

WALDINEY PIRES MORAES

**Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do
flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimum acutifolium***

**Belém
2011**

WALDINEY PIRES MORAES

**Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do
flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimum acutifolium***

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz.

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva.

Belém

2011

WALDINEY PIRES MORAES

**Caracterização do mecanismo de ação antiinflamatória do
flavonóide BAS1 isolado da planta *Brosimum acutifolium***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz (Orientador) – UFPA

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva (Co-orientador) - UFPA

Prof. Dr. Moises Batista da Silva (Examinador) - UFPA

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa (Examinador) - UFPA

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira (Examinador) - UFPA

Belém, 18 de novembro de 2011

Dedico esta Tese à minha amada mãe Maria Genildes de Moraes
(*in memoriam*), minha grande incentivadora, meu exemplo de
luta e dignidade, que se foi de forma tão inesperada, mas que
vive presente em meus pensamentos todos os dias.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade, onde fui formado desde a graduação até o doutorado, anos que com certeza marcaram minha vida;

À Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular pelo apoio;

À Universidade Federal do Oeste do Pará, por me dispensar de minhas atividades para a conclusão deste curso;

À Secretaria Executiva de Saúde do Estado do Pará, pela licença para a realização deste curso;

À Escola de Governo do Estado do Pará (EGPA) pelo apoio financeiro;

Ao Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz pela orientação, oportunidade e por ter acreditado em meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva pela co-orientação deste trabalho, pelo apoio, incentivo, amizade e pelas intensas discussões desta tese;

Ao Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado por disponibilizar seu laboratório e pelas contribuições dadas a este trabalho;

Ao Prof. Dr. Moisés Batista da Silva pela contribuição, incentivo e discussões;

Ao Prof. Dr. Evander Batista pelo apoio e colaboração;

À Dra. Karen Renata Oliveira; pela parceria, amizade e apoio na realização do Western Blot;

Ao Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa, pela disponibilidade e pela contribuição dada a este trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia (LNE) pela força e pelos momentos de descontração;

Aos amigos do Laboratório de Dermato-Imunologia (LDI) pela ajuda; especialmente Simone Campelo, Daniella Paternostro e Tânia Mara Pires Moraes;

A toda minha família pelo apoio incondicional em todo o período de minha formação acadêmica;

À tia Hilda de Nazaré Queiroz pelo acolhimento e incentivo;

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho;

“Imaginação é mais importante que conhecimento”

Albert Einstein

RESUMO

Inflamação é a resposta do organismo a injúria e perigo. Apesar de a inflamação ser um mecanismo de defesa do organismo, a intensidade e/ou a persistência desta resposta pode ser maléfica para o indivíduo. Neste contexto, os produtos naturais, são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas, e é considerado, um recurso promissor para a descoberta de novos fármacos. Baseado em estudos etnofarmacológicos, foi isolado da planta *Brosimum acutifolium*, popularmente conhecida como “Mururé da Terra-Firme” o flavonóide BAS1 (4'-hidroxi,7,8-(2'',2'')-dimetil-pirano)-flavana), ainda não descrito na literatura anteriormente. Diante disso, o presente trabalho caracterizou o mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1, em macrófagos murinos estimulados. Macrófagos foram ativados com LPS e IFN- γ . A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT, os níveis dos mediadores inflamatórios foram determinados por ELISA (TNF- α , PGE₂, IL-10), através da reação de Griess (NO) e a expressão de proteínas por Western blot. Nossos resultados demonstraram que BAS1 apresentou efeito citotóxico apenas para altas concentrações (100 μ M), inibiu a produção de NO (95%), inibiu a expressão de NOS-2, reduziu a produção de TNF- α (39%) e PGE₂(57%), mas não alterou a produção de IL-10 em macrófagos ativados. Dessa forma, uma importante contribuição deste estudo, foi evidenciar o efeito farmacológico do flavonóide BAS1, bem como, fundamentar o uso da planta *Brosimum acutifolium*, como antiinflamatória em nossa região. Somado a isso, a produção de extrato desta planta poderia fornecer um antiinflamatório eficaz e com menor custo para a população local. O presente trabalho, também pode contribuir para a determinação de nova classe de agente antiinflamatório, baseado em flavonóides naturais, como BAS1.

Palavras chaves: Inflamação, Flavonóides, BAS1, *Brosimum acutifolium*.

ABSTRACT

Inflammation is the body's response to injury and danger. Even though it's a body defensive mechanism, this response's intensity and/ or persistency might be harmful for an individual. In such context, natural products are important sources of biologically active molecules, and they're considered promising resources for the discovering of new drugs. Based on ethno pharmacological studies, BAS1 flavonoid (4'-hydroxy, 7, 8 - (2", 2"-dimethyl-pyran)-flavan), which hasn't been described by literature yet, was isolated from the *Brosimum acutifolium* plant, popularly known as "mururé da terra-firme." Facing this, the present study aimed at characterizing the anti-inflammatory mechanism of action of BAS1 flavonoid in stimulated murine macrophages. Macrophages were activated with LPS and IFN- γ , cell viability was evaluated by the MTT, levels of inflammatory mediators were determined by ELISA (TNF- α , PGE2, IL-10) through Griess reaction (NO) and protein expression by Western blotting. The results demonstrate that BAS1 only has cyclotoxic effects at high concentrations (100 μ M) inhibited NO production (95%), negatively regulated the expression of NOS-2, reduced the TNF- α production (39%) and PGE2 (57%), but didn't with IL-10 in activated macrophages. Thus, demonstrating the pharmacological effect of BAS1 flavonoid, as well as supporting the usage of the *Brosimum acutifolium* plant as an anti-inflammatory in our region was an important contribution from this study. Furthermore, the production of this plant's extract could provide the local population with an effective and affordable anti-inflammatory. The present work may also contribute to the establishment of a new classification of anti-inflammatory agents, based on natural flavonoids, such as BAS1.

Key-words: Inflammation, flavonoids, BAS1, *Brosimum acutifolium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via clássica de ativação dos receptores por LPS.....	24
Figura 2	Biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos.....	28
Figura 3	Estrutura química da indometacina.....	34
Figura 4	Estrutura química da dexametasona	34
Figura 5	Estrutura básica dos flavonóides.....	38
Figura 6	Estrutura química de BAS1	48
Figura 7	Fotomicrografia de células obtidas da medula óssea de camundongos BALB/c.....	60
Figura 8	Viabilidade celular em função da concentração de BAS1 (10-100 μ M)	61
Figura 9	Efeito do LPS na produção de nitrito e na expressão de NOS-2 em macrófagos.....	63
Figura 10	Produção de nitrito em cultura de macrófago estimulados com LPS (1 ou 5 μ g/ml), IFN- γ (5 UI/ml) ou LPS(1 μ g/ml)+IFN- γ (5 UI/mL) durante 24h de exposição.....	65
Figura 11	Expressão de NOS-2 e produção de NO em macrófagos.....	67
Figura 12	Produção de TNF- α em cultura de macrófago estimulados com LPS (1 μ g/ml)+IFN- γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1 em 3 concentrações diferentes (10, 25 e 50 μ M) durante 24h de exposição.....	68

Figura 13 Produção de IL-10 em cultura de macrófago estimulados com LPS (1 µg/ml) + IFN-γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1 em 3 concentrações diferentes (10, 25 e 50 µM) durante 24h de exposição..... 69

Figura 14 Produção de PGE₂ em cultura de macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) + IFN-γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido araquidônico

AINE's – antiinflamatórios não esteroidais

ANOVA – análise de variância

AP1- Proteína de ativação 1

BAS1- *Brosimum acutifolium* substância 1

CoA – Acetil coenzima A

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDRF – Fator de relaxamento derivado do endotélio

EPM – Erro padrão da média

EROS – Espécies reativas de oxigênio

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

FDA - Food and Drug Administration

GM-CSF- Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos

GAS - Sequência ativadora de interferon gama

GC - Glicocorticóides

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

ICAM's - Moléculas de adesão intercelular

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL -6 – Interleucina 6

IL-12 – Interleucina 12

IL-10 – Interleucina 10

IFN- γ – Interferon γ

IRF-1 – Fator regulador do interferon 1

IRF-3- Fator regulador de interferon 3

iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

LPS – Lipopolissacarídeo

LXA₄ – Lipoxina A₄

LXB₄ – Lipoxina B₄

LBP- Proteína de ligação ao LPS

M ϕ - Macrófagos

MCP-1 – Proteína de quimioatração do monócito-1

MIP-1 α - Proteína inflamatória do macrófago-1 α

M-CSF- Fator estimulante de colônia de macrófagos

NO – Óxido Nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NOS-1 - Óxido nítrico sintase isoforma 1

NOS-2 - Óxido nítrico sintase isoforma 2

NOS-3 - Óxido nítrico sintase isoforma 3

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NADPH – Nicotinamida adenosina nucleotídeo

NO – Óxido nítrico

NO_2^- - Nitrito

NO_3^- - Nitrato

NFkB – Fator nuclear kappa B

O_2 - Oxigênio

ONOO^- - Peroxinitrito

OH^- - Íon hidroxila

PLA – Fosfolipase A

PRRs- Receptores de reconhecimento padrão

PAMPs- padrões moleculares associados à patógenos

PAF – Fator de ativação das plaquetas

PG s – prostaglandinas

PGE_2 – Prostaglandina E_2

PGD_2 - Prostaglandina D_2

PGF_2 - Prostaglandina F_2

PGI_2 - Prostaglandina I_2

PMN – Polimorfonuclear

SNC- Sistema nervoso central

TXA_2 - Troboxano A_2

TLRs- Receptores Toll-Like

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VCAM's – Moléculas de adesão vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Inflamação.....	19
1.2	O papel dos macrófagos na resposta inflamatória.....	21
1.3	Mediadores Inflamatórios.....	24
1.4	Antiinflamatórios Não-esteróidais e esteróidais.....	30
1.5	Produtos naturais e Inflamação.....	35
1.6	Flavonóides.....	37
1.7	Modelos Experimentais em inflamação.....	40
2	OBJETIVOS.....	47
2.1	Objetivo Geral.....	47
3.2	Objetivos específicos.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1	Drogas e soluções.....	48
3.2	Animais.....	49
3.3	Modelos experimentais.....	49
3.3.1	<i>Isolamento e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea.....</i>	49
3.3.2	<i>Planejamento experimental.....</i>	50
3.3.3	<i>Análise da viabilidade celular.....</i>	52
3.3.4	<i>Dosagem de nitrito.....</i>	53

3.3.5	<i>Método Elisa para dosagens de TNF-α, IL-1β, IL-10 e PGE₂</i>	53
3.3.6	<i>Imunoblotting para análise da expressão de óxido nítrico sintase induzida (NOS-2)</i>	55
3.3.7	Dosagem de proteínas	57
3.3.8	Análise estatística	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Cultura de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c	59
4.2	Análise da viabilidade celular	61
4.3	Efeito do LPS na produção e expressão de NOS-2 em cultura de macrófagos	62
4.4	Produção de nitrito em cultura de macrófagos estimulados com LPS e IFN-γ	64
4.5	Expressão de NOS-2 e produção de nitrito em cultura de macrófagos estimulados com LPS+IFN-γ e tratados com BAS1	66
4.6	Produção de TNF-α por macrófagos estimulados com LPS+IFN-γ e tratados com BAS1	68
4.7	Produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS+IFN-γ e tratados com BAS1	69
4.8	Produção de PGE₂ em cultura de macrófagos estimulados com LPS+IFN-γ e tratados com BAS1	70

5	Discussão.....	71
6	Conclusão.....	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

Inflamação é a resposta do organismo a injúria e perigo. É a rede central de comunicação e processos regulatórios, que detecta e controla ameaças, danos, contenção e cura, que constituem os aspectos críticos na manutenção da integridade de um organismo (Vodovotz *et al.*, 2009). A inflamação é constitutiva e ubíqua e seu papel nas patologias é cada vez mais reconhecido (Nathan, 2002). O passo inicial, denominado fase aguda, tem duração relativamente curta e se caracteriza por exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, resultando em edema e migração celular para o sítio inflamatório (Medzhitov, 2008). A resposta, dependendo da persistência e do estímulo, pode entrar numa segunda fase denominada fase crônica. Esta fase tem duração maior e está associada, em termos histológicos, à presença de linfócitos, macrófagos, angiogênese e formação de tecido conjuntivo (Nathan, 2002). Os fenômenos vasculares e celulares observados na fase aguda levam ao surgimento dos sinais cardinais da resposta inflamatória que são: calor, rubor, tumor (edema), dor e em longo prazo, perda da função estrutural ou fisiológica (Nathan, 2002).

As células envolvidas na resposta inflamatória, como células endoteliais, mastócitos e células residentes, são encontradas nos tecidos, enquanto outras como as células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (monócitos e linfócitos), migram para o foco inflamatório utilizando a via sanguínea ou através de tecidos. Para conseguir chegar a esses locais, neutrófilos precisam aderir e migrar pelas células do endotélio,

processo chamado de diapedese, que é mediado por várias moléculas de adesão, como as selectinas e integrinas, quimiocinas (como a IL-8) e fatores quimiotáticos (Springer *et al.*, 1990).

O processo de migração celular inicia-se com a diminuição do fluxo sanguíneo, ocasionada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular o qual é seguido pela marginação dos neutrófilos ao longo da superfície das células endoteliais. Subseqüente a este processo, ocorre o rolamento das células no endotélio vascular (*Rolling*) até alcançar uma integrina e ocorrer a diapedese atingindo então o foco da injúria. Diversos trabalhos demonstraram que este fenômeno é mediado pela ligação firme entre integrinas expressas pelos leucócitos e moléculas de adesão expressas no endotélio (McEver, 1992).

Agentes quimiotáticos podem ser de origem endógena ou exógena. Os mediadores endógenos incluem os componentes do sistema do complemento, em especial o C5a, os produtos da lipooxigenase, principalmente o leucotrieno B₄ (LTB₄), citocinas, como interleucinas IL-1 e IL-6, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), assim como as quimiocinas da família da IL-8.

O conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no processo inflamatório pode nos revelar importantes alvos de intervenção farmacológica os quais são fundamentais para o desenvolvimento e estudos de fármacos com potencial antiinflamatório. Em estudos sobre inflamação, é demonstrado que os macrófagos apresentam um papel fundamental na liberação de uma série de mediadores químicos, incluindo as substâncias pró-inflamatórias como os fatores de crescimento, lipídios bioativos, enzimas hidrolíticas, citocinas e óxido nítrico (NO) (Zhang *et al.*, 2008; Laskin and Laskin, 2001).

1.2 O Papel dos Macrófagos na Resposta Inflamatória

O macrófago (M ϕ) foi descrito, pela primeira vez, por Metchnikoff, no final do século XIX, observando esse tipo celular em diversos tecidos, sendo classificada como componente do sistema de fagócitos mononucleares, e foi postulado que sua origem provém de células progenitoras oriundas da medula óssea e seus precursores, os monócitos, migram da corrente sanguínea para muitos tecidos e órgãos (Van Furth and Cohn, 1968; Van Furth *et al.*, 1972). Os M ϕ , assim como outras células efetoras do sistema imune inato, reconhecem microrganismos através de vários grupos de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que interagem com componentes microbianos conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Os PRRs são expressos constitutivamente nas superfícies de vários tipos celulares, independente da memória imunológica e ativam vias de sinalização específicas levando a distintas respostas anti-patogênicas (Akira *et al.*, 2009).

Alguns componentes do sistema imune inato são altamente conservados entre espécies, como os receptores Toll (Akira *et al.*, 2006). Esta conservação, junto com outros padrões de resposta celular e humoral justifica a utilização de diferentes modelos experimentais voltados aos estudos sobre inflamação e para testes de substâncias antiinflamatórias. Neste sentido, a caracterização de proteínas de membrana como os receptores Toll, que em mamíferos foram denominados de receptores Toll-Like (TLRs), garantiu um importante passo para elucidação dos processos bioquímicos associados à inflamação (Tosi, 2005).

Os receptores Toll são expressos em várias células do sistema imune, incluindo M ϕ , células dendríticas, células B, células T e também outros tipos celulares como

fibroblastos e células epiteliais. Sua expressão pode ser modulada rapidamente em resposta a patógenos, citocinas e estresses ambientais (Akira, 2009; Akira *et al* 2006; Tosi, 2005).

Como demonstrado na figura 1, o principal PAMP envolvido no estímulo da resposta inflamatória local e sistêmica é o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas que se liga ao Toll-like 4 (TLR4) na superfície de M ϕ . O reconhecimento do LPS se dá por meio de um complexo de proteínas e começa com a ligação do LPS a LBP (proteína de ligação ao LPS). O complexo LBP-LPS liga-se com alta afinidade a proteína de membrana chamada CD14. Após esta ligação o LBP se dissocia do complexo. O CD14 então se associa diretamente ao domínio extracelular do TLR4 (Hume *et al.*, 2001). Em seguida uma proteína celular adicional denominada MD2, se liga ao complexo LPS-CD14-TLR4 dando início a uma cascata de sinalizações. Este processo leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras (MyD88, IRAK, TRAF6) para a cauda citoplasmática do TLR4 (TIR). Essas proteínas vão gerar sinalização para diversos reguladores transcricionais como o fator nuclear Kappa B (NF κ B), AP1 (proteína de ativação 1) e IRF-3 (fator regulador de interferon-3) que por sua vez ativarão promotores de genes, responsáveis pela codificação de proteínas fundamentais da resposta imune inata (Alung *et al.*, 2006; Blasius e Beuteler, 2010).

Quando M ϕ reconhecem microorganismos, tornam-se ativados e ao se ligarem aos mesmos podem fagocitá-los. Neste processo além dos TLRs, outros receptores podem estar envolvidos, tais como: receptores acoplados a proteína G, receptores para Fc de imunoglobulinas, para o fragmento C3 do complemento, além de outros receptores de citocinas, principalmente de interferon γ (IFN- γ). Esses receptores estimularão a produção de enzimas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e intermediários reativos de nitrogênio (p. ex., peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido

nítrico (NO), ânion superóxido (O_2^-) e oxigênio livre (O_2). Essas moléculas podem inativar ou promover morte celular em microorganismos fagocitados (Nathan e Shilon, 2000; Guzik *et al.*, 2003).

Além dos TLRs, outras proteínas citoplasmáticas pertencentes à classe denominada NOD (Nucleotide-oligomerization domain), podem reconhecer peptideoglicanos componentes de microorganismos e contribuir para a resposta inata aumentando a resposta inflamatória via ativação de NF κ B (Althman e Phillipot, 2004).

A ativação de M ϕ resulta na produção de citocinas, principalmente TNF- α e interleucina 1 β que atuam no endotélio vascular fazendo que suas células expressem moléculas de adesão e quimiocinas (Selectinas, ICAM-1 e VCAM-1) que auxiliarão no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação (Chen *et al.*, 2003; Tosi, 2005).

M ϕ ativados podem produzir IL-12, uma citocina que faz a ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. Esta citocina estimula as células NK (Natural Killer) e células T a produzirem IFN- γ , este por sua vez, potencializa a ativação dos macrófagos, aumentando sua ação microbicida devido à ação de reativos derivados do oxigênio e nitrogênio, incluindo o óxido nítrico. A presença de INF- γ contribui também para o aumento da expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas de adesão, o que favorece a apresentação de antígenos e a ativação de imunidade celular (Schindler *et al.*, 2001).

Portanto, a contribuição dos M ϕ no desenvolvimento da resposta imune inata, pela liberação de mediadores imunes e citocinas ou como célula apresentadora de antígeno, é extremamente importante para o desenvolvimento da resposta adaptativa e controle de infecções, embora a exacerbação deste processo culmine em eventos inflamatórios indesejáveis (Bogdan *et al.*, 2000; Gordon e Taylor, 2005; Gordon, 2007).

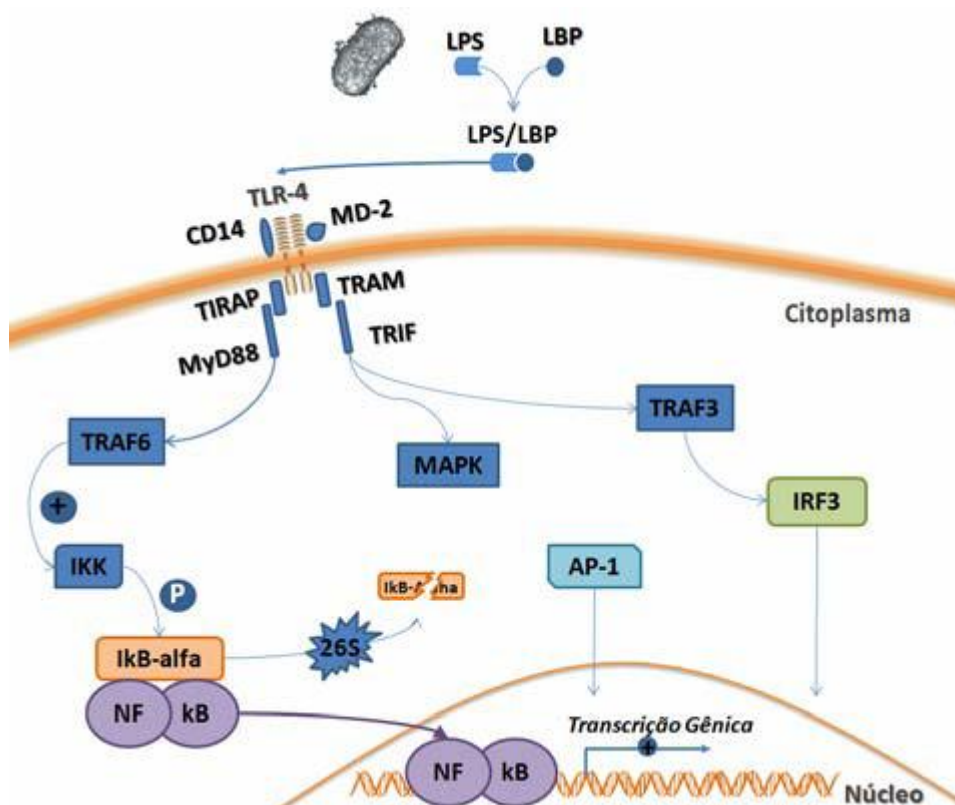


Figura 1 – Via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFκB e de outros fatores de transcrição. fonte: Akira *et al* (2006).

1.3 Mediadores Inflamatórios

A resposta inflamatória é resultante do aumento sequencial de mediadores e recrutamento de leucócitos circulantes, que se tornam ativados no sítio inflamatório e liberam mais mediadores (Hanada e Yoshimura, 2002). Entretanto, em muitos casos a resposta inflamatória é resolvida pelo aumento endógeno de mediadores

antiinflamatórios, assim como, do acúmulo intracelular de fatores regulatórios negativos (Nathan, 2002). Desse modo, as células inflamatórias são desativadas no tempo certo. Entretanto, a acumulação de leucócitos, bem como a ativação persistente, caracterizam a fase crônica da inflamação, sugerindo uma ineficácia dos mecanismos de autorregulação. Sabe-se que a ativação do fator de transcrição NFκB tem um papel central na inflamação através da regulação de codificação de genes de citocinas pró inflamatórias, moléculas de adesão, fator de crescimento e enzimas induzíveis como ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase 2 (NOS-2) (Baldwin, 1996).

A maioria dos mediadores desempenha sua atividade biológica inicialmente através da ligação a receptores específicos em células-alvo. Entretanto, alguns apresentam atividade enzimática direta (p. ex., proteases lisossomais) ou atuam como mediadores de uma lesão oxidativa direta (p. ex., metabólitos do oxigênio), podendo estimular a liberação de outros mediadores nas células-alvo. Esses mediadores secundários podem ser idênticos ou semelhantes aos iniciais e proporcionam mecanismos que amplificam ou, em determinadas circunstâncias, contrapõem-se a atuação do mediador inicial (Barton, 2008).

Os mediadores atuam sobre um ou sobre alguns tipos de células-alvo, apresentam alvos variados ou podem até apresentar efeitos diferentes segundo os tipos de células e tecidos com os quais entrem em contato. Uma vez ativados e liberados das células, a maioria desses mediadores tem uma meia vida curta, são rapidamente degradados (p. ex., metabólitos do ácido araquidônico), inativados por enzimas (p. ex., a quinase inativa a bradicinina), eliminados (os antioxidantes eliminam os metabólitos tóxicos do oxigênio) ou inibidos (p. ex., inibidores do complemento) (Barton, 2008).

Dentre os principais mediadores da resposta inflamatória estão o óxido nítrico (NO), os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) e as citocinas (p. ex. fator de necrose tumoral α , interleucinas), entre outros.

O NO, importante mediador inflamatório, é formado a partir do oxigênio molecular e da L-arginina através de uma reação catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada *et al.*, 1991). Diversos tipos celulares são capazes de sintetizar NO, entre os quais as células endoteliais (Wright *et al.*, 1989) e macrófagos (di Rosa *et al.*, 1990). Existem três isoformas conhecidas de NOS. Duas formas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas nas células endoteliais, a NOS_e ou NOS-3 e no sistema nervoso central a NOS_n ou NOS-1, são cálcio-calmodulina dependentes e produzem baixas concentrações de NO em curtos períodos de ativação (Li e Pulos, 2005). Outra isoforma de NOS, que só é expressa depois de um estímulo é a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS-2), é cálcio-calmodulina independente e produz nanomoles de NO por períodos prolongados de ativação. Do ponto de vista da resposta inflamatória, é a mais importante e expressa após exposição a estímulos como IL-1, TNF, e LPS. Os produtos finais da formação do NO, *in vivo* e *in vitro*, são o nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻). A formação de espécies reativa de nitrogênio é importante na determinação das atividades inflamatórias e antiinflamatórias do óxido nítrico, visto que, os radicais de NO podem ativar COX-1 e COX-2 aumentando a produção de prostaglandinas que pode agravar processos inflamatórios (Asanuma *et al.*, 2001).

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado e não se encontra livre nas células, mas sim na forma esterificada nos fosfolipídios da membrana. O AA é produzido a partir dos lipídios das membranas por ação das fosfolipases celulares (p. ex., fosfolipase A₂) (Figura 2). Eles são remodelados para gerar lipídios biologicamente ativos quando as células são ativadas por diferentes estímulos, os mesmos podem

funcionar como sinais intracelulares ou extracelulares que interferem em diversos processos biológicos, incluindo a homeostasia e a inflamação.

Os metabólicos do AA são também chamados de eicosanóides e se unem aos receptores ligados a proteína G de vários tipos celulares e modulam a resposta inflamatória e, são sintetizados por ação de duas enzimas: a ciclooxigenase (produzindo prostaglandinas e tromboxanos) e a lipoxigenase (leucotrienos e lipoxinas). A via da COX pode ser ativada por duas isoformas diferentes: a isoforma 1 da enzima ciclooxigenase (COX-1), está presente constitutivamente na maioria dos tecidos participando da homeostase e também é produzida em resposta a estímulos inflamatórios. Outra é a ciclooxigenase (COX-2) que é induzida em resposta a estímulos inflamatórios, levando a produção de prostaglandinas (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂) e tromboxano (TXA₂) (Simmons *et al.*, 2004).

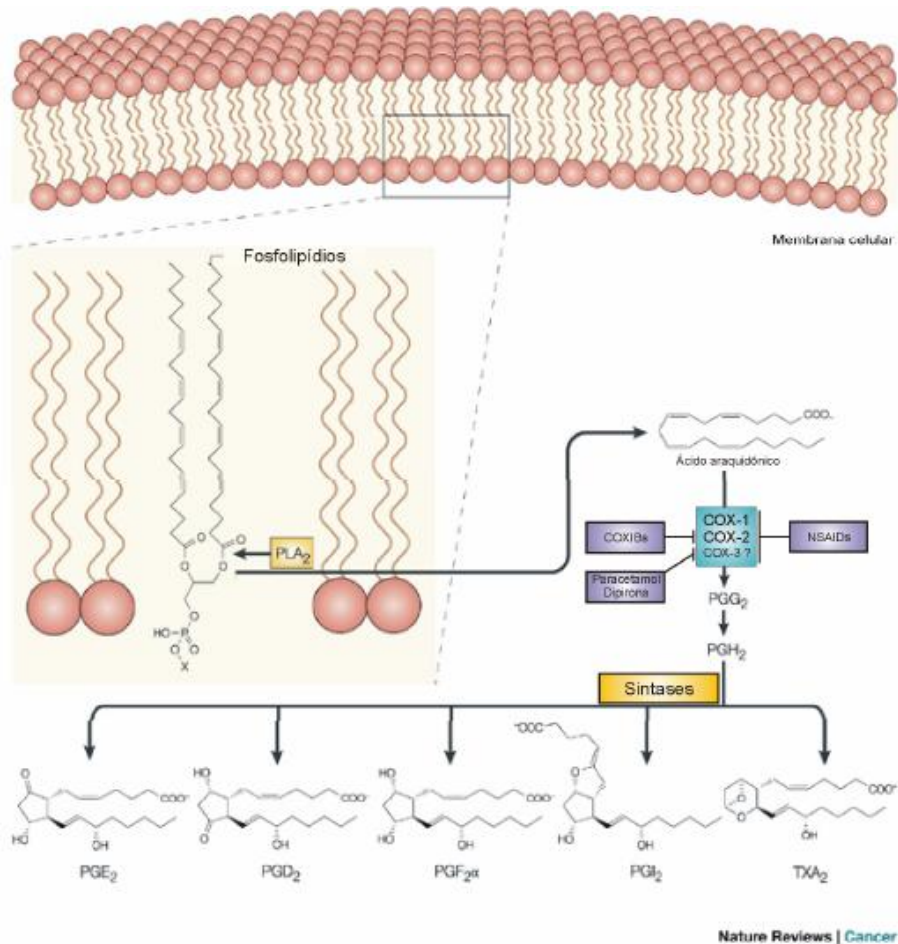


Figura 2. Biossíntese de Prostaglandinas (PG_s) e Tromboxano A₂(TXA₂). O Ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidios de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂). No passo seguinte a COX catalisa a formação de PGG_s e em seguida a redução a PGH₂ o qual é convertido em uma série de PG_s, incluindo PGE₂ e TXA₂ pela atividade de sintases específicas. A maioria dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE'S) inibem de forma não seletivas as duas isoformas de COX, enquanto que os COXIB'S inibem seletivamente COX-2.

Fonte: Adaptado de Gupta e Dubois (2001).

As citocinas são produzidas por vários tipos celulares, principalmente pelos MΦ, cuja secreção pode ser estimulada por endotoxinas e outros produtos bacterianos,

complexos imunes, lesão física e vários tipos de estímulos inflamatórios. As principais citocinas que participam do processo inflamatório são o TNF- α e a IL-1. Suas ações mais importantes são: síntese de moléculas de adesão endotelial e mediadores químicos da inflamação, fatores de crescimento, eicosanóides e NO, produção de enzimas associadas ao remodelamento da matriz e aumento na trombogenicidade da superfície endotelial (Hanada e Yoshimura, 2002).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua como um mediador inflamatório em resposta às infecções e regula uma série de funções celulares críticas, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação (Parameswaran e Patial, 2010). M ϕ são os maiores produtores do TNF- α , e curiosamente também são altamente responsivos a esta citocina (Beutler e Cerami, 1986). Sua síntese e liberação pode ser aumentada em até 10 mil vezes após a exposição ao LPS, juntamente com inúmeras funções benéficas na regulação imune, o TNF- α está relacionado com a patogênese tanto de doenças inflamatórias aguda, assim como, de doenças crônicas (Beutler e Cerami, 1986). A produção excessiva de TNF- α e a sinalização de seu receptor têm sido associada com a patogênese de muitas doenças, incluindo artrite reumatóide, aterosclerose, psoríase, sepse, diabetes e obesidade. Dados da literatura mostram que o RNAm para TNF- α é expresso em várias células, como monócitos e M ϕ e sua expressão gênica é regulada, a nível transcricional, por vários fatores de transcrição, dentre eles, o NF κ B (Parameswaran e Patial, 2010). Drogas imunomoduladoras, como a prednisona, diminuem acentuadamente a produção de TNF- α em macrófagos peritoneais estimulados por LPS, reforçando a participação desta citocina na resposta imune (Campelo *et al.*, 2011).

A interleucina 10 (IL-10) foi inicialmente caracterizada como fator inibidor da síntese de citocinas (FISC), inibindo a produção de citocinas como IL-2, TNF- α , IFN- γ

e fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Fiorentino *et al.*, 1989), dessa forma foi proposto que IL-10 desempenha um papel fundamental na supressão do sistema imune do hospedeiro. É uma importante citocina que participa da regulação do sistema imune, tendo um papel significativo em uma variedade de processos patofisiológicos, produzida por diferentes populações de células; sua principal função biológica parece ser a limitação e cessação da resposta inflamatória e a regulação da diferenciação e proliferação de várias células do sistema imunológico, e a principal fonte de IL-10 *in vivo* parece ser os macrófagos (Pestka *et al.*, 2004). Estudos prévios demonstraram que IL-10 inibe a indução da atividade iniciada por outras citocinas como INF- γ , IL-2 e TNF- α (Kuwata *et al.*, 2003). A principal função de IL-10, entretanto, é limitar a magnitude de uma resposta imune. Como os níveis elevados de citocinas foram associados com doenças auto-imunes, houve então, grande interesse por esta citocina (Pestka *et al.*, 2004).

1.4 Antiinflamatórios Não-esteróidais (AINE's) e Esteróidais (AIE's)

Os AINE'S são amplamente usados na modulação da resposta inflamatória, além de serem usados como analgésicos e antipiréticos. O mecanismo de ação desse grupo de fármaco é bem estabelecido. Sabe-se que sua ação farmacológica se dá através da inibição enzimática das ciclooxigenases (COXs) (Vane *et al.*, 1998), bloqueando a ligação do ácido araquidônico com COX, e dessa forma, cessa a produção de prostaglandinas e tromboxanos. A COX também chamada de prostaglandina H₂ sintase (PGHS), foi identificada como a principal enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em hidroperóxido prostaglandina H₂ (PGH₂), embora a velocidade de

síntese de PGH_2 dependa primariamente da disponibilidade de ácido araquidônico livre, a COX é considerada a enzima limitante da velocidade na rota de biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico. A COX é uma enzima bifuncional que possui duas atividades enzimáticas que ocorrem em dois sítios catalíticos distintos (Vane *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 2004):

- a) Atividade de ciclooxigenase: catalisa a oxidação e ciclização do ácido araquidônico até hidroperóxido prostaglandina G_2 (PGG_2).
- b) Atividade de peroxidase: catalisa a peroxidação de PGG_2 até o hidroperóxido prostaglandina H_2 (PGH_2).

A PGH_2 é quimicamente instável e é rapidamente convertido por sintases específicas em uma série de prostaglandinas e tromboxanos, como a prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina I_2 (PGI_2) e tromboxano A_2 (TXA_2) (Simmons *et al.*, 2004).

Apesar de sua ação benéfica, os AINE'S também estão associados com efeitos colaterais importantes como problemas gastrointestinais, toxicidade renal e hepatotoxicidade (Bessone, 2010).

A enzima COX existe em duas isoformas, a ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2) (Simmons *et al.*, 2004). Apesar de COX-1 e COX-2 catalizarem a mesma reação, suas funções fisiológicas são diferentes. COX-1 é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos, é responsável pela produção de metabólitos de funções homeostáticas, como a proteção da mucosa gástrica, manutenção do tônus da musculatura lisa, mediando a agregação plaquetária e o fluxo de sangue renal (Vane *et al.*, 1998). Uma variante de COX-1 foi descoberta recentemente e chamada de COX-3 (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Esta enzima é expressa

principalmente no SNC e parece ser seletivamente inibida por algumas drogas analgésicas/antipiréticas como paracetamol e dipirona. Assim, a inibição da COX-3 no SNC poderia representar um mecanismo central primário pelo qual as drogas que possuem atividade antiinflamatória quase nula possam causar analgesia e diminuir a febre (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Contudo ainda existe controvérsia a respeito da real existência de uma terceira isoforma de COX cataliticamente ativa e sobre quais seriam suas funções no organismo (Simmons *et al.*, 2004). Por outro lado a COX-2 é expressa constitutivamente em poucos tecidos como o sistema nervoso central (SNC) e é a isoforma cuja expressão é induzida na maioria dos tecidos, principalmente durante uma resposta inflamatória, com contribuição importante não só no reparo da lesão, como também no desenvolvimento da lesão crônica (Vane *et al.*, 1998).

Com relação à estrutura protéica, há uma diferença crucial no sítio ativo que catalisa a reação de ciclooxigenase que é o principal sítio para ligação dos AINE'S (Rome e Lands, 1975; Simmons *et al.*, 2004). Na COX-1 existe uma isoleucina na posição 523 que é substituída por uma valina na COX-2. Esta pequena diferença promove um aumento de cerca de 25% na largura e um aumento na região do sítio catalítico de COX-2. Embora existam outras diferenças na estrutura protéicas das isoformas, a diferença citada acima é a mais importante para o desenvolvimento de inibidores seletivos para cada uma das isoformas, visto que podem ser elaborados inibidores com tamanho suficiente para alcançar o sítio catalítico na COX-2, mas não na COX-1 e assim inibir preferencialmente a COX-2 (Kurumbail *et al.*, 1996).

Agentes estruturalmente distintos que suprimem a atividade da enzima COX como os antiinflamatórios AINE'S, por exemplo a indometacina (figura 3) e inibidores seletivos da COX-2 como os fármacos da família dos coxibs, como celecoxib, muito utilizado no tratamento de osteoartrite, artrite reumatóide e dor aguda, reduzem a

resposta inflamatória. Inibidores seletivos de COX-2 poderiam ser úteis na supressão de processos inflamatórios, sem desencadear os efeitos adversos, relacionados com a inibição não seletiva de outras isoformas de COX, embora este tema ainda seja motivo de debate na literatura, pois este grupo de fármacos pode causar eventos adversos cardiovasculares importantes, que geraram controvérsias significantes (Warner e Mitchell, 2004). Devido ao risco aumentado de infarto do miocárdio, o rofexocib foi retirado do mercado pelo laboratório Merck em 2004. Contudo o celecoxib tem seu uso aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) e é utilizado em muitos países.

Outro grupo de antiinflamatório importante é o grupo dos glicocorticóides (GC) (p. ex. dexametasona) (figura 4), cujos efeitos envolvem a interação entre os esteróides e receptores intracelulares que pertencem à superfamília dos receptores que controlam a transcrição gênica. Os GCs, após penetrarem na célula, ligam-se a receptores específicos ($GR\alpha$ e $GR\beta$) no citoplasma. Após sua interação com o esteróide, o receptor torna-se ativado, isto é sofre uma alteração conformacional, expondo um domínio ligante de DNA. O complexo esteróide-receptor forma dímeros, que a seguir migram para o núcleo e se ligam a elementos de resposta aos esteróides no DNA. O efeito consiste ou em repressão (impedir a transcrição) ou em indução (iniciar a transcrição) de certos genes. A repressão é obtida através da inibição da ação de diversos fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B. Esses fatores de transcrição, uma vez inibidos, deprimem os genes da COX-2, citocinas e moléculas de adesão, bem como a forma induzível da enzima NOS (NOS-2). Dessa forma, interferem na resposta inflamatória e suas principais ações são: produção diminuída de prostanóides, pela diminuição da expressão de COX-2, redução da migração e atividade dos neutrófilos e macrófagos devido à transcrição diminuída dos genes, fatores de adesão celular e de citocinas

(interleucinas e $\text{TNF-}\alpha$), redução da produção de NO induzido e redução da liberação de histamina dos basófilos.

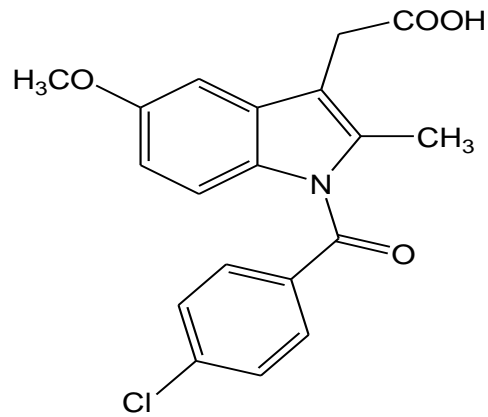


Figura 3: Estrutura química de indometacina.

Fonte: Bandgar *et al* (2011).

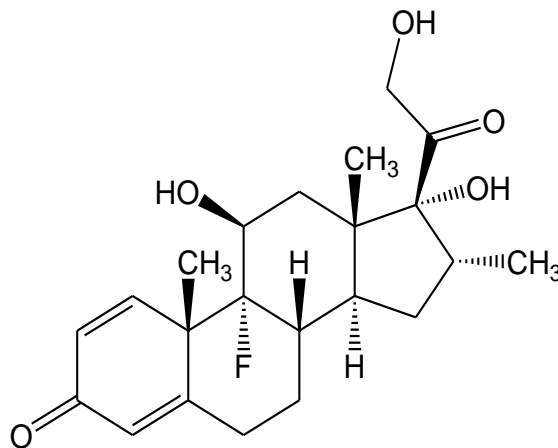


Figura 4: Estrutura química da dexametasona

1.5 Produtos Naturais e Inflamação

A Amazônia com sua enorme biodiversidade muito pode contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de produtos naturais. Grande parte dos medicamentos que são comercializados hoje se originou de produtos naturais, em especial de plantas, e os que não derivaram diretamente, ainda assim, estes participaram em algum momento da história farmacológica dessas drogas (Berg, 1992). A indústria farmacêutica não espera “descobrir” novos compostos de uso terapêutico a partir de plantas medicinais, ainda que isto tenha uma pequena chance de ocorrer. Elas procuram modelos na natureza, padrões, que lhes permitam utilizar como ponto de partida para o desenho de novas drogas, pois apesar do desenvolvimento da biotecnologia, ela ainda não está em condições de competir com a natureza na formulação de moléculas com atividade terapêutica, pois, ainda não se conseguiu o avanço científico que permita desenhar drogas rotineiramente a partir de princípios básicos, sem quaisquer pistas (Calixto, 2000).

Poucas drogas foram desenvolvidas em uma base racional, apesar de conhecimento mais detalhado de objetivos potenciais, como estruturas tridimensionais de enzimas, caminhos metabólicos, e sucessões de genoma. A grande maioria dos fármacos foi desenvolvida de um modo empírico e suas atividades identificadas depois. A procura por novas terapias envolvem grandes arquivos de substâncias químicas e exame de extratos de planta ou outros produtos naturais (Carvalho, 2004). Frequentemente, identificam-se os componentes das plantas medicinais usadas em medicina tradicional e dessa forma são validadas as atividades biológicas dessas plantas. As substâncias naturais com atividade farmacológica frequentemente servem de

modelos para a síntese de novos fármacos que possua ou melhore as propriedades farmacológicas. Atualmente o desenvolvimento de antiinflamatório a partir de produtos naturais tem despertado grande interesse da indústria farmacêutica. Isso se justifica pelo fato de oferecerem algumas vantagens em relação às drogas antiinflamatórias clássicas. Os flavonóides, por exemplo, têm mostrado uma alta margem de segurança, não produzindo efeitos colaterais como ulcerogenicidade (Di Stasi, 2007).

O interesse em flavonóides com atividade antiinflamatória tem aumentado, e se trabalha para descobrir novas moléculas ou estabelecer a relação estrutura química *versus* atividade biológica, como uma alternativa para a obtenção de novos princípios ativos com maior especificidade, maior duração de ação e maior atividade que o composto precursor. Devido aos efeitos colaterais provocados pelos AINE'S ou ações sistêmicas provocadas pelos GC, a pesquisa com princípios ativos de plantas e produtos na busca de novos fármacos têm se tornando bastante promissora (Newman e Cragg, 2007). Um estudo mostrou que cerca de 30% de novas drogas descobertas são derivadas de plantas ou de produtos naturais, e dessas, em torno de 5 % apresentam potencial antiinflamatório (Calixto, 2000).

No tratamento das inflamações, em geral, diversos produtos naturais apresentam potencial farmacológico. Khanna e colaboradores (2007) afirmaram, em seu trabalho, que a busca por produtos naturais para o tratamento de artrites é uma "mina de ouro"; o autor apresentou diferentes metabólitos secundários de origem vegetal que atuaram sobre diversos moduladores inflamatórios; dentre eles, destacam-se os flavonóides, terpenos, quinonas, catequinas e alcalóides. Na China, onde o uso de plantas medicinais é bastante antigo, a *Laggera pterodonta* mostrou ótimo resultado em modelos de pleurisia com redução de PGE₂, além de inibir a infiltração celular em modelo de inflamação crônica – *cotton pellet* (Wu *et al.*, 2006). A *Carapa guianensis*, uma espécie

rica em tetranotriterpenóides, é bastante utilizada na medicina popular amazônica para dores e inflamações; em modelos experimentais reduziram infiltração leucocitária, níveis de IL-1 e inibiu vias de sinalização do NFκB (Penido *et al.*, 2006). O *Hypericum brasiliense*, popularmente conhecido como "mil facas" ou "alecrim bravo" mostrou resultados significativos em modelos inflamatórios agudos, além de agir sobre o sistema nervoso (Perazzo *et al.*, 2008). A *Quassia amara*, uma planta da América do Sul pertencente à família *Simaroubaceae*, rica em quassinóides, apresentou redução significativa do edema induzido por carragenina (Toma *et al.*, 2003). Bighetti e colaboradores (1999) avaliaram a atividade antiinflamatória da *Croton cajucara Benth* (*Euphorbiaceae*), uma espécie endêmica da região amazônica. A atividade antiinflamatória dos dois diterpenóides presentes no óleo essencial (cajucarinolídeo e isocajucarinolídeo) mostrou ação semelhante a dos AINE'S inibindo a atividade da COX-1.

1.6 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma das maiores classes de substâncias naturais, apresentam um grande número de constituintes químicos e uma ampla distribuição no reino vegetal. São substâncias largamente dispersas na natureza, sendo encontradas em diferentes partes das plantas, incluindo frutas e sementes, e em bebidas como chás e vinhos (Harbone *et al.*, 2000). São produtos fenólicos aromáticos, constituídos pelos produtos de condensação do ácido acético ativado, podem ser encontrados na forma livre ou podem estar conjugados a um carboidrato no carbono 3 (heterosídeos flavonóis) ou 7 (heterosídeos flavônicos, isoflavônicos, flavonônicos) (Costa, 1887; Duarte, 1990).

Os flavonóides são metabólitos secundários de origem biossintética mista formados a partir de 3 unidades de malonato e de um intermediário fenilpropanoídico (*p*-cumaril-CoA) derivado do ácido chiquímico. Reação de condensação conduzida pela enzima chalcona-sintase leva a formação do esqueleto básico dos flavonóides, ou seja, a chalcona. Todas as modificações do anel A dos flavonóides ocorrem durante o estágio de chalconas. Quimicamente são constituídos por um núcleo fundamental benzopirano ou cromano, ao qual se encontra ligado um anel aromático, isto é 2-fenil-benzopirano (A). Com exceção das isoflavonas e isoflavononas, o segundo anel fenólico (B) está unido em todos os demais flavônios no átomo de carbono na posição 2 (Figura 5) (Costa, 1987; Duarte, 1990). Sabe-se que a ligação de radicais no anel B aumenta a lipossolubilidade da molécula (Harbone *et al.*, 2000).

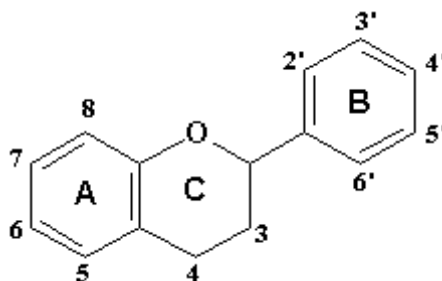


Figura 5: Estrutura básica dos flavonóides

Fonte: Kim *et al* (2004)

Dentre as ações farmacológica dos flavonóides, está a ação diurética, anti-espasmódica, anti-alérgica (Gamet-Payraastre *et al.*, 1999), atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, vasculares, inibição de enzimas, antitumoral e antimicrobiana (Harbone *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004).

A estrutura dos flavonóides é muito importante para atividade antioxidante dos flavonóides. O grupo hidroxila presente ligado ao esqueleto básico favorece a atividade antioxidante e quanto maior o número de hidroxilas ligadas, maior esta ação. Nos últimos anos tem se intensificado a busca de novos flavonóides com atividades antioxidantes diferenciadas através de estudos monitorados por vários tipos de testes biológicos e bioquímicos. São descritos diferentes propriedades para o potencial antiinflamatório de flavonóides (Harbone *et al.*, 2000; Serafini *et al.*, 2010).

Os flavonóides são conhecidos por inibirem enzimas responsáveis pela produção de ânion superóxido e de outras enzimas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), redução ou capturas de radicais livres. Outra ação dos flavonóides é a habilidade dessa classe de substância em estabilizar membranas celulares por meio da diminuição da viscosidade interna, uma vez que participam dentro da parte hidrofóbica da membrana, causando uma diminuição considerável na fluidez dos lipídeos (Kim *et al.*, 2004).

Flavonóides podem inibir as enzimas ciclooxigenase (COX) e/ou lipooxigenase (Moroney *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 2004), impedindo a síntese de metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas (Williams *et al.*, 1995; Harbone *et al.*, 2004). O flavonóide quercetina mostrou seletividade para COX, enquanto que 6-hidroxiluteonina-6-metil-éter mostrou inibir tanto COX como lipooxigenase (Harbone *et al.*, 2000).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que uma das plantas medicinais usadas como antiinflamatória na região amazônica é a *Brosimum acutifolium* (Moraceae), conhecida popularmente como “mururé da terra-firme” ou “mercúrio vegetal”. O caule

e a raiz são utilizados como antiinflamatório no tratamento de reumatismo, dores musculares e ósseas, além de apresentar atividade depurativa e antisifílica (Berg, 1992).

O estudo da casca do caule da espécie *B. acutifolium* demonstrou uma composição ricamente variada de diferentes tipos de flavonóides, sendo isolados uma flavanona (isobavachina); duas chalconas, cinco flavanas não substituídas no anel heterocíclico (posições 3 e 4), das quais duas ainda não haviam sido citadas na literatura, chamadas de *Brosimum Acutifolium* Substância 1 (BAS1 - 4'-hidroxi,7,8-(2'', 2''-dimetil-pirano)-flavan e *Bosimum Acutifolium* Substância 2 (BAS2 - 4'-hidroxi-7,8-(3''-hidroxi-2'',2''-dimetilhidropirano)-flavana) (Torres *et al.*, 2000).

Estudos anteriores mostraram que o flavonóide BAS1 exerceu atividade antiinflamatória, em diferentes variáveis do processo inflamatório utilizando modelos experimentais *in vivo* (de edema de pata de rato e bolsa de ar em ratos), entretanto, o mecanismo de ação da atividade antiinflamatória desta substância não foi elucidado (Moraes, 2008).

1.7 Modelos Experimentais em Inflamação

Vários modelos experimentais são utilizados para estudar o processo inflamatório tanto *in vivo* como *in vitro*, dentre eles o modelo de granuloma (Swingle e Shiderman, 1972) que é um modelo de inflamação crônica que avalia a infiltração celular. É um processo que começa com infiltração de neutrófilos seguida por fibroblastos, terminando na fase proliferativa com secreção de colágeno no local da inflamação. A técnica de pleurisia induzida por carragenina (Mikami e Miyasaka, 1983) tem como parâmetro avaliar a infiltração celular (neutrófilos e mononucleares) na cavidade

pleural, através de uma inflamação induzida por carragenina. O modelo de edema de orelha induzido por Xilol que promove a permeabilidade vascular seguida de edema por se tratar de um agente irritante, é um dos testes básicos para avaliação da atividade antiedematogênica (Young e De Young, 1989).

NO modelo de edema de pata é administrado um agente flogístico (p. ex. carragenina) capaz de induzir uma resposta inflamatória por administração local (na pata do animal). A administração de carragenina na região intraplantar de ratos produz aumento do volume da pata do rato resultante de uma resposta inflamatória típica que é caracterizada pelo extravasamento de líquido e proteínas para o interstício (Di Rosa *et al.*, 1971). Este líquido contém uma quantidade variável de substâncias que são capazes de provocar alterações teciduais e circulatórias que levam, em última instância, ao edema inflamatório. Estas substâncias são mediadores potentes do processo inflamatório e atuam de diferentes formas. Entre estes mediadores deve-se dar destaque especial às substâncias originárias da cascata do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e leucotrienos, (Winter *et al.*, 1962). Este “gatilho” inflamatório também funciona promovendo o aumento da migração de células para a região de administração do estímulo (Nantel *et al.*, 1999; Sammons *et al.*, 2000). Alguns tipos de flavonóides são descritos por sua atividade antiedematogênica (Emim *et al.*, 1994). Nosso trabalho anterior mostrou que o flavonóide BAS1 promoveu a diminuição do volume do edema de pata, cujo efeito foi semelhante ao da indometacina usado como antiinflamatório padrão (Moraes, 2008).

Sabe-se que alguns flavonóides inibem a enzima COX (Willoughby *et al.*, 2000), reduzindo, deste modo, a resposta inflamatória. Portanto a análise dos níveis de prostaglandinas, especialmente PGE₂, poderia nos fornecer um dado interessante em relação ao mecanismo de ação de um fármaco em estudo, portanto no presente estudo

propomos avaliar o nível de PGE₂ em cultura de macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ e tratados com BAS1. Outra análise importante seria avaliar a expressão da proteína da enzima COX-2, nos fornecendo subsídio para inferir se BAS1 esta interferindo na expressão desta enzima, o que também propomos neste estudo.

O modelo de inflamação em bolsa de ar em ratos, empregado para estudar a atividade antiinflamatória de determinada droga, não faz apenas uma análise volumétrica como no modelo de edema de pata, mas também é capaz de avaliar e medir qualitativamente o exsudato inflamatório (Tao *et al.*, 1999). Neste modelo o processo inflamatório induzido por carragenina é caracterizado pelo acúmulo de leucócitos, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e pelo aumento da permeabilidade vascular com formação de exsudato na bolsa de ar (Hambleton e Willans, 1989; Morikawa *et al.*, 2003). Amostras do fluído e tecidos podem ser coletadas de modo simples da bolsa inflamatória para análise (Ohuchi *et al.*, 1985; Silán *et al.*, 1997; Hambleton e Willans, 1989; Tao, X., 1999). Este modelo experimental é útil para determinar o volume de exsudato formado na bolsa de ar, número de células, permeabilidade vascular e níveis de mediadores inflamatórios induzidos pelo agente flogístico carragenina e possibilita demonstrar uma correlação entre os mediadores inflamatórios, migração celular e exsudação.

Moraes (2008) também demonstrou um potente efeito inibidor sobre o aumento do volume de exsudato inflamatório gerado na bolsa de ar, após a administração do flavonóide BAS1 sistemicamente, cujo efeito foi semelhante ao da dexametasona usado como antiinflamatório padrão.

Citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 β e o TNF- α atuam regulando a atividade da COX-2 e NOS-2 em culturas de células (Salveni *et al.*, 1993), além disso, o

NO produzido pode atuar ativando COX, já que este parece atuar no grupamento heme-ferro contido na COX (Salveni *et al.*, 1993; Wu, 1995; Aktan, 2004).

O TNF- α e a IL-1 atuam nas células endoteliais das vênulas pós-capilares adjacentes à infecção e induz a expressão de várias moléculas de adesão como as selectinas e integrinas essenciais para a migração dos leucócitos ao local da inflamação (Brito e Ribeiro, 1999). No processo inflamatório induzido por estímulos exógenos como carragenina, zymosan ou lipopolissacarídeo (LPS) ou mediadores quimiotáticos, como IL-1 e TNF- α , que induzem a migração por mecanismos indiretos, os macrófagos residentes parecem ser as células mais importantes atuando no controle do recrutamento celular, por produzirem grande quantidade destes mediadores quimiotáticos (Souza & Ferreira, 1985; Faccioli, 1990). Portanto, o emprego de células animais como ferramenta para investigação e desenvolvimento de fármacos representa uma tecnologia moderna, baseada em princípios científicos e de engenharia. O cultivo de células animais é utilizado com êxito para a produção de vacinas, terapias celulares e gênicas, toxicologia e fisiologia *in vitro*, entre outros (Moraes *et al.*, 2007). Além de sua utilização na obtenção de uma gama variada de bioprodutos com aplicações nas áreas terapêuticas, diagnósticas e vacina, o cultivo de células animais tem inegável utilidade na realização de testes de citotoxicidade *in vitro*. Os modelos animais são limitados para estudos do metabolismo humano, e há ainda o aspecto ético do seu emprego para a realização de experimentos (Freshney, 1992).

Neste contexto, o cultivo de células animais, especialmente M ϕ pode nos fornecer um modelo de estudo de atividade antiinflamatória por representar a principal célula da resposta imune inata. Durante a inflamação a maioria dos macrófagos é derivado de monócitos do sangue. No tecido, os macrófagos podem responder a estímulos de ativação e mudar radicalmente sua fisiologia.

Em cultura de M ϕ a atividade dos mesmos é avaliada com administração de um estímulo e o tratamento com drogas pode ser avaliado pela redução nos níveis de mediadores e citocinas produzidos por essas células, assim como a expressão de enzimas induzidas durante a resposta inflamatória. M ϕ são encontrados nos fluidos peritoneal, pleural, sinovial, no colostro e nos espaços alveolares e tecidos. Muitos macrófagos residentes, nos diferentes tecidos, estão em um estado quiescente, apresentam morfologia semelhante ao monócito, além de terem uma capacidade de espraiamento e atividade de fagocitose baixa e mostrarem-se pouco responsivos a linfocinas (Adams e Hamilton, 1984). Utilizando estímulos apropriados, os M ϕ residentes podem apresentar alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais profundas. Estas alterações inflamatórias intensificam a responsividade dos macrófagos a microrganismos, resposta inflamatória ou neoplasia.

Experimentalmente, macrófagos inflamatórios são estimulados por injeção de irritantes estéreis, tais como caldo de tioglicolato, carragenina ou proteose-peptona, na cavidade peritoneal de animais como camundongos ou ratos. Os M ϕ ativados apresentam aumento do enrugamento da membrana plasmática e aumento da capacidade de aderência, espraiamento e fagocitose com aumento do número de vesículas endocíticas e fagolisossomos (North, 1978).

M ϕ estão em abundância nos nódulos linfáticos e nos espaços sinusóides, podendo ser obtidos de diferentes formas, como por exemplo da cavidade peritoneal de camundongos, podem ser isolados da medula óssea de camundongos ou isolados dos alvéolos pulmonares (Zhang *et al.*, 2008). A cavidade peritoneal é ligada a uma membrana e cheia de líquido abdominal dos mamíferos que contém o fígado, o baço e a maioria do trato gastrointestinal e outras vísceras. Abriga uma série de células do sistema imunológico, incluindo M ϕ , células B e células T. A presença de macrófagos

residentes na cavidade peritoneal torna um local de escolha para a colheita de macrófagos teciduais residentes (Zhang *et al.*, 2008). O fácil acesso para a colheita do número moderado de macrófagos residentes não elicitados deste local, contribuiu muito para o grande uso deste método. Geralmente, o número de M ϕ quiescentes presentes no peritônio é insuficiente para extensos estudos bioquímicos. O rendimento, no entanto, normalmente é cerca de $0,5 \times 10^6$ por camundongo. Entre as células viáveis obtidas da cavidade peritoneal, 50-60 % são células B, macrófago 30 % e 5-10 % são células T (Ray e Ditell, 2010)

Para aumentar o número de macrófagos coletados do peritônio, pode ser injetado antes da colheita na cavidade peritoneal agentes desencadeantes, por exemplo, caldo de tioglicolato, esse agente aumenta a migração de monócitos para o peritônio e, portanto aumentam sua colheita. Embora tenha sido levantada dúvida sobre a forma como esses agentes podem afetar a fisiologia destas células. Camundongos da linhagem BALB/c e C57BL/6 fornece um bom rendimento de macrófagos e são totalmente sensíveis a estímulos exógenos (Zhang *et al.*, 2008).

Um método alternativo para o isolamento de um número relativamente grande de macrófagos quiescentes se dá através da diferenciação das células progenitoras mielóides em macrófagos maduros *in vitro* com o uso de fator estimulante de colônia de macrófagos (CSF-M) para diferenciar células progenitoras de macrófagos originadas da medula óssea em macrófagos maduros em cultura (Stanley, 1985). Após 7 dias de diferenciação as células são diferenciadas em macrófagos (Zhang *et al.*, 2008). A principal vantagem deste modelo é que além de proporcionar um número maior de células, também fornece uma população homogênea de macrófagos, em um relativo estado de repouso, sendo sensíveis a estímulos de ativação *in vitro*, tendo maior responsividade que as células obtidas da cavidade peritoneal (Zhang *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o mecanismo de ação antiinflamatória do flavonóide BAS1 (4'-hidroxi-7,8-(2",2"-dimetilpirano)flavana), obtido da planta *Brosimum acutifolium*, em macrófagos murinos estimulados com LPS e IFN- γ .

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar, *in vitro*, a atividade de BAS1 sobre a viabilidade de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c.
2. Determinar o efeito do flavonóide BAS1 sobre a produção de Óxido Nítrico em macrófagos ativados.
3. Avaliar o efeito de BAS1 sobre a produção da citocina pró inflamatória TNF- α e antiinflamatória IL-10 em macrófagos ativados.
4. Avaliar o efeito de BAS1 sobre a produção de PGE₂ em macrófagos ativados.
5. Avaliar a expressão da isoforma induzível da enzima NOS (NOS-2) em macrófagos murinos ativados.

3 Materiais e Métodos

3.1 Drogas e Soluções

A) Comerciais: dexametasona (Sigma Chemical Co), dimetilsulfóxido (Fisher Chemical, EUA), LPS (*E.coli* EH 100-Sigma Chemical Co), IFN- γ (BD Biosciences).

B): A substância teste usada no presente estudo foi a 4'-hidroxi, 7,8-(2'', 2''-dimetil-pirano)-flavana, denominada BAS1, flavonóide isolado da casca da planta *Brosimum acutifolium* por Torres *et al* (2000), a planta foi coletada no município de Portel (Pará) e identificada por Dra. Maria Elizabeth van den Berg, do Museu Paraense Emílio Goeldi e gentilmente cedida pela Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda, do Laboratório do Programa de Pesquisa em Química da Universidade Federal do Pará (UFPA) (figura 6). BAS1 foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final de DMSO usada nos experimentos, não foi superior a 2%.

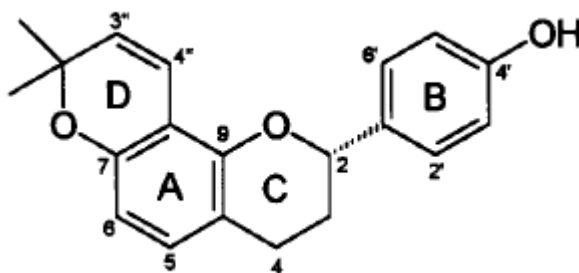


Figura 6: Estrutura química de BAS1.

Fonte: Torres *et al* (2000)

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos, linhagem BALB/c, machos, de 8 a 12 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Dermato-Imunologia - ICB/UFPA, mantidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, em temperatura ambiente controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$). Todos os animais tiveram acesso à água e comida a vontade. Durante a realização deste trabalho, as normas éticas para pesquisa científica com animais de laboratório foram rigorosamente aplicadas.

3.3 Modelos Experimentais

3.3.1 Isolamento e cultivo de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c

O isolamento de macrófagos derivados da medula óssea seguiu o protocolo descrito por Zhang e colaboradores (2008). Após o sacrifício de camundongos BALB/c e retirada do fêmur e tíbia, é feita a lavagem dos mesmos para obtenção da fração mononuclear extraído da medula óssea. As células progenitoras foram cultivadas em meio contendo 50 % de RPMI, 20 % de Soro Bovino Fetal e 30 % do Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos (M-CSF), este último, foi obtido a partir de cultivo de fibroblastos da linhagem L929, o qual foi cedido pelo Laboratório de Dermato-Imunologia - ICB/UFPA.

No 9º dia, as células não aderentes são retiradas por lavagem e as células aderentes são colhidas para os testes. Posteriormente, a suspensão de células é submetida à centrifugação de 1500 RPM por 5 minutos, e após ressuspensão do pellet de células obtidos em meio RPMI e suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina e estreptomicina, foi feita a contagem das referidas células em câmara de Neubauer, a qual foi ajustada para 5×10^5 macrófagos por poço de placa de cultura de 24 poços. A seguir, aplica-se o volume correspondente a cada poço da placa, que é incubada por 2 horas a 37° C, em uma estufa contendo 5% de CO₂, para a adesão dos macrófagos na placa. Posteriormente, foi feito três lavagens com PBS estéril para a remoção das células não aderentes.

Macrófagos aderentes derivados da medula óssea são normalmente mais de 90% das células aderidas na placa e, portanto o número de macrófagos distribuído em cada poço da placa pode ser definido com mais precisão. Este protocolo tem sido usado para analisar a capacidade funcional dos macrófagos em diferentes condições de estimulação exógena (Warren e Vogel, 1985; Anderson e Mosser, 2002). Praticamente todas as células desta população de macrófagos têm a capacidade de responder a estímulos exógenos, e, por conseguinte populações relativamente uniforme de macrófagos podem ser geradas e colhidas para análises bioquímicas (Zhang et al., 2010).

3.3.2 Planejamento experimental

Após o isolamento dos macrófagos é feito o ajuste do número de células para cada poço da placa de 24 poços (5×10^5 células/poço), então, foram realizados os

tratamentos desejados. Foi realizado o co-tratamento com BAS1 em diferentes concentrações 10, 25, 50 e 100 μM e LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) + IFN- α (5 UI/ml) em cultura de macrófagos derivados da medula óssea por um período de 24 h. Para efeito comparativo da resposta antiinflamatória de BAS1 foi usado como padrão a dexametasona (10 μM), e como controle positivo o grupo tratado apenas com o estímulo (LPS + IFN- γ) nas mesmas condições experimentais.

Após 24 horas de exposição, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi colhido e estocado (-20 °C) para análise dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), antiinflamatória (IL-10), PGE₂ e nitrito. Para análise de expressão da enzima NOS-2 e as células foram coletadas da placa e imediatamente congeladas em -80 °C para posteriores procedimentos experimentais. Desta forma os grupos experimentais foram divididos da seguinte forma:

No primeiro grupo (controle negativo), foi adicionada apenas NaCl 0,9% associada ao DMSO 2%.

O segundo grupo (controle positivo) as células foram tratadas com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) + IFN- γ (5 UI/ml) por um período de 24 horas de exposição. Este grupo serviu para análises comparativas com os efeitos de BAS1.

No terceiro, quarto, quinto e sexto grupos (tratados) foi feito o co-tratamento com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) + IFN- γ (5 U/ml) e BAS1, por 24 h, em quatro concentrações diferentes (10, 25, 50 e 100 μM) e cada concentração representando um grupo. BAS1 foi veiculada em Nacl 0,9% e DMSO 2%.

No sétimo grupo foi feito o co-tratamento com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) + IFN- γ (5 U/ml) e dexametasona (10 μM) , por 24 h, para análise comparativa do efeito de BAS1.

3.3.3 Análise da Viabilidade Celular

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o método MTT como previamente descrito (Mosmann, 1983). A técnica é fundamentada na redução do MTT nas mitocôndrias das células viáveis gerando cristais insolúveis em solução aquosa de coloração roxa que pode ser quantificado por espectrofotometria. As culturas de macrófagos mantidas durante 24 horas, submetidas ao tratamento com BAS1, deverão ser lavadas com tampão PBS (pH: 7,4). Após a lavagem, foi adicionado MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H tetrazolio) diluído em PBS (0,5 mg/ml). As células serão incubadas durante 3 horas a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o tempo de incubação o MTT foi retirado para adição de 300 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço para diluição dos cristais formados, e em seguida, esta solução foi coletada e transferida para uma microplaca. A absorvância a 570 nm foi determinada em um leitor de microplaca automático (MRX Revelation-DINEX, Chantilly, VA) e cada amostra foi analisada em triplicata. A viabilidade celular dos grupos é expressa em porcentagem de formazan formado em comparação com o controle.

3.3.4 Dosagem de nitrito

Para avaliar o efeito, *in vitro*, de BAS1 na produção de óxido nítrico foi determinada a concentração de nitrito (NO_2^-) presente no sobrenadante de culturas de macrófagos através da reação de Griess (Green *et al.*, 1982). Este método baseia-se na quantificação indireta de NO pelo seu principal metabólito, o nitrito. Nessa técnica, o nitrito da amostra reage em meio ácido com a sulfanilamida produzindo um sal de diazônio, o qual reage com o naftileno, produzindo uma coloração rósea. Este reagente é preparado pela mistura de volume de solução de naftil-etileno a 0,1% com a solução de sulfanilamida a 1 % em ácido fosfórico à 5%. Um volume de 100 μL de amostra é misturada com o mesmo volume de reagente de Griess. O resultado da reação é a coloração rosa púrpura do meio. Em seguida, a leitura espectrofotométrica Foi determinada em um comprimento de onda 540 em um leitor de microplaca (MRX Revelation-DINEX, Chantilly, VA). Os resultados são expressos em concentração molar (μM) de NO_2^- . As concentrações de nitrito foram determinadas pela comparação com os resultados obtidos pela curva padrão de diluições seriadas de nitrito de sódio (NaNO_2) dissolvidos em meio de cultura (RPMI suplementado).

3.3.5 Método ELISA para dosagem de TNF- α , IL-10 e PGE₂

Os níveis de TNF- α , IL-10 e PGE₂ foram quantificados por ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), Baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A enzima mais comumente utilizada nestas

provas é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada (H_2O_2) em H_2O e O_2 . Foram utilizados Kits adquiridos da empresa BD Biosciences. A quantificação destas citocinas foi determinada no sobrenadante de cultura de macrófagos derivados da medula óssea após 24 de tratamento.

Após a coleta do sobrenadante das culturas, o mesmo foi centrifugado à 3000 rpm (rotações por minuto) a $4^\circ C$ durante 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido, e estocado a $-20^\circ C$ até a realização da dosagem.

Para o ensaio dosagem do TNF- α e IL-10 as placas foram inicialmente sensibilizadas com o anticorpo de captura espécie-específico (1:250) durante 18 horas a $4^\circ C$. Após esse período, a placa foi lavada com uma solução de PBS 0,05% Tween-20 e incubada com a solução de bloqueio (PBS SFB 5%) por mais uma hora. Em seguida, após uma nova série de lavagens, as amostras são adicionadas aos poços por um período de duas horas em temperatura ambiente. Paralelamente, para diluição da curva-padrão, são utilizadas diferentes diluições do padrão de TNF- α ou IL-10.

Após a incubação das amostras, uma solução do anticorpo de detecção foi adicionada por mais uma hora, seguida da solução de avidina ligada a peroxidase (HRP). Após a adição do substrato TMB, a reação é interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2N). A quantidade de TNF- α e IL-10 em cada poço foi determinada com auxílio do leitor de microplaca em um comprimento de onda de 540 nm (MRX Revelation-DINEX, Chantilly, VA), sendo que a concentração referente a cada amostra foi calculada a partir da curva padrão correspondente em pg/ml e expressa em percentagem em relação ao controle.

Para análise da quantificação de PGE₂, foi usado kit de imunensaio seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical, cat n°

414014). O nível de PGE₂ foi avaliado usando um leitor de microplaca a 540 nm (MRX Revelation-DINEX, Chantilly, VA), cada amostra analisada em duplicata.

3.3.6 Imunoblot para análise da expressão de NOS Induzida (NOS-2)

Para caracterizar o efeito de BAS1 na expressão da enzima NOS induzida (iNOS ou NOS-2) foi utilizada a técnica de imunoblot (Western Blot). Esta técnica é usada para identificar antígenos macromoleculares que reagem com um anticorpo específico, onde as proteínas são primeiramente separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Os sítios de ligação da membrana que não reagiram são bloqueados para suprimir adsorção não específica de anticorpos. As proteínas imobilizadas reagem com o anticorpo específico. Em seguida, o complexo Ag-Ac (antígeno-anticorpo) reage com um segundo anticorpo (anti-Ig-G de camundongo) que está marcado com fosfatase alcalina que é visualizada após o uso de solução reveladora.

Para isso as células da cultura de macrófagos, são lavadas 3 vezes com PBS para remoção dos estímulos e excessos de proteínas contidas no meio de incubação, posteriormente as células são homogeneizadas e coletadas em solução de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 1%, e ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 250mM pH 6.8; SDS 10%; glicerol 40%; β-mercaptoetanol 20% e azul de bromofenol 0,001%). Uma amostra foi previamente separada para posterior dosagem de proteína. A seguir, as amostras serão colocadas em banho-maria em ebulição (100°C) por 2 minutos.

Posteriormente, o homogenado foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para separação das proteínas presentes na amostra. A

corrida eletroforética foi realizada com o sistema SE-600 (Amersham GE Biosciences) em uma solução de Tris-HCl 25 mM; Glicina 250 mM, SDS 0,1% e metanol absoluto. Na primeira etapa, as amostras serão aplicadas (20µg) diretamente no gel de poliacrilamida 3,5% (proporção de acrilamida/bisacrilamida) e a voltagem mantida em 60V durante 30 minutos para que as proteínas atinjam ao mesmo tempo no gel de poliacrilamida de separação 7,5%. Na segunda etapa, uma amperagem fixa de 30mA é aplicada até a linha de frente da corrida alcançar o final do gel de fracionamento. Padrões de pesos moleculares também serão utilizados para determinar a mobilidade relativa das proteínas.

Após a eletroforese, as proteínas fracionadas no gel são transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Bioscience) por 12-16 horas, e em seguida, a membrana é corada com uma solução de Ponceau 1% para marcação das proteínas com intuito de assegurar a eficácia do procedimento de transferência.

Após a transferência, a membrana é lavada com tampão TBS (100mM de Tris-HCl e 1,5M de NaCl) durante 10 minutos. Em seguida, a mesma é incubada durante 1 hora com solução de TBS-T (100mM de Tris-HCl, 1,5M de NaCl e Tween20 0,5%) contendo 5% de albumina bovina sérica (BSA) para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após esse período, a membrana é novamente lavada com TBS-T 1 vez durante 10 minutos. Em seguida, a mesma é incubada com o anticorpo primário (anti-NOS-2; 1:5000) durante 12-16 horas à 4°C em agitação. Após a lavagem do anticorpo primário e incubação com o anticorpo secundário (anti-Ig-G de coelho; 1: 2000) acoplado a peroxidase durante 2 horas, a membrana é lavada 4 vezes com TBS-T e as bandas são reveladas utilizando o kit de detecção ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech).

3.3.7. Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteína foi realizada logo após a o preparo da amostra pelo método descrito por Bradford (1976). Este método baseia-se na interação entre o corante Azul de Coomanssie e macromoléculas de proteínas, que no pH da reação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante da forma catiônica (coloração vermelha) para a forma aniônica (coloração azulada), de acordo com a quantidade de proteínas presente na reação.

Neste ensaio, alíquotas de 100 µl da amostra serão adicionadas a 2 ml do reagente de Bradford (100 mg Azul Brilhante de Coomassie, 50 ml de etanol 95%, 100 ml de ácido fosfórico 85%) e incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a leitura espectrofotométrica foi determinada em um comprimento de onda de 595nm. As concentrações das proteínas foram determinadas pela comparação com uma curva-padrão com BSA.

3.8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste Tukey-Kramer (para análise de três ou mais grupos). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença significativa foi de $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c

Com intuito de padronizarmos nosso modelo experimental, avaliamos o processo de diferenciação celular induzido pelo Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos (M-CSF) em células indiferenciadas de medula óssea murina. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com M-CSF induziu intensa diferenciação celular nas culturas após nove dias de cultivo com o referido fator (Figura 7). Tal observação é evidenciada pelo espreadimento das células sobre a superfície da placa o que caracteriza uma morfologia típica de macrófagos.

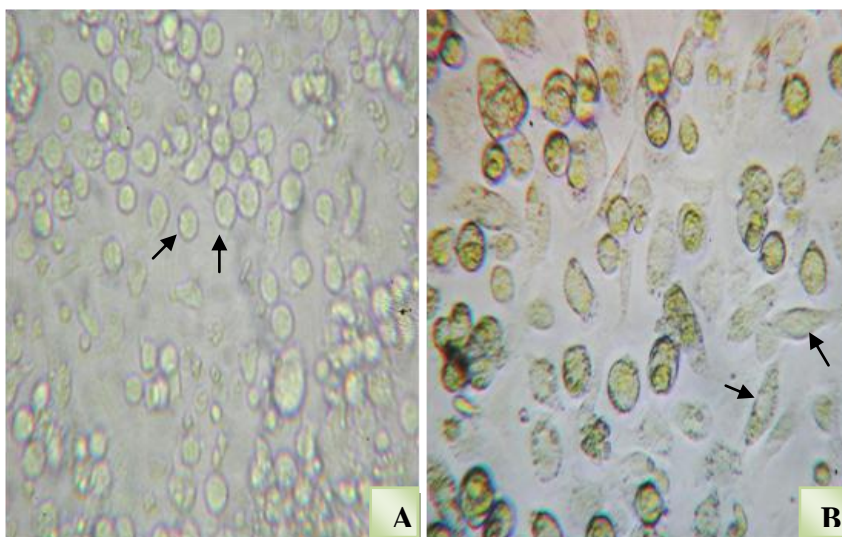


Figura 7. Fotomicrografia de células obtidas da medula óssea de camundongos BALB/c. (A) Fotomicrografia de células progenitoras que acabaram de ser coletadas da medula óssea. (B) fotomicrografia das células diferenciadas em macrófagos depois de 9 dias de cultivo em meio contendo Fator Estimulante de Colônia de Macrófagos (M-CSF) a 37 °C e 5% CO₂. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Zeiss), em objetiva 40 x. As setas indicam as células na fotomicrografia.

4.2 Análise da viabilidade celular

A substância BAS1 foi testada em macrófagos derivados da medula óssea com o objetivo de avaliar preliminarmente o possível efeito citotóxico desse flavonóide em função da concentração utilizada. Analisando o resultado apresentado na figura 8, verifica-se que o tratamento com BAS1 não promoveu efeito citotóxico nas concentrações de 10, 25 e 50 μM , contudo, observamos diminuição significativa da viabilidade celular quando as células foram tratadas com alta concentração de BAS1 (100 μM). Desta forma, excluímos esta última concentração nos demais parâmetros de análise.

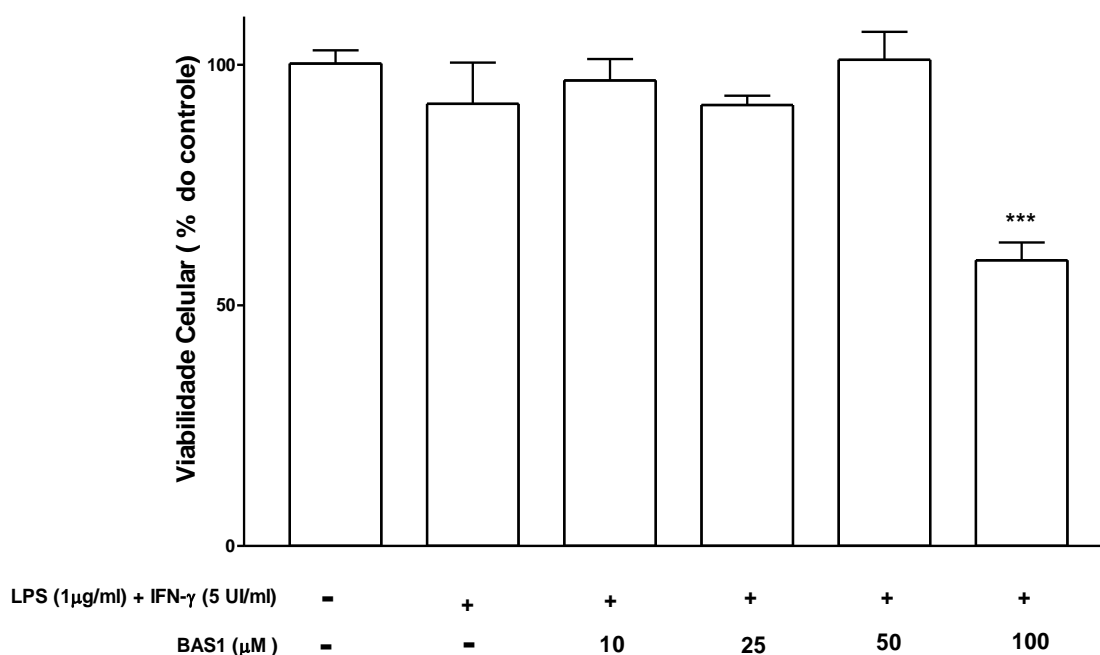


Figura 8. Viabilidade celular em função da concentração de BAS1 (10-100 μM). Os resultados foram expressos em porcentagem do grupo controle (Meio de cultura RPMI). Dados representados por média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle.

4.3 Efeito do LPS na produção de nitrito e expressão de NOS-2 em cultura de macrófagos

Como descrito nos métodos, utilizamos o LPS como agente ativador de macrófago, tendo como parâmetro de efeito a quantidade de nitrito no ambiente extracelular e a expressão de NOS-2. Nossos resultados demonstraram que as concentrações de LPS (1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) promoveram aumento dependente de concentração na produção de nitrito (Figura 9). Concomitante a esta avaliação, investigamos também o efeito do LPS na expressão da enzima NOS-2 que está relacionada à atividade nitrérgica (Figura 9). Como podemos observar na figura 9, a expressão da referida enzima foi detectada somente nos grupos tratados com LPS, sendo observado um efeito concentração dependente. Este dado mostra uma correlação da produção de nitrito, com o aumento da expressão de NOS-2, em cultura de macrófagos, sob as mesmas condições de tratamento, para as diferentes concentrações de LPS.

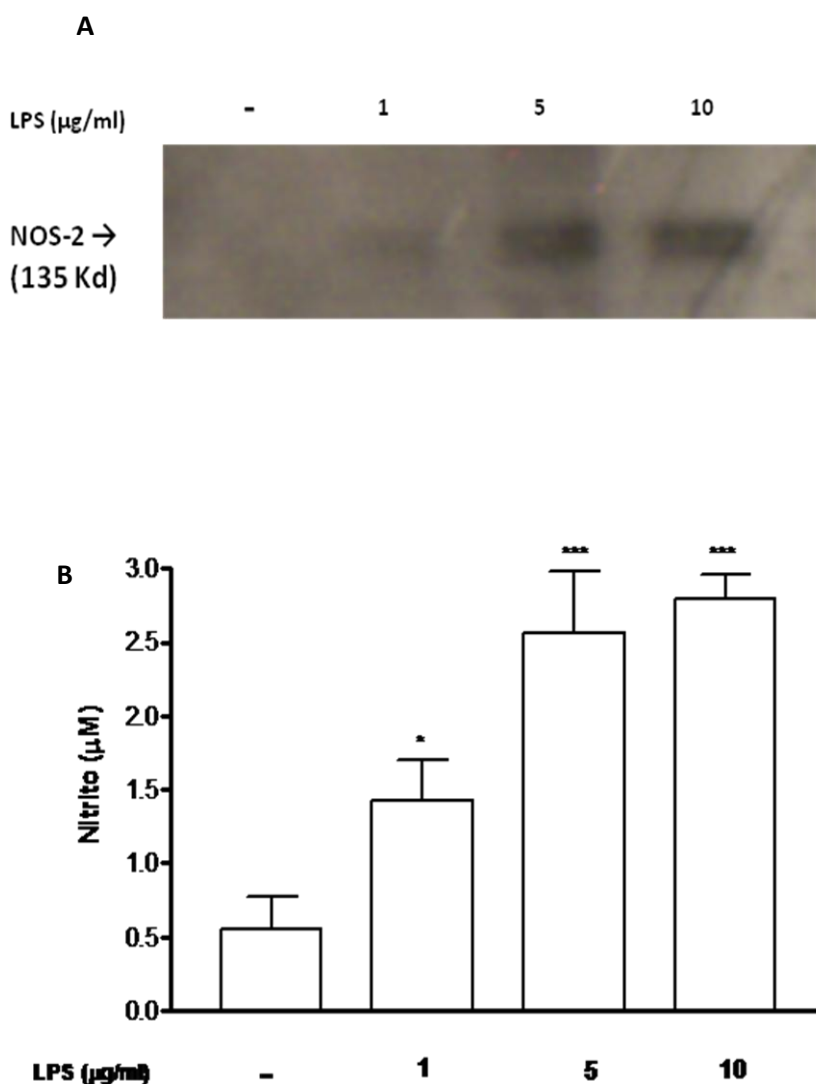


Figura 9. Efeito do LPS na produção de nitrito e na expressão de NOS-2 em macrófagos. Em 9A observamos a expressão de NOS-2, determinada por Western blotting. No poço 1 está a amostra do grupo não estimulado, e nos poços 2, 3 e 4 estão os grupos tratados com 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS respectivamente, após 24 horas de incubação. 9B mostra o nível de nitrito no grupo não estimulado e nos grupos tratados com 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, observamos um aumento significativo, comparados com o grupo não estimulado com LPS (controle negativo). Dados representados por média \pm EPM, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle.

4.4 Produção de Nitrito em cultura de macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ

Para estabelecer um padrão de resposta dos macrófagos mediante ao estímulo, padronizamos em nosso laboratório, a resposta do macrófago frente a diferentes estímulos, tendo como parâmetro de avaliação a produção de nitrito. Foram testadas diferentes concentrações de LPS associadas ou não ao IFN- γ , clássicos ativadores endógenos de macrófagos. Como mostra a figura 10, no grupo de macrófagos não estimulados com LPS e/ou IFN- γ (controle negativo), os níveis de nitrito foram próximos do basal. Entretanto, quando as células foram estimuladas com LPS e/ou IFN- γ a produção de nitrito foi aumentada significativamente. Observamos um efeito sinérgico quando o LPS foi associado com IFN- γ , visto que, a produção de nitrito foi aumentada consideravelmente. Porém, quando os macrófagos foram estimulados apenas com IFN- γ a produção de nitrito não foi significativa, quando comparada com o grupo não estimulado (controle negativo).

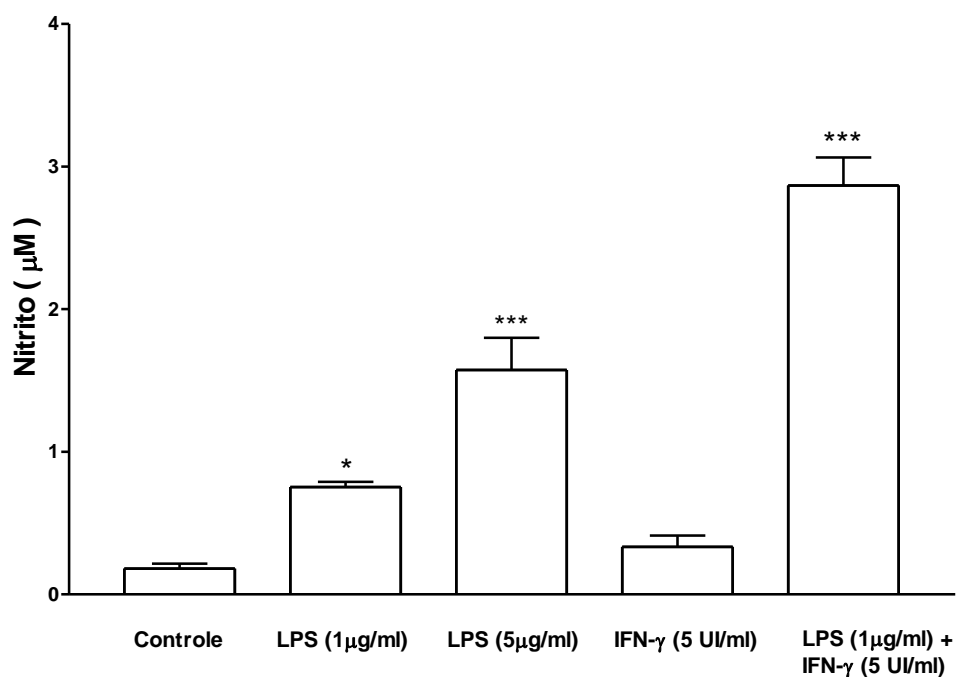


Figura 10: Produção de nitrito em cultura de macrófago estimulados com LPS (1 ou 5 µg/ml), IFN-γ (5 UI/ml) ou LPS(1µg/ml)+IFN-γ (5 UI/mL) durante 24h de exposição. Dados representados por média ± EPM. *p<0,05; ***p<0,001 (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle negativo (não estimulado).

4.5 Expressão de NOS-2 e produção de nitrito em cultura de macrófagos estimulados com LPS + IFN- γ e tratados com BAS1

BAS1 suprimiu marcadamente a expressão de NOS-2 em macrófagos murinos, quando comparamos como o grupo tratado somente com estímulo (controle positivo) como mostra a figura 11. Por conseguinte, significativa inibição na produção de nitrito foi observada em cultura de macrófagos tratados com LPS e IFN- γ e co-tratados com diferentes concentrações de BAS1 (10, 25 e 50 μ M), reduzindo os níveis de nitrito em $84\pm 1,7$; $90\pm 0,7$ e $95\pm 0,4$ % respectivamente, quando comparados com o grupo tratado somente com estímulo (controle positivo). A dexametasona (10 μ M), usada como padrão de antiinflamatório, também inibiu a produção de nitrito significativamente ($96\pm 0,2$ %) quando comparado com o controle positivo. Estes resultados mostram uma correlação da inibição da produção de nitrito, com o bloqueio da expressão de NOS-2 em cultura de macrófagos (Figura 11).

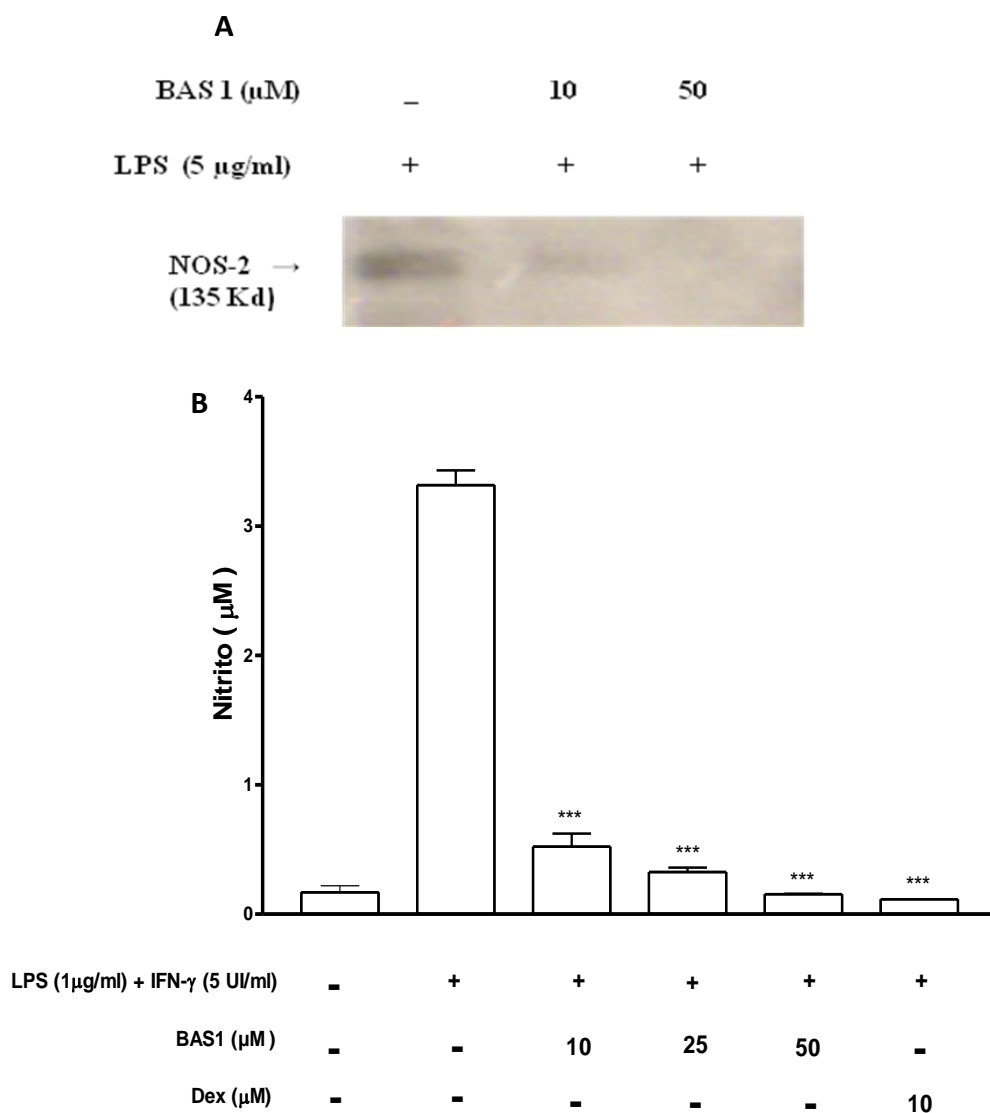


Figura 11. Expressão de NOS-2 e produção de NO em macrófagos. Em 11A observamos a expressão de NOS-2, determinada por Western blotting. No poço 1 está a amostra do grupo estimulado (LPS 5 $\mu\text{g/ml}$), e nos poços 2, 3 estão os grupos tratados com 10, 50 μM de BAS1 respectivamente, após 24 horas de incubação. 11B mostra a produção de nitrito em cultura de macrófagos estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)+IFN- γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1 em 3 concentrações diferentes (10, 25 e 50 μM) durante 24h de exposição. Dados representados por média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle positivo(estimulado).

4.6 Produção de TNF- α por macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ e tratados com BAS1

A análise da figura 12 mostra que diferentes concentrações de BAS1, 10, 25 e 50 μ M promoveu uma diminuição significativa nos níveis de TNF- α de 35 ± 1.5 , 38 ± 5 e 39 ± 1 % respectivamente, comparado com o controle positivo (somente com estímulo). Observamos também uma diminuição significativa da produção de TNF- α (50 ± 1.6 %) no grupo tratado com dexametasona (10 μ M) usado como padrão, também em relação ao controle positivo.

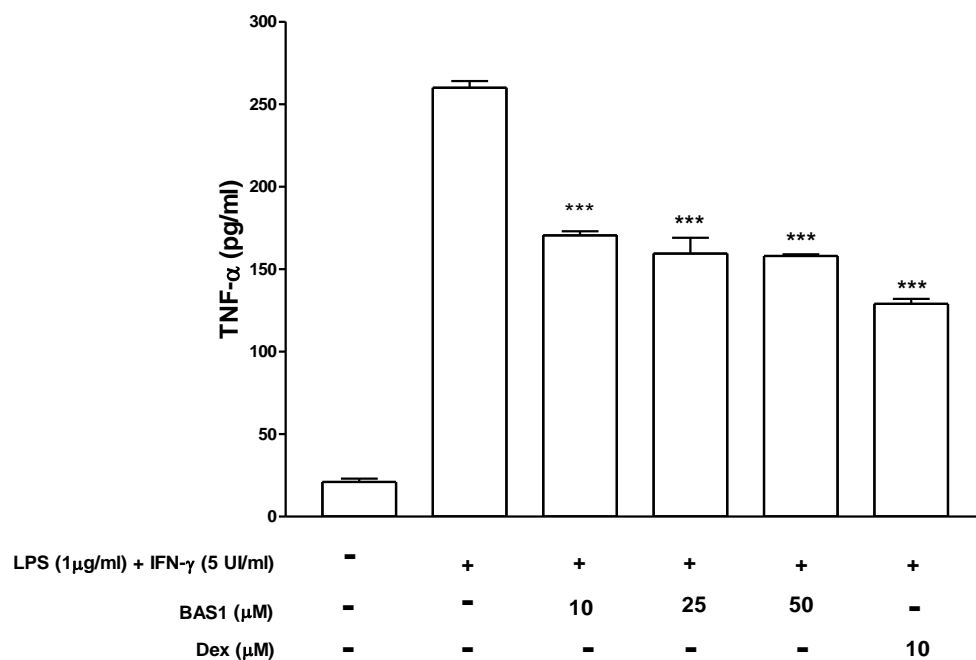


Figura 12. Produção de TNF- α em cultura de macrófago estimulados com LPS (1 μ g/ml)+IFN- γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1 em 3 concentrações diferentes (10, 25 e 50 μ M) durante 24h de exposição. Dados representados por média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle positivo (tratado somente com estímulo).

4.7 Produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS+IFN- γ e tratados com BAS1

Não foi observada redução significativa da produção de IL-10 em macrófagos tratados com BAS1 nas diferentes concentrações (10, 25 e 50 μ M) quando comparamos com o controle positivo (grupo tratado apenas com o estímulo). Observamos diferença significativa somente em relação ao grupo controle negativo (não estimulado) e demais grupos experimentais. Dexametasona (10 μ M), antiinflamatório padrão, também não reduziu de maneira significativa a produção de IL-10, em relação ao controle positivo (figura 13).

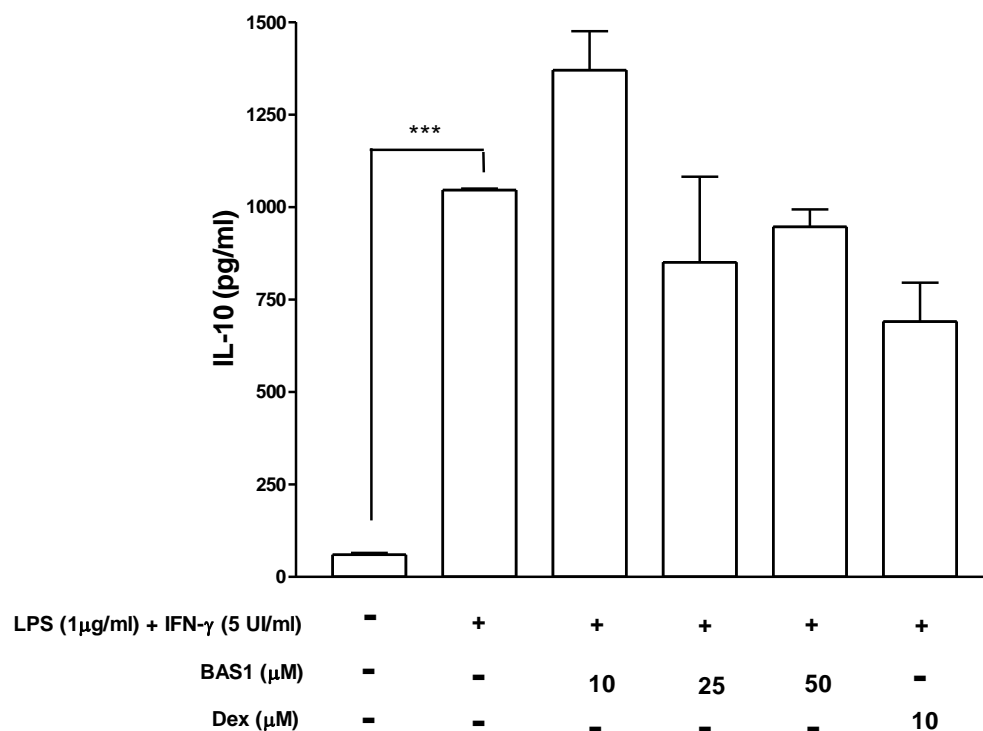


Figura 13. Produção de IL-10 em cultura de macrófago estimulados com LPS (1 μ g/ml)+IFN- γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1 em 3 concentrações diferentes (10, 25 e 50 μ M) durante 24h de exposição. Dados representados por média \pm EPM. *** p <0,001 (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle positivo (tratado somente com estímulo).

4.8 Produção de PGE₂ em cultura de macrófagos estimulados com LPS+IFN- γ e tratados com BAS1

Significativa redução, concentração dependente, nos níveis de PGE₂ foi observada nos grupos tratados com BAS1 nas diferentes concentrações (10, 25 e 50 μ M) reduzindo em 15 \pm 1.3 %, 36 \pm 0.3% e 57 \pm 7%, respectivamente, a produção de PGE₂ quando comparado com o controle positivo (grupo tratado apenas com o estímulo), Figura 14. Dexametasona (10 μ M), antiinflamatório padrão, também reduziu a produção de PGE₂ de maneira significativa, quando comparada com o controle positivo.

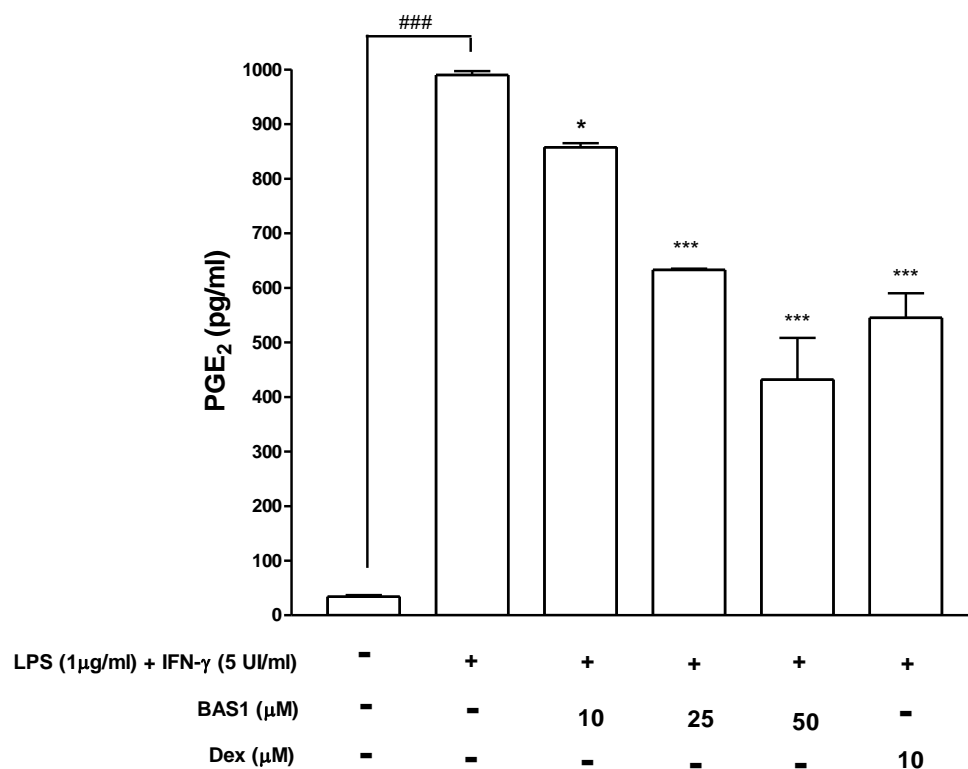


Figura 14. Produção de PGE₂ em cultura de macrófagos estimulados com LPS (1 μ g/ml)+IFN- γ (5 UI/ml) e co-tratado com BAS1 em 3 concentrações diferentes (10, 25 e 50 μ M) durante 24h de exposição. Dados representados por média \pm EPM. * p <0,05; *** p <0,001; ### P <0,001 (ANOVA + Tukey-Kramer), comparados com o controle positivo (tratado apenas com estímulo).

5 DISCUSSÃO

Demonstramos previamente que o flavonóide BAS1 exerceu atividade antiinflamatória *in vivo*, em modelo de edema de pata e bolsa de ar em ratos, cujo mecanismo da ação antiinflamatória não foi elucidado (Moraes, 2008). Considerando, o potencial farmacológico do flavonóide BAS1, o presente estudo investigou o mecanismo de ação antiinflamatória de BAS1 em macrófagos murinos estimulados.

A atividade dos macrófagos, *in vitro*, pode ser determinada com administração de um estímulo, e o efeito de drogas antiinflamatórias pode ser avaliado pela redução nos níveis de mediadores inflamatórios e citocinas produzidos por essas células, assim como a expressão de enzimas induzíveis (Bogdan *et al.*, 2000; Gordon e Tylor, 2005; Gordon, 2007). Primeiramente, padronizamos no presente estudo, o estímulo para ativação de macrófagos. A literatura mostra que o estímulo mais eficaz para ativar macrófagos *in vitro* é o LPS, cuja ativação é potencializada pela ação sinérgica do IFN- γ (Alley *et al.*, 1995). Os resultados demonstraram que IFN- γ sozinho não foi capaz de ativar macrófagos quiescentes, visto que, a produção de nitrito não foi alterada. Este dado está de acordo com a literatura, a qual mostra que macrófagos quiescentes não expressam receptores para IFN- γ , passando a expressá-los somente após sua ativação prévia. Mais uma vez confirmamos estes resultados em nossos experimentos, onde mostramos que quando associado ao LPS, promoveu um intenso aumento na produção de NO. Diante disso, validamos nosso modelo experimental como adequado para avaliação do efeito antiinflamatório da BAS-1.

Um importante pré-requisito para a habilitação de uma droga como antiinflamatória é sua baixa toxicidade. Neste contexto, nossos resultados demonstraram que BAS1 apresentou citotoxicidade apenas para altas concentrações, estando de acordo com dados da literatura, onde mostram que concentrações de flavonóides acima de 50 μM causam morte celular em cultura de macrófagos (Kim *et al.*, 2004). Estes dados corroboram nossos estudos prévios, *in vivo*, onde não observamos efeitos tóxicos agudos de BAS1, avaliando os níveis de indicadores bioquímicos da função renal e hepática (Moraes, 2008).

No que tange a avaliação bioquímica, nossos resultados mostraram que BAS1 inibe significativamente a produção de nitrito em até 95%, revelando que esta substância é um potente inibidor da atividade nitrérgica. Este efeito foi semelhante ao efeito da dexametasona (96%), antiinflamatório usado como padrão, descrito como potente redutor da síntese de NO (Walker *et al.*, 1997). Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, demonstramos também que BAS1 inibiu de forma significativa a produção de nitrito, *in vivo*, no exsudato inflamatório da bolsa de ar em ratos, induzido com carragenina (Moraes, 2008). Estes resultados estão de acordo com os dados do presente estudo, em macrófagos ativados *in vitro*. Desta forma confirmamos que um importante mecanismo da droga supracitada é um bloqueio de um importante mediador do processo inflamatório, o óxido nítrico.

Não obstante, procuramos avaliar se o efeito sob o sistema nitrérgico estava associado à expressão da enzima de síntese do NO, que no caso de eventos inflamatórios se destaca a NOS-2. Assim, nós também demonstramos que BAS1 foi capaz de inibir a expressão de NOS-2 em macrófagos ativados. Este resultado indica que a inibição da produção de nitrito induzida por BAS1, está associada à repressão da expressão gênica para NOS-2. Dados da literatura também demonstram que

glicocorticóides, como dexametasona, também inibem a expressão de NOS-2 em macrófagos ativados (Joly *et al.*, 1997). Desta forma caracterizamos que a BAS-1 possui, considerando a ativação nitrérgica, um efeito semelhante aos antiinflamatórios clássicos esteroidais. Este fato pode ser explicado pela alta lipofilidade de nosso composto, embora estudos relacionados à avaliação da permeabilidade celular da BAS1 sejam necessários para confirmar nossa hipótese. Outro aspecto de importante discussão é que, embora não tenhamos mostrado o mecanismo de ação relacionado ao bloqueio da expressão de NOS-2, sabe-se que outros flavonóides, como a curcumina e wogonina, diminuem sua expressão, via inibição da ativação do fator de transcrição NFκB (Serafini *et al.*, 2010). Desta forma trabalhos futuros em nosso laboratório serão realizados no intuito de avaliar tal fenômeno.

Procuramos estudar também se o tratamento com BAS1 era capaz de promover alterações nos níveis de uma importante citocina pró-inflamatória, o TNF- α (Hanada e Yoshimura, 2002; Beutler e Cerami, 1986; Parameswaran e Patial, 2010). Os resultados deste estudo demonstram que BAS1 reduziu significativamente a produção de TNF- α , quando comparado com o controle positivo (grupo tratado somente com estímulo). Dados da literatura mostram que drogas antiinflamatórias diminuem acentuadamente a produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS (Campelo *et al.*, 2011). Estudos prévios também apontam que um grupo de flavonóides, como a quercetina, também inibem a produção de TNF- α em diferentes tipos celulares como macrófagos (Santangelo *et al.*, 2007). Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, que demonstram associação entre efeito antiinflamatório e diminuição de TNF- α . Isto é justificado pelo fato do TNF- α ter um papel chave no desencadeamento da resposta pró-inflamatória, levando à transcrição gênica de várias moléculas inflamatórias, sua

inibição; regula negativamente a expressão de proteínas inflamatórias (Parameswaran e Patial, 2010).

Outro dado importante, mostrado em nossos resultados, foi a avaliação da produção de PGE₂. Observamos uma diminuição concentração dependente do nível de PGE₂, em macrófagos ativados e tratados com BAS1. Sabe-se que o mecanismo de ação dos AINE's se dá através da inibição enzimática de ciclooxigenase (Vane *et al.*, 1998; Simmons *et al.*, 2004), bloqueando a ligação do ácido araquidônico com esta enzima, e dessa forma, inibindo a produção de eicosanóides como a PGE₂. Flavonóides como luteolina, 3',4'-dihidroxiavona, galangin, também foram demonstrados como inibidores da enzima COX (Bauman *et al.*, 1987). Considerando que BAS1 diminuiu significativamente a produção de PGE₂, podemos inferir que BAS1 pode estar bloqueando a atividade de COX, similarmente aos AINE's. Baseado no comportamento do sistema nitrérgico e no possível efeito sobre a COX, podemos inferir que a BAS-1 possui efeito que se assemelha aos descritos para antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais, contudo tal observação deve ser confirmada com experimentos futuros. Resultados obtidos em trabalhos anteriores em nosso laboratório ratificam os dados apresentados no presente estudo, naqueles o efeito de BAS1 na permeabilidade vascular foi determinado, da mesma forma que o volume de exsudato na bolsa de ar em ratos foi quantificado (Moraes, 2008). Os resultados *in vivo* demonstraram uma diminuição em ambos os parâmetros citados, o que pode ser explicado pelos resultados do presente estudo uma vez que PGE₂ e NO são fatores que reconhecidamente aumentam a permeabilidade vascular e edema no local do tecido inflamado (Shin *et al.*, 2009). Dessa forma, os dados deste trabalho *in vitro*, em cultura de macrófagos, corroboram nossos resultados anteriores *in vivo*.

Entendemos que o efeito antiinflamatório de uma droga pode estar associado tanto a agentes pró quanto antiinflamatórios. Neste contexto, o presente estudo, avaliou também o efeito de BAS1 na geração da citocina antiinflamatória IL-10. Como descrito em nossos resultados, BAS1 não mostrou alteração significativa na produção de IL-10, quando comparado com o grupo controle positivo (tratado somente com estímulo), mostrando que BAS1 não altera os níveis de IL-10. Estes dados sustentam a hipótese que a BAS-1 possui uma ação específica na via pró-inflamatória, sendo desta forma um agente que junto com a resposta antiinflamatória natural age no controle do processo inflamatório.

6 CONCLUSÕES

O efeito de BAS1 sobre a viabilidade de macrófagos derivados da medula óssea foi significativo apenas para a concentração 100 μ M, causando morte celular;

BAS1 inibiu a produção de Óxido Nítrico, por ter reduzido significativamente a síntese de seu metabólito, o nitrito;

BAS1 diminuiu a liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α , em cultura de macrófagos, estimulados com LPS e IFN- γ ;

BAS1 regulou negativamente a expressão de NOS-2 em macrófagos ativados;

BAS1 bloqueou a liberação de PGE₂ em macrófagos significativamente;

BAS1 não interferiu na liberação da citocina antiinflamatória IL-10, em cultura de macrófagos, estimulados com LPS e IFN- γ ;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALUNG, H. T.; SHRODER, K.; HIMES, S. R.; BRION, K.; VAN ZUYLEN, W.; TRIEU, A.; SUZUKI, H.; HAYASHIZAKI, Y.; HUME, D. A.; SWEET, M. J.; RAVASI, T. LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. **The FASEB Journal**, 20: 1315-1327, 2006.

ALLEY, W. E.; MURPHY, W. J.; RUSSELL, S. W. A classical enhancer element responsive to both lipopolysaccharide and interferon- γ augments induction of the iNOS gene in mouse macrophages. **Gene**, 158: 247-25, 1995.

AKIRA, S.; UEMETSU, S.; TAKENCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, 24: 783-801, 2006.

AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. **Proceedings of Japan Academy Series B: Physical e Biological Sciences**, 85: 143-156, 2009.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, 75: 639-653, 2004.

ANDERSON, C. F.; MOSSER, D. M. Cutting edge: Biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. **The Journal of Immunology**, 168: 3697-370, 2002.

ASANUMA, M.; NISHIBAYASHI-ASANUMA, S.; MIYAZAKI, I.; KOHNO, M.; OGAWA, N. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by scavenging of nitric oxide radicals. **Journal of Neurochemistry**, 76: 1985-1994, 2001.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T.A. The cellbiology of macrophage activation. **Annual Review of immunology**, 2: 283-318, 1984.

ALTHAMAM, R.; PHILLPOT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and NOD proteins. **Current Opinion Microbiology**, 7: 25-32, 2004.

BALDWIN, A. S. J. The NF κ B and I κ B Proteins: New Discoveries and Insights. **Annual Review Immunology**, 14: 649-68, 1996.

BANDGAR, B.P.; SARANGDHAR, R.J.; SANTOS, H. V.; AHAMED, F.A. Synthesis and Biological Evaluation of Orally Active Prodrugs of Indomethacin. **Journal of Medicinal Chemistry**, 54: 1191-1201, 2011.

BAUMAN, J.; BRUCHHAUSEN F, V.; WURM, G. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. **Prostaglandins**, 20: 627-639,1980.

BARTON, G. M.; A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, 118: 413-420, 2008.

BERG, M. E. van den. Plantas Medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento. **CNPQ/PTU/MPEG**, Belém, 2ª Ed. p 97, 1992.

BESSONE, F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs : what is the actual risk of liver damage ? **World Journal of gastroenterology**, 16: 5651-5661, 2010.

BLASIUS, A. L .; BEUTLER, B. Intracelular toll-like receptors. **Immunity**, 26: 305-315, 2010.

BEUTLER, B. AND CERAMI, A. Cachecin an Tumor Necrosis Factor as como two sides of the same biological coin. **Nature**, 320: 584-588, 1986.

BIGHETTI, E. J.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO J. S.; BRITO, A. R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of Croton cajucara. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 51: 1447-1453, 1999.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion Microbiology**, 12: 64-75, 2000.

BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Migração de neutrófilos: mecanismos e mediadores. **Pesquisa Médica Fortaleza**, 2: 108-115, 1999.

BRED, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: physiologic messenger molecule. **Annual Review Biochemistry**, 63: 175-195, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254, 1975.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. V. 55, p. 37-38, 2000.

CAMPELO S. R.; DA SILVA, M. B.; VIEIRA, J. L. F.; DA SILVA, J. P.; SALGADO, C. G. Effects of immunomodulatory drugs on TNF- α and IL-12 production by purified epidermal langerhans cells and peritoneal macrophages. **BMC Research Notes**, 4: 24-31, 2011.

CARVALHO, J. C. T.; **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmed Edit., 480p, 2004.

CHANDRASEKARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. Cyclooxygenase – 1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**: 99, 13926-13931, 2002.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinoceptive activities of *Piper Cubeta*, *Phisalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, 89:171-175, 2003.

CHEN, X. L.; ZHANG, Q.; ZHAO, R.; DING, X.; TUMMALA, P. E.; MEDFORD, R. M. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 35:573-580, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3^a. Ed. Lisb, Fundação Calouste Gulbenkian, p. 1032, 1987.

DI ROSA, M.; RADOMISK, M.; CARNUCCIO, R.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibits induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 172(3):1246-52, 1990.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenan and turpentine. **Pathology**, 104, 1:15-29, 1971.

DI-STASI, L. C. Plantas Medicinaias verdades e mentiras. Plantas medicinaias e seus distintos contextos de uso. **Ed UNESP** p. 48, 2007.

DUARTE, M. R.; YAMOTO, Y.; CECY, G. **Guia de farmacognosia aplicada**. Curitiba, Educa, 84 p, 1990.

EMIM, J. A. D. S.; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 46: 118-122, 1994.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration in vivo by indirect mechanisms. **Agents Actions**, 30 (3-4): 344-9, 1990.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **Journal of Experimental Medicine**, 170: 2081-2095, 1989.

FRESHNEY, R. I. **Animal Cell Culture – A Practical Approach**. 2 ed. Oxford: **IRL Press**, 1992.

GAMETE-PAYRASTRE, L. Flavonoids and inhibition of PKC and PI 3-Kinase. **General Pharmacology**, 32: 279-286, 1999.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Review Immunology**, 5: 953-964, 2005.

GORDON, S. Macrophage: Past, present and future. **European Journal of Immunology**, 37: 9-17, 2007.

GREEN, LC.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, 126: 131-138, 1982.

GUPTA, R. A.; DUBOIS R, N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nature Review Cancer**, 1: 11-21, 2001.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMERK-GUZIK, T. Nitric Oxid and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal Physiology Pharmacology**, 54: 649-487, 2003.

HAMBLETON, P.; WILLANS, C. A. Studies on carrageenan air pouch inflammation in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, 70: 425-433, 1989.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 13: 413-421, 2002.

HARBONE, J. B.; WILLIANS, C. A. Advences in flavonoid reserch since 1992. **Phytochemistry**, 55: 481-504, 2000.

HUME, D. A.; UNDERHILL, D. M.; SWEET, M. T.; OZINSKY, A. O.; LIEW, F. Y.; ADEREM, A. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. **BMC Immunology**, 2: 2-11, 2001.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, W. H.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, 96: 229-245, 2004.

KUWATA, H.; WATANABE, Y.; MIYOSHI, H.; YAMAMOTO, M.; KAISHO, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. IL-10 inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- α production in macrophages. **The American Society of Hematology**, 102: 4123-4129, 2003.

LASKIN, D. L.; LASKIN, J. D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. **Toxicology**, 160: 111-118, 2001.

LI, H.; POULOS, T.L. Structure–function studies on nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 99: 293-305, 2005.

McEVER, R. P. Leucocyte-endothelial cell interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, 4(5): 840-849, 1992.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents.

Proceeding of the Nutrition Society, 69: 273-278, 2010.

MEDZHITOV, R. Origen an physiological and physiological roles of inflammation.

Nature, 454: 428-435, 2008.

MIKAMI, T.; MIYASAKA, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, 95: 1-12, 1983.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43(2): 109-41, 1991.

MORAES, WALDINEY PIRES. Estudo sobre o efeito antiinflamatório de um flavonóide isolado da planta *Brosimum acutifolium* e de uma lignana da *Virola michelli*. 2008. 76 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular**.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo; **Roca**, 2007.

MORONEY, M. A. Selective of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 40: 787-792, 1988.

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

MORIKAWA, K.; NONATA, M.; TORII, I.; MORIKAWA, S. Modulatory effect of fosfomycin on acute inflammation in the rat pouch model. **International journal of Antimicrobial Agentes**, 21: 332-339, 2003.

NANTEL, F. Distribution and regulation of ciclooxigenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, 128: 853-859, 1999.

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive Oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**, 97: 8841-8848, 2000.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of New Drugs over the 25 years. **Journal of Natural Products**, 70: 461-477, 2007.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophages. **The Journal of Immunology**, 121: 806-809, 1978.

OHUCHI, K.; HIRASAWA, N.; WATANABE, M.; TSURUFUJI, S. Pharmacological analysis of the vascular permeability response in the anaphylactic phase of allergic inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology**, 117: 337-345, 1985.

OLESEN, J.; THOMSEN, L. L.; IVERSEN, H. Oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. **TiPS**, 15: 149-153, 1994.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. **Critical Reviews Eukaryotic Gene Expression**, 20: 87-103, 2010.

PENIDO, C.; CONTE, F.P.; CHAGAS, M.S.; RODRIGUES, C. A.; PEREIRA, J. F.; HENRIQUES, M. G. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. **Inflammation Research**, 55: 457-64, 2006.

PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M; PADILHA, M. M., ROCHA, L. M., SOUZA, P. J. C., CARVALHO, J. C. T. Antiinflammatory and analgesic activities of *Hypericum Brasiliensis* (Willd) standardized extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18: 320-325, 2008.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D; SARKAR, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y.; AND FISHER, P. B. Interleukin-10 and Related Cytokines and receptors. **Annual Review. Immunology**. 22: 929-979, 2004.

RAY, A.; DITTEL, B. N. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. **Journal of Visualized Experiments**, 2: 1-3, 2010.

SALVENI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAM, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy Sciences**, 90: 7240-7244, 1993.

SAMMONS, M. J. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein Kinase pathway. **Brain Research**, 876: 48-54, 2000.

SANTAGELO, C.; R, VARIÌ; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MARSELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling an inflammation. **Ann Inst Super Sanità**. 43 (4) : 394-405. 2010.

SILÁN , A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. M. Adjuvant carrageenan-induced inflammation in mice. **General. Pharmacology**, 29 (4): 665-669, 1997.

SOUZA, G. E.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, 17(1): 97-103, 1985.

SCHINDLER, H.; LUTZ, M. B.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. The production of IFN-gama by IL-12/IL-18 activated macrophages requeres STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **Journal of Immunology**, 166: 3075-3082, 2001.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, 346(6283): 425-34.1990.

STANLEY, E. R. The macrophage colony-stimulating factor, CSF-1. **Methods in Enzymology**, 116:564-587, 1985.

SWINGLE, K. F.; SHIDEMAN, F.E. Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and their modification by certain antiinflammatory drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 183: 226-234, 1972.

TAO, X.; MA, L.; LIPSKY, P. E. Suppression of carrageenan-induced inflammation in vivo by extract of Chinese herbal remedy *Tripterygium wilfordii* Hook F. **Inflammation Research**, 48: 139-148, 1999.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; ANDRADE, F.D.; VILEGAS, W. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of Quassia amara bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 85: 19-23, 2003.

TORRES, S. L.; MONTEIRO, J. C. M.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Two flavanas from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, 53: 1047-1050, 2000.

TOSI, M. F. Innate immune responses to infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 116: 241-249, 2005.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **Journal of Experimental Medicine**, 128: 415, 1968.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A.; HIRSCH, J. G.; HUMPHREY, H. H.; SPECTOR, W. G.; LANGEVORT, H. L. The mononuclear phagocytes system. A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. **Bulletin of the World Health Organization**, 46: 845-852, 1972.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, 38: 97-120, 1998.

WALKER, G.; PFEILSCHIFTER J.; KUNZ, D. Mechanisms of Suppression of Inducible Nitric-oxide Synthase (iNOS) Expression in Interferon (IFN)- γ -stimulated RAW 264.7 Cells by Dexamethasone. **The Journal of Biological Chemistry**, 26: 16679-16687, 1997.

WARREN, M. K.; VOGEL, S. N. Bone marrow-derived macrophages: Development and regulation of differentiation markers by colony stimulating factor and interferon. **Journal of Immunology**, 134: 982-989, 1985.

WRIGHT, C. D.; MULSCH, A.; BUSSE, R. & OSSWALD, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 160(2): 813-9, 1989.

WILLIAMS, C. A.; Houlst, J. R. S.; Harbone, J. B.; Greenham, J.; Eagles, J.A. Biologically active lipophilic flavonoid from *Tanacetum parthenium*. **Phytochemistry**, 38: 267-270, 1995.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2 and COX-3 the future treatment of chronic inflammatory disease. **The Lancet**, 355: 646-647, 2000.

WILLOUGHBY, D. A. Resolution of inflammation disease. **International Journal of Immunopharmacology**, 22: 1131-1135, 2000.

WINTER, C. A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine**, 111: 544-7, 1962.

WU, K. K. Inducible cicloxygenase and nitric oxide synthase. **Advances in Pharmacology**, 33: 179-207, 1995.

WU, Y.; ZHOU, C.; LI, X.; SONG, L.; WU, X.; LIN, W.; CHEN, H.; BAI, H.; ZHAO, J.; ZHANG, R.; SUN, H.; ZHAO, Y. Evaluation of antiinflammatory activity of the total flavonoids of *Laggera pterodonta* on acute and chronic inflammation models. **Phytotherapy Research**, 20: 585-590, 2006.

YOUNG, J. M.; DE YOUNG, L. M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. **Pharmacological methods in the control of inflammation**, Spector J, Back N (eds). Liss: New York: 215-231, 1989.

VODOVOTZ, Y.; CONSTANTINE, G.; RUBIN, J.; CSETE, M.; VOIT, E.; AN, G. O. Mechanistic Simulations of Inflammation: Current State and Future Prospects. **Math Biosci.** 217: 1-10, 2008.

ZANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. **Current Protocols in Immunology**, 1: 1-18, 2008.