



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA PTEROCARPANOQUINONA
LQB 118 EM MACRÓFAGOS MURINOS**

JOÃO PESSOA – PB

2018

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA PTEROCARPANOQUINONA
LQB 118 EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues
Mascarenhas

**JOÃO PESSOA – PB
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Éssia de Almeida.

Atividade anti-inflamatória da pterocarpanoquinona LQB
118 em macrófagos murinos / Éssia de Almeida Lima. -
João Pessoa, 2018.

72 f. : il.

Orientação: Sandra Mascarenhas.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Biotecnologia.

1. Inflamação. 2. Citocinas. 3. Zimosan. I.
Mascarenhas, Sandra. II. Título.

UFPB/BC

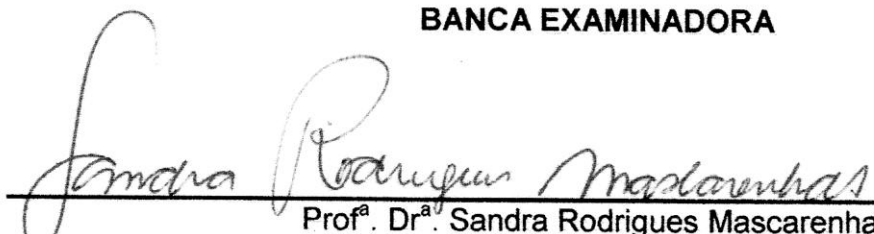
ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

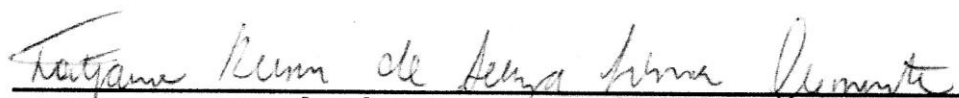
**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA PTEROCARPANOQUINONA LQB 118 EM
MACRÓFAGOS MURINOS**

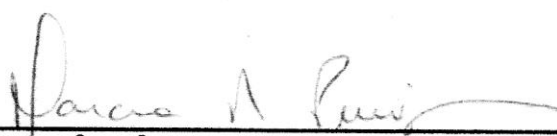
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**.

Dissertação de Mestrado aprovada em 25/09/2018

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Orientadora)


Prof.^a. Dr.^a. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
(Departamento de Biologia Celular e Molecular – UFPB. Avaliadora interna)


Prof.^a. Dr.^a. Márcia Regina Piuvezam
(Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – UFPB.
Avaliadora externa)

Dedico este trabalho a Deus e minha família,
meus pais Edna e Evandes e minhas irmãs
Éssica e Edvania, pelo incentivo e por serem
sempre meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e confiança em mim depositada. Eu agradeço principalmente pela educação que me foi dada, por terem me incentivado aos estudos desde pequena e por todos os momentos em que tiveram a paciência e sabedoria para me guiar pelos melhores caminhos. Vocês são a razão do meu esforço!

Às minhas irmãs, com quem dividi e ainda divido a mesa de estudos. Apesar das brigas, eu amo vocês!

Ao meu noivo, Rogério, pelo apoio, incentivo e por sempre me fazer acreditar que tudo será como eu sempre quis. Te amo!

Aos meus tios, primos e amigos, que contribuíram direta ou indiretamente não só para a realização desse trabalho, mas para a realização de um sonho.

Aos amigos da graduação, em especial à Deyse, Eduarda e Rephany, pela amizade sem limites, por estarem sempre presentes e por não me deixarem desistir nos momentos mais difíceis.

Aos amigos da turma de mestrado, Adrielly, Anauara, Rafael, Joseanne e Ubiratan, que sempre ajudaram uns aos outros em tudo que foi preciso e pelo companheirismo em todas as disciplinas cursadas.

À minha orientadora, Sandra Rodrigues Mascarenhas, pela confiança em me deixar fazer parte da sua família científica, pela amizade ao longo desses anos e por me permitir conhecer e fazer ciência. Muito obrigada!

Aos professores do Centro de Biotecnologia, que contribuíram com a minha formação e que mesmo com todas as dificuldades enfrentadas desempenham da melhor forma suas funções. Que cada um conquiste o espaço que merece!

Aos amigos do Laboratório de Imuno, em especial a **Luiz Henrique** por (quase hahaha) sempre ser paciente e estar disposto a esclarecer minhas dúvidas por mais bobas que elas fossem. À **Deyse**, minha amiga desde a graduação e que também se tornou colega de bancada e de loucuras durante os experimentos, ah, e

não posso esquecer-me da imensa gratidão por injeitar o tioglicolato nos animais das nossas culturas hahaha. A **Júlia, José Guilherme, Anne, Marreiro** e os demais, que tanto ajudaram no decorrer destes quase dois anos de mestrado, principalmente nas nossas bateadeiras de placas do ELISA. E aos que já não se encontram mais, mas que foram de igual importância na minha formação científica, Jacqueline, Rachel, Talita e Priscila. Muito obrigada!

À minha grande amiga e em breve vizinha **Fany**, que desde a graduação está presente em minha vida, pela amizade e carinho de sempre. Somos agora as noivinhas do ano!!!

À minha grande amiga **Eduarda**, que mesmo longe fisicamente está sempre presente em meu coração. Te amo perua!

À **Bruna**, pela boa vontade de sempre nos ajudar com o citômetro quando era preciso. Te desejo muito sucesso!

Aos Professores da UFRJ, Paulo Roberto Ribeiro Costa, Chaquip Daher Netto e Vivian Rumjanek, por terem cedido gentilmente a substância que gerou esse trabalho, assim como a aluna de iniciação científica **Ângela** que a trouxe para João Pessoa.

Aos membros da Banca, professoras Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente e Márcia Regina Piuvezam por aceitarem fazer parte e contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Às técnicas de laboratório **TCris e Fátima**, pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar quando era necessário. Obrigada!

À **funcionária Mônica**, pela humildade, conselhos, amizade e companhia ao longo dessa jornada.

A José Crispim Duarte e Roberta Nunes, pela imensa dedicação ao biotério, a fim de fornecer nossos animais sempre sadios e em boas condições.

À **Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Centro de Biotecnologia** por possibilitarem a infraestrutura necessária para execução dos experimentos.

Muito obrigada!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”

Winston Churchill

RESUMO

A LQB 118 é uma pterocarpanoquinona, molécula híbrida sintética resultante da união de dois grupos de moléculas naturais bioativas, os pterocarpanos e as naftoquinonas. Esta molécula possui várias atividades biológicas relatadas, incluindo atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação alérgica pulmonar. No entanto, ainda não há relatos na literatura sobre a atividade da LQB 118 em outros modelos de inflamação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em macrófagos peritoneais murinos, o papel da pterocarpanoquinona LQB 118 no processo inflamatório. Inicialmente, camundongos *Swiss* receberam uma injeção de tioglicolato (4%) via intraperitoneal (i.p.). Quatro dias depois, os macrófagos peritoneais foram obtidos e cultivados na concentração de 2×10^5 cels/poço. As células foram tratadas com a LQB 118 (5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M e 0.1 μ M) na presença ou ausência do estímulo inflamatório, zimosan (0,2 mg/mL), por 24 h. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos para a quantificação das citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) por ELISA. A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. Para análise do mecanismo de ação da molécula, os macrófagos foram cultivados na concentração de $1,5 \times 10^6$ cels/poço e tratadas como já descrito. Após 24 h, as células foram utilizadas para análise da expressão de moléculas envolvidas na inflamação por citometria de fluxo. Para isso, os macrófagos foram incubados com os anticorpos anti-TLR2, anti-CD69 e anti-P-p38. Como esperado, o zimosan induziu aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Por sua vez, o tratamento com a LQB 118 foi capaz de reduzir significativamente os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante da cultura celular. Além disso, o tratamento com a LQB 118 foi capaz de reduzir a expressão da molécula CD69, assim como o aumento da fosforilação da MAPK p38 induzida por zimosan. Adicionalmente, a LQB 118 foi capaz de modular negativamente a expressão do TLR2 na presença do estímulo inflamatório. Os resultados obtidos são independentes de morte celular, visto que nenhuma das concentrações de LQB 118 utilizadas interferiu na viabilidade dos macrófagos. Dessa forma, este trabalho demonstrou pela primeira vez o efeito anti-inflamatório da LQB 118 em macrófagos peritoneais murinos.

Palavras-chave: Inflamação. Citocinas. Zimosan.

ABSTRACT

LQB 118 is a pterocarpanoquinone, a synthetic hybrid molecule from the union of two bioactive natural molecule groups, pterocarpan and naphthoquinones. LQB 118 biological activity has been reported, including anti-inflammatory properties in allergic lung inflammation model. However, there are no LQB 118 anti-inflammatory properties reports using other inflammation model. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of pterocarpanoquinone LQB 118 in murine peritoneal macrophages in the inflammatory process. Briefly, female Swiss mice was elicited with an intraperitoneal (i.p.) injection of thioglycollate (4%). After four days, peritoneal macrophages were obtained and cultured at the concentration of 2×10^5 cells/well. Cells were treated with LQB 118 (5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M and 0.1 μ M) in the presence or absence of the inflammatory stimulus, zymosan (0.2 mg / mL) for 24 h. Then, the supernatants were collected for quantification of the cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) by ELISA. Cell viability was determined by the MTT method. For action mechanism analysis of the molecule, the macrophages were cultured at the concentration of $1,5 \times 10^6$ cells / well and treated as described above. After 24 h, the cells were used for analysis of the expression of molecules involved in inflammation by flow cytometry. For this, the macrophages were incubated with anti-TLR2, anti-CD69 and anti-P-p38 antibodies. As expected, zymosan increased inflammatory cytokines evaluated production. On the other hand, LQB 118 treatment was able to significantly reduce levels of the cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the cell culture supernatant. Besides that, treatment with LQB 118 was able to reduce CD69 expression, as well as increased p38 MAPK phosphorylation induced by zymosan. In addition, LQB 118 was able to negatively modulate TLR2 expression in the presence of the inflammatory stimulus. The results obtained are independent of cell death, since none of LQB 118 concentrations interfered with macrophages viability. Therefore, this work demonstrated for the first time the anti-inflammatory effect of LQB 118 on murine peritoneal macrophages.

Key words: Inflammation. Cytokines. Zymosan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da LQB 118	15
Figura 2 – Principais vias de sinalização do TLR2.....	26
Figura 3 – Esquema representativo do protocolo experimental.....	34
Figura 4 – Estratégia de análise dos dados da citometria de fluxo.....	37
Figura 5 – Esquema representativo do efeito da LQB 118 no processo inflamatório <i>in vitro</i>	56
Gráfico 1 – Efeito da LQB 118 na viabilidade de macrófagos peritoneais com ou sem o estímulo do zimosan.....	40
Gráfico 2 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 na cultura de macrófagos peritoneais.....	41
Gráfico 3 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de TLR-2 em macrófagos peritoneais.....	43
Gráfico 4 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de CD69 em macrófagos peritoneais.....	44
Gráfico 5 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis de fosforilação da p38 em macrófagos peritoneais.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
<i>Avidin-HRP</i>	Do inglês “avidin horseradish peroxidase”
AP-1	Proteína ativadora 1
CD69	Do inglês “cluster of differentiation 69”
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
e.p.m.	Erro padrão da média
ERK	Do inglês “extracellular signal – <i>regulated kinase</i> ”
Gal-1	Galectina-1
IFN-γ	Interferon gama
IKK	Cinase do I Kappa B
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
IRAK	Cinases associadas ao receptor de IL-1
JNK	Cinase do N-terminal c-Jun
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
MyD88	Do inglês “Myeloid differentiation primary response 88”
NFkB	Fator de transcrição nuclear kB
NO	Óxido nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
n	Número de animais

PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PE	Ficoeritrina
Pgp	P-glicoproteína
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
p38	Proteína quinase ativadora de mitógeno p38
PBS	Solução fosfato tamponado
PBST	Solução fosfato tamponado contendo tween
mRNA	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura do inglês "Roswell Park Memorial"
SFB	Soro fetal bovino
TIR	Domínio intracelular de homologia ao receptor de interleucina 1
TLRs	Receptores do tipo Toll (Toll-like)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRAF	Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
ZIM	Zimosan

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	A pterocarpanoquinona LQB 118.....	15
1.1.1	Efeitos biológicos da LQB 118.....	16
1.2	Inflamação.....	18
1.2.1	Os macrófagos e o sistema imune.....	20
1.2.2	O papel das citocinas no processo inflamatório.....	22
1.2.3	CD69 e inflamação.....	23
1.2.4	Os receptores semelhantes ao <i>Toll</i> e suas vias de sinalização.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Material.....	32
4.1.1	Animais.....	32
4.1.2	Obtenção e preparo da LQB 118.....	32
4.2	Métodos.....	32
4.2.1	Tratamento com a LQB 118.....	32
4.2.2	Cultura de macrófagos.....	33
4.2.3	Determinação da viabilidade celular.....	34
4.2.4	Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas.....	35
4.2.5	Análise da expressão de CD69 e TLR2	35
4.2.6	Análise da fosforilação da MAPK p38.....	36

4.2.7 Anticorpos monoclonais.....	36
4.2.8 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo.....	36
4.2.9 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Estudo do efeito anti-inflamatório da LQB 118 <i>in vitro</i>	40
5.1.1 Citotoxicidade da LQB 118 em macrófagos peritoneais.....	40
5.1.2 Níveis das citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante da cultura de macrófagos.....	41
5.1.3 Níveis de expressão do receptor TLR2 em macrófagos peritoneais.....	43
5.1.4 Níveis de expressão da molécula CD69 em macrófagos peritoneais.....	44
5.1.5 Níveis de fosforilação da MAPK p38 em macrófagos peritoneais.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS.....	68
ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	69
ANEXO B – Artigo em colaboração publicado na revista Natural Product Communications.....	70
ANEXO C – Artigo em colaboração publicado na revista Frontiers in Physiology.....	71
ANEXO D – Artigo em colaboração publicado na revista Biomedicine and Pharmacotherapy.....	72

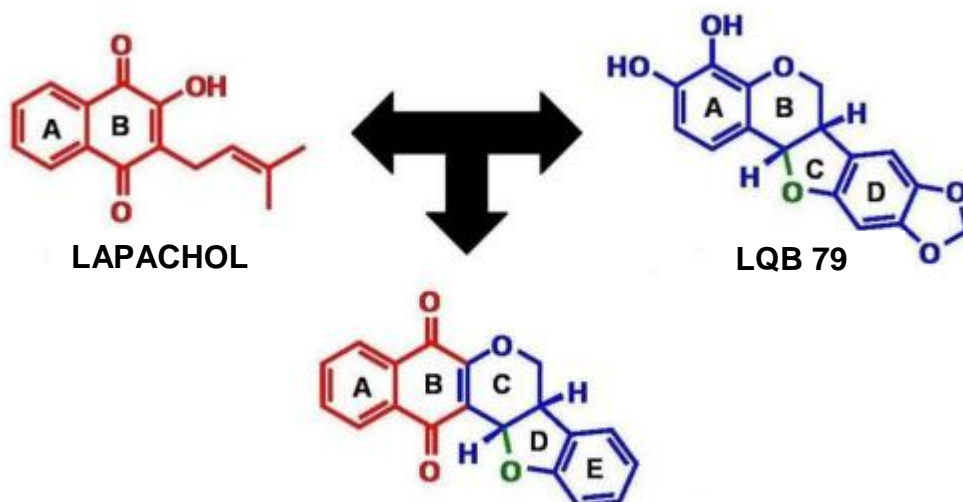
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A pterocarpanoquinona LQB 118

As pterocarpanoquinonas são moléculas híbridas sintéticas resultantes da união de dois grupos de moléculas bioativas: os pterocarpanos e as quinonas. A LQB 118 tem a sua estrutura baseada no lapachol e no pterocarpano LQB 79, conservando em sua estrutura a função quinona presente no lapachol e os anéis B, C e D presentes no LQB 79 (Figura 1) (NETTO et al., 2010). Os pterocarpanos pertencem ao grupo dos isoflavonoides, sendo, portanto, considerados metabólitos secundários, e são produzidos principalmente por plantas da família *Leguminosae* (DONNELLY; BOLAND, 1995). Já as quinonas, estão amplamente distribuídas na natureza tendo importantes funções na respiração celular, na fotossíntese e no processo de coagulação (CONKLIN, 2005). Tanto os pterocarpanos como as quinonas apresentam várias atividades biológicas relacionadas, incluindo atividade anti-inflamatória em diferentes modelos (CHAE et al., 2016; KIM et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2011; LEE et al., 2015).

Figura 1. Estrutura química da LQB 118.



A pterocarpanoquinona LQB 118 teve sua estrutura química planejada sob a coordenação do Professor Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa no Laboratório de Química Bio-orgânica do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Desde então, vários estudos vêm sendo realizados com a molécula, demonstrando que a LQB 118 possui várias atividades biológicas (BUARQUE et al., 2011; RIÇA et al., 2016).

1.1.1 Efeitos biológicos da LQB 118

Foi demonstrado que a LQB 118 apresenta efeito antineoplásico em linhagens de células leucêmicas humanas com diferentes características (HL-60, K562, K562-Lucena, Jurkat e Daudi) e de câncer de pulmão de pequenas e não-pequenas células (GLC-4 e A549). Por outro lado, apresentou baixa toxicidade *in vitro* para células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores normais, sugerindo que o composto é biosseletivo. Além disso, o estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) nessas células induziu aumento nos níveis de TNF- α e por sua vez, o tratamento com a LQB 118, em diferentes concentrações, foi capaz de reduzir os níveis dessa citocina (NETTO et al., 2010).

Nas linhagens tumorais K562 (sensível a quimioterápicos) e K562-Lucena (resistente a quimioterápicos), foi observado que a LQB 118 induz apoptose, o que é resultante do aumento da externalização de fosfatidilserina e dos níveis da caspase-3 (MAIA et al., 2011), uma caspase efetora comumente envolvida na execução da apoptose em vários tipos celulares (ZORNING et al., 2001). Além disso, ambas as linhagens superexpressam proteínas inibidoras da apoptose, tais como a survivina e XIAP. Adicionalmente, os transportadores de efluxo de drogas P-glicoproteína (Pgp), foram inibidos na presença da LQB 118. Neste mesmo trabalho, também foi observado que o composto foi capaz de induzir apoptose em amostras obtidas de pacientes com leucemia mieloide crônica (MAIA et al., 2011).

Altos níveis de cálcio (Ca^{2+}) dentro da célula também podem induzir o processo apoptótico (DOLAI et al., 2011; SUN et al., 2011). Em K562 (linhagem de leucemia mieloide crônica) e Jurkat (linhagem leucêmica de células T) foi observado um aumento na concentração intracelular desse íon na presença da LQB 118 em todas as concentrações utilizadas. Adicionalmente, também foi observada a ativação da caspase-12 em ambas as linhagens, indicando estresse do retículo

endoplasmático nessas células, o que pode induzir morte celular por apoptose mediante ativação de vários mecanismos, como a fosforilação de MAPKs e a ativação de caspases efetoras (caspase-7) (BREDESEN et al., 2004; LIEN et al., 2008). Além disso, a ativação da caspase-12, por sua vez, pode levar à ativação da caspase-9, o que também foi observado mediante tratamento com este composto (BACELAR et al., 2013).

Em linhagem de células de câncer de próstata (PC3), o tratamento com a LQB 118 reduziu a viabilidade celular de uma maneira dependente da concentração, assim como inibiu o processo de proliferação destas células. Isto pode estar relacionado à capacidade dessa molécula de induzir parada no ciclo celular na fase S e G2/M. Adicionalmente, avaliando os níveis de expressão dos mRNA para c-Myc e as ciclinas D1 e B1, que são importantes reguladores da progressão do ciclo celular, pode-se observar que estes tiveram a expressão reduzida mediante o tratamento com o composto. Além disso, os níveis de expressão tanto do mRNA como da proteína P21 (reguladora da progressão do ciclo da fase G1 para S) estavam aumentados. Todos estes fatores culminam com a morte programada da célula, o que de fato foi observado na presença da LQB 118 (MARTINO et al., 2014).

A LQB 118 também foi capaz de modular a localização e a expressão de fatores de transcrição como FoxO3a e FoxM1 em linhagens de leucemia mieloide aguda (HL-60 e U937) (DE MORAES et al., 2014), os quais são importantes por mediar efeitos citotóxicos e citostáticos de várias drogas quimioterápicas (WILSON et al., 2011).

Em linhagens de tumores murinos (EAC e B16F10), a LQB 118 também induziu apoptose, além de apresentar efeito sinérgico com a rapamicina, um promotor de autofagia. *In vivo*, o tratamento de camundongos C57BL/6 com este composto foi capaz de reduzir o crescimento do melanoma B16F10, assim como o Erlich sólido e melhorar efeitos colaterais como a perda de peso e a queda de pelos nos animais (SALUSTIANO et al., 2016). Além disso, a administração de LQB 118 não teve efeito tóxico em células da medula óssea de animais saudáveis (DE MORAES et al., 2014).

Outros estudos têm relatado os efeitos da LQB 118 na infecção por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, onde este composto se mostrou eficaz em diminuir a taxa de infecção de macrófagos *in vitro* por estes parasitas. *In vivo*, em camundongos BALB/c e hamsters, quando administrada subcutânea, oral

ou intraperitonealmente, a LQB 118 foi capaz de controlar as lesões e reduzir efetivamente a carga parasitária, não alterando os níveis de marcadores sorológicos de toxicidade. Adicionalmente, este composto induziu a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nesses parasitas, levando ao estresse oxidativo, além de induzir alterações morfológicas típicas da apoptose, como despolarização da membrana mitocondrial e fragmentação do DNA (COSTA et al., 2014; CUNHA-JÚNIOR et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013).

Avaliando a toxicidade e a eficácia terapêutica da LQB 118 em leishmaniose visceral experimental, Cunha-Júnior e colaboradores (2016) observaram que o tratamento com a molécula inibiu o crescimento do parasita e diminuiu a carga parasitária, assim como inibiu a hepatoesplenomegalia nos animais. Além disso, não houve alterações relevantes nos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e histológicos avaliados, demonstrando que o tratamento com a LQB 118 foi eficaz neste modelo.

Salustiano e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos citotóxicos da LQB 118 no sistema imune de camundongos, concluindo que o tratamento com este composto não foi capaz de causar alterações significativas no peso ou celularidade dos principais órgãos imunológicos (medula óssea, timo, baço, linfonodos axiais e axilares), independente da idade dos animais e do tempo de tratamento empregado.

Mais recentemente, foi reportado que esta molécula possui efeito anti-inflamatório em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS, onde o tratamento de camundongos com a LQB 118 em diferentes concentrações reduziu o infiltrado de neutrófilos, os níveis de mediadores pró-inflamatórios como a citocina TNF- α e a quimiocina KC, assim como os níveis de ativação do NF- κ B (RIÇA et al., 2016). No entanto, apesar deste relato, ainda não foi investigada a ação deste composto em outros modelos de inflamação.

1.2 Inflamação

O sistema imune é formado por uma rede complexa de células, órgãos e moléculas, que agem em conjunto com a finalidade de manter/restabelecer a homeostase do organismo (WILSON; TRUMPP, 2006). Este sistema possui várias funções, sendo uma delas o reconhecimento e eliminação de agentes lesivos, por

diferentes processos, como a indução da inflamação (SKELDON; SALEH, 2011). A inflamação, entre outras circunstâncias, é um processo fisiológico desencadeado quando há o reconhecimento de um agente agressor, seja este infeccioso ou não (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008). Este evento pode ser orquestrado por ambos os sistemas imunes, inato e adaptativo (SCOTT et al., 2004).

As células do sistema imune inato, a exemplo dos macrófagos e neutrófilos, são capazes de reconhecer diferentes classes de moléculas, denominadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), através da interação com seus receptores de repertório limitado. Já as células da imunidade adaptativa, como os linfócitos B e T, reconhecem uma diversidade muito maior de moléculas devido aos seus receptores altamente diversificados (WILSON; TRUMPP, 2006).

A resposta inflamatória gerada pela presença de microrganismos e tecidos danificados não serve somente para eliminar os agentes lesivos, mas também é responsável por estimular os processos de reparo, diminuindo a ocorrência de danos teciduais (ALLER et al., 2007). Por isso, a inflamação pode ser reconhecida como um processo benéfico ao organismo, onde sua desregulação e/ou exarcebação pode estar associada ao desenvolvimento e manutenção de diversas doenças, tais como artrite reumatoide (HOLMDAHL; MALMSTRÖM; BURKHARDT, 2014), hipertensão (MIRHAFEZ et al., 2014), diabetes (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011), doença de Alzheimer (TAKEDA; SATO; MORISHITA, 2014), obesidade (KHAN et al. 2014), asma e até mesmo o câncer (FILEP, 2013; NATHAN; DIG, 2010).

Durante o processo inflamatório, vários mediadores são liberados e desencadeiam, localmente, os sinais característicos da inflamação: rubor, calor, edema e dor, podendo ou não haver a perda da função (SEDGWICK; LEES, 1986; SERHAN, 2010). O calor e rubor são resultantes da vasodilatação; a dor resulta da estimulação das terminações nervosas por mediadores; o edema, do acúmulo de leucócitos no sítio inflamado e do aumento do fluido intersticial e a perda da função é resultado da inibição do reflexo muscular e do rompimento da estrutura do tecido (ALLER et al., 2007; SCOTT et al., 2004).

Didaticamente, o processo inflamatório pode ser dividido em dois estágios: a fase aguda e a fase crônica. Esta divisão relaciona-se à reparação do dano causado pelo agente agressor (RABELO, 2003). A inflamação aguda apresenta curta duração

e os principais eventos dessa fase são as alterações vasculares, como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular; e os eventos celulares, ocasionados pela migração dos leucócitos (especialmente os polimorfonucleares) para o sítio inflamado, o que recruta e ativa mais células através da liberação de vários mediadores inflamatórios, como as quimiocinas e citocinas (POBER; SESSA, 2007; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Já inflamação crônica, apresenta duração mais longa e resulta de uma inflamação aguda persistente (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Nesta fase, o infiltrado leucocitário muda de composição, sendo agora uma mistura de células mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Outras características marcantes da fase crônica são a proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese), fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004). No entanto, a divisão do processo inflamatório em fases é apenas didática, visto que a progressão da inflamação combina eventos presentes nas duas fases mencionadas.

1.2.1 Os macrófagos e o sistema imune

Os macrófagos pertencem à família dos fagócitos mononucleares e têm sua origem na medula óssea. Estas células estão presentes praticamente em todo o corpo, participando de respostas imunes inatas e adaptativas, assim como da manutenção da homeostase nos tecidos (GORDON, 2003; POLLARD, 2009). No sistema imunológico, os macrófagos possuem várias funções, tais como a apresentação de antígenos, fagocitose, ação microbicida e produção de mediadores que interferem na dinâmica da resposta inflamatória (ELOMAA et al., 1998; DE LA TORRE et al., 2008). Todos esses eventos são possíveis devido a uma ampla gama de receptores de superfície celular (a exemplo dos receptores semelhantes ao toll), mediadores intracelulares (MAPKs, por exemplo) e moléculas secretoras, que permitem reconhecimento, englobamento e destruição de patógenos invasores, assim como a regulação de outros tipos de células imunológicas (TAYLOR et al., 2005).

Existem diferentes subpopulações de macrófagos, que diferem entre si quanto aos seus fenótipos, localização e nomenclatura. A depender do local em que se encontram, os macrófagos recebem distintas denominações: no fígado, são denominados de células de Kupffer; no sistema nervoso central, eles compreendem

a micróglia; no tecido ósseo, formam os osteoclastos; nos pulmões, recebem a denominação de macrófagos alveolares e no tecido conjuntivo intersticial são chamados de histiócitos. Quanto ao fenótipo, todos estes macrófagos diferem entre si e, principalmente, dos monócitos circulantes (LAWRENCE; NATOLI, 2011). A migração dessas células para os tecidos pode ser aumentada por estímulos inflamatórios, como as quimiocinas e citocinas (TAYLOR et al., 2005; SHI; PAMER, 2011; KOPPENSTEINER et al., 2012).

Os macrófagos residentes dos tecidos, em situação de repouso, produzem baixos níveis de mediadores inflamatórios. No entanto, quando expostos a sinais ativadores como zimosan, interferon gama (IFN- γ), lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e outras citocinas, estas células tornam-se ativadas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Quando ativados por estímulos inflamatórios, os macrófagos mudam suas características adquirindo um fenótipo pró-inflamatório, que pode ser observado tanto *in vitro* como *in vivo*. Algumas dessas mudanças são o aumento de tamanho, da capacidade de aderência, da quantidade de grânulos, da capacidade de fagocitar e de produzir mediadores inflamatórios. Desta forma, as atividades microbicida e tumoricida dessas células aumentam (MOSSER, 2003; PEREIRA et al., 1994).

Uma vez ativados, os macrófagos participam da resposta inflamatória através da liberação de quimiocinas, citocinas, óxido nítrico e outras moléculas que promovem o recrutamento de células do sangue para o sítio da infecção ou tecido lesado (AMER; SWANSON, 2002). Dentre estas células, encontram-se principalmente os neutrófilos (que são as primeiras células a migrar), monócitos e outros tipos celulares, que ajudam a combater o agente lesivo e restabelecer a homeostase tecidual.

A ativação insuficiente dos macrófagos pode levar ao desenvolvimento de uma resposta imune incompleta, não ocorrendo a eliminação do agente lesivo. Já quando essa ativação é excessiva, pode ocasionar dano tecidual e doenças inflamatórias e autoimunes. Por isso, este processo necessita de regulação. Várias vias de sinalização intracelular (como as desencadeadas pela ativação dos receptores semelhantes ao toll), moléculas de superfície celular (como CD69) e até microRNAs são alvos para regular a ativação dessas células (ZHANG; WANG., 2014).

1.2.2 O papel das citocinas no processo inflamatório

Citocinas são proteínas produzidas por vários tipos celulares, como os neutrófilos e macrófagos, sendo capazes de modular a função da mesma célula que a produziu (controle autócrino) ou de outros tipos de células (controle parácrino e/ou sistêmico) (CHAPLIN, 2010). Os efeitos mediados por muitas dessas moléculas consistem em induzir mudanças na expressão gênica das células alvo, influenciando a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula. Essas substâncias também são capazes de regular a atividade e produção de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (CURFS; MEIS, 1997; SOMMER; WHITE, 2010).

As citocinas produzidas durante o processo inflamatório dependem da natureza do agente causador. Assim, a presença de patógenos bacterianos ou de substâncias como zimosan e lipopolissacarídeo (LPS) é detectada por receptores celulares do sistema imune inato, como os receptores do tipo *Toll* (TLRs). Dessa forma, a ativação desses receptores induz a produção não só de citocinas, mas também de quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (MEDZHITOV 2008; TOGBE et al., 2006).

A produção de citocinas é necessária para regular o início, a manutenção e o término das respostas inflamatórias. No entanto, altos níveis locais de citocinas pró-inflamatórias podem causar efeitos sistêmicos, como instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Dentro desse contexto, as citocinas que se destacam são a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (LACY; STOW, 2011).

A IL-6 é produzida por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, eosinófilos e linfócitos B e T, sendo a IL-1 β e o TNF- α os principais estímulos para sua síntese (ROTHERWELL, 1991). Essa interleucina apresenta efeitos locais e sistêmicos, como a síntese hepática de outros mediadores inflamatórios; ação no hipotálamo causando a febre, além de promover a maturação de macrófagos e ativação de neutrófilos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SOMMER; WHITE, 2010). Diante da importância de suas funções, os níveis sistêmicos da IL-6 estão relacionados com a gravidade de doenças, como diabetes, obesidade e vários tipos de câncer (DMITRIEVA et al., 2016).

A IL-1 β é produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados, neutrófilos e outras células não imunológicas, como os fibroblastos e células endoteliais e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (FERRERO-MILIANI et al., 2006). Essa citocina induz a produção de óxido nítrico (ativando a enzima NO sintetase), de moléculas de adesão (favorecendo o recrutamento de células da circulação para o sítio inflamado), além de aumentar a expressão de genes, como o da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (WITKAMP; MONSHOUWER, 2000). Adicionalmente, a IL-1 β atua no hipotálamo exercendo a função de pirógeno endógeno (ROTHERWELL, 1991).

O TNF- α é produzido tanto por células mononucleares como por polimorfonucleares, e apesar do seu curto tempo de meia-vida (cerca de 20 minutos) exerce potentes efeitos inflamatórios, tais como: estimula a expressão de moléculas de adesão no endotélio (EL ALWANI et al., 2006), aumenta a permeabilidade vascular, induz a produção de fatores de crescimento para fibroblastos e angiogênese dentre outras ações (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Adicionalmente, o TNF- α também é capaz de ativar as vias das proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPKs) JNK, p38 e ERK1/2, que são responsáveis pela ativação de fatores de transcrição que regulam a transcrição de genes de mediadores inflamatórios (KAMINSKA, 2005). Além disso, essa citocina pode agir sinergicamente com a IL-1 β induzindo a produção e liberação em cascata de várias outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-18 e IL-12 (FEGHALI; WRIGHT, 1997; GOLDKIND, 2006; WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

1.2.3 CD69 e inflamação

O CD69 é uma proteína de membrana pertencente à superfamília de lectina animal do tipo C de receptores transmissores de sinal (LOPEZ-CABRERA et al., 1993). Esta molécula é rapidamente expressa, *in vitro*, pela maioria dos leucócitos ativados (CEBRIÁN et al., 1988; TESTI et al., 1989). Já *in vivo*, apenas timócitos selecionados positivamente, algumas células de memória, células Treg e infiltrados de leucócitos de várias doenças inflamatórias crônicas e infecciosas são capazes de expressá-la. Adicionalmente, leucócitos periféricos em repouso não expressam CD69 (IWASHIRO et al., 2001; MOHAMMADI et al., 2013; OKHRIMENKO et al., 2014; SHINODA et al., 2012; WANG et al., 2006).

Além do seu papel como marcador de ativação celular, vários estudos têm evidenciado a importância imunológica da expressão do CD69, dentre eles os que utilizam modelos de camundongos deficientes para esta molécula (KO), que demonstram que sua ausência aumenta a suscetibilidade a doenças inflamatórias e autoimunes, como a artrite induzida por colágeno e a miocardite autoimune (CRUZ-ADALIA et al., 2010; MARTIN et al., 2010; RADULOVIC et al., 2012; SANCHO et al., 2003). Por outro lado, em modelo de asma induzida por ovalbumina, o bloqueio desses receptores por anticorpos específicos é capaz de inibir a inflamação das vias aéreas (WANG et al., 2015). Adicionalmente, o CD69 também está envolvido na regulação da resposta imune em sítios de mucosa (RADULOVIC; NIESS, 2015).

Recentemente, a proteína Galectina-1 (Gal-1), expressa em células dendríticas e macrófagos, foi identificada como ligante específico do CD69 (DE LA FUENTE et al., 2014). A Gal-1 é uma proteína de ligação a carboidratos, e sua deficiência sistêmica exacerba respostas inflamatórias (TOSCANO et al., 2007), semelhante ao que é observado em camundongos deficientes para o CD69 (MARTIN et al., 2010). Vias de sinalização iniciadas pelo receptor CD69 podem ativar, dentre muitas outras, a via da ERK, uma MAPK que está envolvida com a expressão de genes de várias citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios (ZINGONI et al., 2000). Além disso, a ativação de células imunológicas parece ser um pré-requisito para a expressão do CD69, pois inicia vias de sinalização, a exemplo das vias dependentes da p38, que regulam positivamente fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, promovendo a transcrição do gene do CD69 e, conseqüentemente, aumentando sua expressão na superfície da célula (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017; LI et al., 2011).

1.2.4 Os receptores semelhantes ao *Toll* e suas vias de sinalização

Os receptores semelhantes ao *Toll* (TLRs) constituem uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Os PAMPs são estruturas celulares microbianas que sofreram poucas alterações no curso da evolução, e quando reconhecidas, induzem uma resposta imunológica. São exemplos de PAMPs, os lipopolissacarídeos bacterianos e os componentes da parede celular de fungos, como o zimosan (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; AKIRA et al., 2006).

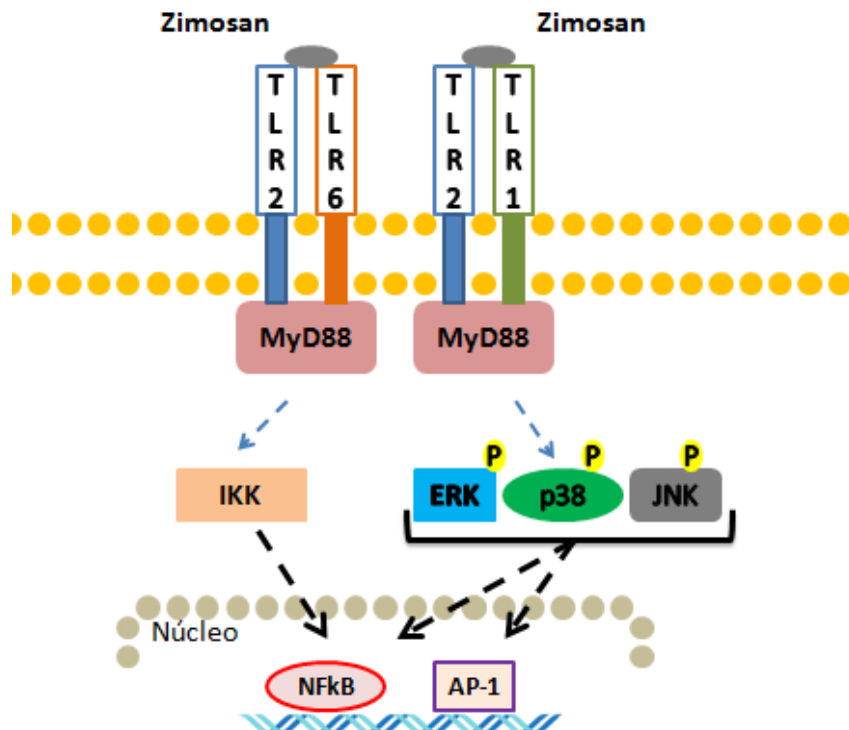
Os TLRs são expressos em vários tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, células B e T, células NK, células dendríticas, fibroblastos e células epiteliais. A expressão desses receptores é contínua, mas pode ser modulada em resposta a patógenos, a várias citocinas e ao stress ambiental (XU et al., 2005; KAWAI; AKIRA, 2006). Os TLRs podem estar presentes na membrana extracelular ou em compartimentos intracelulares, como endossomos. Neste primeiro grupo, estão inclusos os receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6, que são responsáveis pelo reconhecimento de boa parte dos patógenos, por reconhecerem componentes presentes nas membranas de microrganismos. Já os TLRs expressos intracelularmente (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) reconhecem somente ácidos nucléicos de origem microbiana (KAWAI; AKIRA, 2010).

O TLR2 é formado por um domínio extracelular rico em leucinas, que possui afinidade por moléculas de patógenos; um domínio transmembranar e um domínio intracelular de homologia ao receptor de interleucina 1 (TIR), que interage com as proteínas adaptadoras para estimular uma sinalização intracelular (KONDO; KAWAI; AKIRA, 2012). Este receptor é capaz de reconhecer amplo espectro de PAMPs derivados de fungos, bactérias e vírus, dentre eles o zimosan (KAWAI; AKIRA, 2010). Esta grande capacidade de reconhecimento pode estar associada ao fato de que o TLR2 pode formar heterodímeros com TLR1 ou TLR6 (TAKEUCHI, 2002).

De forma geral, todos os TLRs (exceto TLR3) utilizam vias de sinalização dependentes do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88). Esta proteína adaptadora é recrutada pelos TLRs e em associação com outras proteínas, como as cinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK) e o fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF), recruta e ativa várias cinases intracelulares, incluindo a cinase I Kappa B (IKK) e/ou as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como a cinase regulada por sinais extracelulares (ERK), a cinase do N-terminal c-Jun (JNK) e a p38. Estas proteínas, fosforilam seus alvos e induzem a ativação de fatores de transcrição, tais como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), que se translocam para o núcleo, onde induzem a transcrição de genes de vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de ativação (AKIRA; TAKEDA., 2004; CHI et al., 2006) (Figura 2). Dentro desse contexto, modular a ativação das MAPKs é um alvo para a regulação de respostas inflamatórias.

Mediante o exposto, esse trabalho visa elucidar os efeitos da pterocarpanoquinona LQB 118 no processo inflamatório agudo *in vitro*.

Figura 2. Principais vias de sinalização do TLR2



Fonte: Autor, 2018. A interação do ligante com o TLR, promove o recrutamento da proteína adaptadora MyD88. Esta inicia uma cascata de sinalização intracelular que ativa a IKK e/ou as MAPKs, culminando com a ativação de fatores de transcrição, a exemplo do NFκB e AP-1. Uma vez ativos estes fatores migram para o núcleo, se ligam a regiões específicas do DNA e induzem a transcrição de genes de mediadores inflamatórios. As setas tracejadas representam vias não diretas.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A inflamação é uma resposta fisiológica benéfica ao organismo e constitui um mecanismo de defesa contra patógenos e lesão tecidual (FILEP, 2013). No entanto, uma resposta inflamatória desregulada está associada ao surgimento e manutenção de diversas patologias, tais como artrite reumatoide, obesidade, asma, câncer, hipertensão, entre outras (NATHAN; DING, 2010). Sendo assim, mecanismos capazes de controlar a resposta imunológica podem auxiliar a descoberta de ferramentas biotecnológicas. Nesse sentido, torna-se necessária a bioprospecção de novas moléculas que interfiram no processo inflamatório e que possuam menos efeitos colaterais do que as terapias anti-inflamatórias disponíveis atualmente.

A LQB 118 é uma molécula híbrida sintética resultante da união de dois grupos de moléculas bioativas: os pterocarpanos e as naftoquinonas (NETTO et al., 2010). A pterocarpanoquinona resultante possui várias atividades biológicas relatadas na literatura, como atividade anti-leishmania (RIBEIRO et al., 2013; COSTA et al., 2014), citotóxica para linhagens de células de câncer humano (MAIA et al., 2010; BACELAR et al., 2013; MORAES et al., 2014), dentre outras. Além disso, recentemente foi demonstrado o efeito anti-inflamatório desta molécula em modelo de inflamação pulmonar (RIÇA et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da LQB 118 em outros modelos de inflamação, assim como os seus mecanismos de ação. Dessa forma, esse trabalho buscou demonstrar o efeito da LQB 118 na resposta inflamatória em macrófagos ativados por zimosan e delinear parte do seu mecanismo de ação *in vitro*.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório da LQB 118 em modelo experimental murino *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico da LQB 118 em cultura celular de macrófagos peritoneais.
- Analisar o efeito da LQB 118 na produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.
- Elucidar o efeito da LQB 118 nos níveis de expressão do TLR2.
- Determinar o efeito da LQB 118 quanto à expressão da molécula de ativação CD69.
- Investigar o efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação da MAPK p38.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss albino* fêmeas com peso corporal entre 25 e 30 g e idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba e mantidos com livre acesso a água e a uma dieta controlada a base de ração do tipo *pellets* em uma sala com temperatura entre 21 ± 1 °C, e ciclos claro/escuro de 12 h. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB) com o registro número 4658300418 (ANEXO A).

4.1.2 Obtenção e preparo da LQB 118

A LQB 118 foi sintetizada no Laboratório de Química Bio-orgânica, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ segundo a metodologia descrita por Netto et al., 2010 e sob a coordenação do professor titular da UFRJ, colaborador desse trabalho, Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa.

Na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 196 mM e armazenada no freezer (-20 °C). A concentração máxima de DMSO utilizada nos experimentos foi 0,025 %. Esta concentração não induz efeito tóxico (DA SILVA, 2016).

3.2 Métodos

4.2.1 Tratamento com LQB 118

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes concentrações de LQB 118: 5 µM, 1 µM, 0.5 µM e 0.1 µM, contidas em um volume final de 200 µL ou 2 mL. Para isso, foi preparada uma solução mãe na concentração

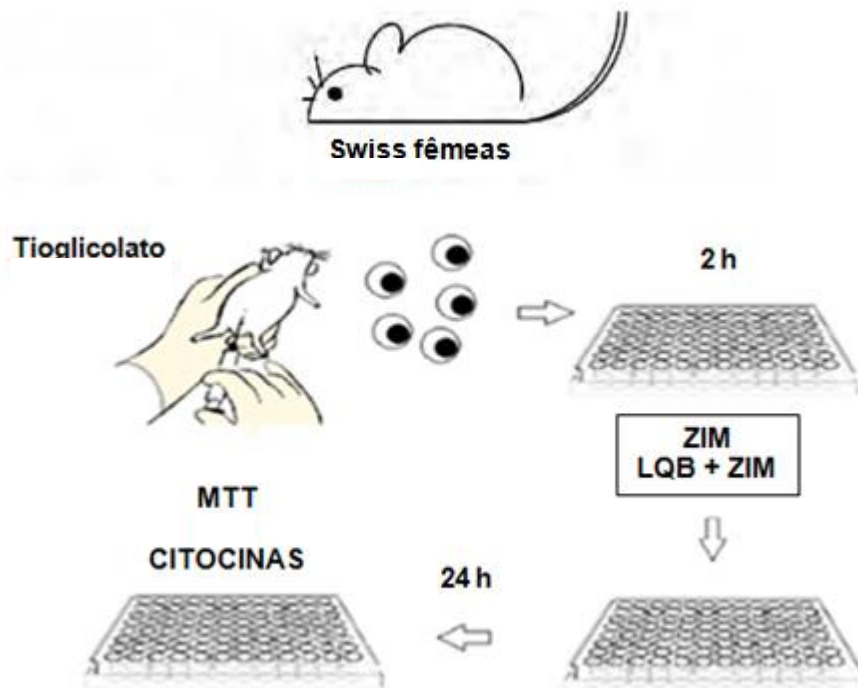
de 50 mM em meio RPMI-1640 estéril, seguindo-se sucessivas diluições até chegar às concentrações utilizadas.

4.2.2 Cultura de macrófagos

Para execução dos experimentos foram utilizados macrófagos do peritônio de camundongos albinos da linhagem *Swiss*. No entanto, o número de macrófagos obtido do peritônio de um animal não-elicitado é insuficiente para alguns estudos. Para aumentar esse número, o tioglicolato pode ser injetado nessa cavidade, induzindo o processo de migração dos monócitos do sangue para o sítio peritoneal. Esse processo de elicitação aumenta em até 10 vezes o rendimento de macrófagos para o estudo (LEIJH et al, 1984). Por isso, os animais foram previamente estimulados com uma injeção intraperitoneal contendo 2 mL de tioglicolato (Sigma-Aldrich) a 4%. No quarto dia após a injeção, os animais foram eutanasiados pelo deslocamento cervical, suas cavidades peritoneais expostas e lavadas com 5 mL de meio RPMI completo (Gibco) (estreptomicina: 10 mg/mL, penicilina: 6 mg/ml, e canamicina: 2 mg/mL). A suspensão celular obtida foi então centrifugada a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco). Uma alíquota foi corada com o Azul de Tripán e a viabilidade celular foi determinada com o auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico.

As células peritoneais foram semeadas em placas de 6 ou 96 poços a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ ou 2×10^5 células/poço em um volume final de 2 mL ou 200 μ L, respectivamente, e incubadas por 2 h em estufa de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C) para permitir a aderência celular. Em seguida, as células não aderentes foram aspiradas dos poços e as células remanescentes foram tratadas com diferentes concentrações da LQB 118 (5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M e 0.1 μ M) e estimuladas ou não com o zimosan na concentração de 0,2 mg/mL. Após 24 horas em cultura, o sobrenadante foi recolhido para quantificação dos níveis de citocinas e as células foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular ou foram soltas da placa e utilizadas para as análises por citometria de fluxo (Figura 3).

Figura 3. Esquema representativo do protocolo experimental



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2014. Camundongos Swiss fêmeas foram previamente estimulados com tioglicolato a 4%. Após quatro dias, os macrófagos peritoneais foram cultivados em placa de 6 ou 96 poços por um período de 2 h. Em seguida, realizou-se o estímulo com o zimosan e os tratamentos nas diferentes concentrações com a LQB 118. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado para a quantificação das citocinas e as células foram utilizadas para realização do ensaio de MTT ou foram soltas da placa e marcadas com anticorpos específicos. LQB=LQB 118; ZIM=Zimosan.

4.2.3 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT (brometo de 3-metil-[4-5dimetiliazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) descrito por Mosmann (1983). Este método se baseia na redução do MTT, um sal amarelo e solúvel em água, a cristais de formazan, de coloração arroxeadada e insolúvel em água, mas solúvel em alguns solventes orgânicos, pela ação das desidrogenases mitocondriais e celulares. Desta forma, quanto maior a intensidade da coloração roxa, maior será a viabilidade.

Após a coleta do sobrenadante para análise das citocinas, a placa remanescente recebeu meio RPMI completo suplementado com 10% de MTT a 5 mg/mL e foi incubada novamente por um período de no mínimo 4 horas. Após o período de incubação o sobrenadante foi removido por aspiração e os cristais de formazan formados foram dissolvidos utilizando um solvente orgânico, o dimetilsulfóxido (DMSO). A viabilidade celular foi quantificada pela medida da

densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device).

4.2.4 Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 presentes no lavado peritoneal foram quantificadas por ELISA sanduíche de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). De forma resumida, placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-6 e incubadas por 18 h (overnight) a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) por 1 hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 h (overnight) a 4 °C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e os anticorpos de detecção de cada citocina foram adicionados e em seguida incubados por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionado. As placas foram incubadas por mais 30 min à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos a reação foi interrompida com a solução de parada (ácido sulfúrico 1N) e a leitura realizada em leitor de microplaca utilizando um comprimento de onda de 450 nm.

4.2.5 Análise da expressão de CD69 e TLR2

Após 24 h da cultura dos macrófagos sob diferentes tratamentos em placas de 6 poços, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1,5 mL de PBS (salina tamponada com fosfato) gelado/poço e as placas foram mantidas no gelo durante 40 min. Posteriormente, as células foram soltas com o auxílio de um raspador de células e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e corante azul de tripan e então plaqueadas em placas de 96 poços com fundo U a uma concentração de 5×10^5 células/poço. Após isso, a placa foi centrifugada a 300 g durante 6 minutos. Em

seguida, o sobrenadante foi desprezado, as células foram bloqueadas com anti-CD16/32 e centrifugadas novamente. Posteriormente, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram então incubadas com o anticorpo anti-CD69 ou anti-TLR2 durante 30 minutos (no gelo). Após a incubação, as células foram lavadas mais uma vez e suspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo.

4.2.6 Análise da fosforilação da MAPK p38

Após 24 h da cultura dos macrófagos sob diferentes tratamentos em placas de 6 poços, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 1,5 mL de PBS (salina tamponada com fosfato) gelado/poço e as placas foram mantidas no gelo durante 40 min. Posteriormente, as células foram soltas com o auxílio de um raspador de células e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e corante azul de tripan e então plaqueadas em placas de 96 poços com fundo U a uma concentração de 5×10^5 células/poço. Após isso, a placa foi centrifugada a 300 g durante 6 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 100 μ L de Cytifix (BD Cytifix™) a fim de fixar as células. Depois de 30 min em estufa de CO₂, a placa foi novamente lavada. Após centrifugação e descarte do sobrenadante foram adicionados 150 μ L de Perm Buffer (BD Phosflow™) em cada poço, para promover a permeabilização celular, e a placa permaneceu durante 30 min no gelo. Decorrido este tempo, a placa foi lavada e então foi feita a marcação com o anticorpo anti-P-p38. Após mais 30 min no gelo, as células foram lavadas novamente e suspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo.

4.2.7 Anticorpos monoclonais

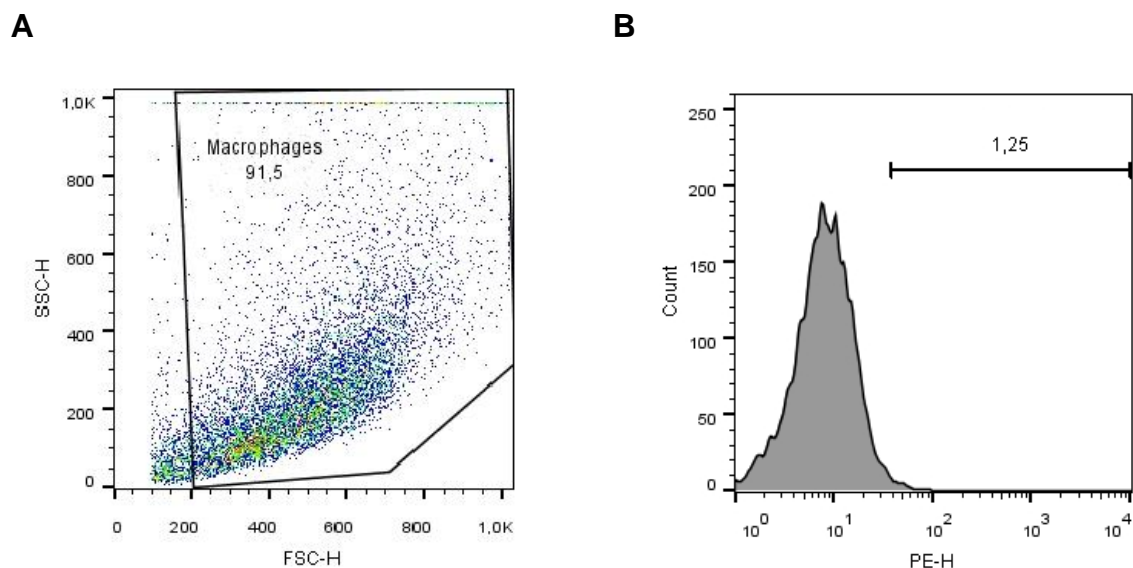
Os anticorpos utilizados para a marcação de moléculas de superfície foram os anti-CD69 (PE) e anti-TLR2 (PE). Para a marcação intracelular utilizou-se o anti-P-p38 (PE-Cy7). Já o CD16/32 foi utilizado para descartar ligações inespecíficas. Todos os anticorpos foram obtidos das companhias Santa Cruz, Ebioscience e BD.

4.2.8 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo foi realizada pela quantificação da fluorescência dos marcadores celulares. O citômetro de fluxo utilizado foi o BD FACSCanto II, que é equipado com três lasers, a saber: azul (488 nm, resfriado a ar, 20 mW no estado sólido), vermelho (633 nm, 17 mW HeNe) e violeta (405 nm, estado sólido de 30 mW). Durante a aquisição dos dados foram coletados 10.000 eventos para avaliação dos macrófagos.

Sumariamente, a estratégia de análise consistiu na visualização em um gráfico tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC), onde foi feito um gate na região de interesse (Figura 4A). Em seguida, as células foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência e % de células marcadas, em um gráfico do tipo histograma (Figura 4B).

Figura 4. Estratégia de análise dos dados da citometria de fluxo



Fonte: Autor, 2018. (A) Os macrófagos foram visualizados em um gráfico de tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) e foi feito um gate, excluindo-se a maioria dos debris celulares. (B) Em seguida, foi feito um gráfico histograma, onde pode ser observada a intensidade de fluorescência e a % de células marcadas (neste caso, histograma representativo do controle negativo).

4.2.9 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA) one-way, seguida de pós-teste de Tukey. As diferenças entre as médias foram

consideradas significantes quando os valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados de citometria de fluxo foram analisados utilizando o software FlowJo versão 10.

RESULTADOS

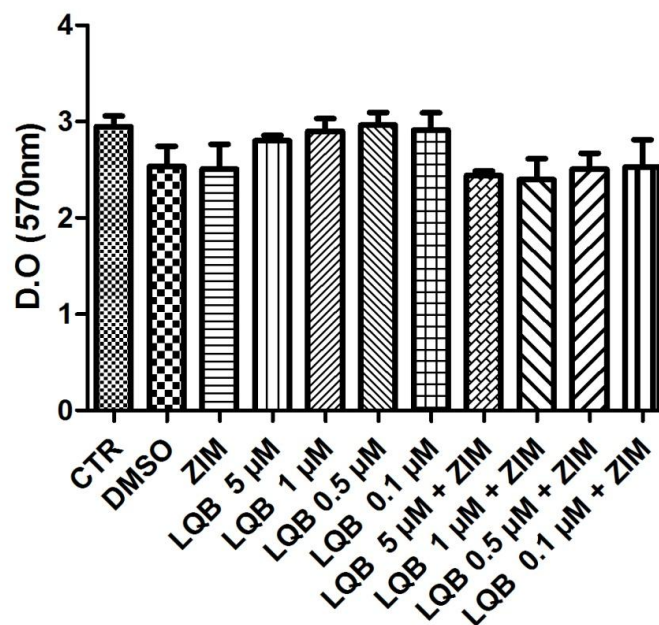
5 RESULTADOS

5.1 Estudo do efeito anti-inflamatório da LQB 118 *in vitro*

5.1.1 Citotoxicidade da LQB 118 em macrófagos peritoneais

Como pode ser observado no gráfico 1, os macrófagos peritoneais tratados com a LQB 118 em diferentes concentrações (5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M e 0.1 μ M), por 24h, na ausência ou presença de zimosan, não demonstraram alteração da viabilidade celular quando em comparação ao grupo controle (meio de cultura).

Gráfico 1 – Efeito da LQB 118 na viabilidade de macrófagos peritoneais com ou sem o estímulo do zimosan



As células foram tratadas com a LQB 118 em diferentes concentrações, na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se 100 μ L de MTT. Após 4h, os cristais de formazan foram dissolvidos com DMSO. O gráfico representa a densidade óptica de absorbância do formazan de acordo com os diferentes grupos de tratamento e representa 3 experimentos em duplicata. Foi feita a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. CTR=Controle; DMSO=Dimetilsulfóxido; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

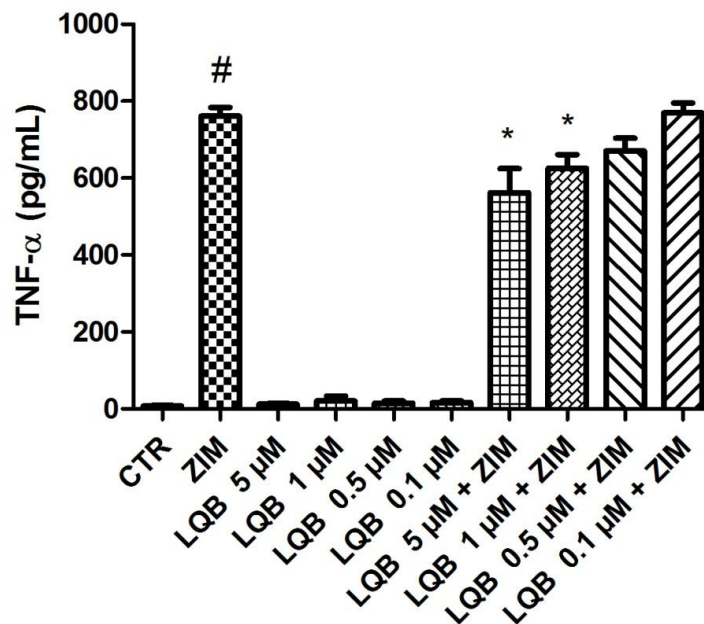
5.1.2 Níveis das citocinas pro-inflamatórias no sobrenadante da cultura de macrófagos

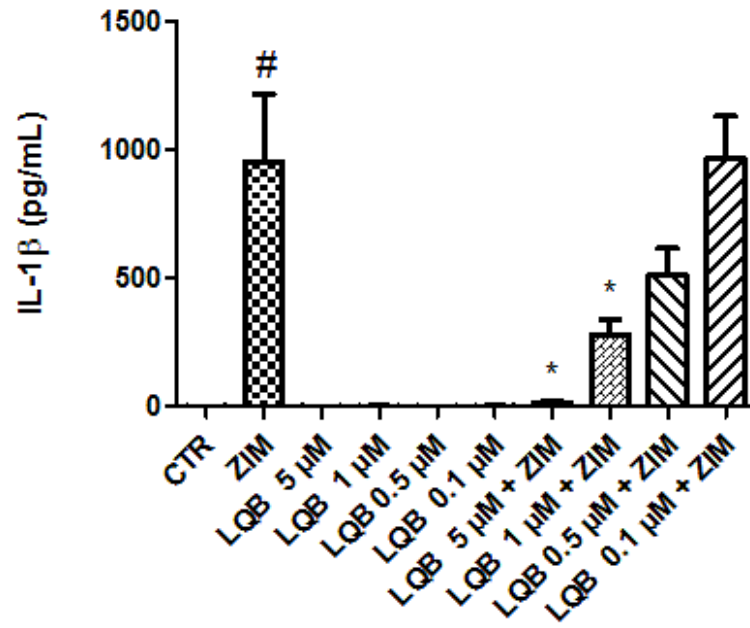
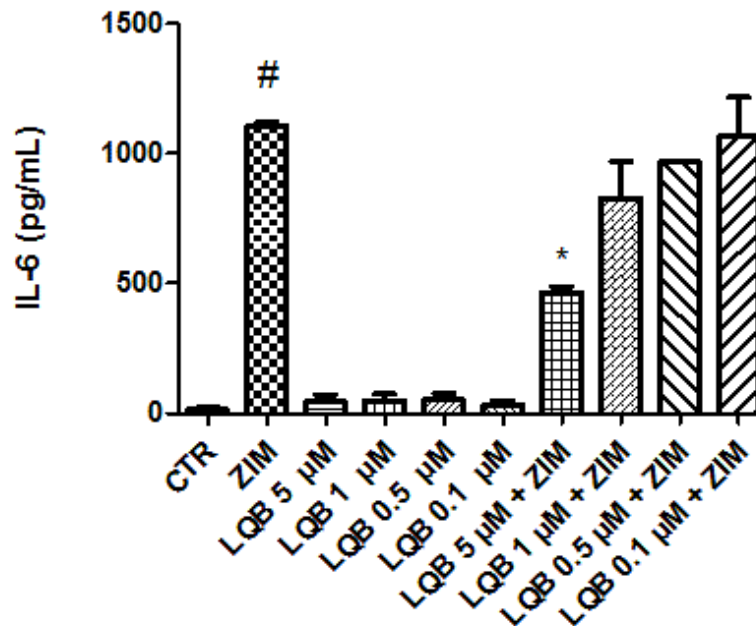
Os macrófagos estimulados com zimosan apresentaram aumento significativo dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 em comparação ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 em diferentes concentrações (5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M e 0.1 μ M) não alterou os níveis de produção basal das citocinas.

O tratamento com a concentração de 5 μ M da LQB 118 foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α (26,2%), IL-1 β (98,25%) e IL-6 (57,9%), já a concentração de 1 μ M só foi capaz de reduzir os níveis da IL-1 β (70,8%) e do TNF- α (17,85%). As demais concentrações não alteraram os níveis dessas citocinas em comparação ao grupo zimosan, como mostrado no gráfico 2 (A, B, C).

Gráfico 2 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 na cultura de macrófagos peritoneais

A



B**C**

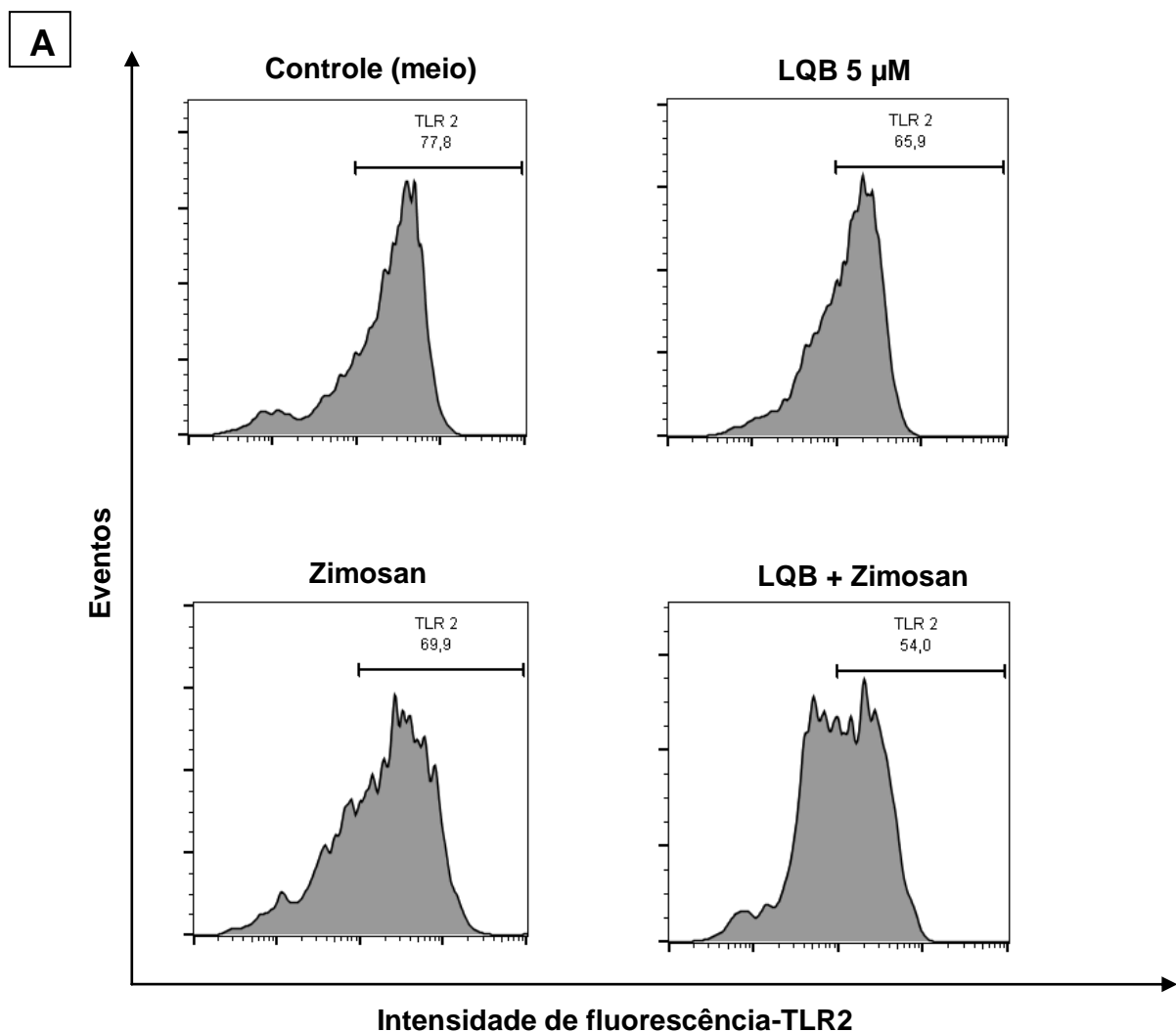
As células foram tratadas com a LQB 118 em diferentes concentrações, na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e os níveis das citocinas foram quantificados pelo ensaio imunoenzimático ELISA. **A:** TNF- α . **B:** IL-1 β . **C:** IL-6. Os dados numéricos foram apresentados em média \pm e.p.m. de 3 experimentos em duplicata, e foi feita a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p < 0,05$) significativo em

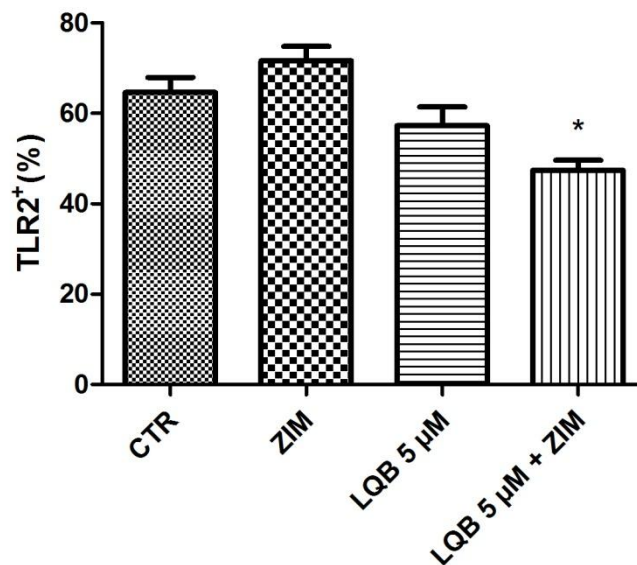
relação ao grupo controle. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.3 Níveis de expressão do receptor TLR2 em macrófagos peritoneais

O tratamento apenas com a LQB 118 (5 μM) não alterou a expressão basal do receptor semelhante ao *Toll* do tipo 2 em macrófagos peritoneais de camundongos. Já em associação com o zimosan, a LQB 118 foi capaz de diminuir em cerca de 33,7% a expressão desse receptor, como pode ser visto no gráfico 3 (A, B).

Gráfico 3 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de TLR2 em macrófagos peritoneais



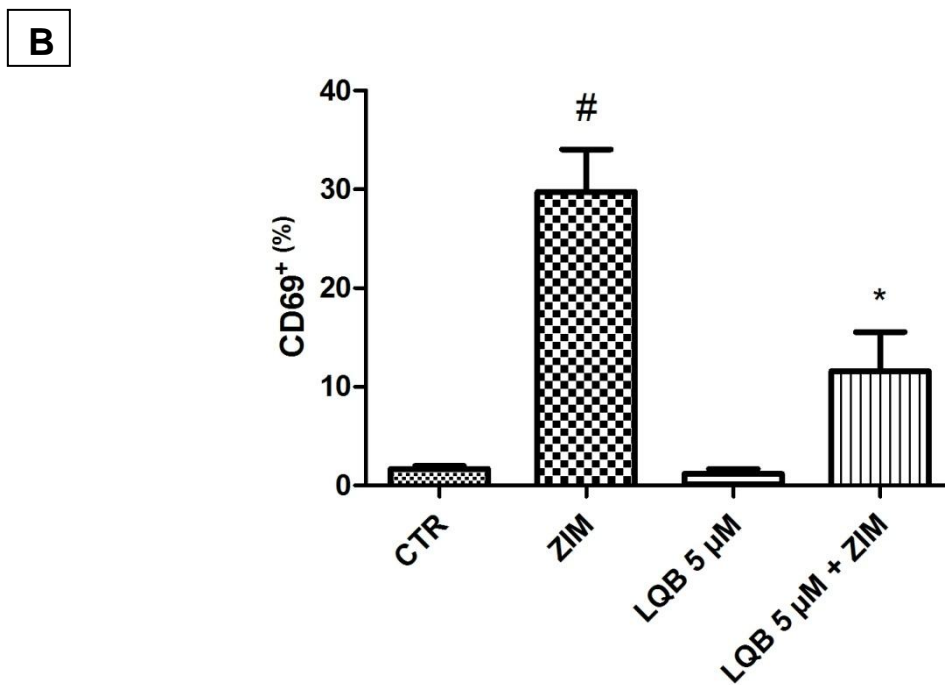
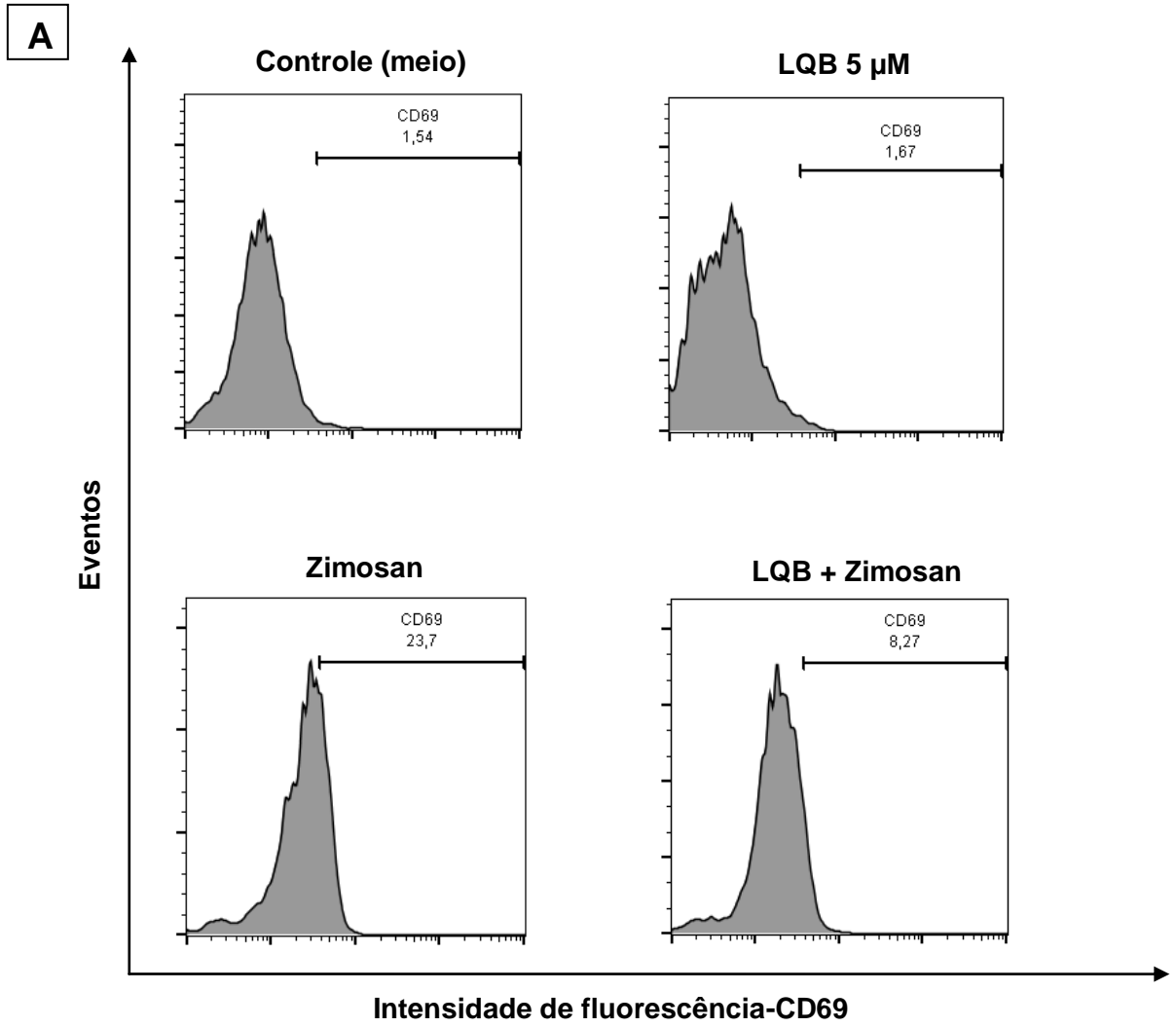
B

As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 µM, na ausência ou presença de zimosan por 24h. A expressão do TLR2 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-TLR2. **A:** Histograma representativo das células marcadas com anti-TLR2. **B:** ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey de 3 experimentos com n=3. *(p<0,05) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.4 Níveis de expressão da molécula CD69 em macrófagos peritoneais

Como mostrado no gráfico 4 (A, B), o zimosan induziu aumento na expressão de CD69 quando comparado ao grupo controle (meio de cultura). O tratamento apenas com a LQB 118 na concentração de 5 µM não alterou a expressão basal dessa molécula. Sob estímulo do zimosan, o tratamento com LQB 118 nessa mesma concentração foi capaz de reduzir a expressão de CD69 (61%).

Gráfico 4 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de CD69 em macrófagos peritoneais

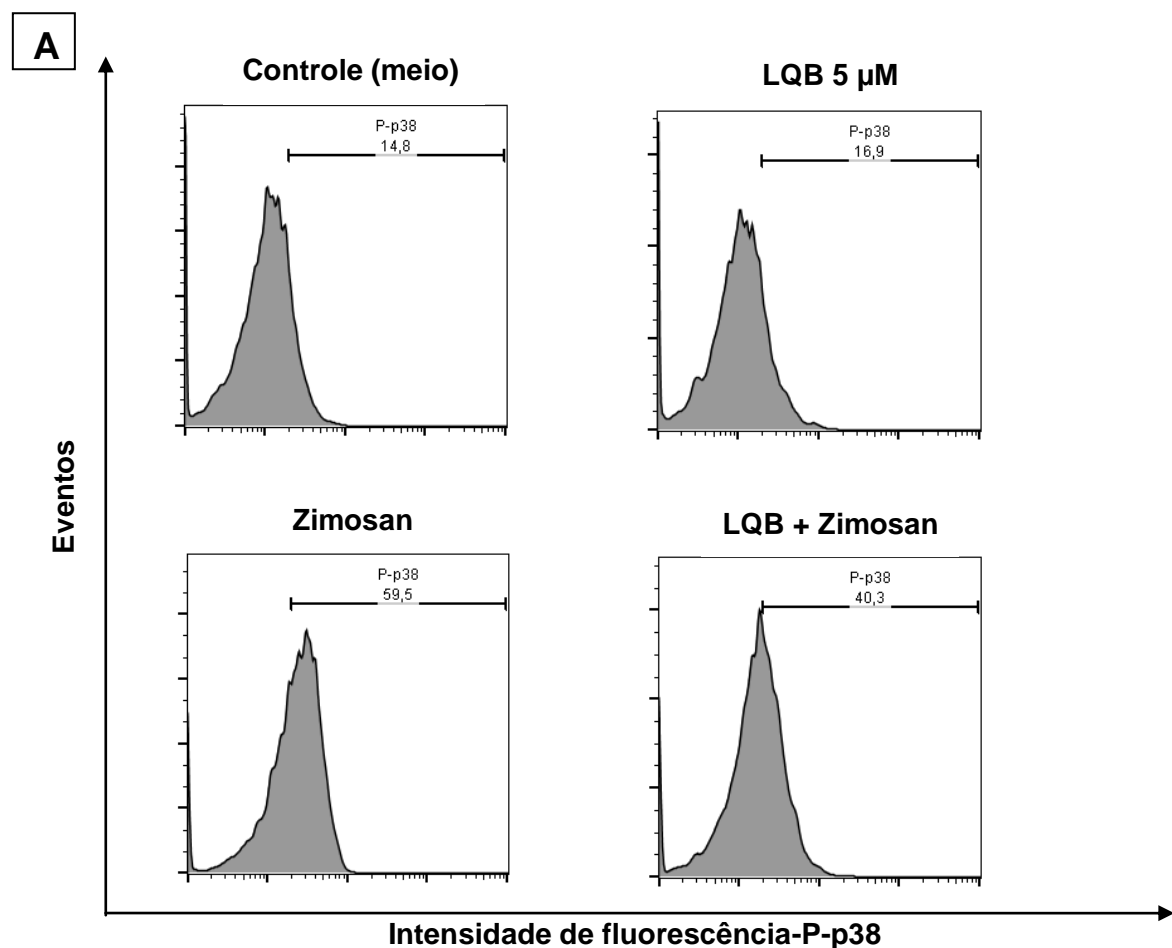


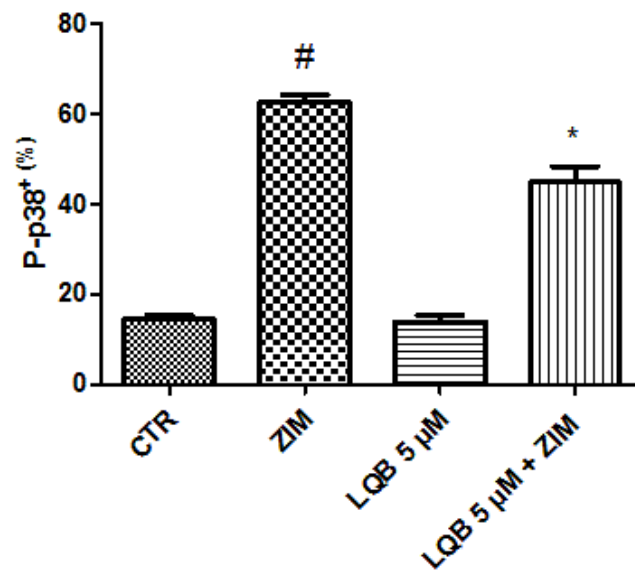
As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 μM , na ausência ou presença de zimosan por 24h. A expressão de CD69 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-CD69. **A:** Histograma representativo das células marcadas com anti-CD69. **B:** ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey ($n = 3$). #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.5 Níveis de fosforilação da MAPK p38 em macrófagos peritoneais

O zimosan induziu um aumento de 4 vezes na fosforilação da P-p38 nos macrófagos, quando em comparação ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 manteve a fosforilação basal dessa MAPK. Já em associação com o zimosan, o tratamento com a molécula foi capaz de reduzir a fosforilação da P-p38 em 28%, aproximadamente, quando comparado ao grupo zimosan.

Gráfico 5 – Efeito da LQB 118 sobre os níveis de fosforilação da p38 em macrófagos peritoneais



B

As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 µM, na ausência ou presença de zimosan por 24h. A expressão de P-p38 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-P-p38. **A:** Histograma representativo das células marcadas com anti-P-p38. **B:** ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey (n = 4). #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A pterocarpanoquinona LQB 118 é uma molécula híbrida sintética, que foi originalmente sintetizada com a finalidade de potencializar a atividade antineoplásica já relatada dos pterocarpanos e das naftoquinonas. No entanto, vários estudos têm demonstrado o potencial da LQB 118 também como substância anti-leishmania e anti-inflamatória (COSTA et al., 2014; CUNHA-JÚNIOR et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013; RIÇA et al., 2016).

No presente trabalho, avaliou-se pela primeira vez o efeito da pterocarpanoquinona LQB 118 em macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. Foi demonstrado que a LQB 118 possui atividade anti-inflamatória, pois foi capaz de modular negativamente alguns parâmetros da inflamação, incluindo citocinas pró-inflamatórias, o receptor semelhante ao *Toll* do tipo 2, a molécula de ativação CD69 e a proteína cinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38).

Em nossa metodologia, o lavado peritoneal é coletado quatro dias após injeção de tioglicolato. No peritônio, os macrófagos residentes se dividem em duas subpopulações: macrófagos peritoneais grandes, que é predominante em condições de homeostase e desaparecem rapidamente após estímulos inflamatórios e os macrófagos peritoneais pequenos, que predominam após estimulação (GHOSN et al., 2009). Essa segunda subpopulação é derivada de monócitos sanguíneos, os quais entram na cavidade peritoneal mediante estímulo e maturam no peritônio entre dois e quatro dias. Os macrófagos peritoneais grandes são responsáveis pela manutenção da fisiologia da cavidade peritoneal, já os macrófagos peritoneais pequenos participam no controle de infecções (CASSADO; LIMA; BORTOLUCI, 2015).

Inicialmente, utilizou-se os macrófagos peritoneais para a análise da citotoxicidade da LQB 118 pelo método do MTT. Nosso resultado demonstrou que nenhuma das concentrações avaliadas reduziu a viabilidade celular (Gráfico 1). Estes dados estão de acordo com SALUSTIANO e colaboradores (2009) que demonstraram que o tratamento com concentrações de até 9 μM da LQB 118 não são tóxicas para células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ativadas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Adicionalmente, em PBMC estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) mediante tratamento com a concentração de 100 μM da LQB 118, as células ainda apresentam mais de 70% de viabilidade (NETTO et al.,

2010). De forma semelhante, em linhagem de macrófagos RAW 264.7 vários pterocarpanos (a exemplo dos crotafuranos A e B e as gliceolinas) e naftoquinonas, (a exemplo das diosquinona e β -lapachona) também não apresentaram efeito citotóxico na faixa de concentração utilizada neste trabalho (0,1 – 5 μ M) (CHAE et al., 2016; DONG et al., 2016; KIM; SUNG; KIM, 2011; KOBAYASHI et al., 2011; PINHO et al., 2011; YOON et al., 2011).

Uma vez que as concentrações não foram tóxicas para as células em estudo, continuaram-se os experimentos avaliando os efeitos da LQB 118 na produção de citocinas. Como estímulo inflamatório foi utilizado o zimosan, que é um polissacarídeo da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, composto principalmente por β -glucana em combinação com quitina, manana e lipídios (SATO et al., 2003). O reconhecimento do zimosan pelos macrófagos se dá via receptores semelhantes ao *Toll* do tipo 2 (TLR2), que quando ativados desencadeiam cascatas de sinalização intracelular promovendo a síntese de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como as quimiocinas, prostaglandinas e citocinas (REID; GOW; BROWN, 2009).

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 são consideradas pró-inflamatórias no modelo utilizado nesse trabalho e possuem tanto ações locais como sistêmicas. Dentre estas ações estão a ativação celular, o aumento da permeabilidade vascular, da expressão de moléculas de adesão (favorecendo o recrutamento de células da circulação para o sítio inflamado) e de moléculas co-estimulatórias, a ativação de enzimas, a indução da resposta de fase aguda e a ação como pirógenos endógenos. Além disso, as ações de diferentes citocinas podem se somar, promovendo a liberação de outras (MEDZHITOV, 2008).

Nossos resultados demonstraram que o estímulo com o zimosan aumentou os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. O tratamento com a LQB 118, por sua vez, foi capaz de reduzir os níveis dessas três citocinas no sobrenadante da cultura dos macrófagos peritoneais (Gráfico 2 A, B, C). Já foi demonstrado que em PBMC estimuladas com LPS o tratamento com a LQB 118 diminui os níveis do TNF- α (NETTO et al., 2010). *In vivo*, em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS, a administração dessa molécula também é capaz de reduzir os níveis dessa citocina. Além disso, os níveis da quimiocina KC, uma citocina quimioatraente para neutrófilos, também são reduzidos no fluido do lavado broncoalveolar de animais tratados com a LQB 118 (RIÇA et al., 2016).

Similarmente, em RAW 264.7 sob o estímulo do LPS, o tratamento com outros pterocarpanos, como o maackia pterocarpano B e as gliceolinas I, II e III e com a naftoquinona diosquinona, também foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Adicionalmente, as gliceolinas promovem não só a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (CHAE et al., 2016; PINHO et al., 2011; YOON et al., 2011). Em linhagem de células da micróglia (BV2), também estimuladas com LPS, o tratamento com a β -lapachona, uma naftquinona natural, reduziu os níveis dessas citocinas pró-inflamatórias (LEE et al., 2015). Ademais, a administração sistêmica da naftoquinona 6-metóxi-7-hidróxi- α -dunniona diminui os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 em modelo de febre induzida por LPS (LOMBA et al., 2017).

Após a análise do efeito da LQB 118 sobre os níveis das citocinas inflamatórias, avaliou-se a expressão do receptor TLR2 em macrófagos, levando-se em consideração o tratamento com o zimosan, o estímulo inflamatório utilizado no presente trabalho. Demonstrou-se que o tratamento com a LQB 118, na presença do estímulo, reduziu a expressão do TLR2 (Gráfico 3 A, B). Para exercer seus efeitos inflamatórios, é necessária a interação do zimosan com o seu receptor, o TLR2. Dentro desse contexto, é possível que a redução da expressão desse receptor seja capaz de reduzir também a sinalização intracelular desencadeada, o que pode estar relacionado ao efeito inibitório da LQB 118 sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias demonstrados anteriormente.

A ativação dos macrófagos por estímulos inflamatórios, como o zimosan, promove a expressão do gene do CD69 por vias dependentes das MAPKs, a exemplo da p38, que regulam positivamente fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, aumentando a expressão dessa molécula na superfície da célula (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017; LI et al., 2011). No presente trabalho, foram avaliados os níveis de expressão da molécula de superfície CD69. Evidenciou-se que o zimosan induziu um aumento na expressão dessa molécula, enquanto o tratamento com a LQB 118 foi capaz de reduzir a expressão do CD69 nos macrófagos estimulados (Gráfico 4 A, B). A redução da expressão de TLR2 induzida pela LQB 118 indica que houve menor estimulação dos macrófagos pelo zimosan, por conseguinte, este efeito pode estar relacionado à menor expressão de CD69, uma molécula associada à ativação celular.

A estimulação de TLR2 induz uma cascata de sinalização intracelular que se inicia com o recrutamento da proteína adaptadora MyD88, que agindo conjuntamente com outras proteínas intracelulares, induzem a fosforilação e consequente ativação de MAPKs, como a p38 (ADEREM; ULEVITCH, 2000; TAKEDA; AKIRA, 2005). A p38 promove a regulação de citocinas como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, a expressão de enzimas importantes para o desenvolvimento da inflamação, a exemplo da COX-2 e iNOS, bem como a expressão de moléculas de superfície como o CD69 (MAHTANI et al., 2001; TURPEINEN et al., 2010; LI et al., 2011).

Neste trabalho, demonstrou-se que o estímulo do zimosan aumentou a fosforilação da p38 em macrófagos peritoneais murinos. Por sua vez, o tratamento com a LQB 118 reduziu os níveis de fosforilação dessa MAPK nos macrófagos estimulados com zimosan (Gráfico 5 A, B). De forma semelhante, em linhagem de células BV2 estimuladas com LPS o tratamento com a β -lapachona levou à redução na fosforilação das MAPKs p38, ERK1/2 e JNK1/2 (LEE et al., 2015). Já em RAW 264.7 mediante o mesmo estímulo e tratadas com o pterocarpano maackia pterocarpano B houve diminuição da fosforilação apenas das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2, mas não houve efeito sobre a fosforilação da p38 (CHAE et al., 2016).

Este efeito da LQB 118 sobre a fosforilação de p38 pode estar relacionado diretamente com a redução da expressão TLR2 e consequente menor ativação da sinalização intracelular desencadeada pelo zimosan. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de a LQB 118 interferir diretamente na via da MAPK avaliada.

Além disso, pode-se sugerir que a inibição da ativação dos macrófagos observada neste trabalho, pode também estar associada com a menor atividade de fatores de transcrição, como o NF- κ B, uma vez que o tratamento com a LQB 118 leva a uma diminuição na ativação do NF- κ B em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS (RIÇA et al., 2016). Similarmente, em RAW 264.7 estimuladas com LPS, o tratamento com os pterocarpanos maackia pterocarpano B e gliceolinas reduz a translocação do NF- κ B para o núcleo, além de inibir a degradação do I κ B α (CHAE et al., 2016; KIM; SUNG; KIM, 2011; YOON et al., 2011). Em linhagem de células BV2 estimuladas com LPS, o tratamento com a β -lapachona também reduz a ativação do NF- κ B e adicionalmente do fator de transcrição AP-1 (LI et al., 2011).

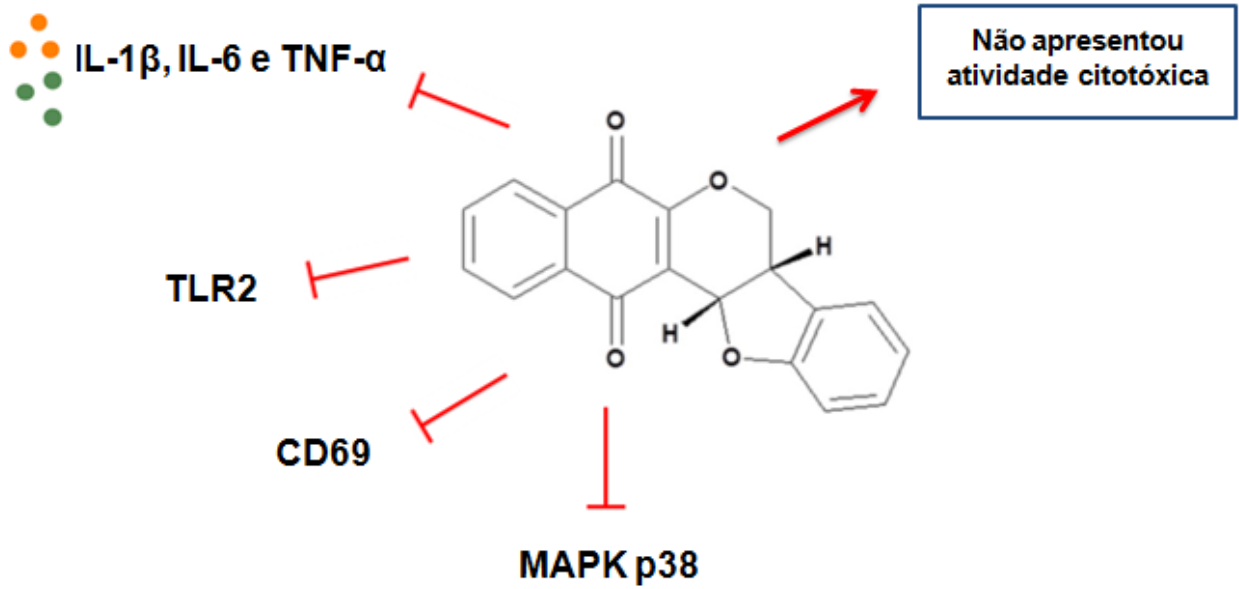
Portanto, este trabalho demonstrou pela primeira vez o efeito da pterocarpanoquinona LQB 118 em macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan, evidenciando a sua ação em modelo de inflamação *in vitro*. Dessa forma, este estudo contribui para o melhor entendimento das potencialidades da LQB 118 no processo inflamatório, além de contribuir com a prospecção de novas moléculas, uma área em constante expansão na biotecnologia.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a pterocarpanoquinona LQB 118 apresenta potencial anti-inflamatório em macrófagos peritoneais, *in vitro*, pela modulação da via TLR2-MAPK p38, levando à redução da expressão da molécula de ativação CD69 e à diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, tornando esta molécula uma potencial candidata a protótipo de fármaco anti-inflamatório, após outros estudos que também envolvam ensaios *in vivo*.

Figura 5. Esquema representativo do efeito da LQB 118 no processo inflamatório in vitro.



Fonte: AUTOR, 2018.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–7, 2000.
- AKIRA, S. TLR signaling. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 311, p. 1–16, 2006.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. **Comptes Rendus Biologie**, v. 327, p. 581–589, 2004.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, p. 675-80, 2001.
- ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.
- AMER, A.; SWANSON, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life. **Macrophage Current opinion in Microbiology**, v. 5, p. 56-61, 2002.
- BACELAR, T. S.; DA SILVA, A. J.; COSTA, P. R. R.; RUMJANEK, V. M. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. **Anti-Cancer Drugs**, v. 24, p. 73–83, 2013.
- BREDESEN, D. E.; ELLERBY, H. M.; RAO, R. V. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, p. 372–380, 2004.
- BUARQUE, C. D.; Militao, G. C. G.; Lima, D. J. B.; Costa-Lotufo, L. V.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Cunha-Junior, E. F.; Torres-Santos, E. C.; Netto, C. D.; Costa, P. R. R. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 6885–6891, 2011.
- CASSADO, A. A.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; BORTOLUCI, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 5, p 1-9, 2015.
- CEBRIÁN, M.; YAGÜE, E.; RINCÓN, M.; LÓPEZ-BOTET, M.; DE LANDÁZURI, M. O.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 168, p. 1621–1637, 1988.
- CHAE, H. S.; YOO, H.; CHOI, Y. H.; CHOI, W. J.; CHIN, Y.W. Maackiapterocarpan B from *Sophora tonkinensis* Suppresses Inflammatory Mediators via Nuclear Factor- κ B

and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 259-266, 2016.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 3-23, 2010.

CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 946–953, 2017.

CONKLIN, K. A. Coenzyme Q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. **Integr Cancer Ther**, v. 4, p. 110–130, 2005.

COSTA, L.; PINHEIRO, R. O.; DUTRA, P. M. L.; SANTOS, R. F.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; DA SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; DA-SILVA, S. A. G. Pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and controls lesions in infected hamsters. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1-8, 2014.

CRUZ-ADALIA, A.; JIMÉNEZ-BORREGUERO, L. J.; RAMÍREZ-HUESCA, M.; CHICO-CALERO, I.; BARREIRO, O.; LÓPEZ-CONESA, E.; FRESNO, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; MARTÍN P. CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. **Circulation**, v. 122, p. 1396–1404, 2010.

CUNHA-JÚNIOR, E. F.; PACIENZA-LIMA, W.; RIBEIRO, G. A.; NETTO, C. D.; DO CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; DA SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; TORRES-SANTOS, E. C. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 1555–1559, 2011.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 742-780, 1997.

DA SILVA, B. C. **Avaliação da toxicidade de quatro solventes e um surfactante, e dos fenilpropanoideseugenol e (E)-cinamaldeído sobre larvas e pupas de *Musca domestica* LINNAEUS, 1758 (DIPTERA: MUSCIDAE)**. 2016. 73 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2016. il.

DE LA TORRE, E.; GENARO, A. M.; RIBEIRO, M. L.; PAGOTTO, R.; PIGNATARO, O. P.; SALES, M. E. Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. **Biochim Biophys Acta**. v. 1782, n. 2, p. 82-9, 2008.

DE LA FUENTE, H.; CRUZ-ADALIA, A.; MARTINEZ DEL HOYO, G.; CIBRIAN-VERA, D.; BONAY, P.; PEREZ-HERNANDEZ, D.; VAZQUEZ, J. et al., The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with galectin-1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 34, p. 2479–2487, 2014.

DE MORAES, G. N.; CASTRO, C. P.; SALUSTIANO, E. J.; DUMAS, M. L.; COSTAS, F.; LAM, E. W-F.; COSTA, P. R. R.; MAIA, R. C. The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. **International Journal of Oncology**, v. 45, p. 1949-1958, 2014.

DMITRIEVA, O. S. et al. Interleukins 1 and 6 as Main Mediators of Inflammation and Cancer. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 81, n. 2, p. 80–90, 2016.

DOLAI, S.; PAL, S.; YADAV, R. K.; ADAK, S. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in *Leishmania* through Ca²⁺-dependent and caspase independent mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 13638–13746, 2011.

DONG, M.; LIU, D.; LI, Y. H.; CHEN, X. Q.; LUO, K.; ZHANG, Y. M.; LI, R. T. Naphthoquinones from *Onosma paniculatum* with Potential Anti-inflammatory Activity. **Planta Med.** v. 83, p. 631–635, 2017.

DONNELLY, D. M. X; BOLAND, G. M. Isoflavonoids and neoflavonoids: naturally occurring O-heterocycles. **Nat Prod Rep**, v. 12, p. 321, 1995.

EL ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171-83, 2006.

ELOOMA, O.; SANKALA, M.; PIKKARAINEN, T.; BERGMANN, U.; TUUTTILA, A.; RAATIKAINEN-AHOKAS, A.; SARIOLA, H.; TRYGGVASON, K. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. **J Biol Chem.** v. 273, n. 8, p. 4530-8, 1998.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 2, p. 12-26, 1997.

FERRERO-MILIANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, O. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1² generation. Review. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, p. 227–235, 2006.

FILEP, J. G. Resolution of inflammation: leukocytes and molecular pathways as potential therapeutic targets. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 5, 2013.

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

GHOSN, E. E. B.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **PNAS**. v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

GOLDKIND, L.; LAINE, L. A systematic review of NSAIDs withdrawn from the market due to hepatotoxicity: lessons learned from the bromfenac experience. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 15, n. 4, p. 213-20, 2006.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Review Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

HOLMDAHL, R.; MALMSTRÖM, V.; BURKHARDT, H. Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation - the three stages of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**. v. 44, n. 6, p. 1593-9, 2014.

IWASHIRO, M.; MESSER, R. J.; PETERSON, K. E. STROMNES, I. M.; SUGIE, T.; HASENKRUG, K. J. Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9226-9230, 2001.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216, 2002.

KAMINSKA, B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1754, n. 1-2, p. 253-262, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptor in innate immunity: update of Toll-like receptors. **Natu Immunology**, v. 11, p. 373-84, 2010.

KHAN, I.; YASIR, M.; AZHAR, E. I.; KUMOSANI, T.; BARBOUR, E. K.; BIBI, F.; KAMAL, M. A. Implication of gut microbiota in human health. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**. v. 13, n. 8, p. 1325-33, 2014.

KIM, H. J.; SUNG, M. K.; KIM, J. S. Anti-inflammatory effects of glyceollins derived from soybean by elicitation with *Aspergillus sojae*. **Inflammation Research**, v. 60, p. 909-917, 2011.

KOBAYASHI, K.; NISHIUMI, S.; NISHIDA, M.; HIRAI, M.; AZUMA, T.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y.; YOSHIDA, M. Effects of Quinone Derivatives, such as 1,4-Naphthoquinone, on DNA Polymerase Inhibition and Anti Inflammatory Action. **Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 37-44, 2011.

KONDO, T.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. **Trends Immunol.**, v. 33, p. 449-458, 2012.

KOPPESTEINER, H.; BRACK-WERNER, R.; SCHINDLER, M. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. **Retrovirology**. v. 4, n. 9, p. 82,

LACY, P.; STOW, J. L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**. v. 118, n. 1, p. 9-18, 2011.

LAFFON, A.; GARCIA-VICUNA, R.; HUMBRIA, A.; POSTIGO, A. A.; CORBI, A. L.; DE LANDAZURI, M. O.; SANCHEZ-MADRID, F. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 546–552, 1991.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 750-761, 2011.

LEE, E. J.; KO, H. M.; JEONG, Y. H.; PARK, E. M.; KIM, H. S. β -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 133, 2015.

LEIJH, P. C. J.; VAN ZWET, T. L.; TER KUILE, M. N.; VAN FURTH, R. Effect of Thioglycolate on Phagocytic and Microbicidal Activities of Peritoneal Macrophages. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 448-452, 1984.

LI, C.; BEAVIS, P.; PALFREEMAN, A. C.; AMJADI, P.; KENNEDY, A.; BRENNAN, F. M. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is critical step for acquisition of effector function in cytokine-activated T cells, but acts as a negative regulator in T cells activated through the T-cell receptor. **Immunology**. v. 132, n. 1, p. 104–110, 2011.

LIEN, Y. C.; KUNG, H. N.; LU, K. S.; JENG, C. J.; CHAU, Y. P. Involvement of endoplasmic reticulum stress and activation of MAP kinases in beta-lapachone-induced human prostate cancer cell apoptosis. *Histology and Histopathology*, v. 23, p. 1299–1308, 2008.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

LOMBA, L. A.; VOGT, P. H.; SOUZA, V. E. P.; LEITE-AVALCA, M. C. G.; MAHTANI, K. R.; BROOK, M.; DEAN, J. L.; SULLY, G.; SAKLATVALA, J.; CLARK, A. R.; Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetrapolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. **Molecular and Cell Biology**. v. 21, n. 19, p. 6461-9, 2001.

MAIA, R. C. et al. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. **Investigational New Drugs**, v. 29, p. 1143–1155, 2011.

MARTIN, P.; GOMEZ, M.; LAMANA, A.; CRUZ-ADALIA, A.; RAMIREZ-HUESCA, M.; URSA, M. A.; YANEZ-MO, M. et al., CD69 association with Jak3/Stat5 proteins regulates Th17 cell differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, p. 4877–4889, 2010.

MARTIN, P.; GÓMEZ, M.; LAMANA, A.; MATESANZ, M. A.; CORTÉS, J. R.; RAMÍREZ-HUESCA, M.; BARREIRO, O.; LÓPEZ-ROMERO, P.; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C.; DE LA FUENTE, H.; CRUZ-ADALIA, A.; SÁNCHEZ-MADRID F. The leukocyte activation antigen CD69 limits allergic asthma and skin contact hypersensitivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, p. 355–365, 2010.

MARTINO, T.; MAGALHAES, F. C. J.; JUSTO, G. A.; COELHO, M. G. P.; NETTO, C. D.; COSTA, P. R. R.; SABINO, K. C.C. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 Mrna and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 3115–3122, 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MIRHAFEZ, S. R.; MOHEBATI, M.; FEIZ DISFANI, M.; SABERI KARIMIAN, M.; EBRAHIMI, M.; AVAN, A.; ESLAMI, S.; PASDAR, A.; ROOKI, H.; ESMAELI, H.; FERNS, G. A.; GHAYOUR-MOBARHAN, M. An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**. v. 8, n. 9, p. 614-23, 2014.

MOHAMMADI, N. M.; SALEHI, E.; MESDAGHI, M. *et al.* Increased expression of CD69 antigen on human peripheral blood natural killer cells in patients with allergic rhinitis. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 12, n. 1, p. 68-74, 2013.

MOSMANN, T. R. Properties and functions of interleukin-10. **Advances in Immunology**., v. 56, p. 1, 1994.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 73, p. 209-212, Feb. 2003.

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

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F.; MORA-FERNÁNDEZ, C.; MUROS DE FUENTES, M.; GARCÍA-PÉREZ, J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews Nephrology**. v. 7, n. 6, p. 327-40, 2011.

NETTO, C. D *et al.* New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF modulation in human PBMC cells. **Bioorg Med Chem**, v. 18, p. 1610–1616, 2010.

OKHRIMENKO, A.; GRÜN, J. R.; WESTENDORF, K.; FANG, Z.; REINKE, S.; VON ROTH, P.; WASSILEW, G.; KÜHL, A. A.; KUDERNATSCH, R.; DEMSKI, S.; SCHEIBENBOGEN, C.; TOKOYODA, K.; MCGRATH, M. A.; RAFTERY, M. J.; SCHÖNRICH, G.; SERRA, A.; CHANG, H. D.; RADBRUCH, A.; DONG J. Human memory T cells from the bone marrow are resting and maintain long-lasting systemic memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A**, v. 111, p. 9229–9234, 2014.

OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, um alcalóide do tipo tetrahidroisoquinólico**. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014., il.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. **Bogliolo Patologia**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., c. 7, p. 111-143, 1994.

PINHO, B. R.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. Is Nitric Oxide Decrease Observed with Naphthoquinones in LPS Stimulated RAW 264.7 Macrophages a Beneficial Property?. **PLoS ONE**. v.6, n. 8, p. e24098, 2011.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions os endothelial cells in inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Review Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259-270, 2009.

RABELO, S. B. **Efeito da fotoestimulação do laser de baixa potência na cicatrização de feridas em ratos portadores de diabetes**. 2003. 82f. Dissertação de Mestrado. São José dos Campos: UNIVAP, 2003.

RADULOVIC, K.; MANTA, C.; ROSSINI, V.; HOLZMANN, K.; KESTLER, H. A.; WEGENKA, U. M, NAKAYAMA, T.; NIESS, J. H. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals tomucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential. **J Immunol**, 188:2001–2013, 2012.

RADULOVIC, K.; NIESS, J. H. "CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment?". **Journal of Immunology Research**, v. 2015. p. 497056, 2015.

REID, D. M.; GOW, N. A.; BROWN, G. D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n.1, p. 30-37, 2009.

RIBEIRO, G. A.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; PINHEIRO, R. O.; DA-SILVA, S. A.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M. DA SILVA, A. J.; COSTA, P. R.; NETTO, C. D.; MELO, R. C.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; TORRES-SANTOS, E. C. LQB 118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 789-799, 2013.

RIBEIRO, G. A.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; PINHEIRO, R. O.; DA-SILVA, S. A. G.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; DA SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; NETTO, C. D.; MELO, R. C. N.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; TORRES-SANTOS, RIÇA, I. G.; NETTO, C. D.; RENNÓ, M. N.; ABREU, P. A.; COSTA, P. R. R.; DA SILVA, A. J. M.; CAVALCANTE, M. C. M. Anti-Inflammatory Properties of Pterocarpanquinone LQB-118 in Mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4415-4423, 2016.

RIÇA, I. G. et al. Anti-Inflammatory Properties of Pterocarpanquinone LQB-118 in Mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2016.

ROTHERWELL, N. J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 430-436, 1991.

SALUSTIANO, E. J. S.; NETTO, C. D.; Fernandes, R. F.; DA SILVA, A. J. M.; BACELAR, T. S.; CASTRO, C. P.; BUARQUE, C. D.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, V. M.; COSTA, P. R. R. **Invest. New Drugs**, 2009.

SALUSTIANO, E. J.; DUMAS, M. L.; SILVA-SANTOS, G. G.; NETTO, C. D.; COSTA, P.R.R.; RUMJANEK, V. M. In vitro and in vivo antineoplastic and immunological effects of pterocarpanquinone LQB118. **Investigational New Drugs**, v. 34, p. 541-551, 2016.

SANCHO, D.; GÓMEZ, M.; VIEDMA, F.; ESPLUGUES, E.; GORDÓN-ALONSO, M.; GARCÍA-LÓPEZ, M. A.; DE LA FUENTE, H.; MARTÍNEZ-A, C.; LAUZURICA, P.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 872–882, 2003.

SATO, M. et al. Direct Binding of Toll-Like Receptor 2 to Zymosan, and Zymosan-Induced NF- κ B Activation and TNF- α Secretion Are Down-Regulated by Lung Collectin Surfactant Protein A. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 417–425, 2003.

SCOTT, A. *et al.* What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, n. 3, p. 248–249, 2004.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Action**, v. 18, n. 3-4, p. 439-46, 1986.

SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **Annual Review of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 1576-91, 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**. v. 11, n. 11, p. 762-74, 2011.

SHINODA, K.; TOKOYODA, K.; HANAZAWA, A.; HAYASHIZAKI, K.; ZEHENTMEIER, S.; HOSOKAWA, H.; IWAMURA, C.; KOSEKI, H.; TUMES, D. J.; RADBRUCH, A.; NAKAYAMA T. Type II membrane protein CD69 regulates the

formation of resting T-helper memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A**, v. 109, p. 7409–7414, 2012.

SKELDON, A.; SALEH, M. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 15, 2011.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. – **Pharmacology of Pain**. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 279-302, 2010.

SUN, S.; LI, W.; ZHANG, H.; ZHA, L.; XUE, Y.; WU, X. et al. Requirement for storeoperated calcium entry in sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer cells. **Bioscience Report**, v. 32, p. 83–90, 2011.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TAKEDA, S; SATO, N,; MORISHITA, R. Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. **Frontiers in Aging Neuroscience**. v. 6, p. 171, 2014.

TAKEUCHI, O., SATO, S., HORIUCHI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; DONG, Z.; MODLIN, R. L.; AKIRA, S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 10-4, 2002.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review Immunology*, v. 23, p. 901-944, 2005.

TESTI, R.; PHILLIPS, J. H.; LANIER, L. L. T cell activation via Leu-23 (CD69). **Journal of Immunology**, v. 143, p. 1123–1128, 1989.

TOGBE, D.; SCHNYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; COUILLIN, I.; MAILLET, I.; BIHL, F.; MALO, D.; RYFFEL, B.; QUESNIAUX, V. F. TLR4 gene dosage contributes to endotoxin-induced acute respiratory inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 80, n. 3, p. 451-457, 2006.

TOSCANO, M. A.; BIANCO, G. A.; ILARREGUI, J. M.; CROCI, D. O.; CORREALE, J.; HERNANDEZ, J. D.; ZWIRNER, N. W. et al., Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature Immunology**, v. 8, p. 825–834, 2007.

TURPEINEN, T.; NIEMINEN, R.; MOILANEN, E.; KORHONEN, R. Mitogen activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in A459 human lung epithelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 333, n. 1, p. 310-8, 2010.

VERDAN, M. H.; STEFANELLO, M. E. A.; ZAMPRONIO, A. R. A. Naphthoquinone from *Sinningia canescens* Inhibits Inflammation and Fever in Mice. **Inflammation**. v. 40, n. 3, p. 1051-61, 2017.

WANG, H. Y.; SHEN, H. H.; LEE, J. J.; LEE, N. A. CD69 expression on airway eosinophils and airway inflammation in a murine model of asthma. **Chinese Medicine Journal (Engl.)**, v. 119, n. 23, p. 1983-1990, 2006.

WANG, HUI-YING.; DAI, YU.; WANG, JIAO-LI.; YANG, LXU-YAN.; JIANG, XIN-GUO. Anti-CD69 monoclonal antibody treatment inhibits airway inflammation in a mouse model of asthma. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 622-631, 2015.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93-106, 2006.

WILSON, M. S.; BROSENS, J. J.; SCHWENEN, H. D.; LAM, E. W. FOXO and FOXM1 in cancer: the FOXO-FOXM1 axis shapes the outcome of cancer chemotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 1256-1266, 2011.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **The Veterinary quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2000.

XU, D., KOMAI-KOMA, M., FOO, Y., LIEW, M. F. Y. Expression and function of Toll-like receptor on T cells. **Cellular Immunology**, v. 233, p. 85–89, 2005.

YOON, E. K.; KIM, H. K.; CUI, S.; KIM, Y. H.; LEE, S. H. Soybean glyceollins mitigate inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression levels via suppression of the NF- κ B signaling pathway in RAW 264.7 cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 29, p. 711-717, 2012.

ZHANG, J. M. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHANG, L.; WANG, C. C. Inflammatory response of macrophages in infection. **Hepatobiliary Pancreat Diseases International**, v. 13, n. 2, p. 138-152, 2014.

ZINGONI, A. G.; PALMIERI, S.; MORRONE, M.; CARRETERO, M.; LOPEZ-BOTEL, M.; PICCOLI, L.; FRATI, A.; SANTONI. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94/NKG2-A inhibitory receptor. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 644-651, 2000.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A-O.; BAUM, W.; EVAN G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1551, p. 1–37, 2001.

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da atividade anti-inflamatória da pterocarpanoquinona LQB 118", protocolada sob o CEUA nº 4658300418 (00 000126), sob a responsabilidade de **Sandra Rodrigues Mascarenhas** e equipe: **Éssia de Almeida Lima** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 11/05/2018.

We certify that the proposal "Study of the anti-inflammatory activity of pterocarpanoquinone LQB 118", utilizing 150 Heterogenics mice (150 females), protocol number CEUA 4658300418 (00 000126), under the responsibility of **Sandra Rodrigues Mascarenhas** and team: **Éssia de Almeida Lima** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/11/2018.

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

Vigência da Proposta: de **06/2018** a **06/2019** Área: **Biotecnologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal - IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos** sexo: **Fêmeas** idade: **6 a 8 semanas** N: **150**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss** Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: **Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba.**

João Pessoa, 11 de maio de 2018

Profa. Dra. Isabela Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO B – Artigo em colaboração publicado na revista Natural Product Communications (Fator de Impacto: 0,8)

NPC Natural Product Communications

2017
Vol. 12
No. 10
1595 - 1597

Anti-inflammatory Effect of Discretamine, a Protoberberine Alkaloid Isolated from *Duguetia moricandiana*

Daniilo Eduardo Costa Vieira Lemos^{1*}, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva¹, **Éssia de Almeida Lima²**, Adriano Francisco Alves³, Ana Sílvia Suassuna Carneiro Lúcio³, José Maria Barroca-Furtado³ and Sandra Rodrigues Mascarenhas^{1,2*}

¹Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

²Department of Cellular and Molecular Biology, Biotechnology Center Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

³Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

* Co-first authors

sandra@cbiotec.ufpb.br

Received: February 9th, 2017; Accepted: June 21st, 2017

Discretamine is a tetrahydroprotoberberine alkaloid isolated from *Duguetia moricandiana* (Annonaceae). In the present study, anti-inflammatory ability of discretamine in a lipopolysaccharide (LPS) stimulated macrophages model was investigated. LPS-induced NO production was reduced by discretamine treatment (100 and 200 µg/mL) around 50%. Furthermore, discretamine (50, 100, and 200 µg/mL) treatment down-regulated pivotal inflammatory cytokines levels, such as IL-6 (74.1, 76.6, and 75.1%, respectively), IL-1β (89.4, 87.4, and 71.8%, respectively), and TNF-α (61, 45.2, and 52.6%, respectively) levels. Also, discretamine did not reduce peritoneal macrophage viability. Besides that, *in vivo* carrageenan-induced paw edema experiments were also carried out. Discretamine treatment (5, 10, and 20 mg/kg) reduced paw edema up to 6h. Taken together, these data demonstrated that discretamine exerted its anti-inflammatory effect by down-regulation the levels of TNF-α, IL-6, and IL-1β, and by inhibition of NO release.

Keywords: Discretamine, Macrophage, Nitric oxide, Cytokines.

Natural products are a continuous source of new lead compounds to treat many diseases [1]. They present several secondary metabolites, including alkaloids, which are nitrogenous compounds with a great structural diversity and several biological activities, including anti-inflammatory effects [2]. Discretamine is a tetrahydroprotoberberine alkaloid (Figure 1) characteristic of species of Annonaceae family, such as *Duguetia* spp. [3] and *Fusistigma glaucozocens* [4]. This alkaloid presents antinociceptive [5], antiplatelet aggregation [6], hypotensive, and vasorelaxant effects [7]. Besides, it is a selective α1D-adrenoceptor and 5-HT receptor antagonist in vascular smooth muscle [4]. It has been reported that many alkaloids are able to reduce inflammatory parameters [8,9], thus, in this work we investigated a possible anti-inflammatory effect of discretamine.

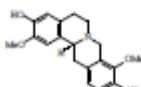


Figure 1: (•) Discretamine structure (Almeida et al. 2011) [5].

Initially, *in vitro* assays were performed using peritoneal macrophage culture to assess anti-inflammatory effect of discretamine. Peritoneal macrophages are immune system phagocytic cells, which remove and neutralize cellular debris and harmful agents (e.g., pathogens), armed with numerous pro- and anti-inflammatory mediators that can also positively or negatively regulate immune response generation. Besides, they are useful tools

to study inflammatory mediators secretion after pathogen stimulation [10]. In this work, lipopolysaccharide (LPS), a membrane component present in gram negative bacteria, was used as an inflammatory *in vitro* stimulus to macrophages [11].

LPS stimulation induced an increased ($p < 0.001$) nitric oxide (NO) macrophage production when compared to basal (non-stimulated) cells (Figure 2(a)). In addition, discretamine (100 and 200 µg/mL) reduced 50.6% and 59%, respectively, LPS-induced NO production. After LPS challenge, macrophage overexpress inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is responsible for NO production during inflammation [12]. Some works have demonstrated that alkaloids are able to inhibit iNOS activity and NO production [13,14]. Thus, it is possible that discretamine acts similarly to reduce NO levels.

Additionally, discretamine effect on LPS-induced pro-inflammatory cytokines secretion was studied. LPS challenge increased ($p < 0.001$) IL-6, IL-1β, and TNF-α levels on macrophage supernatant when compared to non-stimulated cells. Discretamine treatment (50, 100, and 200 µg/mL) reduced IL-6 (74.1, 76.6, and 75.1%, respectively), IL-1β (89.4, 87.4, and 71.8%, respectively), and TNF-α (61, 45.2, and 52.6%, respectively) levels when compared to LPS group (Figure 2 (b), (c), (d)). These pro-inflammatory cytokines contribute to the course of many inflammatory diseases and, in macrophage, their production is related to toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B (TLR4/NF-κB) signaling, the main pathway triggered by LPS [11]. Alkaloids are able to down-regulate this signaling reducing cytokines production [15, 16]. In this regard, discretamine may be inhibiting this pathway to trigger its anti-inflammatory effect.

ANEXO C – Artigo em colaboração publicado na revista *Frontiers in Physiology* (Fator de Impacto: 4,134)



Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain

Lutz H. A. Cavalcanti-Silva¹, **Ésata de Almeida Lima¹**, Doyse C. M. Carvalho², José M. de Salas-Noto³, André R. de Azevedo-Araújo³, José G. F. M. Galvão¹, Juliano S. de França da Silva¹ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Brazil; ² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Brazil; ³ Programa Multidisciplinar de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Brazil

Since the discovery of ouabain as a cardiotonic steroid hormone present in higher mammals, research about it has progressed rapidly and several of its physiological and pharmacological effects have been described. Ouabain can behave as a stress hormone and adrenal cortex is its main source. Direct effects of ouabain are originated due to the binding to its receptor, the Na⁺/K⁺-ATPase, on target cells. This interaction can promote Na⁺ transport blockade or even activation of signaling transduction pathways (e.g., EGFR/Src-Ras-ERK pathway activation), independent of ion transport. Besides the well-known effect of ouabain on the cardiovascular system and blood pressure control, compelling evidence indicates that ouabain regulates a number of immune functions. Inflammation is a tightly coordinated immunological function that is also affected by ouabain. Indeed, this hormone can modulate many inflammatory events such as cell migration, vascular permeability, and cytokine production. Moreover, ouabain also interferes on neuroinflammation. However, it is not clear how ouabain controls these events. In this brief review, we summarize the updates of ouabain effect on several aspects of peripheral and central inflammation, bringing new insights into ouabain functions on the immune system.

Keywords: ouabain, immune system, peripheral inflammation, cell migration, cytokines, neuroinflammation

INTRODUCTION

Although the cardiotonic steroid ouabain was originally identified as a plant secondary metabolite (e.g., from *Strophantus gratus* and *Acalanthes ouabato*), it was later described as an endogenous mammalian substance (Hamlyn et al., 1991) such as other cardiotonic steroids (e.g., marinobufagenin and digoxin) (Bagrov et al., 2009). Ouabain was found in bovine adrenal gland (Laredo et al., 1994; Schneider et al., 1998), adrenal gland tumors (Bianco and Wallace, 2013), bovine hypothalamus (Tymiak et al., 1993), bovine hypophysis (Schoner, 2002), and human plasma (Hamlyn et al., 1991; Ferrandi et al., 1997). It is noteworthy that ouabain isolated from mammalian tissues and body fluids is structurally, biochemically, and immunologically indistinguishable to ouabain isolated from plants (Schoner, 2002).

OPEN ACCESS

Edited by:

Carlos Rosales,
Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico

Reviewed by:

Drino Vogt,
University of Bam, Switzerland
Timothy J. Miles,
Ritchie Centre, Australia

*Correspondence:

Sandra Rodrigues-Mascarenhas
sandr@ciobioic.ufpb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 06 September 2017

Accepted: 24 October 2017

Published: 10 November 2017

Citation:

Cavalcanti-Silva LHA, Lima EA,
Carvalho DCM, Salas-Noto JM,
Araújo AR, Galvão JGF, Silva JSF
and Rodrigues-Mascarenhas S (2017)
Much More than a Cardiotonic
Steroid: Modulation of Inflammation
by Ouabain. *Front. Physiol.* 8:895.
doi: 10.3389/fphys.2017.00895

ANEXO D – Artigo em colaboração publicado na revista *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Fator de Impacto: 3,457)

Biomedicine & Pharmacotherapy 106 (2018) 530–542

Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopharm

Original article

C-phycocyanin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters

E. Fernandes e Silva^{a,b,c}, F.S. Figueira^c, A.D. Coimbra^c, V.S. Machado^d, M.T.S.F. Salgado^{a,b}, T.K. Silva^{a,c}, E.P. Wagner^{a,c}, P.H. Mattozzo^b, **É.A. Lima^a**, M. Sales-Neto^e, V.U. Ferreira^f, A.A. Comitre^{a,c}, S.R. Mascarenhas^g, S.J. Kamil^h, A.P.S. Votto^{a,b}

^a Instituto de Ciências Exatas, UFRJ, RJ, Brazil
^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFRJ, RJ, Brazil
^c Núcleo de Química e Alimentos, UFRJ, RJ, Brazil
^d Centro de Ciências Químicas, UFRJ, RJ, Brazil
^e Centro de Biologia Celular, Universidade Federal de Juiz de Fora, RJ, Brazil
^f Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus São Carlos, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Anti-proliferative
 Docking
 ABCB1
 ABCG2

ABSTRACT

The phenotype of multidrug resistance (MDR) is one of the main causes of chemotherapy failure. Our study investigated the effect of C-phycocyanin (C-PC) in three human erythroleukemic cell lines with or without the MDR phenotype: K562 (non-MDR; no overexpression of drug efflux proteins), K562-Lucerna (MDR; overexpression of ATP-binding cassette, sub-family B/ABCB1), and FEP5 (MDR; overexpression of ABCB1 and ATP-binding cassette, sub-family C/ABCG2). Using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, we showed that 20 and 200 µg/mL C-PC decreased K562 viable cells after 24 h and 200 µg/mL C-PC decreased K562-Lucerna cell proliferation after 48 h. C-PC did not decrease viable cells of FEP5 cells. On the other hand, the MTT assay showed that exposure of 2, 20, and 200 µg/mL C-PC for 24 or 48 h was not cytotoxic to peritoneal macrophages. At 72 h, the trypan blue exclusion assay showed that 20 µg/mL C-PC decreased K562 and K562-Lucerna cell proliferation and in FEP5 cells, only 200 µg/mL C-PC decreased proliferation. In addition, protein-protein docking showed differences in energy and binding sites of ABCB1 and ABCG2 for C-PC, and these results were confirmed by the efflux protein activity assay. Only ABCG2 activity was altered in the presence of C-PC and FEP5 cells showed lower C-PC accumulation, suggesting C-PC extrusion by ABCG2, conferring C-PC resistance. In combination with chemotherapy (vinorelbine [VCR] and daunorubicin [DNR]), the sensitivity of K562-Lucerna cells for C-PC + VCR did not increase, whereas FEP5 cell sensitivity for C-PC + DNR was increased. In molecular docking experiments, the estimated free energies of binding for C-PC associated with chemotherapy were similar (VCR: -6.9 kcal/mol and DNR: -7.2 kcal/mol) and these drugs were located within the C-PC cavity. However, C-PC exhibited specificity for tumor cells and K562 cells were more sensitive than K562-Lucerna cells, followed by FEP5 cells. Thus, C-PC is a possible chemotherapeutic agent for cells with the MDR phenotype, both alone in K562-Lucerna cells (resistance due to ABCB1), or in combination with other drugs for cells similar to FEP5 (resistance due to ABCG2). Moreover, C-PC did not damage healthy cells (peritoneal macrophages of *Mus musculus*).

1. Introduction

The number of new cases of cancer has increased largely because of growth and aging of the world's population [1]. In 2010, it is expected that cancer will result in approximately 5.76 million deaths worldwide [2,3]. Cancer treatment usually involves chemotherapeutic agents to reduce mortality/morbidity and increase quality of life [4]. However, several chemotherapeutic agents have a low therapeutic index, generating serious problems, such as a multidrug resistance (MDR) phenotype [5]. The MDR phenotype is the most significant reason for cancer chemotherapeutic failure and plays a central role in cancer metastasis and recovery [6].

MDR is a well known phenomenon that results in the resistance of cancer cells to one chemotherapeutic drug accompanied by resistance

^{*} Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas Av. Itália, Km 8, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.
 E-mail address: ea.lima@furg.br, fernandesea@ufjf.br (É.A. Lima).