

# EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO EXTRATO ALCOÓLICO DE FOLHAS DE *Garcinia gardneriana* NA PERITONITE INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF *Garcinia gardneriana* LEAF EXTRACT ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED PERITONITIS

EFFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Garcinia gardneriana* EN LA PERITONITIS INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDOS

Jéssica Messias da Silva\*, Karina Miranda de Lazari\*\*, Ana Flávia Santos\*\*, Ariane Harumi Yoshikawa\*\*\*, Lucas Possebom\*\*\*\*, Helena Ribeiro Souza\*\*\*\*\*, Ana Paula Girol\*\*\*\*\*

## Resumo

**Introdução:** A *Garcinia gardneriana* é utilizada na medicina tradicional brasileira para o tratamento de tumores, inflamações e alívio de dores, mas as informações científicas são ainda limitadas. **Objetivos:** Diante do uso popular e o anseio por efeitos colaterais mínimos, o objetivo geral deste estudo foi avaliar as propriedades anti-inflamatórias da *G. gardneriana* em modelo de peritonite induzido por lipopolissacarídeo (LPS). **Métodos:** Ratos Wistar foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (n= 5/ grupo): controle, induzido à peritonite e não tratado e induzido à peritonite e tratado com extrato de folhas alcoólico de *G. gardneriana* a 4%. A peritonite foi induzida por única injeção intraperitoneal de LPS (1 mg/kg). O tratamento com o extrato foi realizado por gavagem (1 ml), administrado antes e 12h após a injeção do LPS. Os ratos foram eutanasiados após 24h da indução de peritonite. Amostras de sangue foram coletadas para análise plasmática de histamina, o lavado intraperitoneal para quantificação de neutrófilos e o intestino delgado para processamento histológico, quantificação de mastócitos e imuno-histoquímica da expressão da proteína Annexina A1 (AnxA1). **Resultados:** As análises quantitativas indicaram os efeitos anti-inflamatórios do extrato, pela redução do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal e a diminuição da quantidade de mastócitos na lâmina própria do intestino delgado, comparadas aos animais não tratados. Não houve diferença estatística dos níveis de histamina. A imuno-histoquímica indicou diminuição acentuada da expressão da AnxA1 na mucosa intestinal dos animais tratados. **Conclusão:** Nossos dados demonstraram que o extrato alcoólico de *G. gardneriana* tem forte ação anti-inflamatória e potencial terapêutico para o desenvolvimento de fitoterápicos com propriedades anti-inflamatórias.

**Palavras-chave:** Peritonite. Fitoterápicos. Inflamação.

## Abstract

**Introduction:** *Garcinia gardneriana* is used in traditional Brazilian medicine for the treatment of tumors, inflammation and relief of pain, but scientific information is still limited. **Objective:** In the face of popular use and the desire for minimal side effects, the general objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory properties of *G. gardneriana* in a model of lipopolysaccharide-induced peritonitis (LPS). **Methods:** Wistar rats were randomly divided into 3 groups (n = 5 / group): control, induced to peritonitis and untreated and induced to peritonitis and treated with 4% alcoholic extract of *G. gardneriana* leaves. Peritonitis was induced by single intraperitoneal injection of LPS (1 mg/kg). Treatment with the extract was performed by gavage (1 ml), given before and 12h after LPS injection. The rats were euthanized 24h after the peritonitis induction. Blood samples were collected for plasma analysis of histamine, intraperitoneal lavage for quantification of neutrophils and the small intestine for histological processing for quantification of mast cells, and immunohistochemical analysis of the expression of Annexin A1 (AnxA1) protein. **Results:** Quantification analyses indicated the anti-inflammatory effects of the extract by reducing the recruitment of neutrophils into the peritoneal cavity and reducing the amount of mast cells in the lamina propria of the small intestine compared to the untreated animals. There was no statistical difference in the levels of histamine. Immunohistochemical studies indicated a marked decrease of the AnxA1 expression in the intestinal mucosa of the treated animals. **Conclusion:** Our data demonstrated that the alcoholic extract of *G. gardneriana* has a strong anti-inflammatory action and therapeutic potential for the development of herbal products with anti-inflammatory properties.

**Keywords:** Peritonitis. Herbal medicines. Inflammation.

\*Biomédica e técnica dos Laboratórios de Histopatologia e Imuno-histoquímica do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP.

\*\* Acadêmicas do curso de Medicina do Centro Universitário Padre Albino (FAMECA/UNIFIPA), Catanduva-SP.

\*\*\*Biomédica, Mestre em Ciências da Saúde pela FAMERP de São José do Rio Preto. Técnica do Centro de Pesquisas Experimentais e Clínicas (CEPEC), do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP.

\*\*\*\*Biólogo, Mestre e Doutor em Biociências pelo Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto-SP. Professor (nível I) das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP.

\*\*\*\*\*Bióloga, Mestre e Doutora em Biociências pelo Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto-SP. Técnica dos Laboratórios de Histopatologia e Imuno-histoquímica do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA), Catanduva-SP.

\*\*\*\*\*Bióloga, Mestre em Morfologia pela UNIFESP, Doutora em Genética, área de concentração Biologia Celular e Molecular e Pós-Doutora em Imunomorfologia pela UNESP de São José do Rio Preto-SP. Professora (nível I) das disciplinas de Biologia Celular, Histologia e Embriologia da UNIFIPA e docente das Pós-Graduações em Biociências, UNESP de São José do Rio Preto-SP e em Biologia Estrutural e Funcional, UNIFESP de São Paulo-SP. Contato para correspondência: anapaula.girol@unifipa.com.br

## Resumen

**Introducción:** *Garcinia gardneriana* se utiliza en la medicina tradicional brasileña para el tratamiento de tumores, inflamaciones y alivio del dolor, pero la información científica aún es limitada. **Objetivo:** Frente al uso popular y la búsqueda de efectos secundarios mínimos, lo objetivo general de este estudio fue evaluar las propiedades antiinflamatorias de *G. gardneriana* en un modelo de peritonitis inducido por lipopolisacárido (LPS). **Métodos:** Se dividieron aleatoriamente ratas Wistar en 3 grupos (n= 5/grupo): control, inducido a peritonitis y no tratado, e inducido a peritonitis y tratado con extracto alcohólico de hojas de *G. gardneriana* al 4%. La peritonitis fue inducida por una única inyección intraperitoneal de LPS (1 mg/kg). El tratamiento con el extracto se realizó por gavaje (1 ml), administrado antes y 12 horas después de la inyección de LPS. Las ratas fueron sacrificadas después de 24 horas de la inducción de peritonitis. Se recopilaron muestras de sangre para el análisis plasmático de histamina, el lavado intraperitoneal para la cuantificación de neutrófilos y el intestino delgado para el procesamiento histológico, la cuantificación de mastocitos y la inmunohistoquímica de la expresión de la proteína Anexina A1 (AnxA1). **Resultados:** Los análisis cuantitativos indicaron los efectos antiinflamatorios del extracto, mediante la reducción del reclutamiento de neutrófilos en la cavidad peritoneal y la disminución de la cantidad de mastocitos en la lámina propia del intestino delgado, en comparación con los animales no tratados. No hubo diferencia estadística en los niveles de histamina. La inmunohistoquímica indicó una disminución pronunciada de la expresión de AnxA1 en la mucosa intestinal de los animales tratados. **Conclusión:** Nuestros datos demostraron que el extracto alcohólico de *G. gardneriana* tiene una fuerte acción antiinflamatoria y potencial terapéutico para el desarrollo de fitoterapéuticos con propiedades antiinflamatorias.

**Palabras clave:** Peritonitis. Fitoterapéuticos. Inflamación.

## INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica protetora que envolve vasos sanguíneos, células imunológicas e mediadores inflamatórios<sup>1</sup>. Entre as células inflamatórias, os mastócitos (MCs) liberam mediadores pró-inflamatórios, por meio da desgranulação, como a histamina, a qual provoca a vasodilatação e consequentemente o extravasamento de plasma, resultando no acúmulo de líquido na região e lesão tecidual<sup>2</sup>.

Contudo, o processo também conta com os mediadores anti-inflamatórios, entre os quais a proteína Anexina A1 (AnxA1), que mantém o equilíbrio da resposta imunológica<sup>3,4</sup>. A AnxA1 foi o primeiro membro clonado de uma superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas, denominadas anexinas, que apresentam uma sequência de 70 a 80 aminoácidos altamente conservada nos vertebrados, sendo capazes de se ligarem aos fosfolípidios de membrana de maneira dependente de cálcio<sup>3-5</sup>. A AnxA1 está envolvida em processos celulares presentes no reparo tecidual, como regulação da inflamação, crescimento celular, migração celular, transporte de membrana, proliferação, diferenciação e apoptose<sup>5-7</sup>.

Atualmente os medicamentos anti-inflamatórios disponíveis apresentam efeitos colaterais adversos, que inibem o seu uso clínico<sup>8</sup>. Desse modo, há grande demanda por novas terapias anti-inflamatórias. Na busca de novas opções terapêuticas que podem causar menos

efeitos colaterais adversos, os compostos naturais têm sido amplamente estudados<sup>9</sup>. Entre as plantas brasileiras com esse potencial, destaca-se a *Garcinia gardneriana*, espécie da família *Clusiaceae*, nativa da Amazônia<sup>10,11</sup>, comumente conhecida como bacupari, que tem sido usada na medicina tradicional brasileira para tratamento de tumores, inflamação do trato urinário, artrite e alívio da dor<sup>11,12</sup>. Diferentes estudos mostraram propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antitumorais, antioxidantes e vasodilatadoras do gênero *Garcinia* em vários modelos experimentais<sup>13-18</sup>. Contudo as atividades anti-inflamatórias da *G. gardneriana* em estudos de inflamação ainda são limitadas.

Considerando o uso popular e o anseio de efeitos colaterais mínimos, avaliamos as propriedades anti-inflamatórias da *G. gardneriana* em modelo de peritonite induzido por endotoxina.

## OBJETIVOS

**Objetivo Geral:** avaliar os efeitos anti-inflamatórios do extrato bruto de *G. gardneriana*, em modelo de peritonite induzida com lipopolissacarídeo (LPS).

**Objetivos específicos:** quantificar neutrófilos no lavado intraperitoneal; avaliar os mastócitos e analisar a expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 na mucosa intestinal; dosar histamina no plasma sanguíneo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do extrato e seleção da dosagem

Folhas de *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (IAC: 56753) foram coletadas na APTA regional polo centro norte, Pindorama-SP. O extrato de *G. gardneriana* foi obtido por percolação, com o uso de 20 g de folhas secas e trituradas com 100 mL de álcool de cereais, resultando no extrato bruto final a 20%.

A dosagem do extrato foi selecionada por meio de estudos de citotoxicidade *in vitro*. Para as avaliações de hemólise, o álcool foi evaporado e o extrato resuspenso em solução glicosilada em diferentes concentrações, e adicionado a uma suspensão de glóbulos vermelhos glicosilados, seguido de leitura de absorbância no espectrofotômetro. No controle negativo foi adicionada apenas a solução glicosilada e o detergente *triton* foi usado no controle positivo.

### Animais

Ratas da linhagem *Wistar* (n = 15), pesando entre 200g a 250g, foram obtidas da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) de Catanduva-SP, Brasil. Os animais foram abrigados sob o ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a comida e água, mantidos em gaiolas padrão. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Cirurgia Experimental e Multidisciplinar da UNIFIPA, após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFIPA) (certificado nº 05/18).

Para a realização dos experimentos as ratas foram divididas em 3 grupos (n= 5/grupo): Controle (C), Peritonite induzida por endotoxina (PIE) sem tratamento e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. gardneriana* a 4% (PIE + *G. gardneriana*).

### Modelo de peritonite e protocolos de tratamento

A peritonite foi induzida, em dois grupos de ratas, com solução de 25 mg de LPS (sorotipo 0127: B8, Sigma Chemical Co.) diluído em 200 µl de PBS e aplicada intraperitonealmente (i.p)<sup>19</sup>. Animais sem manipulação foram usados como grupo controle.

Para avaliação das atividades anti-inflamatórias da *G. gardneriana*, um dos grupos foi administrado duas

vezes, por gavagem, com o extrato a 4% (1 ml / gavagem), sendo a primeira administração realizada antes da injeção do LPS e a segunda 12h depois da indução da peritonite. Após 24h da injeção do LPS os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico inalatório (isoflurano) para coleta de sangue, lavado peritoneal e intestino delgado.

### Avaliações quantitativas e histopatológicas

Após coleta de sangue por punção cardíaca, a pele do abdome foi retirada e adicionados 2 ml de PBS, intraperitonealmente. O abdome foi massageado suavemente e uma pequena incisão foi feita logo abaixo do externo para aspiração cuidadosa do lavado peritoneal, que foi então centrifugado a 1500 RPM durante 10 minutos. A seguir, o excesso de PBS foi descartado e o *pellet* resuspenso em 900 µl de PBS e 100 µl de Turk para quantificação das células inflamatórias em câmara de Neubauer. Os valores foram obtidos como número de células x 10<sup>3</sup> ml.

Fragmentos do intestino delgado foram lavados com PBS, fixados em formol a 4%, processados para inclusão em parafina e seccionados (3µm). Os mastócitos (MCs) foram corados pelo Azul de Toluidina a 0,1% e avaliados de acordo com suas características morfológicas e estado de ativação em intactos (inativos) e desgranulados (ativos). A quantificação dos MCs foi realizada em 10 imagens por lâmina, obtidas pela objetiva de 40X no microscópio *Leica* (DM500) do Laboratório Multidisciplinar UNIFIPA. As áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do *software Leica Image Analysis*. Os dados foram expressos como média ± erro padrão (S.E.M.) do número de MCs por mm<sup>2</sup> <sup>20,21</sup>.

### Estudo imuno-histoquímico

A expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 foi estudada por imuno-histoquímica e densitometria. Para isso, secções (3 µm) das diferentes amostras foram preparadas em lâminas gelatinizadas, desparafinizadas, reidratadas e, após a recuperação antigênica (tampão citrato pH 6,0 a 96° C, durante 10 minutos) e o bloqueio com metanol, as secções foram lavadas em PBS e incubadas *overnight* em câmara úmida a 4° C com o anticorpo primário *polyclonal rabbit anti-AnxA1* (1:2000; *Abcam*) diluído em BSA a 1%. No dia

seguinte, foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (kit *Zymed Invitrogen*), e a seguir, em substrato diaminobenzidina (DAB) (kit *Zymed Invitrogen*) para revelação. Após, as secções foram contracordadas com Hematoxilina.

Para as análises densitométricas, lâminas de todos os grupos foram usadas e 20 pontos distintos do epitélio e da lâmina própria da mucosa intestinal, por lâmina, foram avaliados para obtenção da média relacionada a intensidade da imunomarcação. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (de 0 a 255) pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis*<sup>20,21</sup>.

### Análises do plasma sanguíneo

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas, as alíquotas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 RPM e o plasma congelado a -70° C para posterior dosagem da histamina, que foram realizadas por ELISA, com kits comercialmente disponíveis e de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. de ng de proteínas/ml.

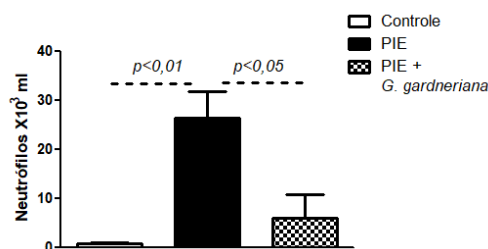
### Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade. Para distribuição normal foi usada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS

A análise de leucócitos do lavado peritoneal (Figura 1) indicou grande influxo de neutrófilos ( $p < 0,01$ ) nos animais induzidos à peritonite e não tratados, comparado ao controle. Contudo, nos animais tratados com o extrato de *G. gardneriana* ocorreu redução do influxo de neutrófilos ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sem tratamento.

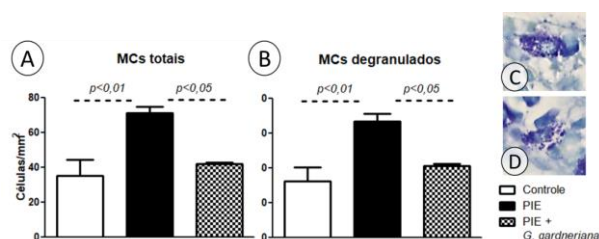
**Figura 1** - Quantificação de neutrófilos no lavado peritoneal



Grupos Controle, Peritonite induzida por endotoxina sem tratamento (PIE) e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. gardneriana* a 4% (PIE + *G. gardneriana*). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão (S.E.M.) do número de neutrófilos X 10<sup>3</sup> ml (n= 5/ grupo).

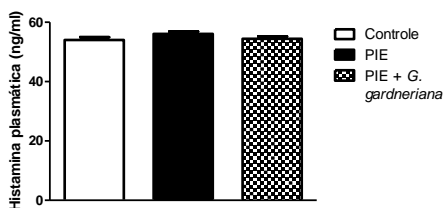
Nas avaliações histopatológicas da mucosa intestinal (Figura 2), os MCs foram identificados na lâmina própria, pela presença de grânulos metacromáticos no citoplasma e considerados intactos, quando as células mostraram contornos bem definidos (Figura 2C) e desgranulados (Figura 2D) quando os grânulos foram observados dispersos ao redor. A quantificação indicou aumento significativo ( $p < 0,01$ ) dos MCs, intactos (Figura 2A) e desgranulados (Figura 2B) no grupo peritonite sem tratamento em comparação com o controle. A administração do extrato de *G. gardneriana* reduziu essas células ( $p < 0,05$ ).

**Figura 2** - Quantificação dos mastócitos na lâmina própria do intestino delgado



Mastócitos (MCs) totais (A) e desgranulados (B). Detalhes das características histopatológicas das células intactas (C) e desgranuladas (D). Coloração Azul de Toluidina. Grupos Controle, Peritonite induzida por endotoxina sem tratamento (PIE) e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. gardneriana* a 4% (PIE + *G. gardneriana*). Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão (S.E.M.) do número de MCs por mm<sup>2</sup>. (n= 5/ grupo).

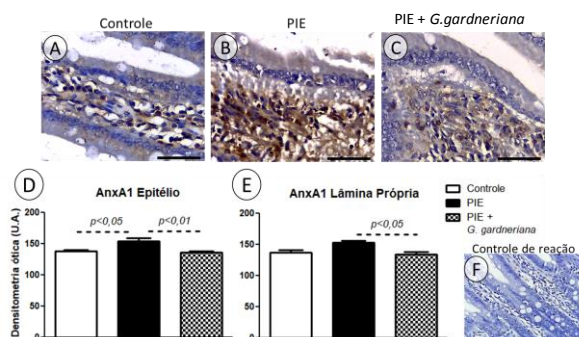
As análises do plasma sanguíneo indicaram que não houve diferença significativa entre os grupos para a histamina (Figura 3).

**Figura 3** - Níveis de histamina no plasma sanguíneo

Os dados são representados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M).

Os estudos imuno-histoquímicos mostraram expressão da proteína AnxA1 no epitélio e lâmina própria da mucosa intestinal (Figura 4). O padrão de expressão foi semelhante nos grupos controle (Figura 4A) e peritonite tratado com extrato de *G. gardneriana* (Figura 4C). Diferentemente, foi observado aumento da expressão da proteína nos animais não tratados.

As análises densitométricas da expressão da AnxA1 foi analisada no epitélio (Figura 4D) e na lâmina própria (Figura 4E) da mucosa intestinal. A especificidade da imunomarcagem foi comprovada pelo controle de reação (Figura 4F). Essas análises corroboram as observações histológicas e indicaram aumento na expressão da proteína no grupo não tratado, no tecido epitelial ( $p < 0,05$ ), e redução da expressão após tratamento no epitélio ( $p < 0,01$ ) e na lâmina própria ( $p < 0,05$ ).

**Figura 4** - Expressão da AnxA1 na mucosa intestinal

Expressão da AnxA1 no epitélio e lâmina própria dos grupos Controle (A), Peritonite induzida por endotoxina sem tratamento (PIE) (B) e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. gardneriana* a 4% (PIE + *G. gardneriana*) (C). A imunomarcagem é aumentada no grupo não tratado (B). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 50 $\mu$ m. Ausência de imunorreatividade no controle de reação (F). **Análises densitométricas.** No epitélio (D) e lâmina própria (E). Os dados são representados como média  $\pm$  erro padrão da média (S.E.M)

## DISCUSSÃO

No Brasil, a utilização de plantas medicinais no tratamento de diferentes condições clínicas é uma prática comum e, atualmente, alguns medicamentos fitoterápicos estão disponíveis na rede farmacêutica e nas instituições de saúde<sup>22,23</sup>, o que estimula o desenvolvimento de novas investigações sobre a eficácia de fitoterápicos como alternativas terapêuticas ou adjuvantes no tratamento de diferentes doenças. As espécies de *Garcinia* vêm sendo estudadas em diferentes condições inflamatórias e diversas infecções em modelos animais e apresentam algumas propriedades biológicas interessantes como atividades antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e vasodilatadoras<sup>11,15-17,24</sup>. No presente estudo, avaliamos as propriedades anti-inflamatórias de *G. gardneriana* em modelo de peritonite induzida por LPS, para justificar seu uso na medicina popular.

O LPS liga-se a receptores Toll-like (TLR4) presentes em células epiteliais e fagocitárias e promove a produção de citocinas pró-inflamatórias e migração de leucócitos<sup>25</sup>. No nosso estudo, a administração da endotoxina induziu intensa resposta inflamatória com influxo de leucócitos, especialmente células mononucleares e neutrófilos na cavidade peritoneal. Entretanto, o tratamento com o extrato de *G. gardneriana* reduziu significativamente a resposta inflamatória. O efeito protetor de fitoterápicos no modelo de peritonite também foi demonstrado em outras investigações<sup>26,27</sup>, reforçando a potencialidade de aplicação de ervas medicinais na inflamação. A *G. gardneriana* é rica em metabólitos secundários, entre os quais xantonas, esteroides, triterpenos e flavonoides que têm sido associados a efeitos farmacológicos como atividades anti-inflamatórias, antinociceptivas, antibacterianas e antiparasitárias<sup>11</sup>. Em especial, o composto fukugetina encontrado na *G. gardneriana* apresentou importante atividade anti-inflamatória no edema de pata de camundongo induzido por carragenina<sup>28</sup>.

As análises também indicaram diminuição no número de mastócitos intactos e desgranulados na mucosa intestinal na lâmina própria do intestino, no grupo tratado, mostrando o papel anti-inflamatório do extrato de *G. gardneriana* também em células de defesa

do tecido conjuntivo. O conteúdo dos grânulos dos MCs pode ser liberado por meio da ativação com ligação da IgE aos receptores FcεR, mas também, por outros mecanismos como ativação dos receptores *toll-like* por produtos microbianos<sup>2,29,30</sup>.

De maneira interessante, nas dosagens de histamina, nossos dados não mostraram valores significativamente diferentes entre os grupos. Isto pode estar relacionado ao momento de coleta do sangue, após 24h da indução da peritonite, pois a liberação de histamina pelos MCs provavelmente ocorreu nas primeiras horas da aplicação do LPS conforme observado no trabalho de Seeley et al.<sup>31</sup>.

Na sequência do trabalho, estudamos a expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 na mucosa intestinal, e as análises mostraram aumento na expressão da proteína no grupo induzido pelo LPS. Esse resultado era esperado, visto a AnxA1 ser um potente mediador anti-inflamatório endógeno e exógeno<sup>6,7</sup>. Investigações *in vivo* e *in vitro* indicaram que a AnxA1 promove fechamento de lesões provocadas em epitélio intestinal<sup>32,33</sup>. Ferlazzo et al.<sup>34</sup> observaram que, em cultivo de macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS), o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 induziu liberação de IL-10 de modo dose dependente, evidenciando que, parte da mediação anti-inflamatória da AnxA1 é devida ao estímulo da expressão de IL-10.

Contudo, no grupo tratado com o extrato de *G. gardneriana* os níveis de expressão da proteína são semelhantes ao do grupo controle. Esses resultados apontam que os efeitos anti-inflamatórios observados pela administração do extrato ocorrem de maneira independente da AnxA1.

## CONCLUSÃO

Os dados do estudo evidenciam os efeitos anti-inflamatórios do extrato alcoólico de *G. gardneriana* em modelo de peritonite. O tratamento reduziu o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal, diminuiu o número de mastócitos intactos e desgranulados na lâmina própria da mucosa intestinal. A redução da proteína anti-inflamatória AnxA1, na mucosa do intestino delgado, com a administração do extrato indica que o tratamento atua de maneira independente desse mediador. Em conjunto esses dados revelam a

potencialidade terapêutica do extrato de *G. gardneriana* para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios.

## REFERÊNCIAS

1. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jan; 12(1):49-62.
2. Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*. 2014 Oct; 62(10):698-738.
3. Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J*. 2007 Apr; 21(4):968-75.
4. Han PF, Che XD, Li HZ, Gao YY, Wei XC, Li PC. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. *Chin J Traumatol*. 2020 Apr; 23(2):96-101.
5. Sheikh MH, Solito E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar; 19(4):1045.
6. Girol AP, Mimura KK, Drewes CC, Bolonheis SM, Solito E, Farsky SH, Gil CD, Oliani SM. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation *in vivo* and *in vitro*. *J Immunol*. 2013 Jun; 190(11):5689-701.
7. Xu R, Weber MC, Hu X, Neumann PA, Kamaly N. Annexin A1 based inflammation resolving mediators and nanomedicines for inflammatory bowel disease therapy. *Semin Immunol*. 2022 Nov;61-64:101664.
8. Shukla S, Mehta A, Mehta P, Vyas SP, Shukla S, Bajpai VK. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models. *Food Chem Toxicol*. 2010 Jan; 48(1):61-4.
9. Pan X, Cao X, Li N, Xu Y, Wu Q, Bai J, Yin Z, Luo L, Lan L. Forsythin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing JAK-STAT and p38 MAPK signalings and ROS production. *Inflamm Res*. 2014 Jul; 63(7):597-608.
10. Ampofo AS, Waterman PG. Xanthenes and neoflavonoids from two Asian species of *Calophyllum*. *Phytochemistry*. 1986; 25(11):2617-20.
11. Espírito Santo BLS, Santana LF, Kato Junior WH, Araújo FO, Bogo D, Freitas KC, et al. Medicinal potential of *Garcinia* Species and their compounds. *Molecules*. 2020 Oct; 25(19):4513.
12. Prakash Babu N, Saravanan S, Pandikumar P, Bala Krishna K, Karunai Raj M, Ignacimuthu S. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of 3-hydroxy, 2-methoxy sodium butanoate from the leaves of *Clerodendrum phlomidis* L.f. *Inflamm Res*. 2014 Feb; 63(2):127-38.
13. Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1978. v. 1. p. 232-4.
14. Diaz Carballo D, Malak S, Bardenheuer W, Freistuehler M, Reusch HP. Novel antitumoral compound isolaste from *Clusia rosea*. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2013; 41:622-3.
15. Hay AE, Aumont MC, Mallet S, Dumontet V, Litaudon M, Rondeau D, et al. Antioxidant xanthenes from *Garcinia vieillardii*. *J Nat Prod*. 2004; 67(4):707-9.
16. Cruz AJ, Santos MH, Nagem TJ, Côrtes SF, et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. *Phytomedicine*. 2006; 13(6):442-5.
17. Castardo JC, Prudente AS, Ferreira J, Guimaraes CL, Monache FD, Filho VC, Otuki MF, Cabrini DA. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw edema. *J Ethnopharmacol*. 2008; 118(3):405-11.

18. Souza HR, Zucoloto AR, Francisco ITP, Rays HP, Tinti NP, Della Matta NJ, Guandalini RB, Yoshikawa AH, Messias da Silva J, Possebon L, Iyomasa-Pilon MM, Moreno AH, Girol AP. Evaluation of the healing properties of *Garcinia brasiliensis* extracts in a cutaneous wound model. *J Ethnopharmacol.* 2022 Sep; 295:115334.
19. Gruen M, Biehlmann AL, Zollner TM, Nagel J. Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of abdominal pain in the LPS-induced peritonitis model in the rat. *J Neurosci Methods.* 2014; 232:118-24.
20. Souza HR, Azevedo LR, Possebon L, Costa SS, Iyomasa-Pilon MM, Oliani SM, et al. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. *PLoS One.* 2017; 12(3):e0173649.
21. Possebon L, Lebron ISL, Silva LF, Paletta JT, Glad BG, Sant'Ana M, Iyomasa-Pilon MM, Souza HR, Costa SS, Pereira da Silva Rodrigues G, Pereira ML, de Haro Moreno A, Girol AP. Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. *Biomed Pharmacother.* 2018 Mar; 99:591-7.
22. Antonio GD, Tesser CD, Moretti-pires RO. Phytotherapy in primary health care. *Rev Saúde Pública.* 2014; 48(3):541-53.
23. Caccia-Bava MCGG, Bertoni BW, Pereira AMS, Martinez EZ. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). *Ciênc Saúde Coletiva [Internet].* 2017; 22(5):1651-9.
24. Otuki MF, Bernardi CA, Prudente AS, Laskoski K, Gomig F, Horinouchi CD, Guimarães CL, Ferreira J, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V, Cabrini DA. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011 Jul; 109(1):56-62.
25. Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2009 May; 29(2):247-64.
26. Marques LC, Pinheiro AJ, Araújo JG, Oliveira RA, Silva SN, Abreu IC, et al. Anti-inflammatory effects of a pomegranate leaf extract in LPS-induced peritonitis. *Planta Med.* 2016; 82(17):1463-7.
27. Lavor EM, Leal AEBP, Fernandes AWC, Ribeiro FPRA, Barbosa JM, Silva MG, et al. Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. *Phytomedicine.* 2018; 47:58-68.
28. Recalde-Gil AM, Klein-Júnior L, Salton J, Bordignon S, Cechinel-Filho V, Matté C, Henriques A. Aromatase (CYP19) inhibition by biflavonoids obtained from the branches of *Garcinia gardneriana* (Clusiaceae). *Z Naturforsch C J Biosci.* 2019; 74(9-10):279-82.
29. Alves JP, Silva VF, Tencarte SR, Montresor LB, Pereira GH, Possebon L, Souza HR, Girol AP. Mast cells profiles and heterogeneity in lipopolysaccharide-induced uveitis model. *World J Adv Res Rev.* 2019; 4(2):75-81.
30. Harvima IT, Nilsson G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. *Acta Derm Venereol.* 2011; 91(6):644-50.
31. Seeley EJ, Sutherland RE, Kim SS, Wolters PJ. Systemic mast cell degranulation increases mortality during polymicrobial septic peritonitis in mice. *J Leukoc Biol.* 2011; 90:591-7.
32. Leoni G, Alam A, Neumann PA, Lambeth JD, Cheng G, McCoy J, Hilgarth RS, Kundu K, Murthy N, Kusters D, Reutelingsperger C, Perretti M, Parkos CA, Neish AS, Nusrat A. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest.* 2013 Jan; 123(1):443-54.
33. Leoni G, Neumann PA, Kamaly N, Quiros M, Nishio H, Jones HR, et al. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. *J Clin Invest.* 2015 Mar; 125(3):1215-27.
34. Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, Caruso R, Feo S, Cillari E, Parente L. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol.* 2003 Oct; 3(10-11):1363-9.

Envio: 13/06/2023  
Aceite: 28/08/2023