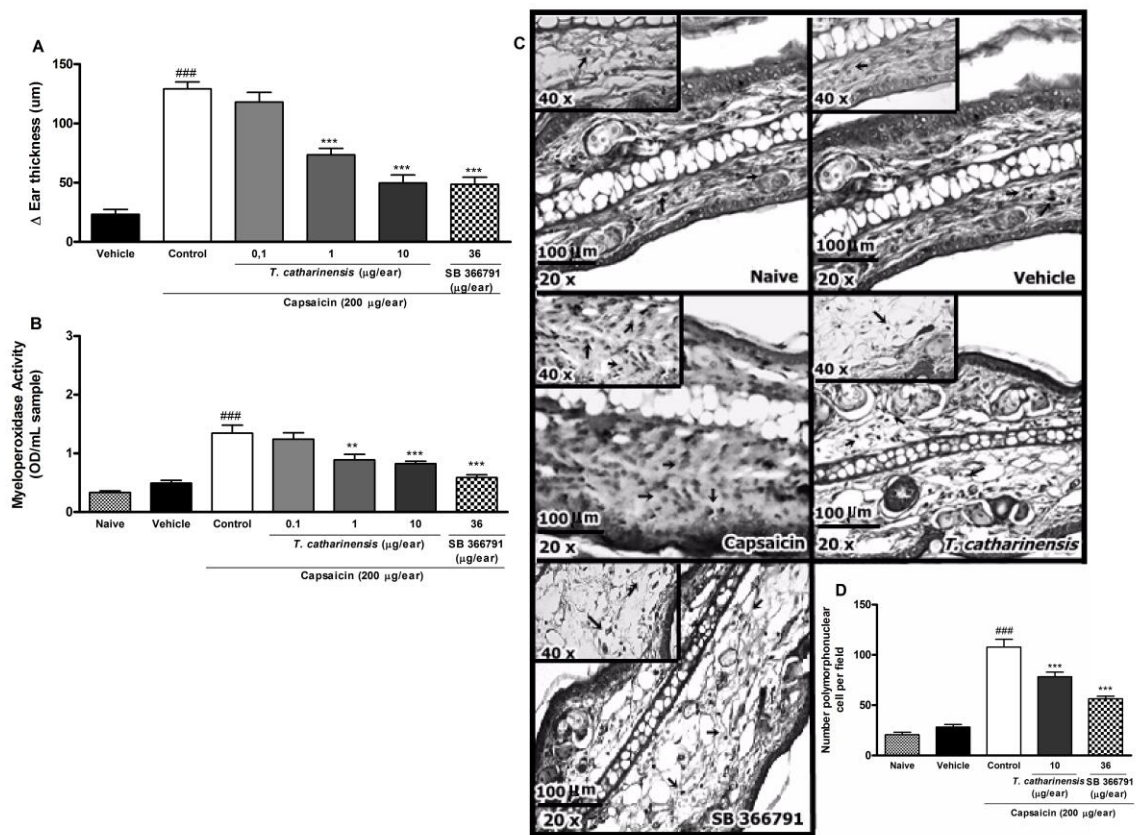


Fig 4. Topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* (TcE) and SB 366791 irritant contact dermatitis capsaicin-induced. The TcE and SB 366791 anti-inflammatory effect was evaluated on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with capsaicin. Ear edema and MPO activity were measured at 0.5 and 12 h after capsaicin application, respectively. The TcE (0.1-10 μg/ear) and SB-366791 (36 μg/ear) were applied immediately after capsaicin application. Histological changes of TcE were observed in a dose of 10 μg/ear. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with control, vehicle or naive group. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

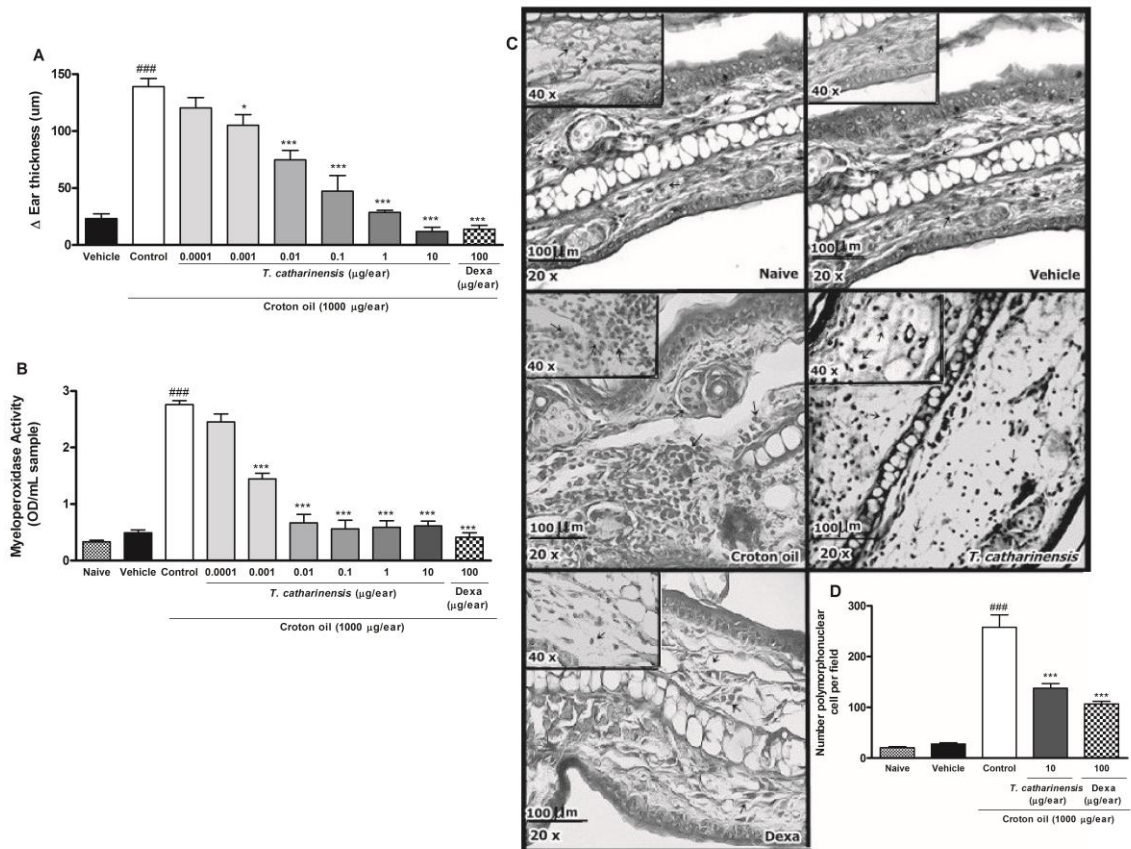


Fig 5. *T. catharinensis* (TcE) and dexamethasone (Dexa) topical anti-inflammatory effect on irritant contact dermatitis croton oil-induced. The TcE and dexamethasone (Dexa) anti-inflammatory effect was evaluated on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with croton oil. Histological analysis of TcE was observed in a dose of 10 μg/ear. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil application. The TcE (0.0001-10 μg/ear) and Dexa (100 μg/ear) were applied immediately after croton oil application. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive group. ###P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; *P<0.05, ***P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

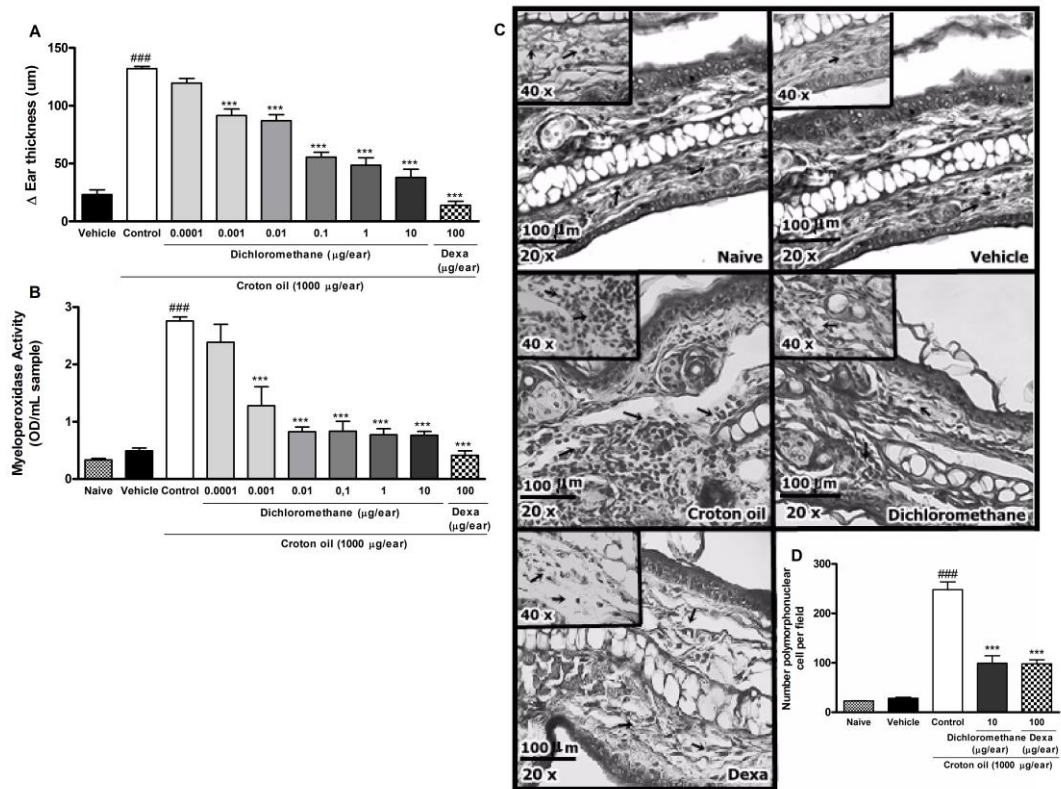


Fig 6. Topical anti-inflammatory effect of dichloromethane fraction *T. catharinensis* (TcE)-isolated and dexamethasone (Dexa) on irritant contact dermatitis croton oil-induced. The dichloromethane fraction and dexamethasone (Dexa) anti-inflammatory effect was evaluated through acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with croton oil. Histological analysis of dichloromethane fraction was observed in a dose of 10 μg/ear. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil application. The fraction (0.0001-10 μg/ear) and Dexa (100 μg/ear) were applied immediately after croton oil application. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ***P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

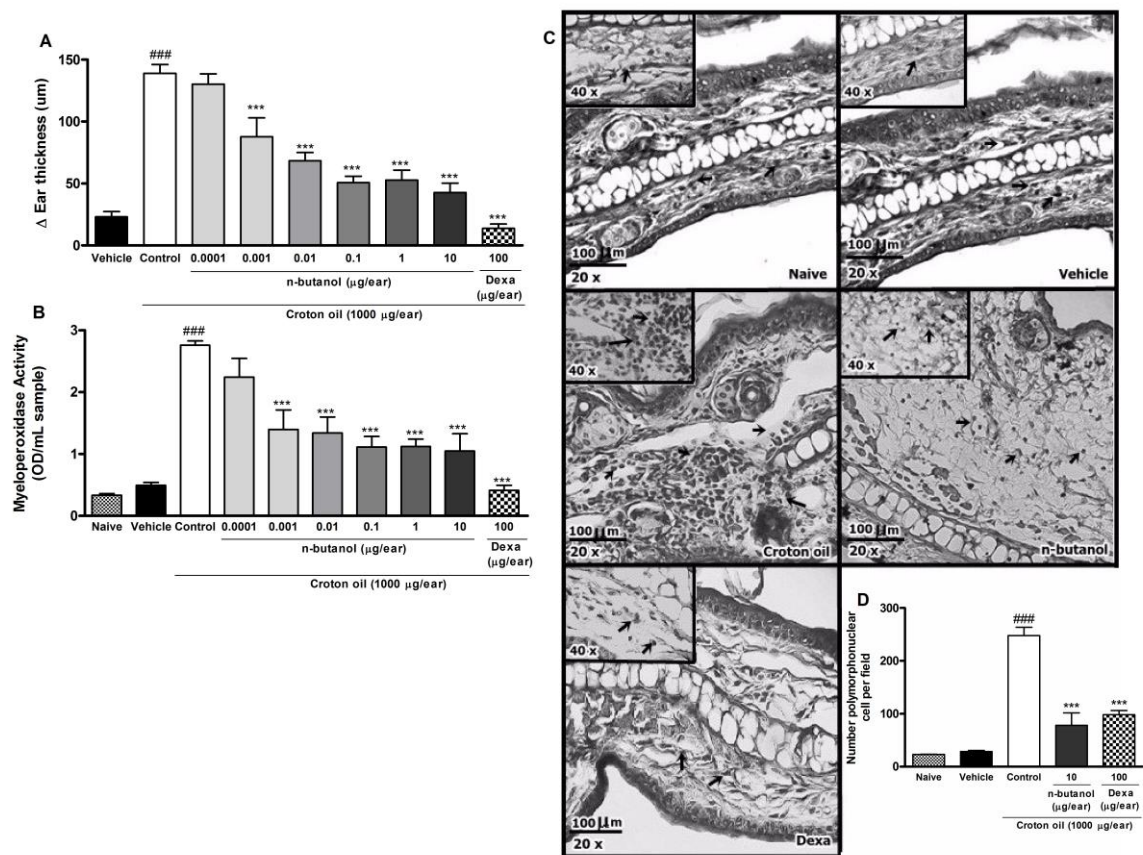


Fig 7. Topical anti-inflammatory effect of n-butanol fraction *T. catharinensis* (TcE)-isolated and dexamethasone (Dexa) on irritant contact dermatitis croton oil-induced. The n-butanol fraction and dexamethasone (Dexa) anti-inflammatory effect was assessed on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil application. The fraction (0.0001-10 μg/ear) and Dexa (100 μg/ear) were applied immediately after croton oil application. Histological changes of n-butanol fraction were observed in a dose of 10 μg/ear. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

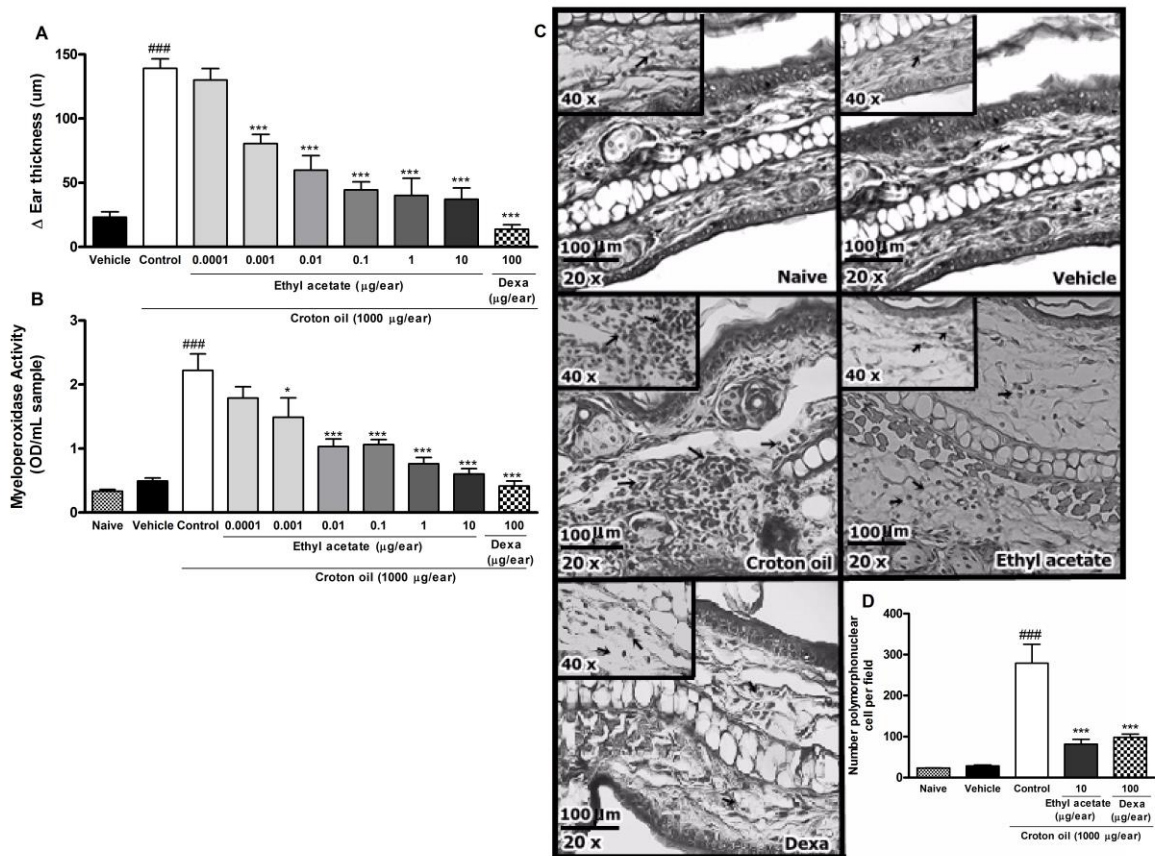


Fig 8. Topical anti-inflammatory effect of ethyl acetate fraction *T. catharinensis* (TcE)-isolated and dexamethasone (Dexa) on irritant contact dermatitis croton oil-induced. The ethyl acetate fraction and dexamethasone (Dexa) anti-inflammatory effect was evaluated on acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil application. The fraction (0.0001-10 µg/ear) and Dexa (100 µg/ear) were applied immediately after croton oil application. Histological changes of ethyl acetate fraction were observed in a dose of 10 µg/ear. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ^{*}P<0.05, ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

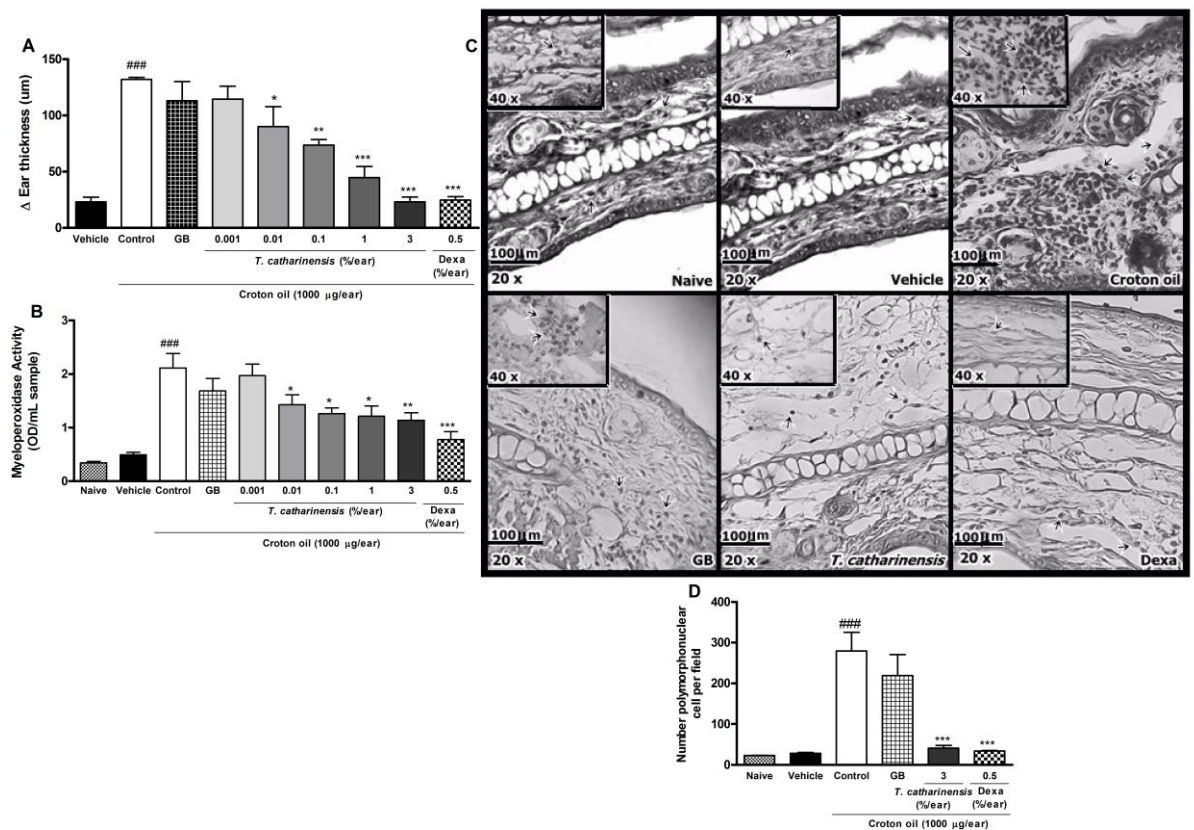


Fig 9. Topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* (TcE) and dexamethasone (Dexa) gel formulations on irritant contact dermatitis croton oil-induced. TcE and dexamethasone (Dexa) gel formulations anti-inflammatory effect was assessed through acute ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C) and number of polymorphonuclear cells per field (D) on mice ear topically administered with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured at 6 h after croton oil application. The TcE (0.001-3%; 15 mg/ear), Dexa gel (0.5%; 15 mg/ear) and white gel (GB; 15 mg/ear) were applied immediately after croton oil application. Histological changes of TcE gels were observed in gel concentration of 3%. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. ^{###}P<0.001 when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 and ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

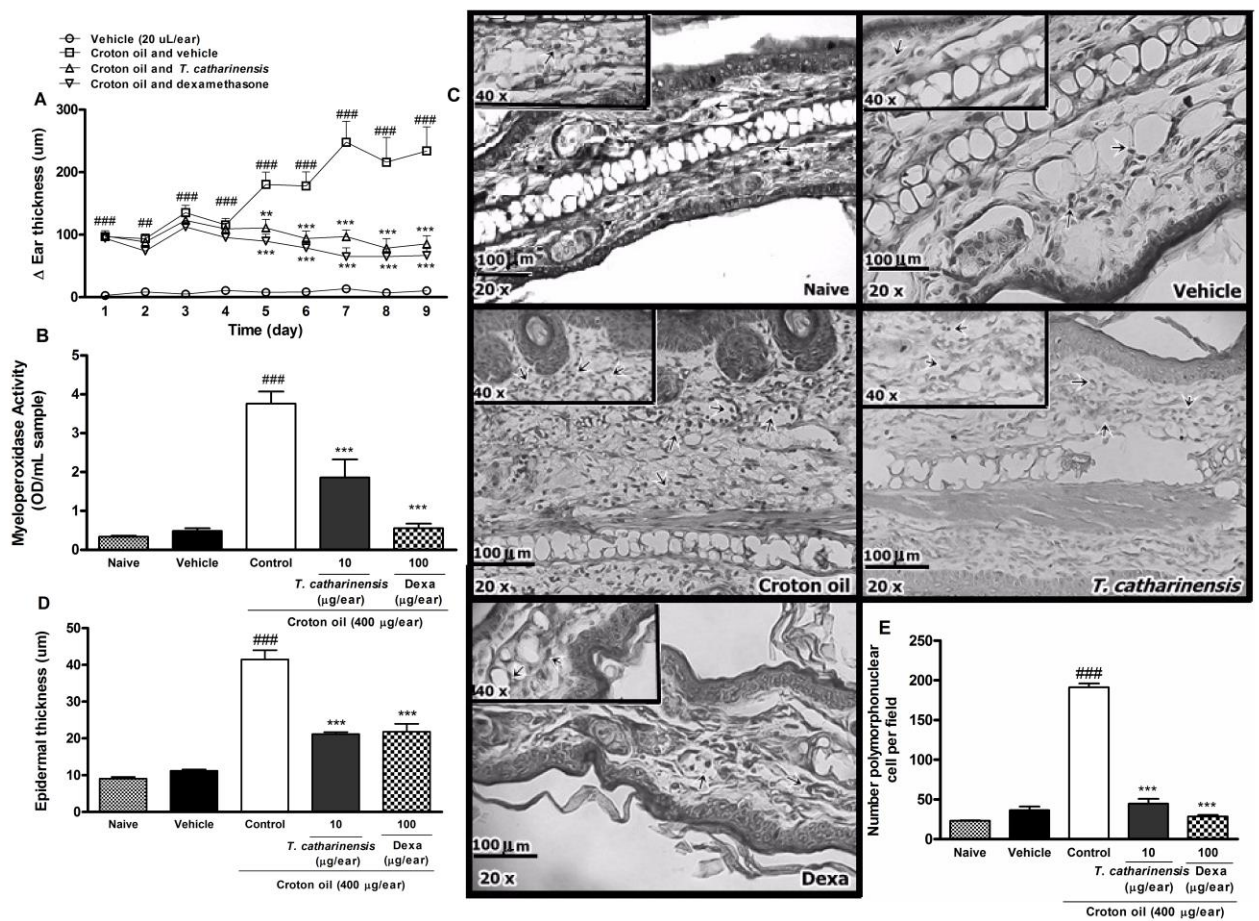


Fig 10. Topical anti-inflammatory effect of *T. catharinensis* (TcE) dexamethasone (Dexa) on irritant contact dermatitis croton oil-induced. The TcE and dexamethasone (Dexa) anti-inflammatory effect was evaluated on chronic ear edema (A), MPO activity (OD/mL sample) (B), histological changes (hematoxylin-eosin 200 and 400x) (C), epidermal thickness (μm) (D) and number of polymorphonuclear cells per field (E) on mice ear topically administered with croton oil. Ear edema and MPO activity were measured daily and at 9th day of experiment, respectively. The TcE (10 $\mu\text{g}/\text{ear}$) and Dexa (100 $\mu\text{g}/\text{ear}$) were applied right after croton oil application. Each bar represents the mean+S.E.M. for 5-6 animals. The arrows indicate the presence of inflammatory cells in the ear tissue. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control, vehicle or naive groups. #### $P < 0.001$ when compared with the vehicle (A) and naive (B) groups; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ when compared with the control group (repeated measures two-way ANOVA followed post hoc Bonferroni test) (A); (one-way ANOVA followed post hoc Newman-Keuls test) (B and D).

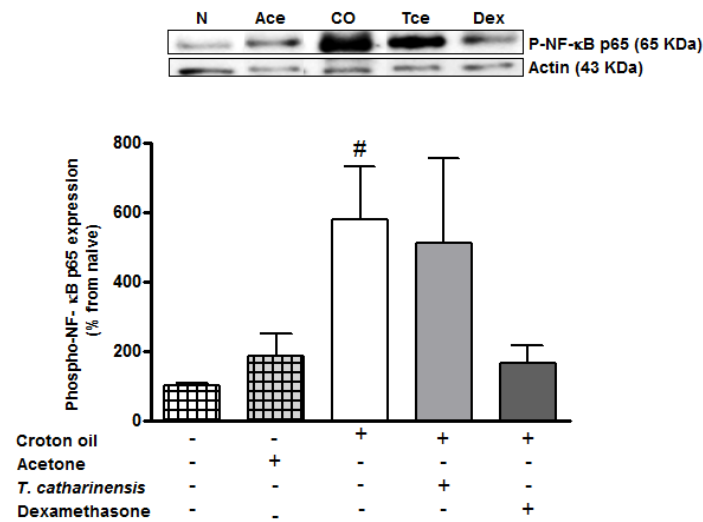


Fig 11. Western blot analysis showing NF-κBp65 phospho protein immunoreactivity in the ear tissue samples obtained from naive mice and mice ears exposed to acetone (Ace) or croton oil (CO) topical administration, or treated with dexamethasone (Dex) or Tce right after croton administration. [#]P<0.05 when compared with the naïve group (One-way ANOVA, followed by Dunnet post hoc tests).

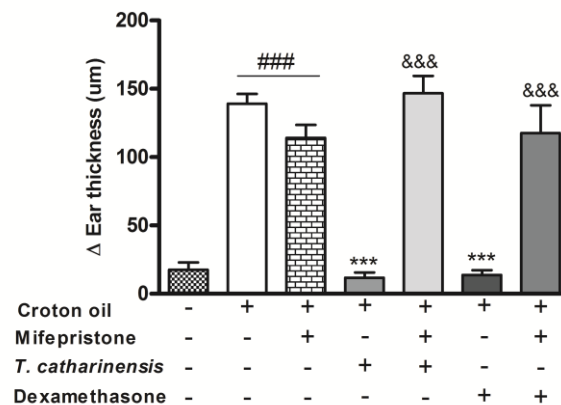


Fig 12. Reversal of the anti-edematogenic activity of *T. catharinensis* (TcE) (10 µg/ear) and dexamethasone (100 µg/ear) by mifepristone. TcE and dexamethasone was applied immediately after acute topical application of croton oil. Mifepristone (50 mg/kg s.c.) was administered 15 min prior to TcE or dexamethasone. Each bar represents the mean+S.E.M. for 6 animals. The graphic symbols denote the significance levels when compared with the control or naive groups. ^{###}P<0.001 when compared with the naïve group (first column); ^{***}P<0.001 when compared with the control group (croton oil); ^{&&&}P<0.001 when compared with croton oil and TcE or croton oil and dexamethasone groups (one-way ANOVA followed post hoc Newman-Keuls test).

pH values			
	Low T (4±2 °C)	Room T (25±5 °C)	High T (38±2 °C)
Zero time	5.42 ± 0.3	5.41 ± 0.10	5.41 ± 0.05
7 days	5.39 ± 0.8	5.38 ± 0.6	5.33 ± 0.13
15 days	5.31 ± 0.1	5.21 ± 0.5	5.12 ± 0.6
30 days	5.20 ± 0.2	5.19 ± 0.12	5.04 ± 0.1
60 days	5.07 ± 0.9	5.01 ± 0.3	4.93 ± 0.9
90 days	5.02 ± 0.11	4.96 ± 0.8	4.87 ± 0.3
Viscosity reduction (%)			
	Low T (4±2 °C)	Room T (25±5 °C)	High T (38±2 °C)
Zero time	0	0	0
7 days	1.96 ± 0.01	4.02 ± 0.009	18.87 ± 0.02
15 days	11.1 ± 0.00	17.3 ± 0.009	31.73 ± 0.03
30 days	14.61 ± 0.006	24.13 ± 0.02	44.3 ± 0.1
60 days	18.93 ± 0.02	31.19 ± 0.02	55.24 ± 0.02
90 days	24.46 ± 0.003	43.64 ± 0.01	65.4 ± 0.03

Table 1. pH values and viscosity reduction (%) of the *T. catharinensis* gels during the accelerated stability study.

	Low T (4±2 °C)	Room T (25±5 °C)	High T (38±2 °C)
Zero time	51.07 ± 0.16	51.03 ± 0.08	51.12 ± 0.13
7 days	50.83 ± 1.09	50.49 ± 0.25	50.07 ± 0.04
15 days	50.19 ± 0.73	49.86 ± 0.14	48.69 ± 0.19
30 days	47.25 ± 0.42	47.03 ± 0.03	47.05 ± 0.23
60 days	46.91 ± 0.58	45.62 ± 0.19	41.93 ± 1.15
90 days	43.18 ± 0.23	42.15 ± 0.10	40.21 ± 1.07

Table 2. Quantity of caffeic acid in the *T. catharinensis* gels during the stability study. Concentration (µg/g of gel ± S.E.M).

ng/mL cytokines/ mg protein	Naive	Vehicle	Control	TcE (10 µg/ear) + Arachidonic acid (2000 µg/ear)	Positive control Indo (2000 µg/ear)
MIP-2	0.007±0.001	0.006±0.002	0.1±0.05 ^{###}	0.007±0.002 ^{**}	0.01±0.0009 ^{**}
TNF-α	0.36±0.1	0.36±0.1	3±0.7 ^{###}	1±0.07 ^{**}	1±0.1 ^{**}
IL-1β	0.05±0.02	0.03±0.006	1±0.3 ^{###}	0.07±0.01 ^{***}	0.03±0.008 ^{***}

			+ Cinnamaldehyde (4 µg/ear)		HC- 030031(36 µg/ear)
MIP-2	0.007±0.001	0.006±0.002	0.07±0.02 ^{###}	0.03±0.01 ^{**}	0.005±0.001 ^{***}
TNF-α	0.36±0.1	0.36±0.1	3±0.5 ^{###}	2±0.4 [*]	1±0.1 ^{**}
IL-1β	0.05±0.02	0.03±0.006	0.4±0.02 ^{###}	0.2±0.04 ^{***}	0.1±0.01 ^{***}
			+ Capsaicin (200 µg/ear)		SB-366791 (36 µg/ear)
MIP-2	0.007±0.001	0.006±0.002	0.05±0.02 ^{##}	0.01±0.002 ^{**}	0.004±0.002 ^{**}
TNF-α	0.36±0.1	0.36±0.1	3±0.3 ^{###}	1±0.1 ^{***}	1±0.2 ^{***}
IL-1β	0.05±0.02	0.03±0.006	0.4±0.04 ^{###}	0.1±0.01 ^{***}	0.2±0.03 ^{***}
			+ Phenol (10% v/v/ear)		Dexa (100 µg/ear)
MIP-2	0.007±0.001	0.006±0.002	0.02±0.002 ^{##}	0.006±0.003 ^{***}	0.005±0.001 ^{***}
TNF-α	0.36±0.1	0.36±0.1	1.3±0.3 ^{##}	0.5±0.04 ^{**}	0.6±0.06 ^{**}
IL-1β	0.05±0.02	0.03±0.006	0.2±0.03 ^{###}	0.04±0.009 ^{***}	0.02±0.01 ^{***}
			+ Croton oil (1000 µg/ear)		Dexa (100 µg/ear)
MIP-2	0.007±0.001	0.006±0.002	0.06±0.009 ^{##}	0.03±0.002 ^{**}	0.03±0.007 ^{**}
TNF-α	0.36±0.1	0.36±0.1	3±0.9 [#]	0.4±0.04 [*]	0.5±0.06 ^{**}
IL-1β	0.05±0.02	0.03±0.006	0.2±0.02 ^{###}	0.07±0.02 ^{***}	0.03±0.02 ^{***}

Table 3. Effect of TcE and positive controls topically administered on pro-inflammatory cytokines MIP-2, TNF-α and IL-1β levels in the acute ear edema induced by different irritant agents (control groups). The pro-inflammatory cytokines levels were measured at 6 h after irritant agents application. The TcE (10 µg/ear) and different positive controls were applied immediately before irritants agents administration. Each value represents the mean±S.E.M. for 5-6 animals. The symbols denote the significance levels when compared with the control or vehicle group. ^{###}P<0.001, [#]P<0.05 when compared with the vehicle group; ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 and ^{***}P<0.001 when compared with the control group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

Groups	Open- field		ALT	AST	Urea	Creatinine	Glucose
	Crossings	Rearings	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
Naive	70±4	33±0.7	36±3	18±3	32±5	4±2	100±1
Vehicle	68±8	31±4	49±2	13±2	25±2	1±0.3	106±5
TcE (10 µg/ear)	64±6	24±3	46±9	20±4	28±3	4±0.9	108±3
Dexa (100 µg/ear)	66±6	35±2	29±9	13±1	35±3	3±0.8	123±7*

Table 4. Effect of TcE and dexamethasone on biochemical parameters toxicity and spontaneous locomotor activity (open-field test). Each value represents the mean±S.E.M. for 5-6 animals. The symbols denote the significance levels (*P<0.05) when compared with vehicle group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls test).

5 CONCLUSÃO

5.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

- Formulações em géis com extrato bruto de *T. catharinensis* mostraram valores estáveis e compatíveis com pH cutâneo (4,6-5,8). A formulação mostrou reduzida estabilidade somente em altas temperaturas (38 ± 2 °C) e em 90 dias, avaliada através de parâmetros de viscosidade e degradação do ácido cafeico.
- Extrato bruto de *T. catharinensis* apresentou potente atividade anti-inflamatória tópica sobre a DCI aguda induzida por diferentes agentes irritantes, confirmando seu uso popular em enfermidades cutâneas.
- A atividade anti-inflamatória tópica do extrato bruto de *T. catharinensis* pode ser atribuída pelo sinergismo entre os compostos anti-inflamatórios presentes (flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides e terpenoides).
- As frações (diclorometano, n-butanol e acetato de etila) isoladas do extrato bruto de *T. catharinensis* apresentaram atividades anti-inflamatória tópica similares.
- Efeito anti-inflamatório tópico de *T. catharinensis* possa ser atribuído pelo sinergismo entre os compostos fitoquímicos ou pela presença de ácidos fenólicos ou alcaloides (presentes expressivamente em todas as frações estudadas).
- Extrato bruto de *T. catharinensis* apresenta efeito anti-inflamatório tópico mesmo quando incorporado em formulações em gel e, com uma eficácia maior do que a dexametasona gel.
- Extrato bruto de *T. catharinensis* reduziu os níveis de MIP-2, TNF- α and IL-1 β em modelos de DCI induzida por diferentes agentes irritantes, o que explica seus efeitos sobre o edema e infiltração de células polimorfonucleares.

- Tratamentos que atuem na inibição da produção e liberação de múltiplas citocinas tornam-se efetivas estratégias na terapia de doenças inflamatórias de pele, como a DCI.
- Extrato bruto de *T. catharinensis* mostrou atividade anti-inflamatória tópica em um modelo crônico de DCI, sendo útil no tratamento de processo inflamatório cutâneo, como a DCI crônica (tipo clínico mais comum).
- Efeito anti-inflamatório tópico de *T. catharinensis* pode ser atribuído, em parte, a inibição da produção e liberação de citocinas inflamatórias, porém de maneira independente do fator de transcrição NF-kB.
- Pré-tratamento com o antagonista do receptor de glicocorticoide, mifepristona, previniu o efeito inibitório do extrato bruto de *T. catharinensis* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Sugere-se que o extrato bruto de *T. catharinensis* exerce um **EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TIPO GLICOCORTICOIDE**.
- A interação com o receptor de glicocorticoide explica ambos os efeitos (anti-inflamatório e antiproliferativo) do extrato bruto de *T. catharinensis*, uma vez que os glicocorticoides são comumente usados como agentes anti-inflamatórios e antiproliferativos em doenças inflamatórias cutâneas.
- Embora o efeito anti-inflamatório tópico do extrato bruto de *T. catharinensis* pareça atuar de forma dependente do receptor de glicocorticoide, esse provou ser mais potente e seguro que o glicocorticoide dexametasona, uma vez que não apresentou os efeitos adversos gerados pela dexametasona.

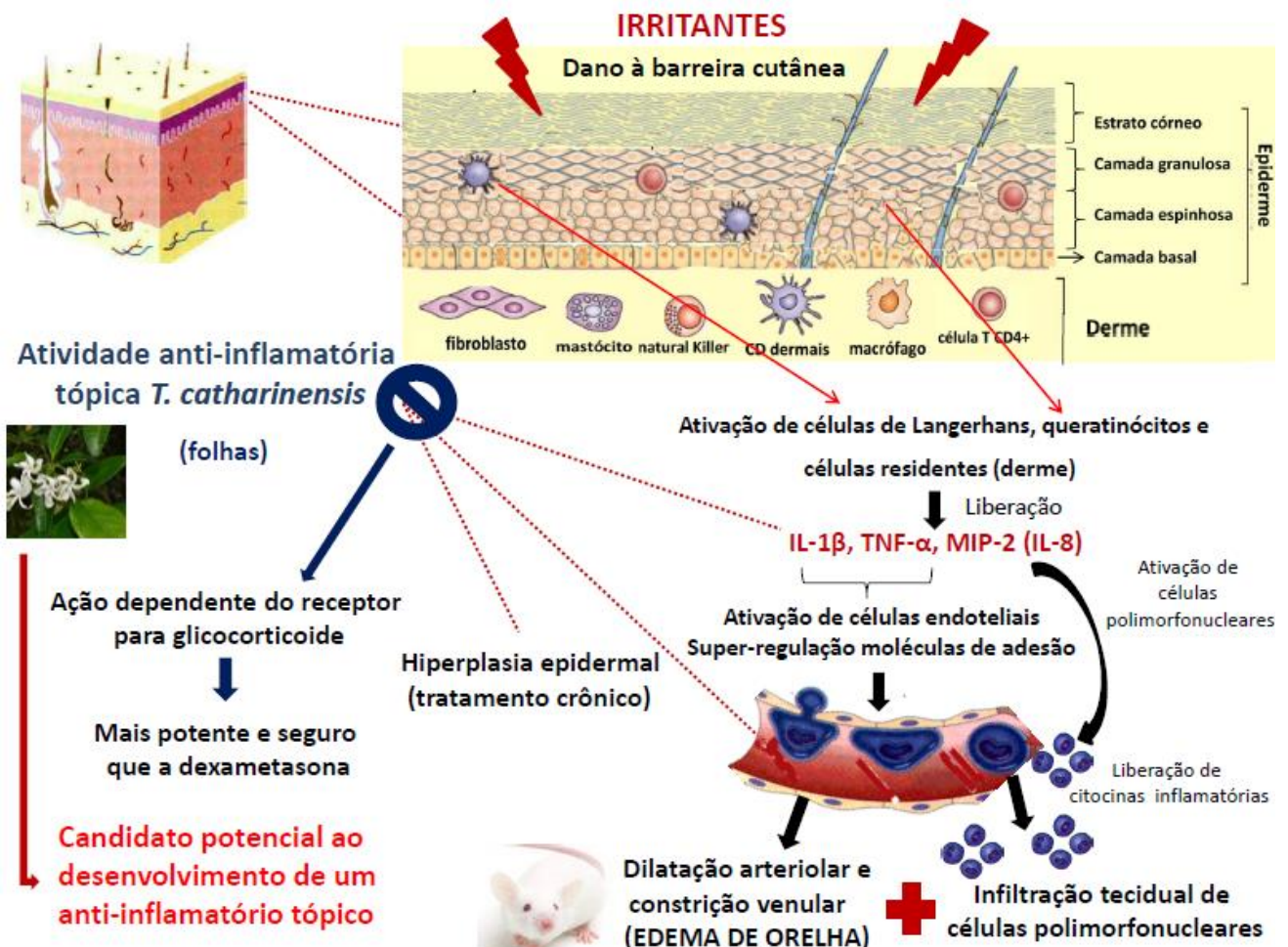
5.2 CONCLUSÃO GERAL

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, concluímos que *T. catharinensis* possui atividade anti-inflamatória tópica, uma vez que reduziu de forma significativa todos os parâmetros inflamatórios observados: edema de orelha (espessura da orelha), infiltração de células polimorfonucleares, e níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e MIP-2), sem causar efeitos adversos sistêmicos durante sua administração tópica. Compostos que atuam de forma efetiva sobre esses parâmetros inflamatórios podem ser considerados potenciais terapêuticos no tratamento de doenças inflamatórias de pele. Além disso, em um modelo crônico de inflamação cutânea, foi possível verificar que *T. catharinensis* também apresentou eficácia sobre a hiperplasia epidermal, efeito esse também presente por glicocorticoides e imunossupressores. Desta maneira, o mecanismo de ação foi elucidado, e mostra que *T. catharinensis* possui, em parte, uma ação dependente de receptor para glicocorticoide, corroborando sua atividade anti-inflamatória tópica. Felizmente o efeito anti-inflamatório tópico da *T. catharinensis* ocorreu sem desencadear os efeitos adversos causados pela dexametasona (aumento de glicemia, alterações no peso (relativo) do baço e redução no consumo de água e ração) demonstrando alta efetividade e baixo risco de efeitos adversos comparados aos fármacos glicocorticóides comercializados como a dexametasona (Figura 3).

Neste contexto, o presente trabalho fornece evidências científicas que comprovam o uso popular por via tópica de *T. catharinensis* no tratamento de processos inflamatórios cutâneos, bem como demonstra o potencial do extrato bruto desta planta para o desenvolvimento de um anti-inflamatório tópico efetivo e seguro.

Figura 3 – Breve resumo da patogênese da dermatite de contato irritante e os efeitos inibitórios do extrato bruto e frações das folhas de *T. catharinensis* que a designaram como uma possível alternativa de anti-inflamatório tópico no tratamento de doenças de pele.

Agentes irritantes quando em contato com a pele ocasionam um dano à integridade da barreira cutânea, facilitando sua entrada às camadas da pele e, promovendo a ativação sequencial de queratinócitos, células de Langerhans e células residentes presentes na derme. Essas células ativadas produzem e liberam diversas citocinas pró-inflamatórias, entre essas, IL-1 β , TNF- α e MIP-2 (IL-8). Citocinas primárias (IL-1 β , TNF- α) promovem ativação das células endoteliais e super-regulação de moléculas de adesão, o que culmina em alterações vasculares, como dilatação arteriolar e contração venular (edema) juntamente com o fornecimento de células polimorfonucleares ao tecido lesado. Células polimorfonucleares infiltradas ao tecido são ativadas pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células residentes da pele, bem como produzem citocinas inflamatórias, amplificando o processo inflamatório de pele. O tratamento tópico (agudo e crônico) com *T. catharinensis* inibiu (⊗) os principais eventos inflamatórios (edema de orelha, infiltração de células polimorfonucleares e níveis de citocinas pró-inflamatórias), bem como a hiperplasia epidermal (observada durante o tratamento crônico), de forma mais potente e segura que o glicocorticoide usualmente prescrito na clínica, a dexametasona. Esses efeitos anti-inflamatórios foram propostos pela sua ação dependente do receptor para glicocorticoide. Dessa maneira, corrobora-se o efeito anti-inflamatório tópico de *T. catharinensis* e a torna como uma potencial alternativa para o desenvolvimento de um anti-inflamatório tópico efetivo e seguro.



6 PERSPECTIVAS

- Identificar a composição química de constituintes ainda não identificados no extrato bruto e das frações diclorometano, n-butanol e acetato de etila das folhas de *T. catharinensis*, a fim de avaliar a possível presença de um composto majoritário com atividade anti-inflamatória, comum no extrato bruto e frações da planta;
- Havendo a presença deste composto majoritário, promover seu isolamento e avaliar sua atividade anti-inflamatória tópica em modelos de dermatite de contato irritante em camundongos;
- Aliar a tecnologia farmacêutica, através da nanotecnologia, no desenvolvimento de uma formulação estável, efetiva e segura com o extrato bruto de *T. catharinensis* para o tratamento de doenças inflamatórias de pele;
- Realizar estudos de permeabilidade em pele humana das formulações desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

AFZAL, M. et al. *Bryophyllum pinnatum*: a review. **International Journal of Research in Biological Sciences**, v.2, p. 143–149, 2012.

ABTIN, A. et al. Perivascular macrophages mediate neutrophil recruitment during bacterial skin infection. **Nature Immunology**, v. 15, p. 45-53, 2014.

AGUERO, M. G. et al. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8⁺ T cells and activating Foxp3⁺ regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 1700-1711, 2012.

AHN, E. H. et al. Transduced PEP-1-ribosomal protein S3 (rpS3) ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. **Toxicology**, v. 276, p. 192-197, 2010.

AKINDELE, A. J.; UNACHUKWU, E. G.; OSIAGWU, D. D. 90 days toxicological assessment of hydroethanolic leaf extract of *Ipomoea asarifolia* (Desr.) Roem. and Schult. (Convolvulaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 582-594, 2015.

ALMEIDA, L. et al. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 137, p. 19-27, 2004.

AL-SAYED, E.; EL-NAGA, R. N. Protective role of ellagitannins from *Eucalyptus citriodora* against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Impact on oxidative stress, inflammation and calcitonin-gene related peptide. **Phytomedicine**, v. 22, p. 5-15, 2015.

ARTICO, M. et al. Descrição anatômica do xilema secundário de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). *Balduinia*, v.24, p. 10-15, 2010.

BACCHI, S. et al. Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs: A Review. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 52-64, 2012.

BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v.29, p. 360-376, 2011.

BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Morfologia polínica das espécies arbóreas de Apocynaceae do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, p. 577-582, 2008.

BATINA, M. F. C. et al. Inhibition of the Lethal and Myotoxic Activities of *Crotalus durissus terrificus* Venom by *Tabernaemontana catharinensis*: Identification of One of the Active Components. **Planta Medica**, v. 66, p. 424-428, 2000.

BELLIK, Y. et al. Molecular Mechanism Underlying Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Activities of Phytochemicals: An Update. **Molecules**, v. 18, p. 322-353, 2013.

BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L. Phytochemical Investigation and Cytotoxic Properties of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Cultivated in Brazil. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 6, p. 127-131, 2012.

BOLIGON, A. A. et al. Phytochemical constituents and *in vitro* antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, p. 77-80, 2013.

BOLIGON, A. A. et al. HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, p. 7-18, 2015.

BONNEVILLE, M. et al. Skin Contact Irritation Conditions the Development and Severity of Allergic Contact Dermatitis. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1430-1435, 2007.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 17, de 24 de fevereiro de 2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 fev. 2000.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e revoga a RDC n. 17/2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Presidência da República, Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun, 2006a. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm>. Acesso em: 7 dez. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde, Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 4 mai, 2006b.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 60, de 8 de novembro de 2011. Aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, primeira edição e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 nov. 2011.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 26, de 8 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mai. 2014.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC n. 84, de 17 de junho de 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 jun. 2016.

BROMLEY, S. K. et al. Recirculating Memory T Cells Are a Unique Subset of CD4⁺ T Cells with a Distinct Phenotype and Migratory Pattern. **Journal of Immunology**, v. 190, p. 970-976, 2013.

BRUM, E. S. et al. *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction presents antinociceptive activity without causing toxicological effects in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 115-124, 2016.

BRUM, T. F. et al. Ethnopharmacological study and topical anti-inflammatory activity of crude extract from *Poikilacanthus glandulosus* (Nees) Ariza leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 60-67, 2016.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B). **Planta Medica**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latina America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, A.C.B. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 467-479, 2011.

CHIBLI, L. A. et al. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 330-338, 2014.

CHIU, I. M.; VON HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, v. 15, p. 1063-1067, 2012.

CHU, CC.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. **Seminars in Immunology**, v. 23, p. 28-41, 2011.

CLARK, R. A. Skin-Resident T Cells: The Ups and Downs of On Site Immunity. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 362-370, 2010.

CONAGHAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy and toxicity. **Rheumatology International**, v. 32, p. 1491-1502, 2012.

DAINICHI, T.; HANAKAWA, S.; KABASHIMA, K. Classification of inflammatory skin diseases: A proposal based on the disorders of the three-layered defense systems, barrier, innate immunity and acquired immunity. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, p. 81-89, 2014.

DAVIS, J. A. et al. Influence of tumor necrosis factor- α polymorphism-308 and atopy on irritant contact dermatitis in healthcare workers. **Contact Dermatitis**, v. 63, p. 320-332, 2010.

DI MEGLIO, P.; PERERA, G. K.; NESTLE, F. O. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. **Immunity**, v. 35, p. 857-869, 2011.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, p. 935-950, 2010.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-12, 2014.

EBERTING, C. L. Irritant Contact Dermatitis: Mechanisms to repair. **Journal of Clinical & Experimental Dermatology Research**, v. 5, p. 4-11, 2014.

EL MALKI, K. et al. An Alternative Pathway of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in the Absence of Interleukin-17 Receptor A Signaling. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 441-451, 2013.

ENGLISH, J. et al. Consensus statement on the management of chronic hand eczema. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 34, p. 761-769, 2009.

ENDO, D. et al. Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils. **Inflammation Research**, v. 65, p. 151-159, 2016.

FEINGOLD, K. R.; SCHMUTH, M.; ELIAS, P. M. The Regulation of Permeability Barrier Homeostasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1574-1576, 2007.

FERRERO-MILIANI, L. et al. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 147, p. 227-235, 2007.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cadernos de Pesquisa (São Luís)**, v. 18, p. 90-95, 2011.

FLUHR, J. W. et al. Skin Irritation and Sensitization: Mechanisms and New Approaches for Risk Assessment. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 21, p. 124-135, 2008.

FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 201-208, 2008.

FULLERTON, J. M.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, p. 551-567, 2016.

FURTADO, A. A. et al. Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 225-235, 2016.

GOMES, R. C. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Tabernaemontana catharinensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 372-376, 2009.

GITTLER, J. K.; KRUEGER, J. G.; GUTTMAN-YASSKY, E. Atopic dermatitis results in intrinsic barrier and immune abnormalities: Implications for contact dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, p. 300-313, 2013.

GUIDOTI, D. G. G. et al. Morphoanatomic characterization of the stem and the leaf of *Tabernaemontana catharinensis* A.DC (Apocynaceae) and antimutagenic activity of its leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 667-678, 2015.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. **Blood**, v. 93, p. 2143-2148, 1998.

HANIFFA, M. et al. Human Tissues Contain CD141^{hi} Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103⁺ Nonlymphoid Dendritic Cells. **Immunity**, v. 37, p. 60-73, 2012.

HAUGE, E. et al. Topical valrubicin application reduces skin inflammation in murine models. **British Journal of Dermatology**, v. 167, p. 288-295, 2012.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nature Immunology**, v. 14, p. 978-985, 2013.

HERSHKO, A. Y. et al. Mast Cell Interleukin-2 Production Contributes to Suppression of Chronic Allergic Dermatitis. **Immunity**, v. 35, p. 562-571, 2011.

HERTER, J.; ZARBOCK, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 4451-4457, 2013.

HOU, X. L. et al. Suppression of inflammatory Responses by Dihydromyricetin, a Flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via Inhibiting the Activation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1689-1696, 2015.

HORINOUCI, C. D. S. et al. Combretum leprosum Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 311-319, 2013.

JENKINS, S. J. et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation. **Science**, v. 332, p. 1284-1288, 2011.

JIANG, X. et al. Skin infection generates non-migratory memory CD8⁺ T_{RM} cells providing global skin immunity. **Nature**, v. 483, p. 227-231, 2012.

KABASHIMA, K. New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis: Interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity. **Journal of Dermatological Science**, v. 70, p. 3-11, 2013.

KARLBERG, AT. et al. Allergic Contact Dermatitis – Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 53-69, 2008.

KHANDOGA, A. et al. Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. **Blood**, v. 106, p. 725-733, 2005.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 496-511, 2011.

KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 185-198, 2013.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 241-248, 2009.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 2400-2407, 2008.

KOCHI, I.; RAPINI, A. Apocynaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2011. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB004861>>. Acesso em: 10 dez, 2016.

KONRADI, S. et al. Langerhans cells maturation is accompanied by induction of N-cadherin and the transcriptional regulators of epithelial-mesenchymal transition ZEB1/2. **European Journal of Immunology**, v. 44, p. 553-560, 2014.

KUO, I. H. et al. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. **Allergy Clinical Immunology**, v. 131, p. 266-278, 2013.

LABORATÓRIO DE MANEJO FLORESTAL DA UNICENTRO. In: **Compêndio Online Gerson Luiz Lopes – *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae)**, 2016. Disponível em: <<http://sites.unicentro.br/wp/manejoflorestal/9542-2>>. Acesso em: 3 dez., 2016.

LACY, P.; STOW, J. L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**, v. 118, p. 9-19, 2015.

LAI, Y.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 131-141, 2009.

LANDECK, L. et al. Impact of tumour necrosis factor- α polymorphisms on irritant contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 66, p. 221-227, 2012.

LEE, H. Y. et al. Cytokines and Chemokines in Irritant Contact Dermatitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

LEE, J. et al. Topical Application of *Angelica sinensis* Improves Pruritus and Skin Inflammation in Mice with Atopic Dermatitis-Like Symptoms. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, p. 98-105, 2016.

LEHMANN, A. C. et al. Effects of *Tabernaemontana catharinensis* ethyl acetate fraction on glycemic responses and oxidative stress. **Nutrire**, v. 40, p. 297-305, 2015.

- LIM, KH. et al. *Seco-tabersonine* alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. *Phytochemistry*, v. 70, p. 424-429, 2009.
- LIN, YK. et al. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. ***Plos One***, v. 10, p. 1-19, 2015.
- LISBY, S.; BAADSGAARD, O. Mechanisms of Irritant Contact Dermatitis. In: FROSCHE, P. J.; MENNÉ, T.; LEPOITTEVIN, JP. **Contact Dermatitis**. 4 ed. Berlin: 2010. cap. 4, p. 69-82.
- MACLEOD, A.; HAVRAN, W. Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v. 68, p. 2399-2408, 2012.
- MABUCHI, T. et al. CCR6 Is Required for Epidermal Trafficking of $\gamma\delta$ -T Cells in an IL-23-induced Model of Psoriasiform Dermatitis. ***The Journal of Investigative Dermatology***, v. 133, p. 164-171, 2013.
- MAHDI, J. G. et al. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. ***Cell Proliferation***, v. 39, p. 147-155, 2006.
- MALISSEN, B.; TAMOUTOUNOUR, S.; HENRI, S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. ***Nature immunology***, v. 14, p. 417-428, 2014.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. ***Journal of Pathology***, v. 229, p. 176-185, 2013.
- MARTINS, L. E. A. M.; REIS, V. M. S. Immunopathology of allergic contact dermatitis. ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, v. 86, p. 419-433, 2011.
- MATOZINHOS, C. N.; KONNO, T. U. P. Diversidade taxonômica de Apocynaceae na Serra Negra, MG, Brasil. ***Hoehnea***, v. 38, p. 569-595, 2011.
- MEDEIROS, R. et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. ***European Journal of Pharmacology***, v. 559, p. 227-235, 2007.
- MEDEIROS, M. R. F. et al. Antimicrobial Activities of Indole Alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*. ***Natural Product Communications***, v. 6, p. 193-196, 2011.
- MENDES, D. A. G. B. et al. Hydroalcoholic extract of *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax displays potent anti-inflammatory activities through a glucocorticoid receptor-dependent pathway. ***Phytomedicine***, v. 23, p. 1610-1620, 2016.
- MIKAMI, N. et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Is an Important Regulator of Cutaneous Immunity: Effect on Dendritic Cell and T Cell Functions. ***Journal of Immunology***, v. 186, p. 6886-6893, 2011.

MOHAMMED, D. et al. Influence of niacinamide containing formulations on the molecular and biophysical properties of the stratum corneum. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, p. 192-201, 2013.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Immunology**, v. 8, p. 958-969, 2008.

NAGAO, K. et al. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. **Nature Immunology**, v. 13, p. 744-752, 2012.

NESTLE, F. O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Immunology**, v. 9, p. 679-691, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NICOLAOU, A. Eicosanoids in skin inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, p. 131-138, 2013.

NIXON, M.; ANDREW, R.; CHAPMAN, K. E. It takes two to tango: Dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. **Steroids**, v. 78, p. 59-68, 2013.

OUWEHAND, K. et al. Epidermis-to-dermis migration of immature Langerhans cells upon topical irritant exposure is dependent on CCL2 and CCL5. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 2026-2034, 2010.

OUWEHAND, K. et al. Irritant-Induced Migration of Langerhans Cells Coincides with an IL-10-dependent Switch to a Macrophage-Like Phenotype. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 418-425, 2011.

OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. **Nature immunology**, v. 16, p. 378-391, 2016.

PANDEY, A.; NEGI, P. S. Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Neolamarckia cadamba*: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, p. 118-135, 2016.

PARK, E. J. et al. Structural basis of blocking integrin activation and deactivation for anti-inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, p. 51, 2015.

PASPARAKIS, M. Role of NF- κ B in epithelial biology. **Immunological Reviews**, v. 246, p. 346-358, 2012.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Immunology**, v. 14, p. 289-301, 2014.

PASSOS, G. F. et al. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, 413-420, 2013.

PEREIRA, C. G. et al. Antioxidant and Antimycobacterial Activities of *Tabernaemontana catharinensis* Extracts Obtained by Supercritical CO₂+ cosolvent. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, p. 533-538, 2005.

PEREIRA, C. G.; CARVALHO, J. E.; MEIRELES, M. A. A. Anticancer activity of *Tabernaemontana catharinensis* extract obtained by supercritical fluid extraction. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 144-149, 2006.

PEREIRA, C. G. et al. Chemical Constituents from *Tabernaemontana catharinensis* Root Bark: A Brief NMR Review of Indole Alkaloids and *in vitro* Cytotoxicity. **Quimica Nova**, v. 31, p. 20-24, 2008.

PETERS, E. M. J. et al. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1937-1947, 2006.

PIANA, M. et al. Anti-inflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a modelo f sunburnin rats and the gel stability study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 458-465, 2013.

PIANA, M. et al. Phytochemical analysis and antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 881-888, 2014.

PIANA, M. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.179, p. 16-21, 2016.

PINTO, N. C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-337, 2015.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endotelial cells in inflammation. **Nature Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. .M.; JENSEN, JM. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063-1072, 2008.

RATHEE, P. et al. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 8, p. 229-235, 2009.

ROCHLITZER, S. et al. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide affects allergic airway inflammation by modulating dendritic cell function. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 41, p. 1609-1621, 2011.

ROTH, S. H. Coming to Terms with Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Gastropathy. **Drugs**, v. 72, p. 873-879, 2012.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 486-491, 2011.

SAUDER, D. N. et al. Epidermal Cell Production of Thymocyte Activating Factor (ETAf). **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 79, p. 34-39, 1982.

SCHACKE, H. et al. Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, p. 1088-1103, 2009.

SCHNEIDER, M. R.; ULLRICH, R. S. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. **Current Biology**, v. 19, p. R132-R142, 2009.

SENESCHAL, J. et al. Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. **Immunity**, v. 36, p. 873-884, 2012.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, p. 92-101, 2014.

SEYFARTH, F. et al. Dry skin, barrier function, and irritant contact dermatitis in the elderly. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 31-36, 2011.

SHKLOVSKAYA, E. et al. Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 18049-18054, 2011.

SIDDIQUI, F. et al. *Opuntia dillenii* cladode: Opuntiol and opuntioside attenuated cytokines and eicosanoids mediated inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 182, p. 221-234, 2016.

SIEWEKE, M. H.; ALLEN, J. E. Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. **Science**, v. 342, p. 1-8, 2013.

SILVA, K. A. B. S. et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyirin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, v. 152, p. 1872-1887, 2011.

SILVA, M. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 393-401, 2013.

SILVA, A. R. H. et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, p. 908-916, 2014.

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

SLODOWNIK, D.; LEE, A.; NIXON, R. Irritant contact dermatitis: A review. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 49, p. 1-11, 2008.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Immunology**, v. 10, p. 427-439, 2010.

SUNDD, P. et al. 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. **Nature**, v. 488, p. 399-403, 2012.

ST JOHN, A. L. et al. Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 9190-9195, 2011.

TAN, SY.; ROEDIGER, B.; WENINGER, W. The role of chemokines in cutaneous immunosurveillance. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, p. 337-346, 2015.

TREVISAN, G. et al. Identification of the Plant Steroid α -Spinasterol as a Novel Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Antagonist with Antinociceptive Properties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 343, p. 258-269, 2012.

TRIVELLATOGRASSI, L. et al. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, antinociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 127-138, 2013.

UNZUETA, A.; VARGAS, H. E. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug-Induced Hepatotoxicity. **Clinics in Liver Disease**, v. 17, p. 643-656, 2013.

VAN BUUL, J. D.; HORDIJK, P. L. Endothelial Signaling by Ig-Like Cell Adhesion Molecules. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 1870-1876, 2007.

VERONESE, E. L. G. et al. Inhibition of the myotoxic activity of Bothrops jararacussu venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). **Phytomedicine**, v. 12, p. 123-130, 2005.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Immunology**, v. 15, p. 692-704, 2015.

VISSER, M. J. et al. Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 168, p. 326-332, 2013.

WALKER, C. I. B. et al. Antinociceptive effect of *Mirabilis jalapa* on acute and chronic pain models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 685-693, 2013.

WANG, BJ. et al. Hexavalent chromium induced ROS formation, Akt, NF- κ B, and MAPK activation, and TNF- α and IL-1 α production in keratinocytes. **Toxicology Letters**, v. 198, p. 216-224, 2010.

WANG, CY. et al. Glycyrrhizic Acid and 18 β -Glycyrrhetic Acid Modulate Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ Inhibitions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7726-7733, 2011.

WANG, H. et al. An Animal Model of Trichloroethylene-Induced Skin Sensitization in BALB/c Mice. **International Journal of Toxicology**, v. 34, p. 442-453, 2015.

WEBER, C.; FRAEMOHS, L.; DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. **Nature Immunology**, v. 7, p. 467-477, 2007.

WULLAERT, A.; BONNET, M. C.; PASPARAKIS, M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. **Cell Research**, v. 21, p. 146-158, 2011.

XIAO, X. et al. Rebounding triad (severe itching, dryness and burning) after facial corticosteroid discontinuation defines a specific class of corticosteroid-dependent dermatitis. **Journal of Dermatology**, v. 42, p. 697-702, 2015.

XU, Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of Flos populi. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 540-545, 2014.

YEOM, M. et al. Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear. **Journal of Dermatological Science**, v. 67, p. 101-110, 2012.

YOSHIKI, R. et al. IL-23 from Langerhans Cells Is Required for the Development of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Dermatitis by Induction of IL-17 A-Producing $\gamma\delta$ T Cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. 1912-1921, 2014.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, p. 1421-1428, 2010.

ANEXO A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Tabernaemontana catharinensis* E DO BRUTO DE *Solanum aculeatissimum* SOBRE O EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR AGENTES IRRITANTES."

Número do Parecer: 150/2014

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dr.^a Sara Marchesan de Oliveira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

*** Foram Aprovados 420 animais (Camundongos heterogênicos).**

OBS: esta carta de aprovação retifica a carta emitida em 25 de março de 2015, na qual constava 420 ratos heterogênicos.

DATA DE APROVAÇÃO: 25/03/2015.

Santa Maria, 23 de fevereiro de 2017.

Prof.^a Dr.^a Daniela B. Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

ANEXO B



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO BRUTO E FORMULAÇÕES EM GÉIS DE *Tabernaemontana catharinensis* EM MODELO DE INFLAMAÇÃO DE PELE EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 5199270616, sob a responsabilidade de **Sara Marchesan de Oliveira** e equipe; *Camila Camponogara* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 25/08/2016.

We certify that the proposal "Topical anti-inflammatory activity of crude extract and gels formulations *Tabernaemontana catharinensis* on skin inflammation model in mice", utilizing 433 Heterogenics mice (433 males), protocol number CEUA 5199270616, under the responsibility of **Sara Marchesan de Oliveira** and team; *Camila Camponogara* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 08/25/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **12/2018**

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **4 a 5 semanas**

N: **433**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Resumo: A pele é o revestimento externo do corpo, na qual exerce diversas funções fisiológicas essenciais à vida. Apresenta um papel importante na manutenção e desenvolvimento de defesa, uma vez que está constantemente sujeita a estímulos externos, podendo desencadear uma resposta inflamatória. Para que a resposta inflamatória torne-se evidente, é necessário que ocorra diversos mecanismos hemodinâmicos. No entanto, uma falha em um dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória pode predispor ao desenvolvimento de doenças inflamatórias da pele. As doenças inflamatórias de pele mais comuns incluem dermatite atópica e psoríase. Ambos os distúrbios podem ter um alto impacto sobre a qualidade de vida do paciente. Pelo fato de os tratamentos, como por exemplo, os corticoides, atualmente disponíveis para tratar doenças inflamatórias crônicas de pele, produzir uma infinidade de efeitos colaterais, como, retenção de líquidos, aumento da pressão arterial, problemas gástricos, crescimento de pêlos no rosto, osteoporose, entre outros, torna-se necessária a busca de alternativas de tratamentos eficazes e seguros. Assim, este trabalho tem por finalidade investigar a propriedade anti-inflamatória tópica do extrato bruto e formulações em géis de *Tabernaemontana catharinensis* em modelo de inflamação de pele em camundongos. Para os experimentos serão utilizados camundongos Swiss albinos machos (25-30 g). O modelo de inflamação de pele (agudo e crônico) será induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton. Parâmetros inflamatórios de infiltração leucocitária, níveis de citocinas pró-inflamatórias, avaliação de um possível mecanismo de ação e toxicidade pelo tratamento com *T. catharinensis* também serão verificados.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia (LabNeuro)

Santa Maria, 10 de dezembro de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria