



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



RENATA MARCIA COSTA VASCONCELOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO SALICILATO DE BORNEOL, UM DERIVADO
SALICÍLICO, EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA**

João Pessoa – PB

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR



RENATA MARCIA COSTA VASCONCELOS

**ESTUDO DA ATIVIDADE DO SALICILATO DE BORNEOL, UM DERIVADO
SALICÍLICO, EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular do Centro
de Ciências Exatas e da Natureza, da
Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de **MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR.**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam

João Pessoa - PB

2012

V331e Vasconcelos, Renata Marcia Costa.

Estudo da atividade do salicilato de Borneol, um derivado salicílico, em modelos experimentais de inflamação aguda / Renata Marcia Costa Vasconcelos.-- João Pessoa, 2012.

108f. : il.

Orientadora: Márcia Regina Piuvezam

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1.Biologia Celular e Molecular. 2.Salicilato de Borneol(SB).
3. Inflamação aguda. 4. Permeabilidade vascular. 5. Citocinas.
6. Óxido nítrico.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)

ESTUDO DA ATIVIDADE DO SALICILATO DE BORNEOL, UM DERIVADO SALICÍLICO, EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO AGUDA

Renata Marcia Costa Vasconcelos

Dissertação de Mestrado avaliada em 28/03/2012 como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR** pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Orientadora

Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros

Professora Adjunta - Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Examinadora Externa

Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Examinadora Interna

Prof. Dr. Cláudio Roberto Rodrigues dos Santos

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Suplente

Àqueles que amo.

Sem amor, nada disto seria possível;

E ainda que fosse possível, não haveria sentido.

AGRADECIMENTOS

*"E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho, por mais que pense estar."*

(Gonzaguinha, Caminhos do Coração)

A Deus, que sempre me fez sentir Sua presença mesmo quando só havia motivos para questioná-La.

Aos meus pais, Eliziel e Wedna, pelo amor incondicional; por serem meu porto seguro e meu exemplo. **Ao meu irmão**, o eterno Segundinho, por ser meu primeiro amigo apesar de nossas tantas semelhanças – e, eventualmente, diferenças. **Aos meus familiares**: avós, tios, tias, primos e primas, sogra e cunhada, por estarem presentes e se alegrarem em minhas pequenas vitórias. **A Evellyne**, que durante longos anos tem sido a irmã que a vida me emprestou, e que não pretendo devolver! **Aos meus amigos**, que sendo tão poucos só podiam ser imensamente especiais. **Àquele que escolhi para amar**, Everton, por todo amor devotado e pelo suporte emocional ao longo deste período de crescimento, mesmo com a enorme distância que nos manteve separados.

À minha orientadora, professora Márcia Piuvezam minha profunda gratidão pela confiança em mim depositada, pela acolhida nos momentos de dificuldade e por todo o conhecimento transmitido. **Aos professores do Laboratório de Imunofarmacologia** Sandra Mascarenhas e Cláudio Santos, obrigada por estarem presentes e contribuírem sempre que preciso. **Ao professor Luiz César Rodrigues**, por produzir e fornecer a substância utilizada para os testes. **Ao professor Fábio Sampaio**, pela disposição em me receber e me dar uma

série de conselhos valiosos assim que cheguei à UFPB, e pela acertada sugestão da professora Márcia como orientadora neste programa. **À professora Carmen Lúcia Bassi**, muito obrigada por me receber no Laboratório de Investigação Médica da UFMT e com isto proporcionar experiências fundamentais para a minha formação.

Às professoras Karina Medeiros e Márcia Rosa de Oliveira pela disponibilidade de analisar nosso trabalho e adicionar contribuições valiosas. **Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**, que foram essenciais ao longo destes anos – em especial Luiz Fernando Marques, Sávio Torres e Krystyna Gorlach-Lira.

Aos vitoriosos integrantes das primeiras turmas de mestrado da PGBCM, especialmente Laís Campos, Priscila Jacob, Francianne Amorim e Yara Rodrigues, obrigada pelo conhecimento compartilhado nos seminários intermináveis e pelas boas risadas nos momentos de diversão.

A todos os companheiros de bancada do Laboratório de Imunofarmacologia, ilustres protagonistas da história que será contada aqui. Hermann, Giciane, Juliana, Luciana, Jaime, Danielle, Jacqueline, Fagner, Priscila, Ítalo, Laércia, Adriano, Vítor, Talita, Raquel, Laiz, Thalissa e Ana Luiza, serei eternamente grata pela ajuda, indispensável na superação de cada obstáculo com que me deparei durante o mestrado. Além de todo conhecimento e experiência que dividimos, levarei comigo uma grande saudade de todos. Sintam-se por mim abraçados!

À amiga de longa data Morgana Gadelha e família. Faltam-me palavras para descrever a importância de suas atitudes, que culminaram com a minha vinda para João Pessoa. Muito obrigada pelo carinho, pelo aconchego, por todo crédito, pelas palavras de incentivo e puxões de orelha que ouvi sempre que precisei.

Aos queridos Rogério Alexandre Santos, Danielle Ribatski e respectivas famílias, minha imensa gratidão pelo abrigo, pela companhia e por todos os bons momentos vivenciados durante minha estada em Cuiabá. É imprescindível dizer que, nesta cidade, o que mais pude sentir foi o calor: além dos 40 graus peculiares do clima do cerrado, **o calor humano dos colegas e funcionários do Laboratório de Investigação Médica da UFMT**. Muito obrigada a vocês por tudo!

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. **Às secretárias da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e aos funcionários do Biotério Dr. Thomas George**, pela dedicação e pelos bons serviços prestados à comunidade acadêmica. **À Glaucia Faheina**, muito obrigada por toda a colaboração durante os experimentos *in vitro*. Não posso esquecer **a pequena grande Mônica** e suas doses diárias de cafeína, que nos mantiveram em estado de vigília nos experimentos mais demorados!

À Universidade Federal da Paraíba, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades; **ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Pró-Reitoria de Pós Graduação (PRPG)**, pelo apoio financeiro.

***"Resta essa faculdade incoercível de sonhar,
De transfigurar a realidade, dentro dessa incapacidade
De aceitá-la tal como é, e essa visão
Ampla dos acontecimentos, e essa impressionante
E desnecessária presciência, e essa memória anterior
De mundos inexistentes, e esse heroísmo
Estático, e essa pequenina luz indecifrável
A que às vezes os poetas dão o nome de esperança.
(...)
Resta esse constante esforço para caminhar dentro do labirinto
Esse eterno levantar-se depois de cada queda
Essa busca de equilíbrio no fio da navalha
Essa terrível coragem diante do grande medo, e esse medo
Infantil de ter pequenas coragens."***

(O Haver, Vinícius de Moraes, 15/04/1962)

RESUMO

O Salicilato de Borneol (SB) é um derivado salicílico, obtido pela esterificação do ácido salicílico e do monoterpeneo (-)-borneol, e seu uso tópico em doenças inflamatórias foi descrito no início do século XX. Derivados salicílicos possuem excelente atividade anti-inflamatória e sabe-se que o borneol possui atividade neuroprotetora, genoprotetora e analgésica. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do SB em modelos experimentais de inflamação aguda. A toxicidade do SB foi analisada, mensurando-se o consumo de água e ração, peso, letalidade e peso dos principais órgãos. Para avaliar seu efeito anti-inflamatório, camundongos pré-tratados com SB foram submetidos aos protocolos de edema de pata induzido por carragenina, prostaglandina E2, bradicinina ou histamina, peritonite induzida por zimosan e aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético. A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada em cultura de macrófagos peritoneais. Não foram observados sinais de toxicidade aguda com a administração de 1000 mg/kg de SB em camundongos machos e fêmeas. Além disto, o pré-tratamento com SB foi significativamente ($p < 0,05$) eficaz na redução do edema de pata induzido por carragenina em tempos precoces e tardios, pela modulação de eicosanoides e bradicinina, e independente de histamina. A migração de neutrófilos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) provocadas pelo zimosan, bem como o extravasamento de fluidos mediado pelo ácido acético também foram reduzidos em animais tratados com SB. *In vitro*, o SB reduziu a liberação de NO em células estimuladas por lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS). Estes dados sugerem que SB tem efeitos anti-inflamatórios relacionados com diferentes mecanismos da inflamação, e novos estudos são necessários para explorar seu potencial.

Palavras-chave: inflamação aguda, permeabilidade vascular, citocinas, óxido nítrico, salicilato de borneol.

ABSTRACT

Bornyl Salicylate (BS) is a salicylic derivative, obtained by esterification of salicylic acid and monoterpene (-)-borneol, and its topical use in inflammatory diseases has been described in the beginning of 20th century. It is also known that salicylic derivatives have anti-inflammatory activity and borneol have neuroprotective, genoprotective and analgesic activity. The goal of this study was to evaluate activity of BS in experimental models of acute inflammation. The toxicity of BS was analyzed by measuring water and food intake, weight, mortality and weight of major organs. To assess its anti-inflammatory effect, mice pre-treated with BS were subjected to carrageenan, prostaglandin E2, bradykinin or histamine-induced paw edema, zymosan-induced peritonitis and increased vascular permeability induced by acetic acid. NO production was analyzed in peritoneal macrophage cell culture. There were no signs of acute toxicity with the administration of 1000 mg/kg BS in male and female mice. Furthermore, pretreatment with BS was significantly ($p < 0.05$) effective in reducing paw edema induced by carrageenin in early and late times; this effect is related to eicosanoid mediators and bradykinin, and independent of histamine. Neutrophils migration and the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 and IL-6) induced by zymosan, and the fluid leakage induced by acetic acid were also reduced in animals treated with BS. *In vitro*, BS reduced NO release in LPS-stimulated macrophage. These data suggest that BS has anti-inflammatory effects related to different mechanisms of inflammation, and further studies are needed to explore its potential.

Keywords: acute inflammation, cytokines, vascular permeability, nitric oxide, bornyl salicylate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Mais ou menos
5-HT	5-hidroxitriptamina; serotonina
a.C	Antes de Cristo
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora – 1
atm	Atmosfera (unidade)
BK	Bradicinina
BS	Bornyl salicylate
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
d.C.	Depois de Cristo
DL₅₀	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E.P.M.	Erro padrão da média
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Kinase ligada a sinais extracelulares
FSC	<i>Forward scatter</i> ou dispersão frontal
g	Gramas
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos
GR	Receptor de glicocorticoide
GRE	Elementos responsivos aos glicocorticoides
h	Hora
HIS	Histamina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenoso
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IP₃	Fosfatidil inositol
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
MAC	Complexo de ataque à membrana
MAC-1	Antígeno de macrófagos 1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mg	Miligrama
min	Minuto
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NF-κB	Fator nuclear-κB
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanômetro
nmol	Nanomolar
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus celsius
P.A.	Pureza analítica
PAF	Fator de ativação de plaquetas

PBS	Tampão fosfato de sódio (ou fosfato-salina)
PECAM	Molécula de adesão plaqueta-endotélio celular
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA2	Fosfolipase A2
PMN	Polimorfonuclear
q.s.p.	Quantidade suficiente para
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
SB	Salicilato de borneol
SBF	Soro bovino fetal
SNC	Sistema nervoso central
SSC	<i>Side scatter</i> ou dispersão lateral
TGF	Fator de crescimento tumoral
TLR2	Receptor <i>toll like 2</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TX	Tromboxano
v.o.	Via oral
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares
x	Vezes
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células e tecidos envolvidos na resposta inflamatória	20
Figura 2 – Visão geral do processo inflamatório agudo.....	21
Figura 3 – Migração dos leucócitos para o sítio inflamatório	24
Figura 4 – Reação de síntese do Salicilato de Borneol	41
Figura 5 – Efeito do tratamento com salicilato de borneol no peso médio de camundongos <i>Swiss-Webster</i>	50
Figura 6 – Efeito do tratamento com o salicilato de borneol no peso dos principais órgãos	52
Figura 7 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por carragenina.....	54
Figura 8 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por PGE2	56
Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por bradicinina	58
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por histamina	60
Figura 11 – Efeito do pré-tratamento com o salicilato de borneol na permeabilidade vascular	62
Figura 12 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol na celularidade do lavado peritoneal.....	64
Figura 13 – Análise das subpopulações celulares do lavado peritoneal, por tamanho e granulosidade, em citometria de fluxo.....	65

Figura 14 – Análise das populações de neutrófilos e macrófagos no lavado peritoneal por citometria de fluxo	67
Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com o salicilato de borneol nos níveis de citocinas do lavado peritoneal.	69
Figura 16 – Análise da citotoxicidade do salicilato de borneol em macrófagos peritoneais murinos	71
Figura 17 – Efeito do tratamento com salicilato de borneol na produção de nitrito em macrófagos peritoneais murinos.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Consumo médio de água e ração, peso médio inicial e final e número de mortes por grupo de camundongos <i>Swiss-Webster</i> tratados com Salicilato de Borneol	51
---	----

SUMÁRIO

1.0 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFLAMAÇÃO	19
1.2 INFLAMAÇÃO AGUDA.....	20
1.3 FARMACOTERAPIA DAS INFLAMAÇÕES.....	31
2.0 OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 MATERIAL.....	37
3.1.1 Equipamentos	37
3.1.2 Reagentes e Soluções.....	38
3.1.3 Animais.....	40
3.2 METODOLOGIA	40
3.2.1 Obtenção do salicilato de borneol e tratamento dos animais	40
3.2.2 Avaliação da toxicidade aguda do salicilato de borneol.....	41
3.2.3 Estudo da atividade anti-inflamatória do salicilato de borneol	42
3.2.3.1 Edema de pata induzido por carragenina	42
3.2.3.2 Edema de pata induzido por BK, PGE2 ou HIS.....	43
3.2.3.3 Aumento da permeabilidade vascular induzido pelo ácido acético.....	43
3.2.3.4 Peritonite induzida por zimosan.....	44
3.2.4 Estudo da atividade <i>in vitro</i> do salicilato de borneol	45
3.2.5 Análise estatística	47
4.0 RESULTADOS.....	49
4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO SALICILATO DE BORNEOL	49
4.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO SALICILATO DE BORNEOL.....	53
4.2.1 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por carragenina.....	53
4.2.2 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por prostaglandina E2 (PGE2)	55

4.2.3 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por bradicinina	57
4.2.4 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por histamina	59
4.2.5 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol na permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético.....	61
4.2.6 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol na peritonite induzida por zimosan	62
4.3 ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DO SALICILATO DE BORNEOL	70
 5.0 DISCUSSÃO	 74
 6.0 CONCLUSÕES	 83
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 85
 ANEXOS	 ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

INTRODUÇÃO

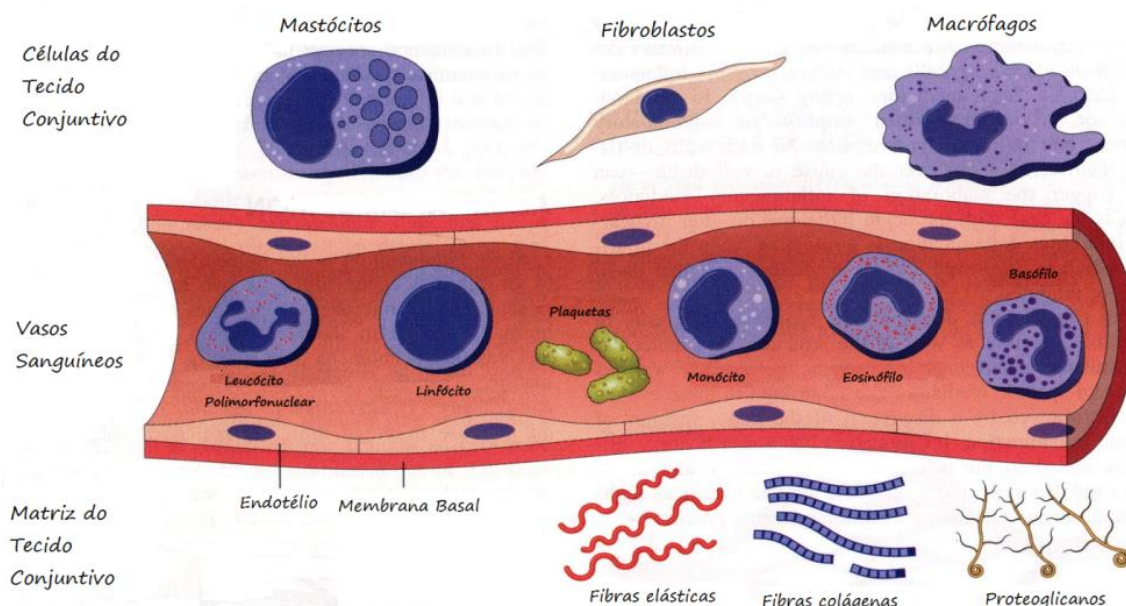
1.0 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser descrita como uma reação complexa dos tecidos vascularizados a vários agentes físicos, químicos e biológicos, como micro-organismos, toxinas e células necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos, produção e liberação de mediadores que podem levar a reações sistêmicas. Embora a inflamação tenha funções homeostáticas e auxiliares no reparo tecidual, os processos inflamatórios também podem causar danos e doença. A resposta inflamatória consiste em dois componentes principais: *reações vasculares* e *reações celulares*. Muitos tecidos, células e mediadores estão envolvidos nessas reações; entre eles podemos destacar a participação efetiva do endotélio vascular, das células do tecido conjuntivo circundante e dos leucócitos, além dos mediadores plasmáticos (Figura 1) (MAJNO, 1975; MEDZHITOV, 2010).

As principais características e os estudos do processo inflamatório vêm sendo registrados de formas diversas, entre elas antigos papiros egípcios que datam de 3000 a.C. Celso (I d.C.) foi quem primeiro descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: *dor, calor, rubor, tumor*. No século XIX Augustus Waller e Julius Conheim, analisando tecidos vivos sob o microscópio, observaram alterações vasculares que levavam ao extravasamento de fluidos para o tecido lesionado, fornecendo as bases fisiológicas dos sinais cardinais. O quinto sinal cardinal, a perda da função, foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858, em seu livro *Cellular Pathologie* (MAJNO, G., 1975; MEDZHITOV, R., 2010).

Figura 1 – Células e tecidos envolvidos na resposta inflamatória



Diversas células e tecidos estão envolvidos com a resposta inflamatória, entre eles as células do endotélio, leucócitos e células do tecido conjuntivo

(FONTE: KUMAR, V., *et al.*, 2005)

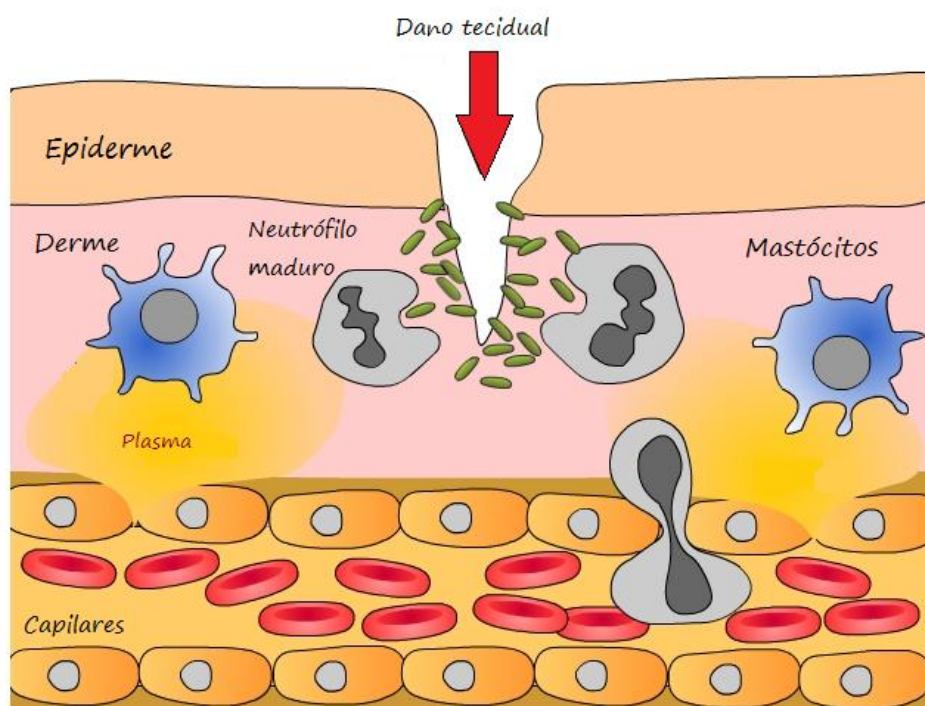
Ao longo da história, inúmeros pesquisadores relataram suas descobertas acerca de mecanismos presentes na resposta inflamatória, entre eles o biólogo russo Ellie Metchnikoff, que em 1880 descreveu as células fagocíticas observando a ingestão de espinhos de rosas pelos amebócitos de larvas de estrelas-do-mar e de bactérias pelos leucócitos humanos (HEIFETS, L., 1982). Metchnikoff deduziu que o propósito da inflamação seria o de levar células fagocitárias até o tecido lesionado, contrariando a teoria da imunidade humoral de Paul Ehrlich, que propunha que a inflamação serviria para levar *fatores do soro* para o tecido. Em pouco tempo ficou claro que tanto os *fatores do soro* quanto as células fagocíticas têm igual importância no processo inflamatório, e Metchnikoff dividiu com Paul Ehrlich o Prêmio Nobel de 1908. (KUMAR, V. *et al.*, 2005)

1.2 INFLAMAÇÃO AGUDA

A inflamação aguda é uma resposta rápida que se inicia imediatamente após o dano tecidual e tem duração curta – minutos, horas ou dias – conduzindo à

eliminação imediata do agente nocivo, além do reparo tecidual. Uma grande variedade de agentes etiológicos, incluindo danos mecânicos, infecções, lesões químicas, queimaduras, radiação, injúria tecidual e choque, podem induzir a inflamação aguda (SCHMID-SCHONBEIN, G. W., 2006). Especificamente, a lesão do tecido resulta em dano no endotélio capilar e degranulação de mastócitos (Figura 2). As aminas vasoativas por estes liberadas induzem a vasodilatação transitória e aumento da permeabilidade vascular. Ao mesmo tempo, plaquetas e leucócitos aderem à superfície alterada do endotélio, e ativam o sistema das cininas no plasma exsudado que conduz à prolongada fase de aumento da permeabilidade vascular. (HERSH, E. M. e BODEY, G. P., 1970). O sistema de plasminogênio-plasmina também é ativado. Na sequência e, como resultado dos eventos anteriores, o sistema complemento é ativado e diversos mediadores quimiotáticos são liberados. Isto resulta em migração e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Além de liberar mais mediadores amplificando o sinal, neutrófilos também fagocitam o agente agressor e os produtos da lesão do tecido.

Figura 2 – Visão geral do processo inflamatório agudo



O processo inflamatório inicia-se com o dano tecidual, levando ao tecido células e mediadores importantes para o restabelecimento da homeostase.

(FONTE: <http://www.hcc.bcu.ac.uk/physiology/inflammation.htm>)

Após a remoção do agente agressor e declínio na atividade dos vários fatores lisossômicos, cessa a resposta inflamatória aguda. Se houver a persistência do agente etiológico, evolui-se para a inflamação crônica, caracterizada pela infiltração predominante de células mononucleares no sítio inflamatório, aumento da angiogênese, fibrose e necrose tecidual (FUJIWARA, N. e KOBAYASHI, K., 2005). Isto resulta da diminuição da infiltração de polimorfonucleares e da proliferação local e persistência das células mononucleares. (HERSH, E. M. e BODEY, G. P., 1970; SPECTOR, W. G. *et al.*, 1968) A lesão tecidual prolongada pode ocasionar câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas. Para que isso não ocorra, é necessário limitar o processo inflamatório pela eliminação do infiltrado celular e de seus produtos potencialmente tóxicos (AGGARWAL, B. B. *et al.*, 2006; BALKWILL, F. e COUSSENS, L. M., 2004).

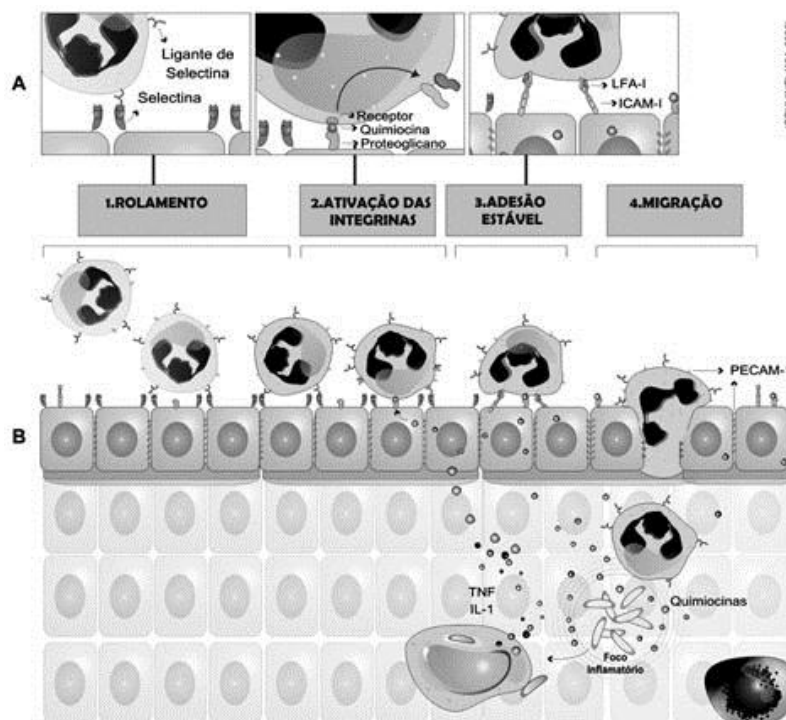
Na inflamação os vasos sanguíneos sofrem alterações que facilitam o movimento de proteínas plasmáticas e células sanguíneas para o local da lesão. Inicialmente, a vasodilatação mediada pela histamina e pelo óxido nítrico, que agem no músculo liso vascular, se inicia pelas arteríolas e aumenta o leito capilar na região inflamada. Posteriormente, ocorre um aumento da permeabilidade vascular devido à formação de fendas no endotélio das vênulas após a ligação de histamina e leucotrienos aos seus receptores, e ativação de vias de sinalização que levam à fosforilação de proteínas contráteis e do citoesqueleto; desta forma, as células endoteliais se contraem e separam as junções intercelulares, sendo este evento de curta duração. Citocinas pró-inflamatórias, cininas e produtos do complemento também são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, entretanto sua ação se dá em períodos entre 2 e 8 horas pós-estímulo. Outros mecanismos como o dano direto e necrose do endotélio podem levar ao aumento da permeabilidade de forma prolongada. O extravasamento de fluido rico em proteínas, conhecido por exsudato, para o sítio inflamado leva à hemoconcentração, favorecendo a estase venosa. Este mecanismo é importante, pois o fluxo sanguíneo reduzido aumenta o contato dos leucócitos com o endotélio e permite a adesão e posterior transmigração destas células para o sítio inflamatório. (LENTSCH, A. B. e WARD, P. A., 2000)

A passagem dos leucócitos do lúmen vascular para o tecido é guiada por interações adesivas específicas, dependentes da existência de diferentes famílias de moléculas de adesão e seus respectivos receptores nos leucócitos e nas células

endoteliais. Os eventos envolvidos nestes processos - marginação e captura dos leucócitos livres circulantes do lúmen vascular; rolagem, ativação, firme adesão e extensão na superfície do endotélio; e por fim a diapedese - compõem a teoria do recrutamento leucocitário (Figura 3). O pré-requisito para todos esses passos é a ativação da monocamada de células endoteliais por sinais derivados do tecido, levando à expressão de moléculas de adesão e a secreção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais (NOURSHARGH, S. e MARELLI-BERG, F. M., 2005; WALZOG, B. e GAEHTGENS, P., 2000). Os principais grupos de moléculas de adesão são as selectinas, importantes no rolamento; as integrinas, na forte adesão; e a superfamília das moléculas de imunoglobulinas (Ig), como o PECAM-1 (molécula de adesão plaqueta-endotélio celular), imprescindível na transmigração. Os principais receptores de adesão endotelial incluem as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão da célula vascular (VCAM) (KUMAR, V. *et al.*, 2005; NOURSHARGH, S. e MARELLI-BERG, F. M., 2005)

Para a migração de polimorfonucleares (PMN), evento importante nos processos inflamatórios agudos, a indução do ligante da L-selectina e de P e E-selectinas no endotélio microvascular por mediadores pró-inflamatórios teciduais dá início ao processo de captura e rolagem. A etapa de recrutamento é mediada por β 2-integrinas, uma família de moléculas de adesão transmembrana expressas na superfície de leucócitos (WALZOG, B. e GAEHTGENS, P., 2000). As moléculas participantes no processo de adesão leucocitária constituem alvos de vários agentes anti-inflamatórios, como corticosteroides, por diminuírem a expressão de moléculas de adesão no endotélio e na superfície do neutrófilo, ou salicilatos, que bloqueiam a ativação de MAC-1 levando a inibição da adesão neutrofílica (FILEP, J. G. *et al.*, 1997; PILLINGER, M. H. *et al.*, 1998)

Figura 3 – Migração dos leucócitos para o sítio inflamatório.



A produção de mediadores da resposta inflamatória no tecido lesado leva à expressão, no endotélio e nos leucócitos, de moléculas fundamentais para a adesão, rolamento e migração leucocitária. Em (A) observam-se as etapas e moléculas responsáveis pela captura de leucócitos circulantes, sua rolagem, ativação, adesão e extensão e em (B) observa-se a diapedese transendotelial a favor do gradiente de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no sítio inflamatório.

(FONTE: MESQUITA JR., *et. al.*, 2008)

As primeiras células a extravasarem a corrente sanguínea em direção aos tecidos inflamados são os neutrófilos. Estes pertencem, juntamente com os eosinófilos e basófilos, à subpopulação de leucócitos denominadas granulócitos (ou polimorfonucleares - PMN). Constituem a maior parte dos leucócitos circulantes em humanos (50-70% em condições fisiológicas, sendo recrutados na medula óssea em condições inflamatórias) e são eliminados em questão de horas quando na circulação (PORTH, C. M., 2010). Durante os processos inflamatórios, entretanto, aumenta a expressão de sinais de sobrevivência para estes leucócitos, que podem permanecer liberando mediadores e espécies reativas de oxigênio (ROS) por até três dias no local da lesão. (ALTZNAUER, F. *et al.*, 2004; LAUBER, K. *et al.*, 2003; PORTH, C. M., 2010; TAN, B. H. *et al.*, 2006). A fagocitose de neutrófilos em apoptose, realizada pelos macrófagos teciduais, é um dos sinais que regulam o final do processo inflamatório, levando à redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios (PORTH, C. M., 2010). Em contraste, a migração continuada destes

para o tecido é uma característica de diversos processos inflamatórios que podem se tornar crônicos, sendo a redução do número de neutrófilos um dos alvos no controle de diversas doenças inflamatórias (MCDONALD, B. *et al.*, 2010; NATHAN, C., 2006).

Os macrófagos são células residentes do tecido conjuntivo, sendo originados de monócitos circulantes que migram para o tecido e se diferenciam. (MEDZHITOV, R., 2010; MORI, T. *et al.*, 2011). No processo inflamatório, os macrófagos possuem três funções importantes; apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação por meio da produção de várias citocinas e fatores de crescimento, desempenhando um papel fundamental na iniciação, manutenção e resolução do processo inflamatório (FUJIWARA, N. e KOBAYASHI, K., 2005). Os sinais de ativação para estas células incluem citocinas tais como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-12, fator estimulante colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF), componentes bacterianos, proteínas da matriz extracelular, e outros mediadores químicos (FUJIWARA, N. e KOBAYASHI, K., 2005). Após a estimulação, os macrófagos produzem várias citocinas e quimiocinas e por serem as principais células produtoras de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1, desempenham um papel fundamental no início da inflamação (CASTELLHEIM, A. *et al.*, 2009; FEGHALI, C. A. e WRIGHT, T. M., 1997; MEDZHITOV, R., 2010). Além disto, os macrófagos expressam receptores *scavenger* que os tornam capazes de fagocitar células apoptóticas e modular negativamente a liberação de mediadores do processo inflamatório (FADOK, V. A. *et al.*, 1998). Desta forma, substâncias capazes de modular a atividade destas células são vistas como novas estratégias no controle dos processos inflamatórios (RODERO, M. P. e KHOSROTEHRANI, K., 2010).

Os mediadores inflamatórios são responsáveis pelos eventos vasculares e celulares decorrentes da injúria tecidual. Estes podem ser classificados de acordo com suas propriedades bioquímicas em classes distintas: aminas e peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (MEDZHITOV, 2010).

As principais aminas vasoativas (ou aminas biogênicas) participantes do processo inflamatório são a serotonina e a histamina. Estas são liberadas de maneira *tudo-ou-nada*, e causam efeitos vasculares complexos, que dependem dos receptores a que se ligam. Estão envolvidas na formação de edema, prurido, e na

dor inflamatória, uma vez que participam dos mecanismos causadores da vasoconstrição inicial e vasodilatação subsequente (BRAND, C. *et al.*, 2002; COTRAN, R. S. *et al.*, 1996; DRAY, A., 1995; SHEPRO, D. e DUNHAM, B., 1986). Nos processos inflamatórios a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é liberada principalmente de mastócitos e plaquetas ativadas, exercendo papel fundamental para a iniciação da inflamação pela ativação do endotélio capilar com aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células T efectoras. Além disto, está envolvida na sensibilização de nociceptores periféricos e centrais, regulação do sono, temperatura e pressão arterial. (BARNES, P. J., 2001; GONZALEZ-REY, E. *et al.*, 2007). A histamina é uma proteína de baixo peso molecular, derivada da descarboxilação da L-histidina, e está distribuída por todos os tecidos, sendo os mastócitos do tecido conjuntivo sua fonte principal. (BARNES, P. J., 2001; GONZALEZ-REY, E. *et al.*, 2007). Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores acoplados à proteína G (HR1, HR2, HR3 e HR4), que podem levar à formação de fosfatidil inositol (IP₃), aumento dos níveis de cálcio intracelular, ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e da via da adenilato ciclase (HILL, S. J. *et al.*, 1997; JUTEL, M. *et al.*, 2005).

Dentre os peptídeos vasoativos, destaca-se a importância da bradicinina (BK) no processo inflamatório agudo. A BK é um nonapeptídeo positivamente carregado, que pertence à família das cininas, peptídeos formados a partir dos cininogênios no plasma e em tecidos periféricos pelas enzimas denominadas calicreínas. As cininas atuam sobre diferentes mecanismos fisiológicos, incluindo o controle da pressão arterial, contração de músculo liso ou relaxamento, permeabilidade vascular e mecanismo de transmissão da dor (FERREIRA, J. *et al.*, 2002). Tais ações se relacionam com a ativação de receptores denominados B₁ e B₂, com sete domínios transmembrana. Receptores B₁ são pouco expressos em tecidos saudáveis, mas sua expressão pode ser aumentada em quadros de injúria e infecção. Os receptores B₂ vêm sendo relacionados com os sinais cardinais da inflamação aguda, como o aumento de permeabilidade vascular, vasoconstrição e dor através da ativação de nervos sensoriais temporários (MCLEAN, P. G. *et al.*, 2000), ao passo que B₁ participa da fase crônica da resposta inflamatória (CALIXTO, J. B. *et al.*, 2000).

O sistema complemento é formado por cerca de 35 proteínas, entre elas enzimas, cofatores, inibidores ou inativadores, proteínas integradas de membrana e receptores para fatores do complemento. A ativação deste sistema se dá pelas vias clássica, mediada pelo complexo antígeno-anticorpo; alternativa, independente de anticorpos ou da lecitina ligadora de manose, que se liga a componentes da superfície celular de bactérias e vírus (KUMAR, V. *et al.*, 2005; NYSTROM, P. O., 1998; SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T., 2004). Os fragmentos C3a, C4a e C5a são os componentes de maior importância na inflamação aguda, e são denominados anafilatoxinas. O fragmento C5a é um potente mediador da inflamação local e sistêmica, e a interação com seu receptor C5aR, leva à atração e agregação neutrofílica, quimiotaxia, atividade citotóxica e liberação de metabólitos reativos do oxigênio e de proteases de eosinófilos, monócitos e neutrófilos. O C5a também aumenta a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (KUMAR, V. *et al.*, 2005). Os fragmentos C3b e seu produto de clivagem iC3b agem como opsoninas, facilitando a fagocitose por neutrófilos e macrófagos; os fragmentos C5b, C6, C7, C8 e C9 atuam em conjunto na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) que, em células do organismo, ativa fosfolipases e estimula uma variedade de atividades celulares, incluindo a síntese de prostanoídes, leucotrienos e citocinas. A ativação do complemento também induz células do tecido conjuntivo a secretar aminas e peptídeos vasoativos (KUMAR, V. *et al.*, 2005; NYSTROM, P. O., 1998; SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T., 2004).

Os mediadores lipídicos (eicosanóides e fatores de ativação plaquetária) são derivados de fosfolipídeos, presentes na membrana celular. Após a ativação por íons Ca^{+2} intracelular, a fosfolipase A2 (PLA2) citosólica gera ácido araquidônico (AA) e ácido lisofosfatídico, a partir da fosfatidilcolina. O AA é metabolizado em eicosanóides, quer por ciclo-oxigenases (COX1 e COX2), que geram prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TX), ou por lipoxigenases (LOX), que geram leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX). PGE2 e PGI2 produzem vasodilatação, e a PGE2 também é um potente indutor de dor e febre. LX inibem a inflamação, além de promover a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual. A segunda classe de mediadores lipídicos, os fatores de ativação plaquetária (PAF), são gerados a partir da acetilação do ácido lisofosfatídico e são responsáveis por ativar vários processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de

leucócitos, vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas (HIGGS, G. A. *et al.*, 1984; SERHAN, C. N., 2007).

As citocinas têm um importante papel regulador sobre o início, a manutenção e o término das reações inflamatórias. Diversas moléculas já foram identificadas, e cada vez mais tem se descoberto sobre seus receptores e vias de sinalização. Esta família de mediadores inclui as interleucinas (IL), interferons (IFN), fator de crescimento tumoral- β (TGF- β), fatores de necrose tumoral (TNF) e as quimiocinas. Enquanto algumas destas citocinas, como o TGF- β , o antagonista do receptor da IL-1 (IL1-Ra) e alguns membros da IL-10 possuem funções anti-inflamatórias, a maioria exerce efeitos pró-inflamatórios, pela ação em receptores específicos de citocinas em células-alvo. Entre as citocinas mais conhecidas, TNF- α , IL-1 β e IL-6 são bastante estudadas devido aos seus papéis na patofisiologia de muitas respostas inflamatórias, assim como no choque séptico (EL ALWANI, M. *et al.*, 2006; MORI, T. *et al.*, 2011; SAADANE, A. *et al.*, 2011).

As principais citocinas pró-inflamatórias causam febre e estimulam a hipófise a liberar hormônios do estresse. Elas também estimulam o fígado a sintetizar inúmeras proteínas de fase aguda como proteína C reativa, fibrinogênio e importantes antiproteases (NYSTROM, P. O., 1998). O TNF- α é produzido principalmente por fagócitos mononucleares, mas pode ser produzido por outras células (endoteliais, neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* – NK – e mastócitos) em resposta a diversos estímulos inflamatórios, capazes de ativar as vias das quinases ativadas por mitógenos (MAPK), NF- κ B e p38. (EL ALWANI, M. *et al.*, 2006; WAGNER, J. G. e ROTH, R. A., 2000). O TNF- α exerce potente efeito inflamatório: induz a expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1 (CUZZOCREA, S., 2005; EL ALWANI, M. *et al.*, 2006; TSOYI, K. *et al.*, 2010; ZHANG, F. *et al.*, 2002), ativa neutrófilos e fagócitos mononucleares, induz a produção do fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (MAMBOLE, A. *et al.*, 2010; SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T., 2004), aumenta a permeabilidade vascular; promove a liberação do NF- κ B no citosol, ao estimular a degradação da subunidade inibitória I κ B. Entre seus efeitos sistêmicos estão a indução de febre, estimulação da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação da cascata de coagulação, supressão miocárdica, indução de vasodilatadores

sistêmicos com consequente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia (SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T., 2004)

Assim como o TNF- α , a IL-1 β é um potente mediador da inflamação e da febre (WAGNER, J. G. e ROTH, R. A., 2000). Os quatro membros da família da IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra e IL-18) são produzidos de forma semelhante ao TNF- α e, frequentemente, são encontrados juntos em inúmeros cenários inflamatórios (EL ALWANI, M. *et al.*, 2006; WAGNER, J. G. e ROTH, R. A., 2000). Seus efeitos fisiológicos são essencialmente idênticos aos do TNF- α , entretanto, a IL-1 β não induz, por si só, lesão tecidual ou morte apoptótica, embora possa intensificar os efeitos lesivos do TNF- α (EL ALWANI, M. *et al.*, 2006; SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T., 2004; WAGNER, J. G. e ROTH, R. A., 2000). A secreção das citocinas TNF- α e IL-1 β , mesmo que transitória, é suficiente para induzir, dentre outros mediadores, uma cascata de citocinas pró-inflamatórias secundárias, incluindo IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, GM-CSF e proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α/β) (FEGHALI, C. A. e WRIGHT, T. M., 1997).

A IL-6, secretada por macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, é o principal sinal para a resposta de fase aguda hepática, induzindo a produção de proteína C-reativa, e serve como fator de crescimento para linfócitos B (EL ALWANI, M. *et al.*, 2006; SHERWOOD, E. R. e TOLIVER-KINSKY, T., 2004). A produção de IL-6 está relacionada com o mecanismo de homeostase do processo inflamatório, uma vez que esta exerce um *feedback* negativo na síntese de TNF- α e IL-1 β (EL ALWANI, M. *et al.*, 2006).

A IL-10, inicialmente reconhecida pela sua capacidade de inibir a ativação e função efetora de células T, monócitos e macrófagos, é uma citocina multifuncional com diversos efeitos, entre eles limitar e, finalmente, encerrar as respostas inflamatórias. Em adição, a IL-10 regula o crescimento e diferenciação de células B, células NK, linfócitos T regulatórios, citotóxicos e auxiliares, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. Os efeitos da IL-10 sobre a produção de quimiocinas e citocinas são cruciais para este mecanismo regulador, uma vez que esta citocina inibe a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, quimiocinas das subclasses CC e CXC, além de se autorregular. A IL-10 também reduz a expressão

dos genes da COX2, reduzindo portanto a liberação de prostaglandinas em condições inflamatórias, e modula negativamente a capacidade das diversas células fagocíticas de apresentarem antígenos aos linfócitos T. Em estudos genômicos de diferentes classes de vírus, têm sido observadas sequências homólogas ao gene da IL-10 humana, corroborando com os dados que apontam para sua importância na imunorregulação, principalmente em processos inflamatórios (MOORE, K. W. *et al.*, 2001).

As quimiocinas constituem uma superfamília de proteínas com baixo peso molecular (8-14 kDa) que são importantes para a migração de leucócitos no desenvolvimento normal do sistema imune, assim como, na regulação da infiltração de células inflamatórias sob condições patológicas (BANISOR, I. *et al.*, 2005; BIBER, K. *et al.*, 2002; PROUDFOOT, A. E., 2002). São produzidas por diferentes tipos celulares, como linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais (TRAN, E. H. *et al.*, 2000). Além das funções no recrutamento de leucócitos, as quimiocinas também podem atuar na regulação e na polarização da resposta imune, apoptose, angiogênese, mitose, metástase tumoral, cicatrização de feridas e secreção de citocinas, metaloproteinases de matriz (MMPs), radicais livres e óxido nítrico (BANISOR, I. *et al.*, 2005; D'AMBROSIO, D. *et al.*, 2003; MAHAD, D. *et al.*, 2006).

O óxido nítrico (NO), produzido em grandes quantidades durante o processo inflamatório, é um radical livre de meia-vida curta, gerado a partir de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e é bastante eficaz na eliminação de patógenos (NATHAN, C. e XIE, Q. W., 1994). As isoformas constitutivas (cálcio-dependente), NOS neuronal (nNOS ou bNOS) e a NOS endotelial (eNOS), produzem pequenas quantidades de NO, que atua como neurotransmissor e vasodilatador, respectivamente. A isoforma induzível (cálcio-independente), iNOS, produz quantidades muito maiores de NO e é expressa apenas durante a inflamação. Enquanto a iNOS pode produzir quantidades prejudiciais de NO, a eNOS e a nNOS, em condições fisiológicas, produzem quantidades benéficas desse radical livre. A iNOS é induzida por citocinas, como IFN- γ , TNF- α , IL-1 e lipopolissacarídeo (LPS) (DAVIS, K. L. *et al.*, 2001; LOWENSTEIN, C. J. e PADALKO, E., 2004; MONCADA, S. e HIGGS, A., 1993)

1.3 FARMACOTERAPIA DAS INFLAMAÇÕES

Em alguns casos, as manifestações sistêmicas do processo inflamatório representam um agravo crônico à saúde ou mesmo risco de morte para o indivíduo, sendo necessário o emprego de terapia anti-inflamatória adequada (NATHAN, C. e DING, A., 2010).

Dentre os principais fármacos utilizados na clínica, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm a aplicação mais ampla. Em sua maioria, agem inibindo a atividade da COX-1 e COX-2, inibindo assim, a síntese de PG e TX (BURIAN, M. e GEISLINGER, G., 2005; MORROW, J. D. e ROBERTS II, L. J., 2003). O ácido acetilsalicílico (AAS) é o protótipo da classe e é capaz de acetilar irreversivelmente a COX. O AAS, introduzido na medicina em 1899, foi sintetizado em 1887, na Alemanha, baseado nas propriedades anti-inflamatórias do ácido salicílico extraído em 1828 das cascas do salgueiro (*Salix alba*) (AMANN, R. e PESKAR, B. A., 2002; VANE, J. R. e BOTTING, R. M., 1998). Além do AAS, outros fármacos como o ibuprofeno, derivado do ácido propiônico, a indometacina, da classe dos derivados do ácido acético, e os ácidos enólicos, como o piroxicam, são considerados anti-inflamatórios não-esteroidais. Todos estes derivados de ácidos competem com o AA pelo local ativo da COX (MORROW, J. D. e ROBERTS II, L. J., 2003). Além da modulação da atividade das isoformas da COX, já foram descritos outros mecanismos de ação relacionados com a atividade anti-inflamatória dos derivados salicílicos, entre eles a inibição de NF- κ B (FRANTZ, B. e O'NEILL, E. A., 1995; GRILLI, M. *et al.*, 1996; KOPP, E. e GHOSH, S., 1994) e a inativação da ERK, proteína pertencente à subfamília de proteínas-quinase, e consequente redução da capacidade de adesão de neutrófilos circulantes (PILLINGER, M. H. *et al.*, 1998). AINEs são os medicamentos mais comumente usados nas doenças inflamatórias, contudo causam sérios efeitos adversos no trato gastrointestinal, além de falência renal e asma. (VANE, J. R. e BOTTING, R. M., 1998).

Glicocorticoides são mediadores anti-inflamatórios endógenos potentes, liberados em minutos em resposta ao estresse e à lesão tecidual, capazes de controlar a severidade da resposta inflamatória. Fármacos glicocorticoides sintéticos

agem da mesma forma que mediadores endógenos, através de receptores nucleares (GR) ativados pelo complexo glicocorticoide-GR que migram para o núcleo e interagem com elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE). Esta ligação leva à ativação ou à inibição da transcrição de genes alvo, modulando a resposta inflamatória de maneira efetiva e duradoura. (GILROY, D. W. *et al.*, 2004; SCHIMMER, B. P. e PARKER, K. L., 2003; WAGNER, J. G. e ROTH, R. A., 2000). Apesar de sua eficácia em controlar quadros inflamatórios agudos graves, a aplicação clínica dos glicocorticoides deve ser cuidadosa e limitada a curtos períodos de tempo, uma vez que os efeitos colaterais destes, principalmente quando da utilização sistêmica, incluem a supressão da liberação do cortisol (principal glicocorticoide endógeno) pelas glândulas adrenais. (SCHIMMER, B. P. e PARKER, K. L., 2003)

Assim, embora os processos inflamatórios sejam estudados há mais de dois séculos, a busca por novas estratégias terapêuticas para as condições inflamatórias que sejam eficazes em reduzir os danos sem interferir nos mecanismos regulatórios da inflamação se mostra uma necessidade premente. Diversos compostos naturais e sintéticos vêm sendo testados no tratamento das doenças inflamatórias, e o estudo de seus mecanismos de ação propiciará maior segurança para o seu emprego adequado na clínica. Entre as diversas estratégias utilizadas para a introdução de novos fármacos na terapêutica, as modificações moleculares mostram-se promissoras. Estas consistem na transformação química de moléculas conhecidas, com o objetivo de aumentar a potência e a segurança (WERMUTH, C. G., 2004).

O borneol (endo-1,7,7-trimetil-biciclo[2.2.1]heptan-2-ol) é um monoterpreno bicíclico presente no óleo volátil de muitas plantas medicinais, incluindo *Valeriana officinalis*, *Matricaria chamomilla* e *Lavandula officinalis*. Extratos destas plantas são usados tradicionalmente para aliviar sintomas de ansiedade, cansaço e insônia, e também para provocar analgesia e anestesia (PASSOS, C. S. *et al.*, 2009). O uso do borneol, por vezes citado como *cânfora de Borneo* (LEWIS, R. J., 2008), na medicina tradicional chinesa foi descrito há mais de um século como estimulante, afrodisíaco e em condições inflamatórias oftálmicas; do mesmo modo, foram descritas alterações importantes no sistema nervoso central (SNC) em diversos mamíferos tratados com altas doses de borneol. (HATTORI, A., 2000; 2001; STOCKMAN, R., 1888)

Estudos recentes demonstraram a capacidade do borneol de reduzir o dano cortical induzido pela isquemia em modelos experimentais. Este dado correlaciona-se com um estudo posterior, que relatou a redução na ativação da via do NF- κ B em células do SNC submetidas à deprivação de oxigênio e glicose *in vitro*, diminuindo a liberação de mediadores importantes nas lesões isquêmicas como o TNF- α (CHEN, X. H. *et al.*, 2010; LIU, R. *et al.*, 2011). Além disto, o borneol se mostrou capaz de reduzir a genotoxicidade causada por espécies reativas de oxigênio em hepatócitos e células testiculares, quando empregado em baixas doses (HORVATHOVA, E. *et al.*, 2009) e demonstrou capacidade vasorrelaxante *in vitro*, relacionada com o bloqueio de canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes (SILVA-FILHO, J. C. *et al.*, 2011).

Não há relatos da utilização do borneol e do salicilato de borneol em ensaios clínicos randomizados, em modelos de inflamação aguda; apesar disto em consultas extensas aos bancos de dados, encontram-se menções ao salicilato de borneol, nomeado nas farmacopeias como *Salit*TM (Tenneco) ou salicilato de bornila, sendo empregado na forma de emulsões de uso tópico em condições inflamatórias de origem reumática e nevralgias (Food and drugs analysis, 1914; THOMAS, M. R., 2000). Diante disto, o presente trabalho visa analisar o efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos.

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda e o efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol em modelos experimentais de inflamação aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar a toxicidade aguda do salicilato de borneol em camundongos *Swiss-Webster*;
- Estudar os efeitos do pré-tratamento com o salicilato de borneol no edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos em camundongos *Swiss-Webster* (carragenina, bradicinina, prostaglandina E2 e histamina);
- Analisar os efeitos do salicilato de borneol na peritonite induzida por zimosan em camundongos *Swiss-Webster*, tendo como parâmetros a migração celular e a liberação de citocinas e quimiocinas no fluido peritoneal;
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com o salicilato de borneol no extravasamento vascular induzido por ácido acético;
- Quantificar indiretamente o NO produzido em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss-Webster* estimulados ou não com LPS de *E. coli*, na presença do salicilato de borneol.

MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Equipamentos

- Agulhas de gavagem para camundongos (Insight®)
- Autoclave Vertical Phoenix AV SD 50
- Balança analítica Sartorius BP16S
- Balança para animais GEHAKA BG 4001
- Citômetro de fluxo FACScalibur BD Biosciences™
- Centrífuga refrigerada Thermo Scientific™
- Filtros para meio de cultura e para seringa Millex Millipore™ 0.22 µm
- Fluxo laminar VECO®
- Freezer -20°C FE26, ELECTROLUX
- Hemocitômetro L. Optik ATC-111020
- Incubadora de células MCO-15A, SANYO
- Leitora de microplacas ELISA ELx800, BIOTEK
- Micrômetro digital Instrutemp 070393611
- Microscópio óptico de inversão Hund Wetzlar mod. 6330

- Microscópio óptico BX40 OLYMPUS
- pHmetro W3B
- Pipetadores analíticos (Gilson e Eppendorff)
- Refrigerador Electrolux
- Vortex KMC-1300V VISION

3.1.2 Reagentes e Soluções

- Ácido Acetilsalicílico (AAS) (Roche®)
- Anticorpos monoclonais anti-MAC-3 e anti-GR-1 (BD Biosciences™, Pharmingen)
- Azul de Tripan 4% - 0,4 g de azul de Tripan (Merck®), PBS q.s.p. 10 mL
- Bradicinina (Sigma-Aldrich®)
- Caldo de Tioglicolato 3% - 1,5 g de caldo de tioglicolato (HIMEDIA®), água destilada q.s.p. 50 mL (solução autoclavada por 15 min a 121°C, 1 atm)
- Carragenina λ (Sigma-Aldrich®)
- Dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) (Nuclear)
- Histamina (Sigma-Aldrich®)
- Indometacina (Roche®)
- *Kits* para dosagem de citocinas murinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10) eBioscience®

- Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich®) – preparado em solução-estoque 1 mg/mL e sonicado por 10 minutos imediatamente antes da utilização
- MTT - brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (Sigma-Aldrich®)
- Prometazina (Roche®)
- Prostaglandina E2 (Sigma-Aldrich®)
- Reagente de Griess (Sigma-Aldrich®)
- RPMI 1640 sem vermelho de fenol - 10,4 g de meio RPMI em pó (Sigma-Aldrich®), 2 g de bicarbonato de sódio (Fluka), 5 mL de solução de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®), água MilliQ q.s.p. 1000 mL; esterilizado por filtração em membrana Millipore 0,22 µm.
- Solução de ácido acético 0,6% – 60 µl de ácido acético glacial (Reagen), água destilada 9,940 mL
- Solução de Azul de Evans 1% - 100 mg Azul de Evans (VETEC®), solução fisiológica de cloreto de sódio q.s.p 10 mL
- Solução de Turk – 10 mg cristal violeta (Merck®), 3 mL ácido acético glacial (Reagen), q.s.p 100 mL água destilada
- Solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) – 9 g NaCl (Fluka®), água destilada q.s.p 1000 mL
- Soro Bovino Fetal (SBF) Inativado GIBCO®
- Tampão fosfato-salina (PBS) - 3,99 g de NaCl (Fluka®) (136,88 mM), 0,1 g de KCl (2,7 mM), 0,061 g de KH₂PO₄ (0,9 mM), 0,454 g de Na₂HPO₄ (6,4 mM), água destilada q.s.p. 500 ml
- Tween 80 (VETEC®)
- Zimosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich®)

3.1.3 Animais

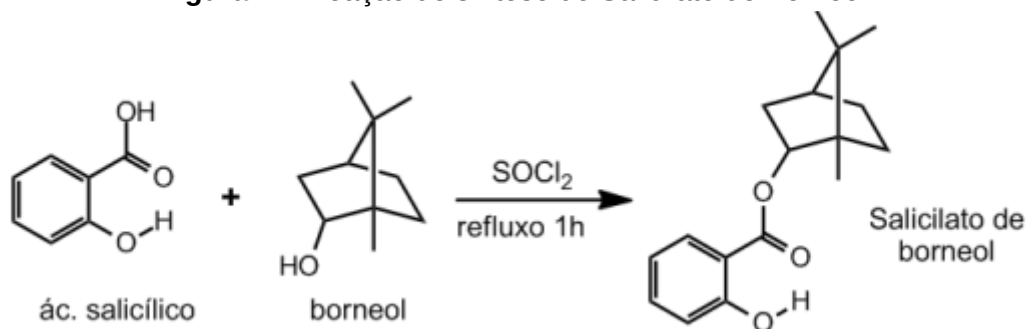
Foram utilizados nos protocolos experimentais camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*) variedade *Swiss-Webster*, entre 6 e 8 semanas de vida e peso médio de 25-30 g, fornecidos pelo biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia da UFPB. A utilização dos animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB/CCS) da Universidade Federal da Paraíba (CEPA Nº 0612/10).

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente apropriado, com temperatura controlada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12h, tendo livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº 11794/2008.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Obtenção do salicilato de borneol e tratamento dos animais

O salicilato de borneol é formado a partir da reação entre o ácido salicílico e o (-)-borneol. Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1 g de ácido salicílico, 1,12 g de (-)-borneol e 30 mL de dioxano, formando uma solução incolor. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL de cloreto de tionila. A mistura foi então levada ao condensador de refluxo em manta aquecedora, onde foi mantida por 1h. Após o tempo de reação, o dioxano foi eliminado em rotaevaporador e o resíduo sólido foi filtrado em coluna de gel de silício usando como eluente uma mistura hexano/acetato 90/10. Obteve-se 2g de salicilato de (-)-borneol.

Figura 4 – Reação de síntese do Salicilato de Borneol.

O salicilato de borneol é obtido com a esterificação do ácido salicílico e (-) borneol.
(FONTE: Luiz Cesar Rodrigues, 2011)

Para a utilização nos experimentos *in vivo*, o salicilato de borneol foi solubilizado em veículo composto de 5% de Tween 80 em solução fisiológica de cloreto de sódio, e administrado por via oral (v.o) com seringas e agulha de gavagem adequadas. Em todos os experimentos, o grupo controle não-tratado recebeu igual volume do veículo empregado na dissolução do tratamento, pela mesma via de administração. Para os experimentos *in vitro*, a solução fisiológica foi substituída por água MilliQ; após o preparo, a solução-estoque de salicilato de borneol foi filtrada em membrana de nitrocelulose 0,22 μM para garantir sua esterilidade. Todos os tratamentos foram preparados imediatamente antes de sua utilização.

O salicilato de borneol utilizado neste trabalho foi sintetizado e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luiz Cesar Rodrigues, membro do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e do Laboratório de Síntese Química do Centro de Biotecnologia da UFPB.

3.2.2 Avaliação da toxicidade aguda do salicilato de borneol

Após jejum de 12h, camundongos machos (n=6) e fêmeas (n=6), foram tratados com 1000 mg/kg de salicilato de borneol (v.o.) e mantidos em observação por um período de 4 h. Grupos de camundongos machos (n=6) e fêmeas (n=6)

foram utilizados como controle não tratado, conforme descrito no tópico 3.2.1. Durante o período de observação, foram registradas as principais alterações comportamentais e as mortes em decorrência do tratamento. Os camundongos que sobreviveram ao período de observação inicial foram monitorados por 14 dias para determinação da dose letal média (DL₅₀). Além da mortalidade, foram mensurados o consumo de água e ração, o ganho de peso médio e o peso médio dos órgãos (coração, baço, fígado e rins). (RIBEIRO-FILHO, J., 2011).

3.2.3 Estudo da atividade anti-inflamatória do salicilato de borneol

3.2.3.1 Edema de pata induzido por carragenina

Esta metodologia permite observar a atividade anti-inflamatória sistêmica do composto em teste a partir de um estímulo inflamatório local, bem como avaliar a melhor dose do tratamento, a ser empregada nas metodologias seguintes. (LEVY, L., 1969)

Camundongos (n=6) foram pesados e tratados, 1h antes do estímulo inflamatório, com diferentes doses do salicilato de borneol (50, 100 ou 200 mg/kg) ou droga padrão (AAS 200 mg/kg), além de um grupo controle não tratado (conforme descrito em 3.2.1). Decorrido o intervalo de 1h, foram administrados 20 µL de uma solução de carragenina 2,5% em tampão fosfato-salina (PBS) no coxim plantar da pata esquerda e volume semelhante de PBS na pata direita. (DE VASCONCELOS, D. I. *et al.*, 2011). Outro grupo de animais, doravante denominado *basal*, foi previamente tratado com solução salina 0,9% e recebeu injeção de 20 µL de PBS em ambas as patas, servindo como controle da eficácia na indução da inflamação.

O volume das patas foi mensurado com auxílio de micrômetro digital em intervalos de tempo de 0, 1, 2, 3, 4, 6 e 24h pós-estímulo, e os resultados

registrados como a diferença entre a medida das patas esquerda e direita. (DE VASCONCELOS, D. I. *et al.*, 2011).

3.2.3.2 Edema de pata induzido por BK, PGE2 ou HIS

Diferentes agentes flogísticos foram utilizados para avaliar a atividade anti-inflamatória do salicilato de borneol, no modelo de edema de pata: a prostaglandina E2, a bradicinina e a histamina figuram entre os principais mediadores presentes no sítio da inflamação, e foram utilizadas como estímulo inflamatório nos experimentos.

Camundongos (n=6) foram tratados 1h antes do estímulo inflamatório, com salicilato de borneol (200 mg/kg) ou droga controle (AAS 200 mg/kg em todos os experimentos, e prometazina 10 mg/kg via intramuscular - i.m. - para o edema induzido por histamina), além de um grupo controle não tratado, conforme descrito em 3.2.1. Decorrido o intervalo de 1h, foram administrados 20 µL de uma solução de PGE2 (5 µg/pata), BK (6 nmol/pata), ou HIS (100 µg/pata) no coxim plantar da pata esquerda e volume semelhante de PBS na pata direita (DE VASCONCELOS, D. I. *et al.*, 2011). O grupo basal foi previamente tratado com solução salina 0,9% e recebeu injeção de 20 µL de PBS em ambas as patas, servindo como controle da eficácia na indução da inflamação.

O volume das patas foi mensurado com auxílio de micrômetro digital em intervalos de tempo pós-estímulo de 15, 30 e 60 min para a PGE2; 15 e 30 min para a BK; 30 e 60 min para a HIS, e os resultados registrados como a diferença entre a medida das patas esquerda e direita (DE VASCONCELOS, D. I. *et al.*, 2011).

3.2.3.3 Aumento da permeabilidade vascular induzido pelo ácido acético

Camundongos (n=6) foram tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg) ou AAS (200 mg/kg) além de um grupo controle não tratado, conforme descrito em 3.2.1. Decorrido o intervalo de 1h, foram administrados 500 µL de solução de azul de

Evans (via intravenosa – i.v.). Decorridos 20 min, foram administrados 300 µL de uma solução de ácido acético 0,6% i.p. O grupo basal foi previamente tratado com solução salina 0,9%, recebeu a injeção de Azul de Evans 1% e, decorrido o mesmo intervalo de tempo, recebeu injeção de 300 µL de solução salina 0,9% i.p., servindo como controle da eficácia na indução da inflamação.

Vinte minutos após a injeção do ácido acético, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram o peritônio exposto e lavado com 10 mL de água destilada. As amostras obtidas foram transferidas para tubos do tipo falcon, centrifugadas (10 min, 1500 rpm, 8°C) e transferidas para placas de 96 poços (200 µL). A medida do extravasamento vascular foi estimada indiretamente pela intensidade de cor azul, obtida com a determinação das absorbâncias a 620 nm, utilizando leitora de microplacas. (MARINHO, M. G. V. *et al.*, 2004)

3.2.3.4 Peritonite induzida por zimosan

O modelo de inflamação peritoneal induzida por zimosan permite analisar a migração celular no sítio inflamatório, bem como a produção e liberação de mediadores da inflamação no fluido peritoneal.

Camundongos (n=6) foram tratados 1h antes do estímulo inflamatório, com salicilato de borneol (200 mg/kg) ou droga controle (AAS 200 mg/kg), além de um grupo controle não tratado, conforme descrito em 3.2.1. Decorrido o intervalo de 1h, a peritonite foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de 500 µL de uma suspensão de zimosan 2 mg/mL em solução salina 0,9% (DOHERTY, N. S. *et al.*, 1985; KOLACZKOWSKA, E. *et al.*, 2010). O grupo basal foi previamente tratado com solução salina 0,9% e recebeu injeção de 500 µL de solução salina i.p., servindo como controle da eficácia na indução da inflamação.

Quatro horas após a injeção do zimosan, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o peritônio exposto para a obtenção do lavado peritoneal com a injeção de 1 mL de PBS gelado, seguido de 1 min de massagem e coleta do

exsudato contendo fluidos e leucócitos. As amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas (1200 rpm, 10 min, 4°C). Os sobrenadantes coletados e armazenados a -20° C foram utilizados para dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10). As células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de PBS gelado, diluídas em solução de Turk na proporção de 1:40 e contadas em microscopia óptica, com ajuda de hemocitômetro.

Após a contagem e determinação do número de células totais, uma alíquota contendo $1,5 \times 10^6$ células de cada amostra foi adicionada a 3 mL de PBS (4° C) e centrifugada (1200 rpm, 10 min, 4°C). Após esta lavagem, o sobrenadante foi descartado e, para impedir ligações inespecíficas, as células foram mantidas na presença de 2 μ L de soro de camundongo diluído (1:100) por 5 min. Posteriormente as células foram incubadas com os anticorpos anti-MAC-3 e anti-GR-1, diluídos conforme recomendação do fabricante. Decorridos 30 min de incubação, as células foram novamente diluídas em 1 mL de PBS e centrifugadas (1200 rpm, 10 min, 4°C); o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 300 μ L de PBS e levadas ao citômetro de fluxo para análise diferencial por tamanho e granulosidade e por fluorescência. Para obtenção dos dados, foi utilizado o software *CellQuest* para Macintosh (BD Biosciences™).

3.2.4 Estudo da atividade *in vitro* do salicilato de borneol

Para o estudo *in vitro* da atividade anti-inflamatória do salicilato de borneol, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss-Webster*, elicitados com injeção intraperitoneal de 1 mL de caldo tioglicolato. Após cinco dias, foi realizado o lavado peritoneal com 10 mL de PBS (4°C) adicionado de 3% de SBF, seguido de massagem e secção do peritônio dos animais. O lavado foi coletado em tubos tipo Falcon e centrifugado (1200 rpm, 10 min, 4°C); o sobrenadante foi então descartado, as células sedimentadas imediatamente ressuspensas em 1 mL de meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de SBF (COSTA, H. F. *et al.*, 2008).

A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas em hemocitômetro com auxílio de solução de azul de Tripán. Os macrófagos viáveis foram então semeados em placas de cultura de fundo chato, com 96 poços, num total de 5×10^5 células/poço em 200 μ L de meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% de SBF, e incubados por 4 h (5% CO_2 a 37°C) para adesão à placa. Em seguida, os poços da placa foram lavados com PBS (37°C) para remover células não aderidas, e foram adicionados os tratamentos (salicilato de borneol preparado conforme descrito em 3.2.1, em concentração final de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). As células foram estimuladas ou não com LPS de *E. coli* (concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$), num volume final de 200 μL de meio RPMI sem vermelho de fenol por poço (COSTA, H. F. *et al.*, 2008). As placas foram incubadas (5% CO_2 a 37°C) por 24h, e o sobrenadante utilizado para a determinação indireta do NO, quantificando o nitrito com o reagente de Griess. (GREEN, L. C. *et al.*, 1982)

A viabilidade celular ao final do experimento foi determinada pelo método MTT, no qual o brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), é reduzido por desidrogenases mitocondriais em células metabolicamente ativas. (TIM, M., 1983) O formazan produzido na reação é proporcional à quantidade de células viáveis, e dada a sua solubilidade em DMSO, é possível mensurar sua produção utilizando-se instrumentos de fotometria. Para isto, após a remoção do sobrenadante, foram adicionados às células em cultura 20 μL de uma solução de MTT em PBS (5 mg/mL) em volume final de 200 μL /poço de meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado. As placas foram incubadas em estufa úmida (5% CO_2 a 37°C) por 24h, e ao final do período de incubação o sobrenadante foi removido e as células lisadas com 150 μL de DMSO, solubilizando o formazan precipitado no citoplasma. As absorbâncias foram determinadas após 5 minutos em leitor de microplacas (540 nm), e a produção de formazan pelas células tratadas e não tratadas, estimuladas ou não com LPS, foi determinada e comparada.

3.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos neste trabalho como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) e representam pelo menos dois experimentos independentes. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, onde se observou a distribuição gaussiana dos dados. Desta forma, optou-se pela Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas a fim de minimizar a interferência do grupo basal na determinação da variância entre as médias. Todas as análises foram desenvolvidas utilizando-se o software *GraphPad Prism* (v. 5.00 para Windows, San Diego CA USA, disponível em www.graphpad.com), e valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

Para os experimentos realizados com citometria de fluxo, foi utilizado o software WinMDI (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*, versão 2.9, disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>) na elaboração dos *dot plots* apresentados e cálculo das populações celulares.

RESULTADOS

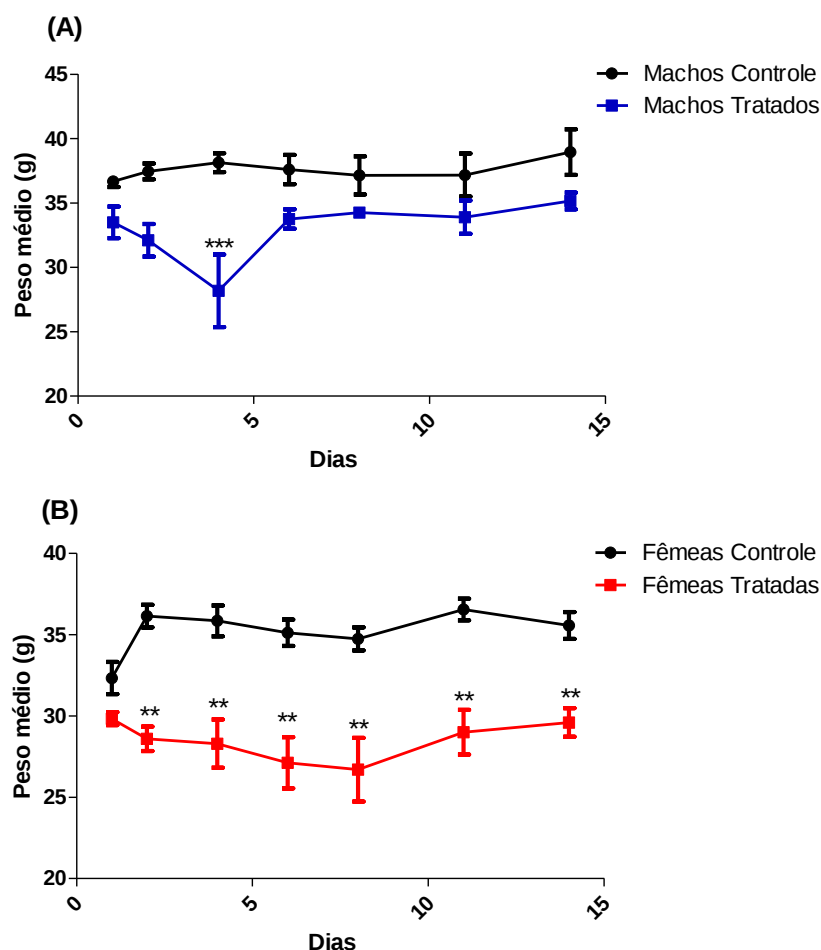
4.0 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO SALICILATO DE BORNEOL

Após a administração de 1000 mg/kg de salicilato de borneol (v.o.) em camundongos *Swiss-Webster* machos e fêmeas, durante o período inicial de 4h foram observadas alterações comportamentais compatíveis com o quadro de dor epigástrica, esperado após a administração de doses elevadas de AINEs. Não foram verificadas mortes no período inicial de observação nos diferentes grupos experimentais.

O peso e o consumo de ração dos animais foram acompanhados, em dias alternados, durante os 14 dias consecutivos à administração do tratamento. Observou-se inicialmente um declínio no ganho de peso em machos (26%, apenas no quarto dia) e fêmeas (média de 22%, do segundo ao décimo quarto dia) tratados com o salicilato de borneol, demonstrado na Figura 5, compensado com a progressão do experimento apenas nos camundongos machos.

Figura 5 – Efeito do tratamento com salicilato de borneol no peso médio de camundongos Swiss-Webster



Camundongos Swiss-Webster machos (A) e fêmeas (B) pré-tratados com salicilato de borneol (1000 mg/kg) foram avaliados durante 14 dias e o peso médio comparado com animais que receberam apenas o veículo (controle). Cada ponto no gráfico representa a média $\pm$ S.E.M do peso em gramas, determinado em dias alternados. Os asteriscos indicam a significância após análise de variância ANOVA *two-way*. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ quando comparados os grupos tratados aos respectivos grupos controle.

Além disto, na Tabela 1 é possível verificar uma redução significativa no consumo médio de água (50%) e ração (41%) pelas fêmeas que receberam o tratamento, quando comparadas com o controle. Tais alterações provavelmente estão relacionadas ao desconforto e à dor epigástrica provocados pelos AINEs quando administrados pela via oral.

Durante os 14 dias de observação 2 animais do grupo de machos tratados e 2 animais do grupo de fêmeas tratadas morreram. Estima-se, portanto que a DL_{50} do salicilato de borneol seja maior que 1000 mg/kg.

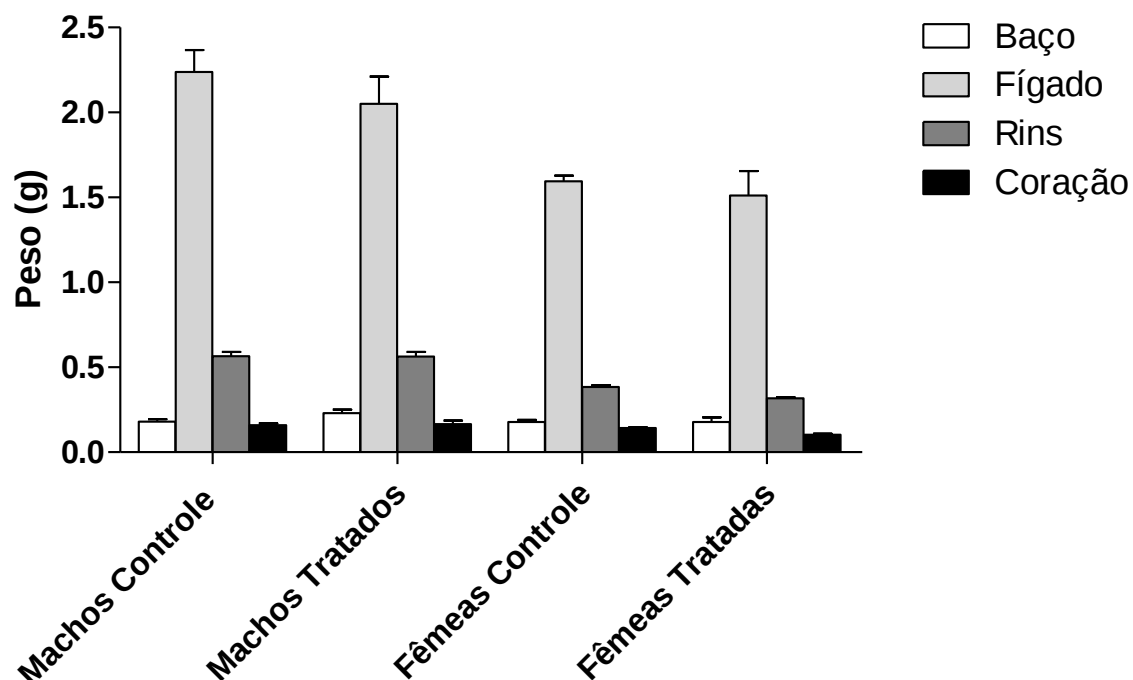
Tabela 1 – Consumo médio de água e ração, peso médio inicial e final e número de mortes por grupo de camundongos *Swiss-Webster* tratados com Salicilato de Borneol

Grupo (n=6)	Consumo de água (mL/animal/dia)	Consumo de ração (g/animal/dia)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Número de mortes
Machos Controle	10,14 ± 0,83	7,29 ± 0,66	36,6 ± 0,42	38,95 ± 1,77	0
Machos Tratados	7,93 ± 1,88	5,00 ± 0,79	33,5 ± 1,23	35,15 ± 0,65	2
Fêmeas Controle	10,13 ± 0,66	7,29 ± 0,74	32,3 ± 0,98	35,5 ± 0,82	0
Fêmeas Tratadas	5,07 ± 0,77**	4,24 ± 0,92*	29,8 ± 0,40	29,6 ± 0,87**	2

Camundongos *Swiss-Webster* machos e fêmeas pré-tratados com salicilato de borneol (1000 mg/kg) foram acompanhados durante 14 dias; o consumo médio de água e ração, bem como o peso médio inicial e final, foi comparado com animais que receberam apenas o veículo. Os dados são expressos como média ± E.P.M. Os asteriscos indicam a significância após análise de variância ANOVA *two-way*. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparados aos respectivos grupos controle.

Transcorridos os 14 dias de acompanhamento, os animais foram eutanasiados e o peso médio dos principais órgãos está representado na Figura 6. Não há diferença estatisticamente significativa entre o peso médio dos rins, fígado, baço e coração quando são comparados animais tratados e controles do mesmo sexo.

Figura 6 – Efeito do tratamento com o salicilato de borneol no peso dos principais órgãos



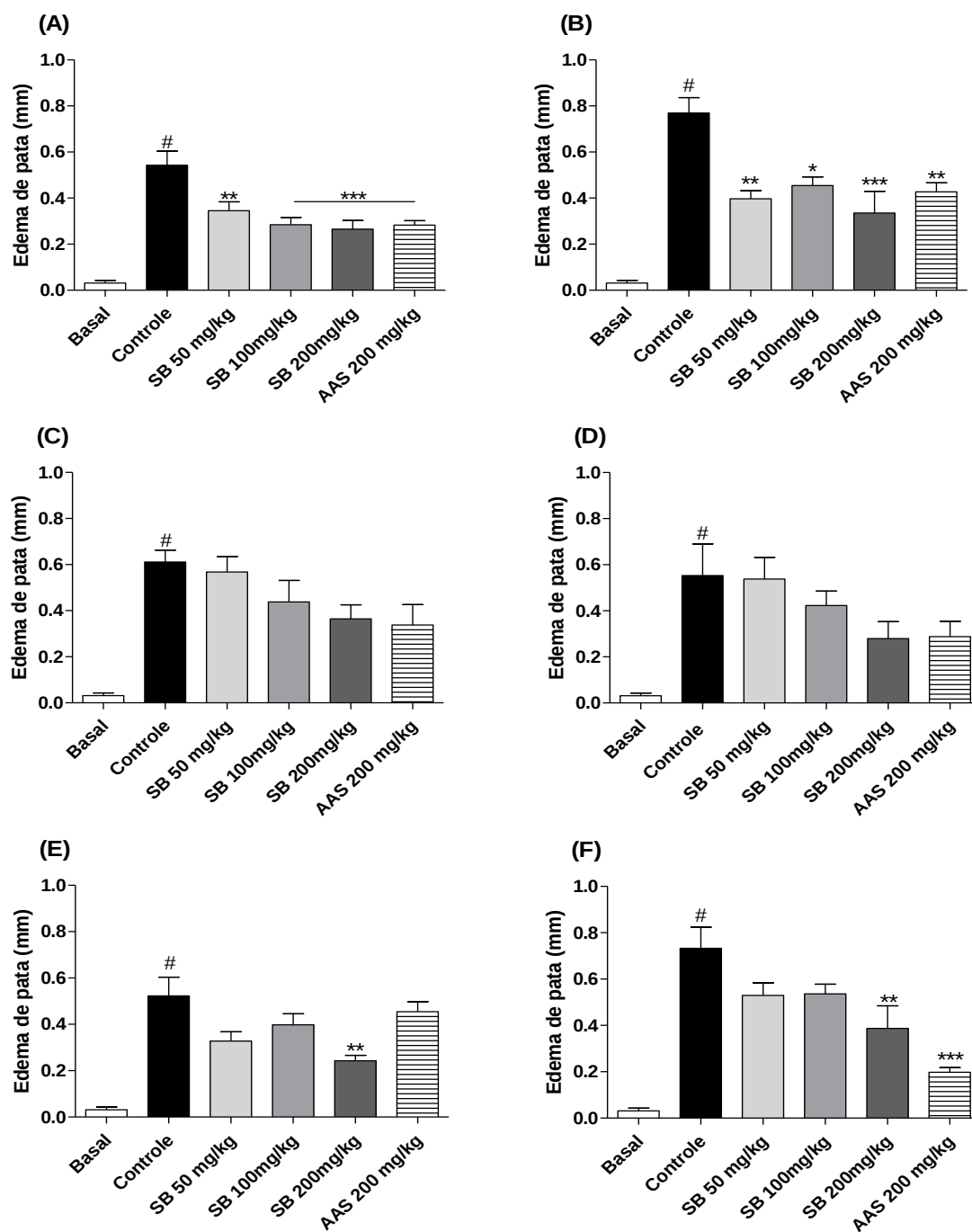
Camundongos Swiss-Webster machos e fêmeas pré-tratados com salicilato de borneol (1000 mg/kg) foram observados durante 14 dias e o peso médio dos órgãos ao final do período foi determinado e comparado com animais que receberam apenas o veículo. Os dados são expressos como a média $\pm$ S.E.M e foram submetidos à análise de variância ANOVA *two-way*.

4.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO SALICILATO DE BORNEOL

4.2.1 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por carragenina

A Figura 7 demonstra que o tratamento com o salicilato de borneol na dose de 200 mg/kg foi capaz de inibir significativamente ($p<0,05$) a formação do edema nos tempos de 1h (51% - A), 2h (56% - B), 6h (53% - E) e 24h (47% - F) após a injeção da carragenina, quando comparados os resultados aos respectivos grupos controle. Tal resultado assemelha-se ao obtido para o AAS, excetuando-se o fato de não ter sido observada atividade deste na sexta hora após a indução da inflamação. Também foi possível observar que doses inferiores a 200 mg/kg do salicilato de borneol não apresentaram atividade anti-inflamatória nos tempos mais tardios, o que justificou a opção da dose de 200 mg/kg nos testes subsequentes.

Figura 7 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por carragenina

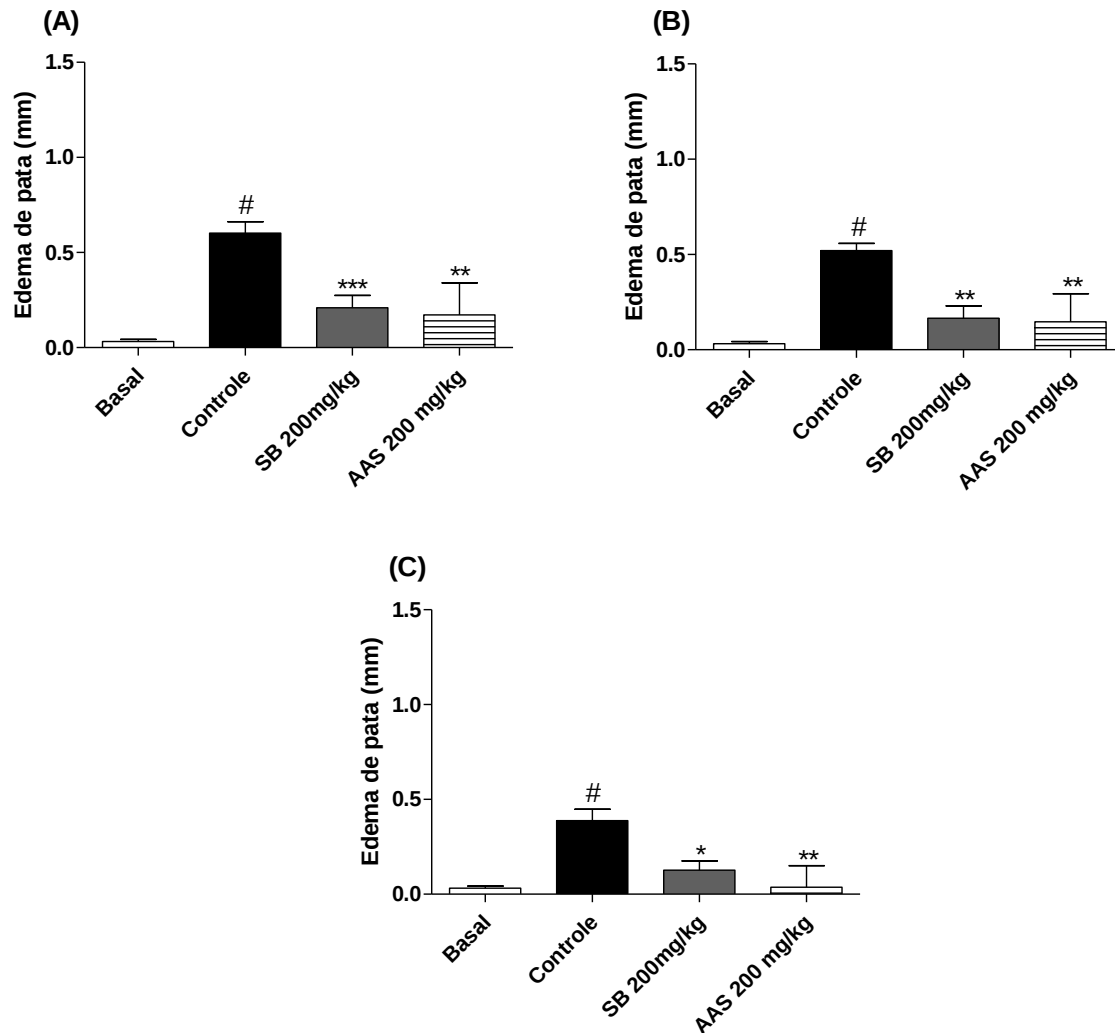


Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (50, 100 ou 200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção (20 μ L) de carragenina 2,5% e PBS nas patas esquerda e direita, respectivamente. O grupo basal recebeu injeção (20 μ L) de PBS em ambas as patas. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. da diferença entre as patas, medida em 1 h (A), 2 h (B), 3 h (C), 4 h (D), 6 h (E) e 24 h (F) após a indução do edema, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

4.2.2 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por prostaglandina E2 (PGE2)

O edema de pata induzido por PGE2 é caracterizado como um edema de rápida formação e curta duração, sendo avaliado em intervalos de tempo igualmente curtos. É possível observar, nas Figura 8 A, B e C, a indução satisfatória do edema a partir de 15 min após a injeção intraplantar da PGE2. Além disto, observa-se redução significativa do edema ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados (15 min – A, 30 min – B, e 60 min – C) para os grupos pré-tratados com salicilato de borneol (65%, 68% e 67%, respectivamente) e com AAS (71%, 71% e 90%, respectivamente).

Figura 8 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por PGE2

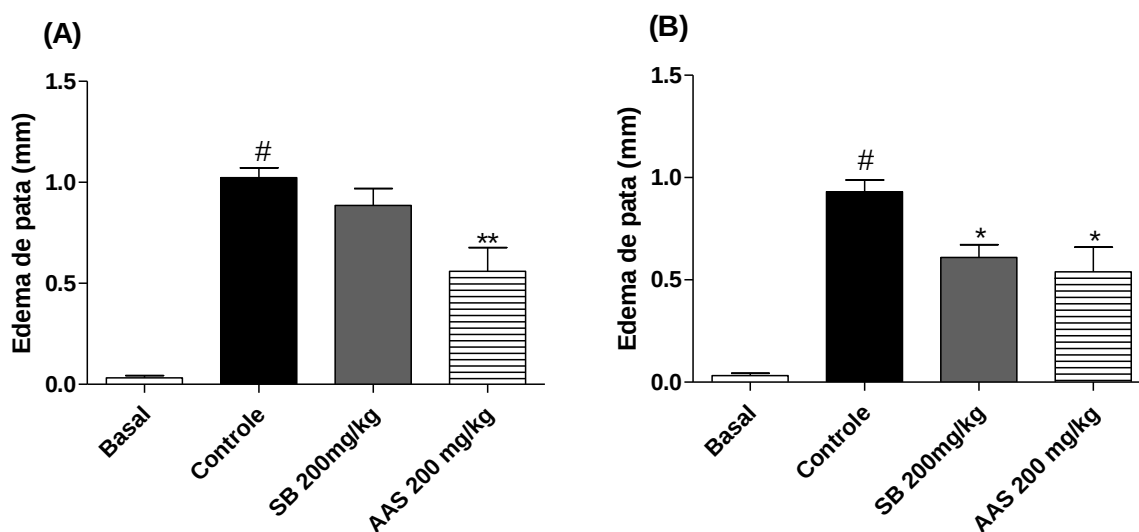


Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção (20 µL) de PGE2 (5 µg/pata) e PBS nas patas esquerda e direita, respectivamente. O grupo basal recebeu injeção (20 µL) de PBS em ambas as patas. Os gráficos representam a média ± E.P.M. da diferença entre as patas, medida em 15 min (A), 30 min (B) e 1h (C) após a indução do edema, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

4.2.3 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por bradicinina

A bradicinina está relacionada com a dor e o extravasamento vascular presentes no processo inflamatório, e de maneira semelhante à prostaglandina, quando utilizada no modelo de edema de pata, age rapidamente e de forma pouco duradoura. Na Figura 9, podemos observar a formação de edema a partir de 15 min após a injeção da bradicinina. O tratamento com AAS reduziu significativamente ($p<0,05$) a formação do edema em 15 min (45%) e 30 min (42%), enquanto o tratamento com o salicilato de borneol provocou redução significativa apenas no tempo de 30 min (35% - Figura 9 B).

Figura 9 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por bradicinina

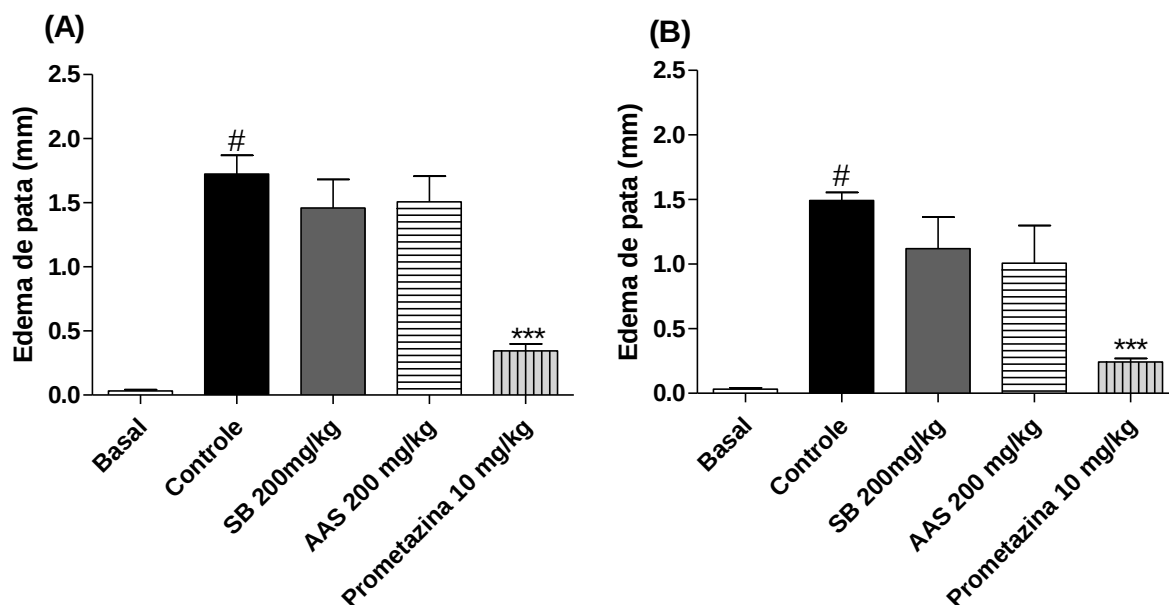


Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção (20 μ L) de BK (6 nmol/pata) e PBS nas patas esquerda e direita, respectivamente. O grupo basal recebeu injeção (20 μ L) de PBS em ambas as patas. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. da diferença entre as patas, medida em 15 min (A) e 30 min (B) após a indução do edema, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

4.2.4 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol no edema de pata induzido por histamina

Em medições realizadas 30 min e 1h após a injeção intraplantar de histamina, é possível observar a presença de edema de grande proporção, evidenciado na Figura 10. Não foi observada redução significativa no edema provocado em camundongos tratados com AAS ou salicilato de borneol, em 30 min e 1h após o estímulo. A prometazina, um anti-histamínico H1 pertencente ao grupo das fenotiazinas administrado 1h antes da indução, foi capaz de inibir significativamente (80%, $p < 0,05$) a formação de edema em todos os tempos avaliados.

Figura 10 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol no edema de pata induzido por histamina



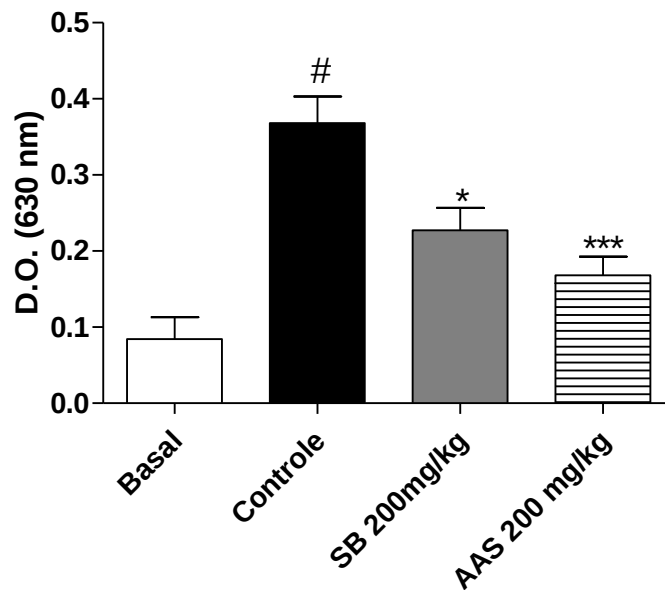
Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), prometazina (10 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção (20 μ L) de HIS (100 μ g/pata) e PBS nas patas esquerda e direita, respectivamente. O grupo basal recebeu injeção (20 μ L) de PBS em ambas as patas. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. da diferença entre as patas, medida em 30 min (A) e 1 h (B) após a indução do edema, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

4.2.5 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol na permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético

O aumento da permeabilidade vascular é um dos fatores que levam à formação do edema inflamatório, e neste trabalho optamos por mensurar o extravasamento de fluidos para a cavidade abdominal mediante injeção de ácido acético como forma de avaliar a integridade vascular.

A Figura 11 representa as densidades ópticas obtidas para o lavado peritoneal de animais que receberam injeção i.v. de azul de Evans. Observa-se que a injeção i.p. de ácido acético aumenta significativamente ($p < 0,05$) o extravasamento do corante para a cavidade abdominal, e que nos grupos tratados com AAS e Salicilato de Borneol houve redução significativa ($p < 0,05$) de 54% e 38%, respectivamente, na densidade óptica do lavado, indicando, portanto, a redução da permeabilidade vascular e corroborando com a atividade antiedematogênica demonstrada.

Figura 11 – Efeito do pré-tratamento com o salicilato de borneol na permeabilidade vascular



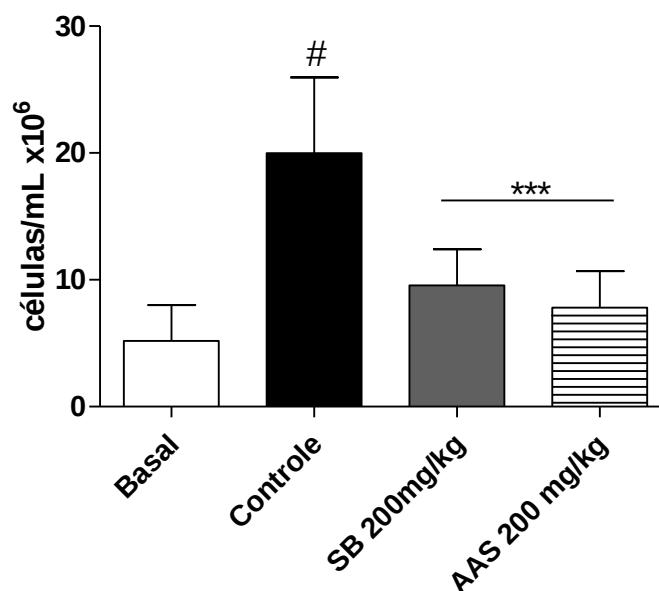
Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, todos os animais receberam injeção I.V. (500 μ L) de Azul de Evans (1%). Passados 20 min, os grupos tratados e controle receberam injeção I.P (300 μ L) de ácido acético (0,6%). O grupo basal recebeu injeção i.p. (300 μ L) de solução salina 0,9%. Vinte minutos após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação indireta do extravasamento vascular. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. das densidades ópticas do lavado peritoneal em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

4.2.6 Efeito anti-inflamatório do salicilato de borneol na peritonite induzida por zimosan

Para avaliar parâmetros como a migração de células e a liberação de citocinas no sítio inflamatório, utilizou-se o modelo experimental de peritonite induzida por zimosan. Quatro horas após o estímulo inflamatório, o lavado peritoneal colhido foi submetido à contagem de células totais em microscopia óptica, e o resultado está demonstrado na Figura 12. Nota-se o aumento significativo da migração celular para a cavidade abdominal de camundongos não tratados e injetados com zimosan ($p < 0,05$); a migração foi significativamente menor ($p < 0,05$) em camundongos tratados com o salicilato de borneol (53%) e com o AAS (61%).

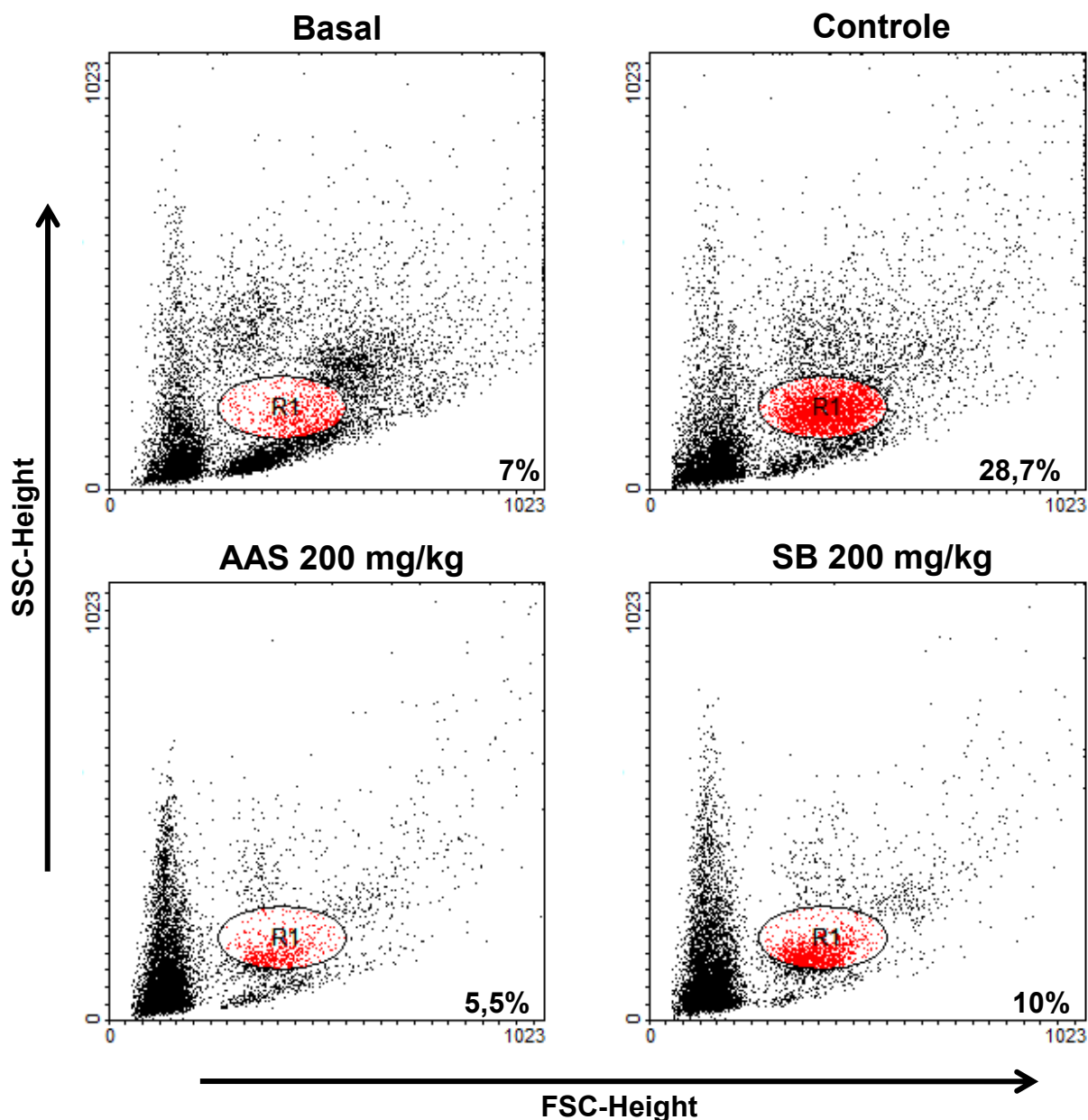
A Figura 13 e a Figura 14 representam a análise em citometria de fluxo destas células colhidas no lavado peritoneal. Na Figura 13, as subpopulações celulares são estabelecidas considerando-se os parâmetros de tamanho e complexidade das células analisadas. A região R1 dos *dot plots* representa a subpopulação de granulócitos, que são as primeiras células que migram para o sítio inflamatório. Verificou-se o aumento do percentual de granulócitos na cavidade abdominal de animais não tratados e estimulados com zimosan, com consequente redução de 80% nos animais tratados com AAS e de 61% em animais tratados com o salicilato de borneol.

Figura 12 – Efeito do pré-tratamento com salicilato de borneol na celularidade do lavado peritoneal



Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção i.p. (500 µL) de zimosan (2 mg/mL). O grupo basal recebeu injeção i.p. (500 µL) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação da celularidade total e diferencial. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da contagem total de células em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

Figura 13 – Análise das subpopulações celulares do lavado peritoneal, por tamanho e granulidade, em citometria de fluxo.



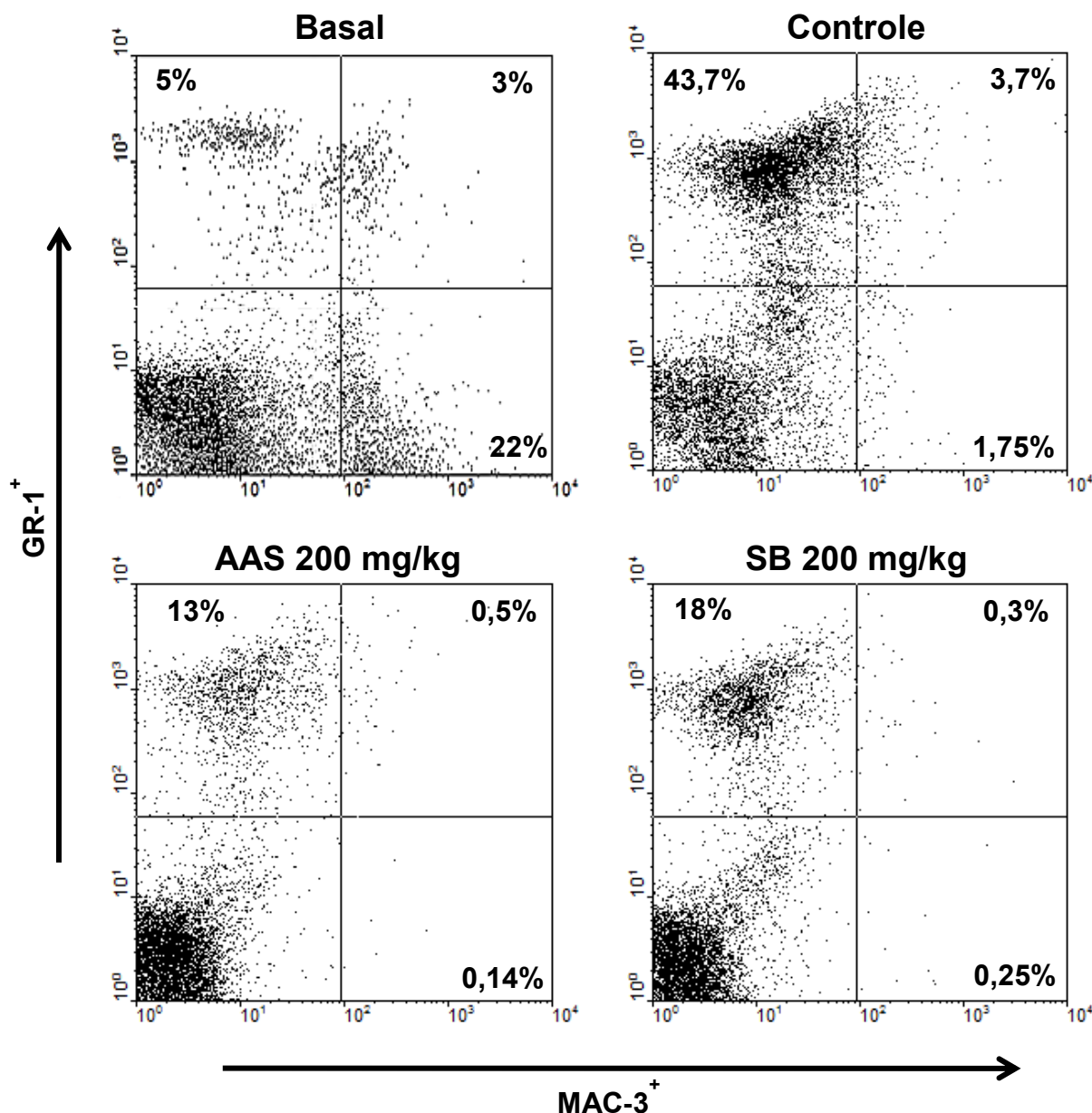
Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção i.p. (500 µL) de zimosan (2 mg/mL). O grupo basal recebeu injeção i.p. (500 µL) de PBS. Quatro após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para análise das subpopulações celulares por citometria de fluxo. Os *dot plots* representam 10000 eventos cada; as abscissas correspondem à dispersão frontal da luz (volume das partículas) e as ordenadas à complexidade citoplasmática (granulosidade e tamanho nuclear). Os percentuais indicados referem-se aos eventos contados em R1 (subpopulação estimada de granulócitos).

A Figura 14 representa a imunofenotipagem das células coletadas no lavado peritoneal, utilizando-se anticorpos específicos para moléculas da superfície celular de macrófagos (MAC-3) e neutrófilos (GR-1). Além destas células, foi possível determinar a subpopulação de monócitos, que expressam os dois marcadores de superfície.

No quadrante superior esquerdo dos *dot plots* está representada a subpopulação de neutrófilos (GR-1⁺); mais uma vez, observa-se o aumento significativo do percentual destas células quando comparados os grupos basal e controle. Os tratamentos foram capazes de reduzir 70% (AAS) e 59% (salicilato de borneol) da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório.

Analisando a subpopulação de macrófagos representada no quadrante inferior direito (MAC-3⁺), nota-se que houve redução significativa nos percentuais desta em todos os grupos expostos ao zimosan. Este fenômeno não se relaciona com o tratamento, mas com o modelo experimental.

Figura 14 – Análise das populações de neutrófilos e macrófagos no lavado peritoneal por citometria de fluxo

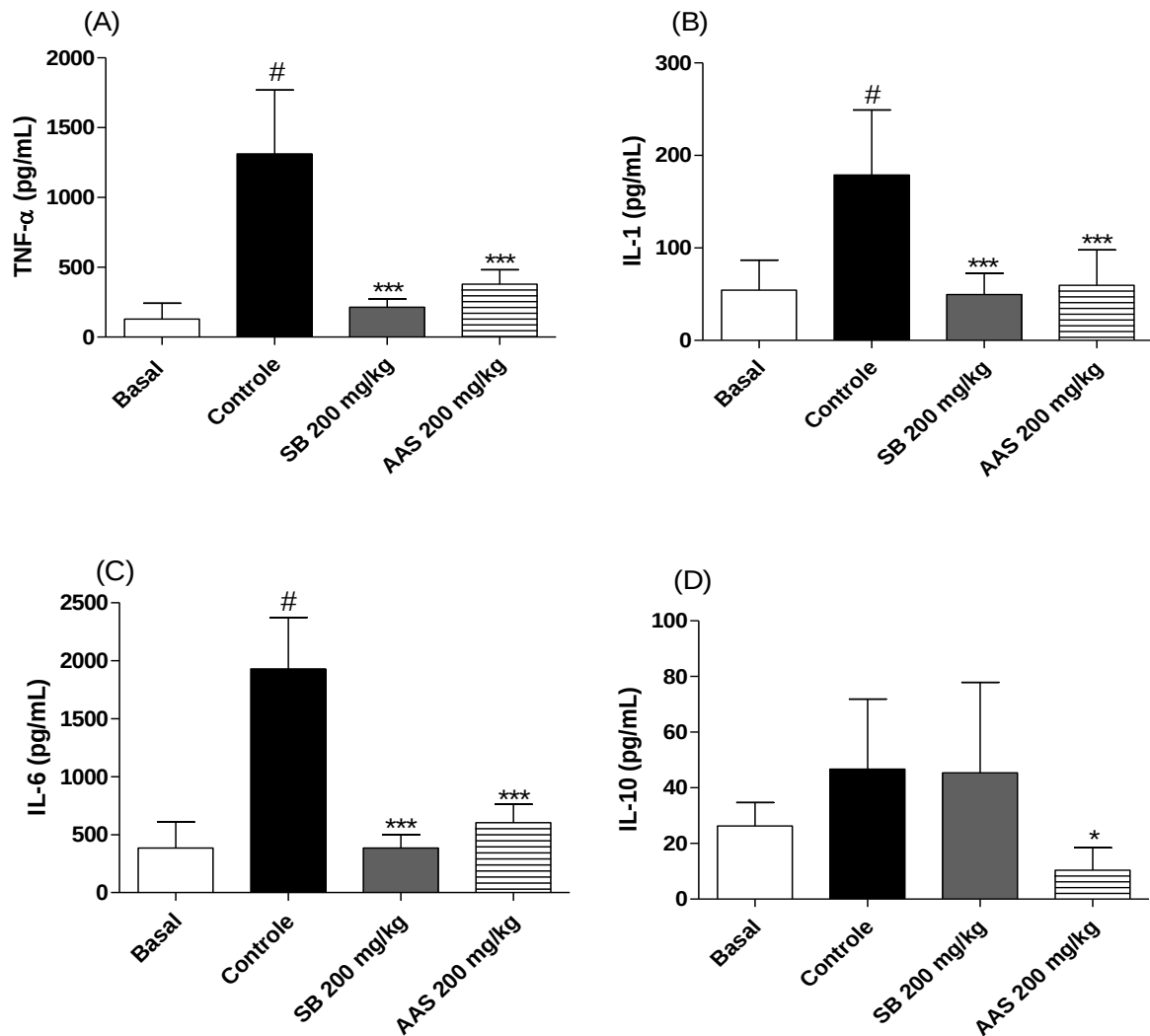


Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção i.p. (500 µL) de zimosan (2 mg/mL). O grupo basal recebeu injeção i.p. (500 µL) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para análise das subpopulações celulares por citometria de fluxo. Os *dot plots* representam 10000 eventos cada; as abcissas correspondem à intensidade de fluorescência das células MAC-3⁺ e as ordenadas à fluorescência emitida pelas células GR-1⁺. Macrófagos estão representados no quadrante inferior direito (MAC-3⁺); neutrófilos estão representados no quadrante superior esquerdo (GR-1⁺), e monócitos estão representados no gráfico no quadrante superior direito (MAC-3⁺/GR-1⁺). Os percentuais indicados referem-se aos eventos contados em cada quadrante.

Após a centrifugação do lavado peritoneal para as análises do conteúdo celular, os sobrenadantes coletados foram utilizados na dosagem das citocinas características do processo inflamatório. As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6 e a citocina reguladora do processo inflamatório IL-10 foram dosadas por ensaio imunoenzimático, conforme orientações do fabricante dos reagentes empregados.

Tanto o salicilato de borneol quanto o AAS reduziram significativamente a liberação dos mediadores pró-inflamatórios induzida pela injeção de zimosan; para o AAS, observou-se redução de 71%, 66% e 55% e para o SB 84%, 72% e 77% nos níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6, respectivamente. Além disto, é possível observar que os animais tratados com o salicilato de borneol não apresentaram redução significativa nos níveis de IL-10 do fluido peritoneal; o mesmo não aconteceu com os animais tratados com AAS, nos quais é possível verificar redução significativa (77%, $p < 0,05$) dos níveis deste mediador (Figura 15).

Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com o salicilato de borneol nos níveis de citocinas do lavado peritoneal.



Camundongos Swiss-Webster foram pré-tratados com salicilato de borneol (200 mg/kg), AAS (200 mg/kg), veículo ou solução salina 0,9%. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle receberam injeção i.p. (500 µL) de zimosan (2 mg/mL). O grupo basal recebeu injeção i.p. (500 µL) de PBS. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação dos níveis de TNF-α (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e IL-10 (D). O gráfico representa a média ± E.P.M. dos níveis de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$, quando comparados os grupos controle e basal. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle.

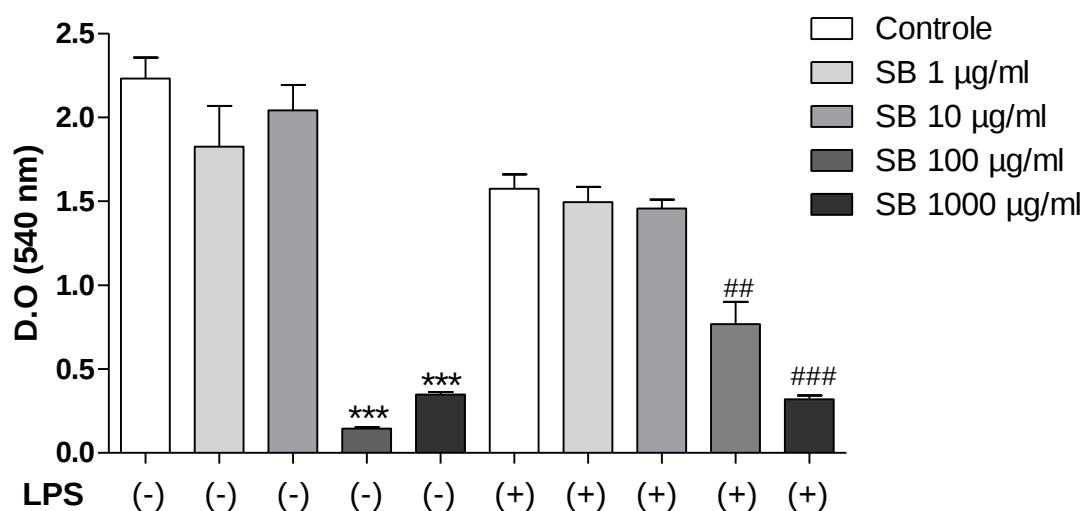
4.3 ATIVIDADE *IN VITRO* DO SALICILATO DE BORNEOL

Uma vez que não há estudos anteriores que descrevam a toxicidade do salicilato de borneol em cultura de macrófagos peritoneais, foi realizado o ensaio do MTT para determinar quais as concentrações ideais a serem empregadas no ensaio para a determinação do NO *in vitro*.

É possível observar, na Figura 16, que as concentrações de 1 e 10 µg/mL do salicilato de borneol não reduziram significativamente a capacidade metabólica destas células *in vitro*, quando estimuladas ou não com LPS e comparadas com os respectivos controles. Entretanto, as concentrações de 100 e 1000 µg/mL reduziram significativamente ($p < 0,05$) a conversão do MTT a formazan, tanto em células expostas como não expostas ao LPS.

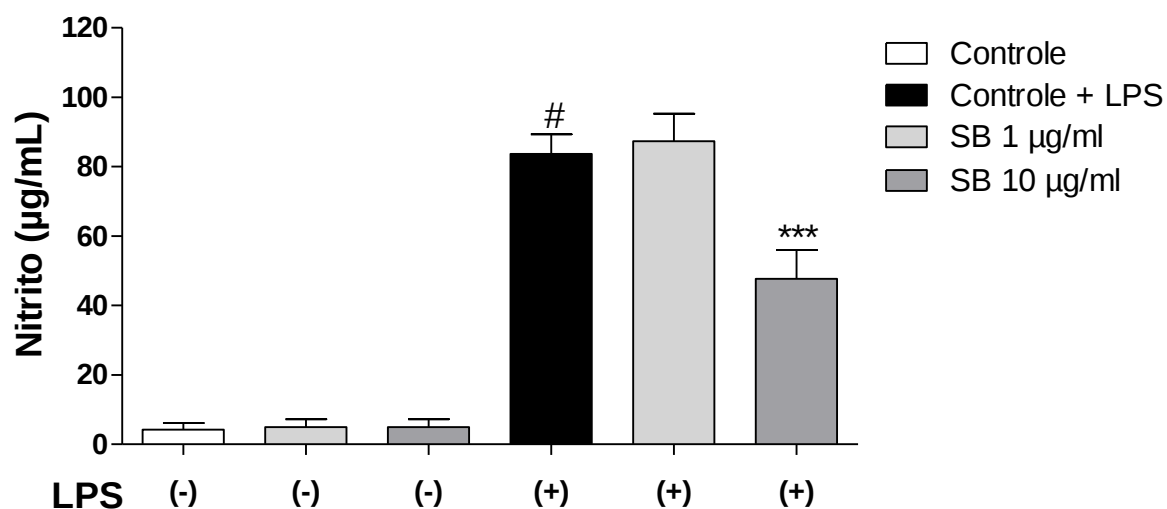
Após o ensaio da viabilidade celular, as concentrações de 1 e 10 µg/mL foram empregadas no tratamento das células para a determinação indireta do NO no sobrenadante da cultura pelo método de Griess. Na Figura 17 podemos verificar que a exposição das células ao salicilato de borneol por 24h não foi capaz de induzir a produção de NO *in vitro*; por outro lado, quando os macrófagos foram estimulados com LPS de *E. coli*, ocorreu aumento significativo da produção de NO ($p < 0,05$). O salicilato de borneol, apenas na concentração de 10 µg/mL, foi capaz de reduzir significativamente (43%; $p < 0,05$) a concentração deste mediador no sobrenadante da cultura.

Figura 16 – Análise da citotoxicidade do salicilato de borneol em macrófagos peritoneais murinos



Macrófagos peritoneais murinos (5×10^5 células/poço) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de SBF, tratados com salicilato de borneol (1, 10, 100 ou 1000 µg/mL) e expostos ou não ao LPS de *E. coli* (10 µg/mL). Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido e as células incubadas em meio completo com MTT (0,5 mg/mL) por 24 h. Ao final, as células foram lisadas com DMSO e o formazan contido no citoplasma solubilizado. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. das densidades ópticas do lisado celular em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle não exposto ao LPS. ### $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados e expostos ao LPS com o grupo controle exposto ao LPS.

Figura 17 – Efeito do tratamento com salicilato de borneol na produção de nitrito em macrófagos peritoneais murinos.



Macrófagos peritoneais murinos (5×10^5 células/poço) foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de SBF, tratados com salicilato de borneol (1 ou 10 µg/mL) e estimulados ou não com LPS de *E. coli* (10 µg/mL). Após 24h de incubação, o sobrenadante foi removido para dosagem do nitrito pelo método de Griess. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. das concentrações de nitrito em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni com comparações planejadas. # indica $p < 0,05$ quando comparados os grupos controle e controle+LPS. *** $p < 0,001$ quando comparados os grupos tratados com o grupo controle+LPS.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

O presente trabalho objetivou estudar a ação do salicilato de borneol na resposta inflamatória aguda, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Em virtude da ausência de informações acerca da toxicidade deste composto em modelos animais, foi realizada avaliação toxicológica preliminar para determinar a dose letal média, as alterações comportamentais decorrentes do tratamento e a toxicidade nos principais órgãos.

Os animais tratados com dose única de 1000 mg/kg de salicilato de borneol não apresentaram alterações comportamentais durante o período inicial de observação. Entretanto, foi visível a redução no consumo de ração e água nos primeiros dias após a administração, resultando numa redução estatisticamente significativa no consumo médio de água e ração pelas fêmeas, quando comparadas com o respectivo grupo controle. Tais alterações provavelmente estão relacionadas às alterações no trato gastrointestinal (entre elas o desconforto e a dor epigástrica) provocadas pelos AINES quando administrados pela via oral (AMANN, R. e PESKAR, B. A., 2002; LAI, L. H. e CHAN, F. K., 2009). Além disto, a ação sedativa do borneol pode interferir nos mecanismos de sono e vigília, reduzindo o consumo de água e alimento após as 4 h de observação inicial (PASSOS, C. S. *et al.*, 2009).

Devido à menor ingesta de alimentos, foi observada a redução significativa no peso médio destas fêmeas ao longo do período de 14 dias; esta diferença só foi observada nos camundongos machos no quarto dia após o tratamento, havendo a compensação no ganho de peso nos 10 dias subsequentes. Tais achados podem estar associados à susceptibilidade e sensibilidade aos fármacos diferenciada entre gêneros (ANDERSON, G. D., 2008).

É preciso considerar que esta é uma investigação preliminar, e estudos posteriores possibilitarão caracterizar o efeito do salicilato de borneol quanto à dose, via de administração e tempo de efeito, estabelecer a DL₅₀ e com isso definir uma janela terapêutica para que este composto possa ser utilizado com eficácia e segurança.

A carragenina é um polissacarídeo coloide presente nas algas vermelhas da Classe *Rhodophyceae*, obtido por extração em fase aquosa. A carragenina é bastante utilizada na triagem farmacológica de substâncias anti-inflamatórias, e quando injetada na pata, promove uma resposta inflamatória de longa duração que envolve diversos mecanismos como a liberação de mediadores (histamina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, NO), infiltração de leucócitos e hiperalgesia (DAMAS, J. e REMACLE-VOLON, G., 1992; HANDY, R. L. e MOORE, P. K., 1998; MEDEIROS, M. V. *et al.*, 1995; VAZ, Z. R. *et al.*, 1996). O edema de pata induzido pela carragenina foi introduzido como modelo para o estudo dos processos inflamatórios por Winter e colaboradores em 1962, e adaptado para a utilização em camundongos por Levy, em 1969. (WINTER, C. A. *et al.*, 1962; LEVY, L., 1969)

Nas quatro primeiras horas após a injeção da carragenina, os principais mediadores que provocam a ativação do endotélio com consequente extravasamento de plasma são os eicosanoides e as aminas vasoativas. Entre quatro e seis horas, ocorre maior infiltrado neutrofílico e as enzimas liberadas por estes colaboram com a manutenção dos níveis de PGE2 nos tecidos inflamados. Além disso, o aumento da expressão da iNOS a partir das 4h leva ao gradativo acréscimo na concentração de NO no tecido, que age em sinergismo com a PGE2 na manutenção do edema no período de 4h a 6h. Também exercem papel importante na manutenção do edema nos tempos intermediários as citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos macrófagos teciduais residentes e células migratórias. Nos tempos tardios (entre 24h e 96h), o principal mediador responsável pela manutenção do edema é a PGE2 (POSADAS, I. *et al.*, 2004).

Nos experimentos realizados, observamos que o salicilato de borneol foi capaz de reduzir o edema formado pela carragenina em tempos precoces, intermediários e tardios. Estes resultados sugerem que este composto interfere em diferentes mecanismos da inflamação, principalmente na formação de mediadores prostanoídes, já que sua atividade se manteve até 24h. A dose que mostrou melhor eficácia foi semelhante à dose usualmente empregada do AAS, que é de 200 mg/kg em modelos experimentais murinos (FALCAO, E. P. *et al.*, 2006; RINALDI, S. *et al.*, 2009).

Tendo sido observada a atividade anti-inflamatória do salicilato de borneol no edema de pata induzido pela carragenina, foram realizados experimentos a fim de elucidar quais os possíveis mediadores e vias envolvidos neste efeito. Uma vez que a fase precoce da inflamação é principalmente mediada por aminas vasoativas, bradicinina e prostaglandinas, optou-se pela utilização destes mediadores isolados na indução do edema de pata.

Sabe-se que a ação da PGE₂ na indução do edema de pata deve-se principalmente à sua ligação aos receptores EP₃, acoplados à proteína G, que medeiam a transcrição de fatores pró-inflamatórios, estimulam a nocicepção e estão relacionados à ocorrência de febre nas doenças inflamatórias. (CLAUDINO, R. F. *et al.*, 2006; USHIKUBI, F. *et al.*, 1998) Diversos fármacos anti-inflamatórios, entre eles o AAS, são descritos classicamente como inibidores da síntese de PGs pela inibição da COX; entretanto, estudos anteriores demonstraram que, em animais tratados com diversos AINEs, injeções intraplantares de PGE₂ não foram capazes de suprimir o efeito antiedematogênico do tratamento (DIPASQUALE, G. *et al.*, 1973). O salicilato de borneol é capaz de reduzir o edema desencadeado pela injeção de PGE₂, entretanto não podemos afirmar que este compete pela ligação aos receptores específicos EP₃, uma vez que moléculas de AINEs de estrutura semelhante não são capazes de antagonizar a ligação da PGE₂ aos receptores EP₃, mas ainda assim reduzem a atividade edematogênica desta por mecanismos ainda não elucidados (DIPASQUALE, G. *et al.*, 1973).

A bradicinina é uma proteína do sistema das cininas, que tem ação pró-inflamatória e age nos receptores acoplados à proteína G denominados B₁ e B₂, promovendo alterações vasculares, celulares e hiperalgesia (KAPLAN, A. P. *et al.*, 2002; MAURER, M. *et al.*, 2011). Receptores B₁ são expressos após exposições repetidas à bradicinina e estão presentes em capilares, no músculo liso e nas membranas de neutrófilos, ativados pela bradicinina e seus metabólitos nos processos inflamatórios crônicos (CAMPOS, M. M. e CALIXTO, J. B., 1995; MCLEAN, P. G. *et al.*, 2000). Já os receptores B₂ são constitutivamente expressos no sistema circulatório e no SNC, e vêm sendo estudados quanto ao seu envolvimento na formação e manutenção dos sinais cardinais da inflamação aguda (BURITOVA, J. *et al.*, 1997; CAMPOS, M. M. e CALIXTO, J. B., 1995).

Além da ação no edema de pata induzido por PGE₂, o salicilato de borneol foi capaz de reduzir o edema provocado pela bradicinina, mediador relacionado com o extravasamento vascular e a dor inflamatória. O AAS é capaz de inibir de forma alostérica a ligação da bradicinina aos receptores B₂ *in vitro* sem comprometer a integridade das membranas celulares (GARDES, J. *et al.*, 2008), e este mecanismo pode estar relacionado à sua atividade antiedematogênica no modelo empregado *in vivo*. É provável que o salicilato de borneol apresente atividade semelhante, por se tratar de uma molécula estruturalmente relacionada. Entretanto, este efeito só foi observado 1h e 30 min após o tratamento (30 min após o estímulo), fato que deve estar relacionado com suas características farmacocinéticas.

A histamina, assim como a serotonina, é uma amina vasoativa liberada no processo inflamatório pelos mastócitos e plaquetas. Sua capacidade de induzir edema no modelo aplicado relaciona-se com a ligação aos receptores histamínicos H₁ e H₂ presentes no endotélio, causando vasodilatação e extravasamento de fluidos (JUTEL, M. *et al.*, 2009). Anti-histamínicos são compostos capazes de antagonizar a ligação entre a histamina e seus receptores, a exemplo da prometazina utilizada em nossos experimentos (SKIDGEL, R. A. e ERDÖS, E. G., 2006).

Assim como outros AINEs estruturalmente similares – entre eles o AAS – o salicilato de borneol não foi capaz de reduzir a formação de edema causada pela injeção deste mediador; desta forma podemos concluir que a atividade do salicilato de borneol nos tempos precoces do edema provocado pela carragenina é independente da via da histamina.

A injeção i.p. de ácido acético em baixas concentrações em camundongos induz contorções abdominais características e extravasamento de plasma rico em proteínas, característica dos momentos iniciais da inflamação; a inibição deste extravasamento pode contribuir para a redução da formação de edema e da migração de neutrófilos. O modelo foi estabelecido em 1964 por Whittle, e além de ser útil para a avaliação da permeabilidade vascular também pode ser empregado no estudo de mecanismos nociceptivos e antinociceptivos (WHITTLE, B. A., 1964). Sabe-se que o aumento da permeabilidade vascular e a hiperalgesia provocados

pelo ácido acético estão relacionados com a liberação local de bradicinina, prostaglandinas, serotonina e histamina (COLLIER, H. O. *et al.*, 1968; DERAEDT, R. *et al.*, 1980).

Nos nossos experimentos, observamos que o salicilato de borneol administrado antes da injeção i.p. de ácido acético foi capaz de reduzir o extravasamento do azul de Evans para a cavidade peritoneal. Tal resultado pode estar correlacionado com a capacidade dos salicilatos e compostos estruturalmente relacionados inibirem alostericamente a ligação da bradicinina com receptores B₂, e corrobora com sua atividade antiedematogênica demonstrada nos modelos de indução de edema de pata.

O zimosan é um carboidrato enriquecido em β -glucanas obtido da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*; é um clássico ativador da via alternativa do sistema complemento, além de estar relacionado à liberação e/ou ativação de diferentes mediadores inflamatórios. Da mesma forma que a carragenina, a formação do edema e a migração celular induzidas por esse produto são muito utilizadas para triagem de substâncias anti-inflamatórias. O zimosan é reconhecido pelo receptor Toll-like 2 (TLR2) e, principalmente por Dectina-1, receptor que reconhece a estrutura da β -glucana. A inflamação induzida por zimosan é dependente de um rápido influxo de leucócitos e formação de anafilatoxinas que contribuem com o aumento da migração celular por desempenharem ação quimiotática para PMNs. C5a induz direta e indiretamente a expressão da P-selectina em células endoteliais e ainda o zimosan induz a produção de citocinas como IL-1 e TNF- α , capazes de promover a expressão de selectinas nas células endoteliais, agindo de forma sinérgica aos fragmentos do complemento (DOHERTY, N. S. *et al.*, 1985; LEITE, D. F. *et al.*, 2007).

A injeção intraperitoneal do zimosan desencadeia um processo inflamatório autolimitado e de curta duração, servindo como modelo ideal para a avaliação dos mecanismos vasculares e celulares agudos. Em nosso trabalho, o zimosan foi utilizado como ferramenta para avaliar as alterações na migração celular e analisar os níveis de citocinas liberadas na cavidade peritoneal 4h após a indução da inflamação. Em animais pré-tratados com AAS ou salicilato de borneol, foi possível

verificar reduções significativas na migração celular e nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias características da fase aguda.

A redução significativa da migração celular caracterizou-se pela diminuição dos neutrófilos no sítio inflamatório, como demonstrado nos experimentos em citometria de fluxo. Em 1998, Pillinger e colaboradores descreveram a capacidade do AAS e seu metabólito ativo salicilato de inibir a ERK em neutrófilos e com isto reduzir sua capacidade de ligação ao endotélio, demonstrando um mecanismo de ação destes compostos não relacionado à inibição da COX (PILLINGER, M. H. *et al.*, 1998). Tal mecanismo, associado à redução de mediadores induzidos pelo NF- κ B, pode estar relacionado com a capacidade tanto do salicilato de borneol quanto do AAS de reduzirem a migração destas células no modelo por nós empregado.

O NF- κ B regula a síntese de muitas proteínas que funcionam em vias inflamatórias, incluindo citocinas pró-inflamatórias, COX e NOS (EL ALWANI *et al.*, 2006; SUN, 2011; ZHENG *et al.*, 2011), sendo um importante fator de transcrição ativado nas doenças inflamatórias. Por outro lado, a IL-10 pode interferir na ativação de células inflamatórias assim como o TGF- β que inibe a produção de NO bloqueando a síntese de mRNA de TNF- α , importante na indução da iNOS em associação ao IFN- γ (OSWALD, I. P. *et al.*, 1992)

No modelo de peritonite induzida por zimosan, observamos a modulação da liberação de citocinas nos momentos iniciais da inflamação. TNF- α , IL-1 e IL-6 tiveram suas concentrações reduzidas no fluido peritoneal em camundongos tratados com AAS ou salicilato de borneol. Em 1995 foi descrita a capacidade do AAS e dos salicilatos de impedirem a translocação nuclear do NF- κ B, sendo este mecanismo importante para a redução da inflamação quando somado à inativação da COX-1.(FRANTZ, B. e O'NEILL, E. A., 1995) Além disto, estudos recentes demonstraram que o borneol reduz a liberação de IL-1 e IL-6 em modelos de inflamação intestinal (JUHAS, S. *et al.*, 2008), corroborando com os dados obtidos em nossos experimentos.

A liberação de IL-10 também foi reduzida pelo tratamento com AAS, e não foi modificada com o salicilato de borneol. Uma vez que a IL-10 participa da regulação do processo inflamatório, a manutenção de níveis mais elevados

aparenta ser benéfica para a fase resolutive da inflamação, servindo como adjuvante dos mecanismos que reduzem a liberação de mediadores que amplificam a resposta. A ação do AAS na liberação de IL-10 varia em modelos experimentais distintos; células dendríticas tratadas com AAS e estimuladas com LPS tiveram a liberação de IL-10 reduzida, bem como outros mecanismos efetores alterados. (BUFAN, B. *et al.*, 2009; HACKSTEIN, H. *et al.*, 2001). Em linhagens distintas de células tumorais, o AAS tanto aumentou quanto reduziu a liberação da IL-10 (BERGMAN, M. *et al.*, 2011), demonstrando que seu papel na modulação deste mediador não está completamente esclarecido. Estudos complementares são fundamentais para esclarecer se o salicilato de borneol é capaz de manter os níveis fisiológicos de IL-10 em diferentes condições, representando assim uma vantagem terapêutica nas condições inflamatórias agudas.

O NO é uma molécula extremamente reativa, produzida a partir da L-arginina (NATHAN, C., 1992). Dependendo das concentrações nos tecidos o óxido nítrico pode apresentar uma variedade de funções biológicas que incluem o relaxamento vascular, a modulação da agregação plaquetária, algumas formas de neurotransmissão central e periférica, além de ação citotóxica e citostática de macrófagos (HIBBS, J. B., JR. *et al.*, 1988). Macrófagos ativados por diferentes estímulos, entre eles o LPS, produzem grandes quantidades de NO, pela indução da iNOS (KRONCKE, K. D. *et al.*, 1997; LIN, C. F. *et al.*, 2008). O NO produzido pelos macrófagos ativados é capaz de provocar lesão tecidual, por mecanismos diversos, entre eles a inibição da função mitocondrial e diminuição da replicação do DNA (ALLER, M. A. *et al.*, 2006; DRAPIER, J. C. e HIBBS, J. B., JR., 1988). Adicionalmente, o NO promove a reação inflamatória por aumentar a síntese e liberação de moléculas inflamatórias, como citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e derivados do ácido araquidônico incluindo PGE₂ (MARCINKIEWICZ, J. *et al.*, 1995; MOLLACE, V. *et al.*, 2005).

O tratamento *in vitro* com o salicilato de borneol em baixas concentrações, em culturas de macrófagos peritoneais estimulados com LPS, foi capaz de reduzir a liberação de NO. Tal achado é importante, pois a presença de NO no sítio inflamatório pode levar ao dano tecidual, estimular a vasodilatação e o extravasamento vascular. Correlacionando este dado com os resultados obtidos no edema de pata induzido por carragenina, observamos que 6 h após a injeção deste

agente flogístico o edema foi significativamente menor nos animais pré-tratados com o salicilato de borneol. Conforme descrito, em tempos intermediários o NO é o principal mediador associado à PGE2 na manutenção do edema. Assim, podemos estimar que a redução do edema de pata provocado pela carragenina no tempo de 6h está ligada à capacidade do salicilato de borneol de reduzir a liberação de óxido nítrico em células ativadas. Diante do exposto, podemos afirmar que a administração sistêmica do salicilato de borneol apresenta efeito anti-inflamatório relacionado com a produção de mediadores eicosanoides; inibição da via da bradicinina; redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), sem interferir na liberação de IL-10; redução na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e diminuição da síntese de NO.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nos experimentos, podemos concluir que o salicilato de borneol apresenta atividade anti-inflamatória, uma vez que:

- Reduziu o edema provocado pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos, nos tempos precoces e tardios;
- Foi capaz de inibir a formação de edema provocada por diferentes mediadores inflamatórios como a prostaglandina e a bradicinina, mas não foi capaz de impedir a formação de edema causada pela injeção de histamina;
- Reduziu o extravasamento vascular induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos;
- Reduziu significativamente a migração de neutrófilos e a liberação de IL-1, IL-6 e TNF- α na cavidade peritoneal de camundongos, no modelo de peritonite induzida por zimosan;
- Ao contrário do AAS, não reduziu a produção e liberação de IL-10 no sítio inflamatório, sendo este um importante mediador na resolução da inflamação;
- Diminuiu a produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss-Webster* estimulados com LPS, sem interferir em sua viabilidade, em concentrações inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S. K. *et al.* Inflammation and cancer: how hot is the link? **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1605-21, Nov 30 2006.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SANCHEZ-PATAN, F. *et al.* The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 10, p. RA225-34, Oct 2006.

ALTZNAUER, F.; MARTINELLI, S.; YOUSEFI, S. *et al.* Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 10, p. 1343-54, May 17 2004.

AMANN, R.; PESKAR, B. A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. **European journal of pharmacology**, v. 447, n. 1, p. 1-9, Jun 28 2002.

ANDERSON, G. D. Gender differences in pharmacological response. **International review of neurobiology**, v. 83, p. 1-10, 2008.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 405-6, Sep 23 2004.

BANISOR, I.; LEIST, T. P.; KALMAN, B. Involvement of beta-chemokines in the development of inflammatory demyelination. **Journal of neuroinflammation**, v. 2, n. 1, p. 7, Feb 24 2005.

BARNES, P. J. Histamine and serotonin. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 14, n. 5, p. 329-39, 2001.

BERGMAN, M.; DJALDETTI, M.; SALMAN, H. *et al.* Inflammation and Colorectal Cancer: Does Aspirin Affect the Interaction between Cancer and Immune Cells? **Inflammation**, v. 34, n. 1, p. 22-28, 2011.

BIBER, K.; ZUURMAN, M. W.; DIJKSTRA, I. M. *et al.* Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 63-8, Feb 2002.

BRAND, C.; TOWNLEY, S. L.; FINLAY-JONES, J. J. *et al.* Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 51, n. 6, p. 283-9, Jun 2002.

BUFAN, B.; MOJSILOVIC, S.; VUCICEVIC, D. *et al.* Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. **International immunopharmacology**, v. 9, n. 7-8, p. 910-7, Jul 2009.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & therapeutics**, v. 107, n. 2, p. 139-54, Aug 2005.

BURITOVA, J.; CHAPMAN, V.; HONORE, P. *et al.* The contribution of peripheral bradykinin B2 receptors to carrageenan-evoked oedema and spinal c-Fos expression in rats. **European journal of pharmacology**, v. 320, n. 1, p. 73-80, Feb 5 1997.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J. *et al.* Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 1-5, Jul 2000.

CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **British journal of pharmacology**, v. 114, n. 5, p. 1005-13, Mar 1995.

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O. L.; ESPEVIK, T. *et al.* Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian journal of immunology**, v. 69, n. 6, p. 479-91, Jun 2009.

CHEN, X. H.; LIN, Z. Z.; LIU, A. M. *et al.* The orally combined neuroprotective effects of sodium ferulate and borneol against transient global ischaemia in C57 BL/6J mice. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 915-23, Jul 2010.

CLAUDINO, R. F.; KASSUYA, C. A.; FERREIRA, J. *et al.* Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 318, n. 2, p. 611-8, Aug 2006.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, Feb 1968.

COSTA, H. F.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; BARBOSA FILHO, J. M. *et al.* Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 519-25, Apr 2008.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robins Patologia estrutural e funcional**. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 52, n. 1, p. 72-82, Jul 2005.

D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 273, n. 1-2, p. 3-13, Feb 2003.

DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G. Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 211, n. 1, p. 81-6, Jan 28 1992.

DAVIS, K. L.; MARTIN, E.; TURKO, I. V. *et al.* Novel effects of nitric oxide. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 41, p. 203-36, 2001.

DE VASCONCELOS, D. I.; LEITE, J. A.; CARNEIRO, L. T. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, p. 912925, 2011.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F. *et al.* Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European journal of pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, Jan 11 1980.

DIPASQUALE, G.; RASSAERT, C.; RICHTER, R. *et al.* Influence of prostaglandins (PG) E2 and F2 α on the inflammatory process. **Prostaglandins**, v. 3, n. 6, p. 741-757, 1973.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P.; BERGEAT, P. *et al.* Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769-89, Nov 1985.

DRAPIER, J. C.; HIBBS, J. B., JR. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. **Journal of immunology**, v. 140, n. 8, p. 2829-38, Apr 15 1988.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British journal of anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-31, Aug 1995.

EL ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M. *et al.* Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171-83, Oct 2006.

FADOK, V. A.; WARNER, M. L.; BRATTON, D. L. *et al.* CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). **Journal of immunology**, v. 161, n. 11, p. 6250-7, Dec 1 1998.

FALCAO, E. P.; DE MELO, S. J.; SRIVASTAVA, R. M. *et al.* Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 2, p. 276-82, Feb 2006.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 2, p. d12-26, Jan 1 1997.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; ARAUJO, R. *et al.* The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1188-97, Dec 2002.

FILEP, J. G.; DELALANDRE, A.; PAYETTE, Y. *et al.* Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. **Circulation**, v. 96, n. 1, p. 295-301, Jul 1 1997.

FOOD AND DRUGS ANALYSIS. **Analyst**, v. 39, n. 465, 1914.

FRANTZ, B.; O'NEILL, E. A. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. **Science**, v. 270, n. 5244, p. 2017-9, Dec 22 1995.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-6, Jun 2005.

GARDES, J.; MICHINEAU, S.; PIZARD, A. *et al.* Aspirin inhibits human bradykinin B2 receptor ligand binding function. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 9, p. 1807-16, May 1 2008.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-16, May 2004.

GONZALEZ-REY, E.; CHORNY, A.; DELGADO, M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 1, p. 52-63, Jan 2007.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, Oct 1982.

GRILLI, M.; PIZZI, M.; MEMO, M. *et al.* Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. **Science**, v. 274, n. 5291, p. 1383-5, Nov 22 1996.

HACKSTEIN, H.; MORELLI, A. E.; LARREGINA, A. T. *et al.* Aspirin inhibits in vitro maturation and in vivo immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. **Journal of immunology**, v. 166, n. 12, p. 7053-62, Jun 15 2001.

HANDY, R. L.; MOORE, P. K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **British journal of pharmacology**, v. 123, n. 6, p. 1119-26, Mar 1998.

HATTORI, A. [Camphor in the Edo era - camphor and borneol for medicines]. **Yakushigaku zasshi. The Journal of Japanese history of pharmacy**, v. 35, n. 1, p. 49-54, 2000.

HATTORI, A. [Historical study of a moth repellent, "Fujisawa Camphor" (2) manufacture of borneol]. **Yakushigaku zasshi. The Journal of Japanese history of pharmacy**, v. 36, n. 2, p. 108-12, 2001.

HEIFETS, L. Centennial of Metchnikoff's discovery. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 31, n. 5, p. 381-91, May 1982.

HERSH, E. M.; BODEY, G. P. Leukocytic mechanisms in inflammation. **Annual review of medicine**, v. 21, p. 105-32, 1970.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Eicosanoids in inflammation. **Annals of clinical research**, v. 16, n. 5-6, p. 287-99, 1984.

HILL, S. J.; GANELLIN, C. R.; TIMMERMAN, H. *et al.* International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 3, p. 253-78, Sep 1997.

HORVATHOVA, E.; SLAMENOVA, D.; MARSALKOVA, L. *et al.* Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 6, p. 1318-23, Jun 2009.

JUHAS, S.; CIKOS, S.; CZIKKOVA, S. *et al.* Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. **Folia biologica**, v. 54, n. 1, p. 1-7, 2008.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 39, n. 12, p. 1786-800, Dec 2009.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. **International archives of allergy and immunology**, v. 137, n. 1, p. 82-92, May 2005.

KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 109, n. 2, p. 195-209, Feb 2002.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B. *et al.* Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492-504, Jun 2010.

KOPP, E.; GHOSH, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. **Science**, v. 265, n. 5174, p. 956-9, Aug 12 1994.

KRONCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 1, n. 2, p. 107-20, Apr 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Bases Patológicas das Doenças**. 7. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAI, L. H.; CHAN, F. K. Nonsteroid anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal injury. **Current opinion in gastroenterology**, v. 25, n. 6, p. 544-8, Nov 2009.

LAUBER, K.; BOHN, E.; KROBER, S. M. *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 717-30, Jun 13 2003.

LEITE, D. F.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C. *et al.* ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 3, p. 630-7, Sep 2007.

LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Regulation of inflammatory vascular damage. **The Journal of pathology**, v. 190, n. 3, p. 343-8, Feb 2000.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life sciences**, v. 8, n. 11, p. 601-6, Jun 1 1969.

LEWIS, R. J. Synonym Cross-Index. In: (Ed.). **Hazardous Chemicals Desk Reference**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.1487-1945. ISBN 9780470335406.

LIN, C. F.; TSAI, C. C.; HUANG, W. C. *et al.* IFN-gamma synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 746-55, Oct 15 2008.

LIU, R.; ZHANG, L.; LAN, X. *et al.* Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor kappaappaB signaling pathway. **Neuroscience**, v. 176, p. 408-19, Mar 10 2011.

LOWENSTEIN, C. J.; PADALKO, E. iNOS (NOS2) at a glance. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 14, p. 2865-7, Jun 15 2004.

MAHAD, D.; CALLAHAN, M. K.; WILLIAMS, K. A. *et al.* Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. **Brain : a journal of neurology**, v. 129, n. Pt 1, p. 212-23, Jan 2006.

MAJNO, G. **The Healing Hand - Man and wound in the ancient world**. Cambridge: MA: Harvard University Press, 1975.

MAMBOLE, A.; BIGOT, S.; BARUCH, D. *et al.* Human neutrophil integrin alpha9beta1: up-regulation by cell activation and synergy with beta2 integrins during

adhesion to endothelium under flow. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 2, p. 321-7, Aug 2010.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European journal of immunology**, v. 25, n. 4, p. 947-51, Apr 1995.

MARINHO, M. G. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A. *et al.* Amburana cearensis e cumarina imunomodulam os níveis de anticorpos antígeno-específico em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 5, 2004.

MAURER, M.; BADER, M.; BAS, M. *et al.* New topics in bradykinin research. **Allergy**, v. 66, n. 11, p. 1397-406, Nov 2011.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, n. 6002, p. 362-6, Oct 15 2010.

MCLEAN, P. G.; AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 3, p. 367-80, Aug 7 2000.

MEDEIROS, M. V.; BINHARA, I. M.; MORENO JUNIOR, H. *et al.* Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **European journal of pharmacology**, v. 285, n. 2, p. 109-14, Oct 16 1995.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-6, Mar 19 2010.

MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T. *et al.* Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, n. 366, p. 366-381, Ago 2008.

MOLLACE, V.; MUSCOLI, C.; MASINI, E. *et al.* Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 2, p. 217-52, Jun 2005.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORI, T.; MIYAMOTO, T.; YOSHIDA, H. *et al.* IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. **International immunology**, v. 23, n. 11, p. 701-12, Nov 2011.

MORROW, J. D.; ROBERTS II, L. J. Autacóides derivados dos lipídeos – Eicosanóides e fator de ativação das plaquetas. . In: (Ed.). **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, 2003. p.503 – 515.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-82, Mar 2006.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-82, Mar 19 2010.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 19, p. 13725-8, May 13 1994.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in immunology**, v. 26, n. 3, p. 157-65, Mar 2005.

NYSTROM, P. O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41 Suppl A, p. 1-7, Jan 1998.

OSWALD, I. P.; WYNN, T. A.; SHER, A. *et al.* Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8676-80, Sep 15 1992.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K. *et al.* Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140-149, 2009.

PILLINGER, M. H.; CAPODICI, C.; ROSENTHAL, P. *et al.* Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil

adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 24, p. 14540-5, Nov 24 1998.

PORTH, C. M. **Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States**. 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 1280

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F. *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-8, May 2004.

PROUDFOOT, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 2, p. 106-15, Feb 2002.

RIBEIRO-FILHO, J. **Alcalóides de Chondrodendron platyphyllum inibem a ativação de eosinófilos e modulam a ação da histamina em modelos de inflamação alérgica experimental**. 2011. Dissertação de Mestrado Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

RINALDI, S.; SILVA, D. O.; BELLO, F. *et al.* Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from Cocos nucifera L. (Palmae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 541-6, Apr 21 2009.

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 3, n. 7, p. 643-53, 2010.

SAADANE, A.; EASTMAN, J.; BERGER, M. *et al.* Parthenolide inhibits ERK and AP-1 which are dysregulated and contribute to excessive IL-8 expression and secretion in cystic fibrosis cells. **Journal of inflammation**, v. 8, p. 26, 2011.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. . In: (Ed.). **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, 2003. p.1241 – 1261.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 101-37, 2007.

SHEPRO, D.; DUNHAM, B. Endothelial cell metabolism of biogenic amines. **Annual review of physiology**, v. 48, p. 335-45, 1986.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. N.; ARCANJO, D. D. *et al.* Investigation of Mechanisms Involved in (-)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, Aug 22 2011.

SKIDGEL, R. A.; ERDÖS, E. G. Histamina, Bradicinina e seus antagonistas. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S., *et al* (Ed.). **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da Terapêutica**. 11. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.639. ISBN 8577260011.

SPECTOR, W. G.; HEESOM, N.; STEVENS, J. E. Factors influencing chronicity in inflammation of rat skin. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 96, n. 1, p. 203-13, Jul 1968.

STOCKMAN, R. The Physiological Action of Borneol. A Contribution to the Pharmacology of the Camphor Group. **The Journal of physiology**, v. 9, n. 2-3, p. 65-91, Aug 1888.

TAN, B. H.; MEINKEN, C.; BASTIAN, M. *et al.* Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. **Journal of immunology**, v. 177, n. 3, p. 1864-71, Aug 1 2006.

THOMAS, M. R. Salicylic Acid and Related Compounds. In: (Ed.). **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**: John Wiley & Sons, Inc., 2000. ISBN 9780471238966.

TIM, M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

TRAN, E. H.; KUZIEL, W. A.; OWENS, T. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha or its CCR5 receptor. **European journal of immunology**, v. 30, n. 5, p. 1410-5, May 2000.

TSOYI, K.; JANG, H. J.; NIZAMUTDINOVA, I. T. *et al.* PTEN differentially regulates expressions of ICAM-1 and VCAM-1 through PI3K/Akt/GSK-3beta/GATA-6 signaling pathways in TNF-alpha-activated human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 213, n. 1, p. 115-21, Nov 2010.

USHIKUBI, F.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y. *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 281-284, 1998.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American journal of medicine**, v. 104, n. 3A, p. 2S-8S; discussion 21S-22S, Mar 30 1998.

VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. *et al.* Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylene derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 278, n. 1, p. 304-12, Jul 1996.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 3, p. 349-74, Sep 2000.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 15, p. 107-113, Jun 2000.

WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: Another way for drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1303-1314, Mar 11 2004.

WHITTLE, B. A. The Use of Changes in Capillary Permeability in Mice to Distinguish between Narcotic and Nonnarcotic Analgesics. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 22, p. 246-53, Apr 1964.

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

ZHANG, F.; YU, W.; HARGROVE, J. L. *et al.* Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 381-6, Apr 2002.

ANEXOS

RESEARCH ARTICLE

Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative

Renata Marcia Costa Vasconcelos^{1,2}, Fagner Carvalho Leite^{1,3}, Jacqueline Alves Leite^{1,3}, Sandra Rodrigues Mascarenhas^{2,3}, Luis Cezar Rodrigues^{2,4}, and Marcia Regina Piuvezam^{1–3}

¹Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Fisiologia e Patologia, Laboratório de Imunofarmacologia, João Pessoa, Paraíba, Brasil, ²Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, João Pessoa, Paraíba, Brasil, ³Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, João Pessoa, Paraíba, Brasil, and ⁴Universidade Federal da Paraíba, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Farmacoquímica, João Pessoa, Paraíba, Brasil

Abstract

Bornyl salicylate (BS) is a salicylic derivative, obtained by sterification of salicylic acid and monoterpene (-)-borneol, and its topical use in inflammatory diseases was described in the early 20th century. It is also known that borneol presents neuroprotective, genoprotective and analgesic properties. The purpose of this study was to evaluate BS in experimental models of acute inflammation. The toxicity of BS was analyzed by measuring water and food intake, weight, mortality and weight of main organs. To assess its anti-inflammatory effect, BS-treated mice were challenged with carrageenan, prostaglandin E2 (PGE2), bradykinin (BK) or histamine (HIS)-induced paw edema, zymosan-induced peritonitis and vascular permeability induced by acetic acid. Nitric oxide (NO) production was analyzed in peritoneal macrophage cultures. There was no sign of acute toxicity of BS in male and female mice. Furthermore, treatment with BS was significantly ($p < 0.05$) effective in reducing paw edema induced by carrageenan in early and late phases; this effect was related to PGE2 and BK, but HIS independent. Neutrophil migration and cytokine release (TNF- α , IL-1 β and IL-6) induced by zymosan and fluid leakage induced by acetic acid were also reduced in BS-treated animals. *In vitro*, BS (10 $\mu\text{g/mL}$) reduced NO production in LPS-stimulated macrophages. These data suggest that BS has an anti-inflammatory effect, which is related, at least in part, with decrease of mediators as PGE2, NO and pro-inflammatory cytokines. However, further studies should be done to explore its potential as an anti-inflammatory drug.

Keywords: Bornyl salicylate, acute inflammation, cytokines, vascular permeability, nitric oxide

Introduction

Although inflammation has defense and homeostatic roles in tissue repair, inflammatory processes may also cause injuries and diseases. In some cases, the systemic manifestations of this immunological phenomenon represent a chronic injury to patients' health or even death risk, which makes it necessary to use an appropriate anti-inflammatory therapy.^(1–3) The main drugs clinically used are non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and they have wide applications. Even though NSAIDs are the most commonly used drugs in inflammatory illnesses,

they may cause serious side effects in the gastrointestinal tract, besides renal failure and asthma.⁽⁴⁾ Mostly, they act by inhibiting the activity of cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), thus inhibiting synthesis of prostaglandins (PG) and thromboxane (TX).^(5,6) The acetylsalicylic acid (ASA) was synthesized in 1887 in Germany, based on the salicylic acid anti-inflammatory properties, which was extracted from the willow bark (*Salix alba*) in 1828. It has been widely used since 1889 and is the most commercialized drug worldwide. The main mechanism

of action of ASA is by acetylating COX in an irreversibly way.^(4,6,7)

Other mechanisms of action of salicylates have already been described, among them inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B)^(8–10) and ERK pathways.⁽¹¹⁾ Thus, although some treatments of inflammatory processes have been done for over two centuries, the search for new therapeutic strategies, effective in reducing damages without interfering in the regulatory mechanisms of inflammation, is urgently needed. Molecular modifications are promising among several strategies used to introduce new drug therapies. The first consists in chemical transformations of known molecules, aiming to increase its potency and safety.⁽¹²⁾

Borneol (endo-1,7,7-trimethyl-bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol) is a bicyclic monoterpene found in the essential oil of many medicinal plants, including *Valeriana officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Lavandula officinalis*, traditionally used to relieve symptoms of anxiety, fatigue and insomnia, and also to cause analgesia and anesthesia.⁽¹³⁾ The use of borneol—also called *Borneo camphor*⁽¹⁴⁾—was described in traditional Chinese medicine over a century ago as stimulant, aphrodisiac, and used in ophthalmic inflammatory conditions; important alterations in the central nervous system (CNS) were described in several mammals treated with high doses of borneol.^(15–17) Recent studies have demonstrated the borneol capacity in reducing cortical damage induced by ischemia in experimental models and NF- κ B pathway activation in CNS cells submitted to oxygen and glucose deprivation *in vitro*, decreasing the production of pro-inflammatory mediators as TNF- α .^(18,19) Low doses of borneol reduce genotoxicity caused by oxygen reactive species in hepatocytes and testicular cells⁽²⁰⁾ and also induce *in vitro* vascular relaxant effect by blocking voltage-dependent calcium channels.⁽²¹⁾

Bornyl Salicylate (BS) is a salicylic derivative obtained by sterification of salicylic acid and monoterpene (-)-borneol. There is no report of its uses in randomized clinical trials, using models of acute inflammation; in spite of this, in extensive database consultations, there are citations regarding the BS—named *Salit*[™] (Tenneco®) in the pharmacopoeias—being used as a topical emulsion to treat inflammatory rheumatic diseases and neuralgia.^(22,23) Hence, this study aimed to analyze the anti-inflammatory effects of bornyl salicylate (BS) in experimental models of acute inflammation regarding parameters as paw edema formation by several phlogistic agents, vascular leakage, cell migration, cytokines and nitric oxide production.

Materials and methods

Animals

Swiss-Webster mice (*Mus musculus*) 6–8 weeks, weighing on average 25–30 g, provided by Prof. Thomas George vivarium (UFPB) were used in experimental protocols. The use of animals was approved by the Committee of Ethics in Animal Research (PgPNSB/UFPB) (CEPA N°

0612/10). The animals were kept in plastic cages with controlled temperature (24 ± 2°C) and light-dark cycle of 12 h, and food and water *ad libitum*. Experimental procedures were carried out according to orientations of National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA) and according to requirements in Arouca Law (Law Number 11794/2008, Brazil).

BS synthesis

BS was made from salicylic acid and the (-)-borneol sterification. A mixture of 1 g (7.2 mMol, 1.0 eq.) of salicylic acid (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 1.12 g (7.2 mMol, 1.0 eq.) of (-)-borneol (Sigma-Aldrich®), 30 mL of dioxane (Merck®, KGaA, Darmstadt, Germany) and 0.5 mL (0.82 g, 6.9 mMol, 0.9 eq.) of thionylchloride (Merck®) was made in a round bottom flask. It was, then, taken to a reflux condenser in heater blanket for 1 h. Dioxane was eliminated in rota-evaporator and the solid residue was filtered in silica gel column using hexane/acetate 90/10 (Merck®) as eluent. It was obtained 1.9 g or a 95% yield of (-)-bornyl salicylate, as an aromatic white solid. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.50–7.37 (m, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.4, 0.6 Hz, 1H), 6.88 (ddd, *J* = 8.3, 1.1, 0.5 Hz, 1H), 5.11 (ddd, *J* = 9.9, 3.2, 2.0 Hz, 1H), 0.95 (s, 3H), 0.91 (s, 6H), 0.89–0.82 (m, 4H) (Sup. 1). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 170.44, 161.59, 135.44, 129.72, 119.01, 117.53, 112.90, 81.23, 77.64, 77.00, 76.36, 49.06, 47.87, 44.94, 44.85, 36.74, 27.99, 27.28, 19.65, 18.84, 13.57 (Sup. 2).

BS was resuspended in vehicle (saline with 5% of Tween 80—VETEC®, Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil) and administered orally (PO) for the *in vivo* procedures. For *in vitro* experiments, saline was substituted by MilliQ[™] water and a stock solution of BS was filtered in a nitrocellulose membrane (Millex Millipore[™], Billerica, MA, USA; 0.22 μ m).

Evaluation of BS acute toxicity

After a 12 h fast, male (*n* = 6) and female (*n* = 6) mice were treated with 1000 mg/kg of BS (PO) and kept under observation during 4 h. During this time, behavioral changes and deaths were recorded. Animals that survived the initial period of observation were monitored during 14 days to determine median lethal dose (LD50). It was also measured the water and ration consumption, the average weight gain and the average weight of main organs as heart, spleen, liver and kidneys.⁽²⁴⁾

Paw edema induced by different phlogistic agents

Mice (*n* = 6, per group) were treated with different doses of BS (50, 100 or 200 mg/kg PO), ASA (200 mg/kg PO), promethazine (10 mg/kg i.m.) or vehicle (positive control group) and, 1 h later, 20 μ L of carrageenan (2.5%, Sigma-Aldrich®), prostaglandin E2 (PGE2 –5 μ g/paw, Sigma-Aldrich®), bradykinin (BK –6 nmol/paw, Sigma-Aldrich®) or histamine (HIS –100 μ g/paw, Sigma-Aldrich®) were injected in the left paw and PBS in right one. Negative control group received 20 μ L PBS injections in both paws. Paw diameter was measured with a digital

micrometer in different time intervals after stimulation, and the difference between the diameter of both, left and right paws, was calculated.⁽²⁵⁾

Peritoneal vascular permeability induced by acetic acid

Mice ($n = 6$) were treated with BS (200 mg/kg PO), ASA (200 mg/kg PO) or vehicle and 1 h after 500 μ L of Evans' blue solution were injected (i.v.). Twenty minutes later, the animals received an intraperitoneal (IP) injection (300 μ L) of a 0.6% acetic-acid aqueous solution; at the same time interval, the animals were euthanized and the peritoneum exposed and washed with 10 mL of distilled water. Peritoneal fluid samples were centrifuged (10 min, 1500 rpm, 8°C) and the supernatants were analyzed using a spectrophotometer at 620 nm. The blue color intensity indicated vascular permeability.⁽²⁶⁾

Zymosan-induced peritonitis

Mice ($n = 6$ per group) were treated with BS (200 mg/kg PO), ASA (200 mg/kg PO) or vehicle, 1 h before inflammatory stimulation. Peritonitis was induced by intraperitoneal injection of 500 μ L of zymosan (2 mg/mL, Sigma-Aldrich®).^(27,28) Four hours after zymosan injection, animals were euthanized and the peritoneum cavity was washed with 1 mL of cold PBS, followed by a 1-min massage and collection of the fluid. Samples were centrifuged (10 min, 1200 rpm, 4°C) and supernatants were used for cytokine quantification (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10, eBioscience®, San Diego, CA, USA ELISA sandwich kits). The pellet of cells was resuspended in 1 mL of PBS (4°C), diluted in Turk solution in the ratio of 1:40 and counted in hemocytometer by optical microscopy. An aliquot of 1.5×10^6 cells of each sample was added to 3 mL of PBS (4°C) and centrifuged (1200 rpm, 10 min, 4°C); the supernatant was discarded and, to avoid non-specific links, the cells were kept in PBS with 2 μ L of mouse serum (1:100) for 5 min. Then, they were incubated with anti-MAC-3 and anti-GR-1 antibodies (BD Biosciences™ Pharmingen, San Jose, CA, USA), diluted according to the manufacturer recommendation. After 30 min of incubation, the cells were washed with 1 mL of PBS (4°C), centrifuged (1200 rpm, 10 min, 4°C), the pellet resuspended in 300 μ L of PBS (4°C) and analyzed by flow cytometer (BD Biosciences™ FACScalibur) for differential fluorescence analysis. CellQuest™ for Mac OS® software (BD Biosciences™, San Jose, CA, USA) was used to acquire the data.

In vitro studies of BS

In vitro BS anti-inflammatory activity was analyzed in mice's peritoneal macrophages. 5×10^5 macrophages/well (96 well culture plates, TPP®, Trasadingen, Switzerland) were cultured in RPMI medium without phenol red (Sigma-Aldrich®) and supplemented with 10% of inactivated fetal bovine serum (FBS, Life Technologies™, GIBCO®, Grand Island, NY, USA). Cells were incubated during 4 h (5% CO₂, 37°C) for adhesion. Nonadherent cells

were removed by PBS washing (37°C). Then, BS (1, 10, 100 and 1000 μ g/mL) or Lipopolysaccharide (10 ng/mL—LPS from *Escherichia coli* 0111:B4—Sigma-Aldrich®) were added.⁽²⁹⁾ Plates were incubated (5% CO₂, 37°C) for 24 h and supernatants were harvested for indirect determination of NO with Griess reagent (Sigma-Aldrich®)⁽³⁰⁾ and cell viability was determined by MTT method.^(29,31)

Statistic analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SEM and represented at least two independent experiments. The numerical variables were evaluated by D'Agostino & Pearson normality test, with Gaussian distribution of the data, opting for the Variance Analysis (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test with planned comparisons. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 5.00 for Windows, San Diego, CA, USA, available at www.graphpad.com) and values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant. For flow cytometry data analysis we used Win MDI software (version 2.9, available at <http://facs.scripps.edu/software.html>).

Results

Evaluation of BS acute toxicity

Oral administration of 1000 mg/kg of BS in male or female mice did not induce death in the initial period of observation. Weight and food consumption were followed during 14 consecutive days of treatment and it was initially observed weight loss in males and females, compensated

Table 1. Mice (male and female, $n = 6$ each group) treated with BS (1000 mg/kg) were evaluated during 14 days. Initial and final weight, food and water intake, death number and weight of main organs were compared to male and female control animals.

	Control male	BS-treated male	Control female	BS-treated female
Water intake (mL/animal/day)	10.14 $\pm$ 0.83	7.93 $\pm$ 1.88	10.13 $\pm$ 0.66	5.07 $\pm$ 0.77**
Food intake (g/animal/day)	7.29 $\pm$ 0.66	5.00 $\pm$ 0.79	7.29 $\pm$ 0.74	4.24 $\pm$ 0.92*
Initial weight (g)	36.6 $\pm$ 0.42	33.5 $\pm$ 1.23	32.3 $\pm$ 0.98	29.8 $\pm$ 0.40
Final weight (g)	38.95 $\pm$ 1.77	35.15 $\pm$ 0.65	35.5 $\pm$ 0.82	29.6 $\pm$ 0.87**
Death number	0	2	0	2
Spleen weight (g)	0.18 $\pm$ 0.038	0.23 $\pm$ 0.029	0.18 $\pm$ 0.032	0.18 $\pm$ 0.054
Liver weight (g)	2.24 $\pm$ 0.32	2.05 $\pm$ 0.23	1.60 $\pm$ 0.08	1.51 $\pm$ 0.28
Kidneys weight (g)	0.56 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.03	0.32 $\pm$ 0.02
Heart weight (g)	0.16 $\pm$ 0.025	0.16 $\pm$ 0.028	0.14 $\pm$ 0.010	0.10 $\pm$ 0.011

Data represent mean $\pm$ S.E.M. of two independent experiments.

** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ when compared treated groups with respective controls in two-way ANOVA, with Bonferroni's post-test.

only in male mice (Table 1). In addition, in Table 1, it is possible to observe a significant reduction of water and food consumption by females when compared to control group. Such alterations may be due the discomfort and/or epigastric pain caused by NSAIDs when orally taken. During the evaluation, only two treated males and two treated females died; therefore it was estimated that LD50 of BS is greater than 1000 mg/kg. Average weight of main organs (kidneys, liver, spleen and heart) of treated and non-treated animals (male and female) was measured and no statistical significant alterations were observed in both groups of animals (Table 1).

Effect of BS in carrageenan-induced paw edema

Figure 1 demonstrated that treatment with BS (200 mg/kg) significantly inhibited ($p < 0.05$) paw edema 1 h (51%), 2 h (56%), 6 h (53%) and 24 h (47%) after carrageenan injection when compared to positive control group. Such results were similar to that observed with ASA treatment. Doses lower than 200 mg/kg of BS were not effective in inhibiting the edema formation in later times (data not shown) justifying the use of 200 mg/kg in the following experiments.

Effect of BS in PGE₂, BK and HIS-induced paw edema

The paw edema induced by PGE₂ is characterized as having fast formation and short duration. It is observed in Figure 2A, the induction of edema 15–60 min after intra-plantar injection of PGE₂. Besides, it was also observed a significant reduction of edema ($p < 0.05$) in all evaluated intervals (15, 30 and 60 min) in BS-treated groups (65%, 68% and 67%, respectively) or ASA-treated ones (71%,

71% and 90%, respectively) when compared to positive control group. On the other hand, BS-treated animals presented significant reduction of paw edema in only 30 min (35%) when the animals were injected with BK (Figure 2B). BK-induced paw edema occurs quickly (15 min) and lasts approximately 30 min. The ASA treatment was significantly effective in decreasing paw edema at both periods of time (15 min –45% and 30 min –42%) (Figure 2B). Histamine, another mediator of inflammation, was used to demonstrate the anti-inflammatory effect of BS. BS and ASA were not able to reduce the histamine paw edema formation. However, promethazine, an H₁ antihistaminic was able to inhibit the formation of paw edema significantly (80%, $p < 0.05$), in all evaluated time intervals (Figure 2C).

Effect of BS in acetic acid-induced vascular permeability

The treatment with BS or ASA significantly ($p < 0.05$, $p < 0.001$, respectively) decreased vascular permeability into the peritoneal cavity of animals stimulated with acetic acid (Figure 3). It can also be observed that injection of acetic acid (positive control group) significantly increased ($p < 0.05$) the overflow of plasma into the peritoneal cavity (Figure 3). The reduction of vascular permeability by BS corroborates its anti-edematogenic activity demonstrated with inflammatory mediators.

Effect of BS in zymosan induced peritonitis

Figure 4 demonstrated the cell migration into the abdominal cavity of animals challenged with zymosan. The cell migration was significantly ($p < 0.05$) lower in mice treated with BS (57.8%) as well as with ASA (69.7%). The cell type inhibited by BS and ASA was neutrophils (Figure 5). Both treatments were effective in inhibiting the pro-inflammatory cytokines release. BS significantly reduced the release of TNF- α , IL-1 β and IL-6 induced by zymosan (Figure 6A–6C) and it was also observed that BS-treated animals did not show significant reduction in IL-10 levels in the peritoneal fluid (Figure 6D).

In vitro studies of BS activity

BS at 1 or 10 μ g/mL did not interfere with macrophage viability even in presence of LPS. However, at 100 or 1000 μ g/mL BS significantly reduced ($p < 0.05$) the cell viability in presence or absence of LPS (Figure 7A). BS-treated macrophages did not produce NO (Figure 7B) at any concentration. On the other hand, macrophages in presence of LPS showed a significantly ($p < 0.05$) increased production of NO, as expected. However, BS (10 μ g/mL) significantly reduced (43%; $p < 0.05$) the production of NO by these cells.

Discussion

The present study demonstrated the anti-inflammatory effect of bornyl salicylate (BS) in experimental models of acute inflammation. Due to lack of information

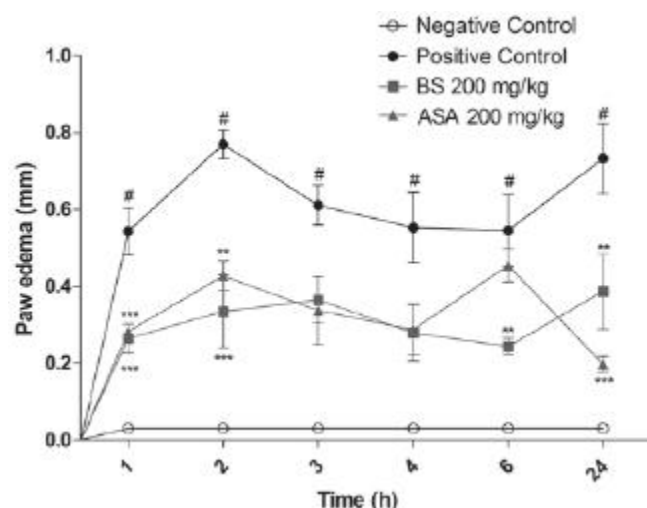


Figure 1. Mice were treated with BS (200 mg/kg), ASA (200 mg/kg), vehicle (positive control) or saline (negative control). One hour later, treated and positive control groups received carrageenan 2.5% and PBS injection (20%L) in the left and right paws, respectively. Negative control group received PBS injection (20%L) in both paws. Each point represents mean $\pm$ SEM of diametric measurement of left and right paws at different times. Data represent two independent experiments and they were analyzed using one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. # $p < 0.05$, when compared with negative control group. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ when compared with positive control group.

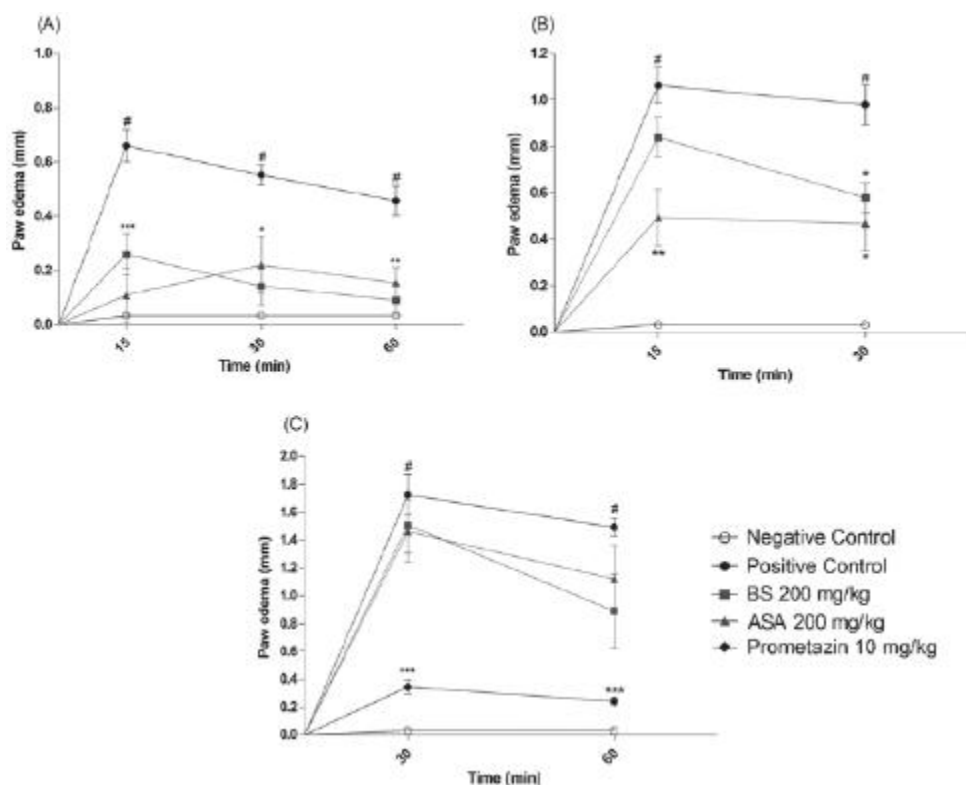


Figure 2. Mice were treated with BS (200mg/kg), ASA (200mg/kg), Prometazin (10 mg/kg), vehicle or saline. One hour later, treated and positive control groups received (A) PGE2 (5 µg/paw), (B) BK (6 nmol/paw) or (C) HIS (100 µg/paw) and PBS injection (20 µL) in the left and right paws, respectively. Negative control group received PBS intraplantar injection (20 µL) in both paws. Each point represents mean $\pm$ SEM of diametric measurement of left and right paws at different times. Data represent two independent experiments and they were analyzed using one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. # p < 0.05, when compared with negative control group. * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 when compared with positive control group.

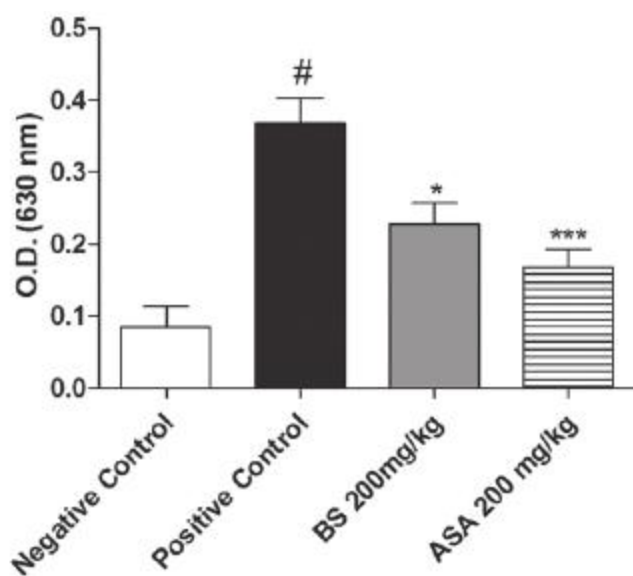


Figure 3. Mice were treated with BS (200mg/kg), ASA (200mg/kg), vehicle or saline. One hour later, treated, positive and negative groups received 500 µL Evans Blue (IV). Twenty minutes later, treated and positive control groups received 300 µL acetic acid (0.6%, IP). Negative control group received saline (IP). Each bar represents mean $\pm$ SEM of peritoneal fluid absorbance (620 nm) of two independent experiments. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. # p < 0.05, when compared with negative control group. * p < 0.05 *** p < 0.001 when compared with positive control group.

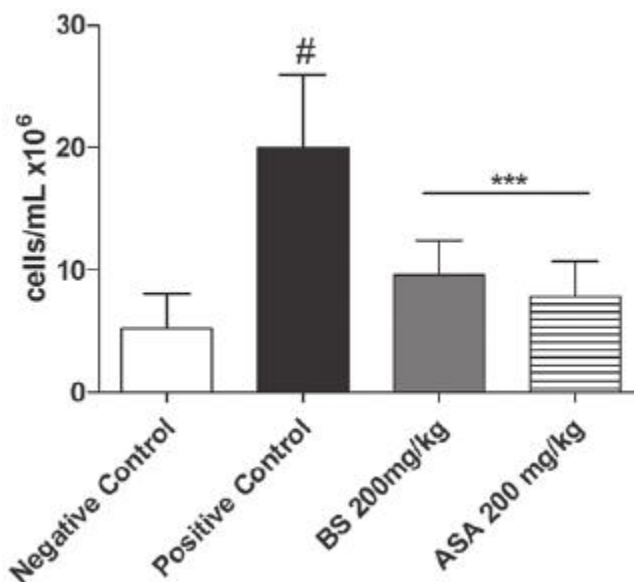


Figure 4. Mice were treated with BS (200 mg/kg), ASA (200mg/kg), vehicle or saline. One hour later, positive control and treated groups received 500 µL of Zymosan (2 mg/mL, IP). Negative control group received 500 µL of PBS, IP. After 4h, peritoneal fluid was collected to analyze cell migration. Each bar represents mean $\pm$ SEM of total cell number ($\times 10^6$ /mL) of two independent experiments. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. # p < 0.05, when compared with negative control group. * p < 0.05 *** p < 0.001 when compared with positive control group.

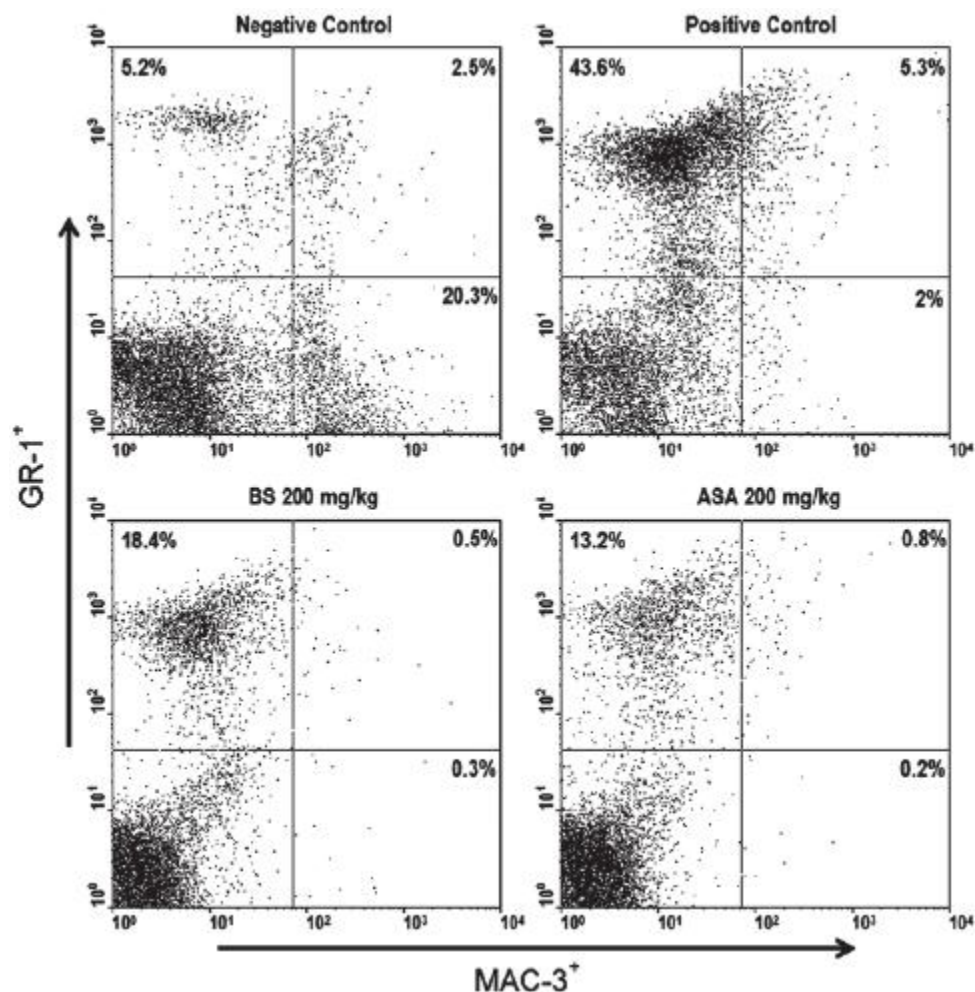


Figure 5. Mice were treated with BS (200mg/kg), ASA (200mg/kg), vehicle or saline. One hour later, positive control and treated groups received 500mL of Zymosan (2 mg/mL, IP). Negative group received 500mL of PBS, IP. After 4h, peritoneal fluid was collected and cells were incubated with anti-MAC-3 and anti-GR-1 antibodies to flow cytometry immunophenotyping. Dot plots represent 10,000 events; abscissa correspond to MAC-3⁺ cells fluorescence and ordinate to GR-1⁺ fluorescence. Neutrophils (MAC-3⁺ cells) are on the up left quadrant. The percentages refer to events counted in each quadrant.

concerning the toxicity of this compound in animal models, preliminary toxicological evaluation was carried out to determine the average lethal dose (LD₅₀), the behavioral changes with treatment and the toxicity in the main organs. The animals treated with a single dose of BS (1000mg/kg PO) did not present behavioral changes during the initial period of observation. However, there was a reduction in food and water consumption during the first days after the administration, mainly by females. Such changes are probably related to gastrointestinal discomfort caused by NSAIDs when given orally.^(7,32) Besides, the sedative action of borneol may interfere in the mechanisms of sleep and wakefulness reducing water and food intake after 4h of initial observation.⁽¹³⁾ Due to BS treatment, a significant weight loss ($p < 0.01$) was also observed in the females throughout the period of 14 days. Such findings can be associated to the different susceptibility and sensitivity for drugs between genders.⁽³³⁾ It is necessary to consider that this is a preliminary study and posterior studies will enable to characterize the effect of BS regarding doses, administration route

and effect onset. It is also necessary to establish the LD₅₀ and define a therapeutic window, making the use of this compound effective and safe.

The carrageenan is a colloid polysaccharide present in *Rhodophyceae* red seaweed, used in the pharmacological screening of anti-inflammatory substances.^(34,35) When injected in paw of mice, it promotes an inflammatory response of long duration which involves several mechanisms.^(36–39) In the first 4 hours, the main mediators which cause activation of endothelial cells with plasma extravasations are eicosanoids and vasoactive amines. Between 4 and 6h, greater neutrophilic infiltration occurs and enzymes released by these cells collaborate with the maintenance of PGE₂ levels in the inflamed tissues. Besides, increases of iNOS expression in macrophages lead to gradual increasing NO concentration in tissue, which acts in synergism with PGE₂ to maintain paw edema during a period of 4 to 6h. Also, pro-inflammatory cytokines secreted by resident tissue macrophages and migratory cells play an important role in the maintenance of paw edema in intermediate times. In later times

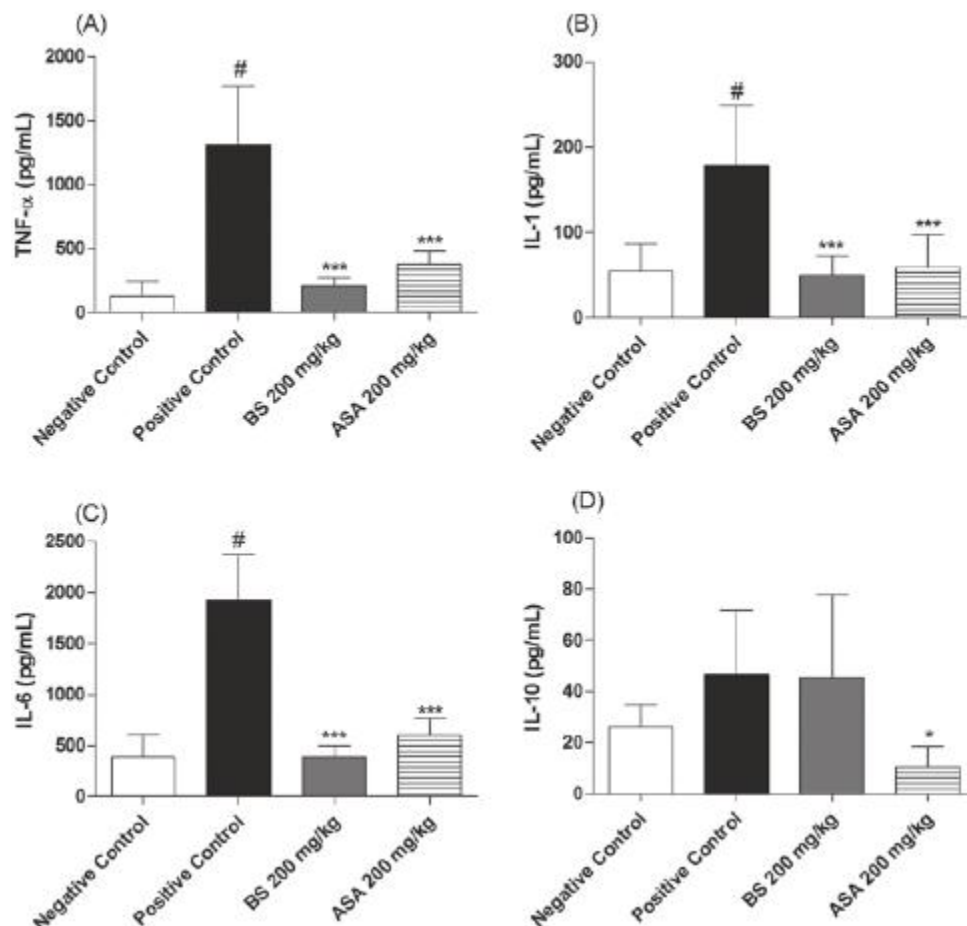


Figure 6. Mice were treated with BS (200 mg/kg), ASA (200 mg/kg), vehicle or saline. One hour later, positive control and treated groups received 500 μ L of Zymosan (2 mg/mL, IP) injection. Basal group received 500 μ L of PBS IP. After 4h, peritoneal fluid was collected, and TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) levels were determined. Data represents mean $\pm$ S.E.M. of cytokine levels in peritoneal fluid supernatant. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. # $p < 0.05$, when compared with negative control group. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ when compared with positive control group.

(between 24h and 96h), PGE₂ is the principal edema maintenance mediator.⁽⁴⁰⁾ This study demonstrated that BS was able to reduce paw edema induced by carrageenan in the early, intermediate and later times. These results suggest that BS acts in different mechanisms of inflammation, mainly in the formation of prostanoids since its activity is kept for 24h. This finding may be related, at least in part, to inhibition of COX promoted by salicylic acid, an active metabolite of salicylates. The best effective dose of BS was similar to the usual ASA one,^(41,42) however it is important to consider that the equivalent weight of BS is 274.16g, while the ASA is 180.16g. Thus, in equal doses, ASA releases 1.52 times more salicylate than BS. This leads to the hypothesis that the association of salicylic acid and borneol increases its potency, probably due to the release of borneol as active metabolite with a synergistic effect.

In order to elucidate the anti-inflammatory mechanisms of BS in carrageenan-induced paw edema, inflammatory mediators such as PGE₂, BK and HIS were used as phlogistic agents. PGE₂ participates in the inflammatory edema formation through EP₃ receptors associated to G protein, which mediates the

transcription of pro-inflammatory factors, stimulates nociception and is related to fever in inflammatory illnesses.^(43,44) The BS reduced paw edema triggered by PGE₂. However, we cannot state that this molecule competes with PGE for EP₃ receptors, since NSAIDs with similar structure and effect are not able to antagonize the binding of PGE₂ to its receptors, but still reduces the edematogenic activity of PGE₂.⁽⁴⁵⁾

In addition, Bradykinin (BK) has its effect by binding to receptors, named B₁ and B₂ associated to G protein. The BK induces vascular permeability, cellular changes and hyperalgesia.^(46,47) The B₂ receptors are constitutively expressed in blood cells and in CNS and are involved in the formation and maintenance of the cardinal signals of acute inflammation.^(48,49) The ASA is able to inhibit, in an allosteric way, the binding of BK to B₂ receptors *in vitro* without changing the cell membrane integrity and this mechanism is related to its anti-edematogenic activity.⁽⁵⁰⁾ It is possible that BS present similar activity considering that its chemical structure is related to ASA.

Another inflammatory mediator is histamine (HIS). This mediator induces edema by binding to H₁ and H₂ receptors which are present in the endothelium

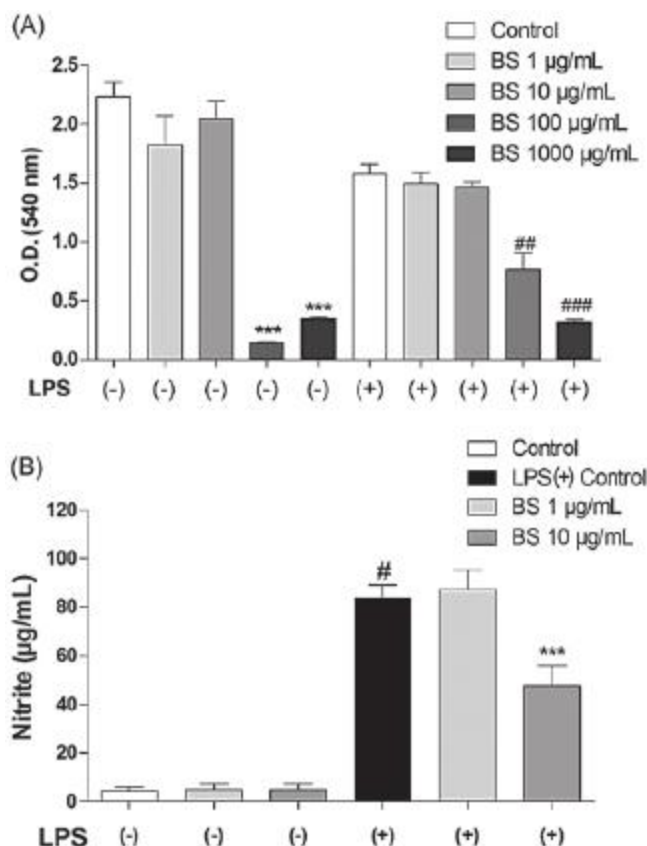


Figure 7. Peritoneal murine macrophages were treated with BS (1, 10, 100 or 1000mg/mL), exposed or not to LPS from *E. coli* (10 ng/mL). After 24h incubation, cell viability (A) and Nitrite levels (B) were determined. (A) Each bar represents the mean $\pm$ SEM of the optical densities of cell lysate. Data were analyzed with one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. *** $p < 0.001$ when compared with LPS (-) control. ### $p < 0.001$ when compared with LPS (+) control. (B) Each bar represents the mean $\pm$ SEM of nitrite concentrations. Data were analyzed with one-way ANOVA and Bonferroni's post-test with planned comparisons. # $p < 0.05$ when compared with LPS (-) control, *** $p < 0.001$ when compared with LPS (+) control.

causing vasodilation and plasma extravasation.⁽⁵¹⁾ Antihistaminics as promethazine are compounds that antagonize the binding between histamine and its receptors.⁽⁵²⁾ Bornyl salicylate, as well as other structurally similar NSAIDs (including ASA), was not able to reduce histamine-induced edema formation, suggesting that BS activity in early times of carrageenan-induced edema is independent of histamine pathway inhibition.

The intraperitoneal injection of acetic acid in mice induces typical abdominal contortions and plasma extravasations, characteristic of the initial moments of inflammation. Inhibition of these events contributes to the reduction of edema and neutrophil migration.⁽⁵³⁾ It is known that vascular permeability and hyperalgesia caused by acetic acid are related to local release of BK, PGs, serotonin and HIS.^(54,55) In our study we observed that BS was able to reduce the plasma extravasations into the peritoneal cavity induced by acetic acid. Such results may be correlated with the capacity of salicylates and related

compounds to inhibit the binding of BK with B_2 receptors, and corroborate its anti-edematogenic activity.

Zymosan is a carbohydrate enriched in β -glucans and derives from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. It is a well-known activator of the alternative way of the complement system, besides being related to the release and/or activation of several inflammatory mediators. Edema formation and cell migration induced by this molecule are used to study anti-inflammatory drugs, similar to carrageenan inflammation models. Intraperitoneal injection of zymosan triggers a short-term and self-limited inflammatory process dependent on leukocyte influx and anaphylatoxin formation, as well as cytokine production (IL-1 and TNF- α).^(27,56) BS-treated animals or ASA-treated ones presented reduction of cell migration, mostly neutrophils, into the peritoneal cavity as well as reduction of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β e IL-6). In 1998, Pillinger and colls. described the capacity of ASA and its active metabolite salicylate to inhibit ERK expression in neutrophils, consequently reducing its capacity of binding to the endothelium, demonstrating a mechanism of action of these compounds independent of COX inhibition.⁽¹¹⁾ Such mechanism, associated with the reduction of mediators induced by NF- κ B, can be related to the capacity of BS and ASA to reduce cell migration in the experimental models used in this study.

The NF- κ B regulates the synthesis of many proteins involved in inflammatory pathways, including pro-inflammatory cytokines, COX and NOS.⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾ Zymosan-induced peritonitis provokes the release of pro-inflammatory cytokines at the initial moments of inflammation. Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were reduced in peritoneal fluid of mice treated with BS or ASA. In 1995 it was described that ASA and salicylates have the ability to avoid nuclear translocation of NF- κ B, which is considered an important tool to reduce inflammation.⁽⁹⁾ Besides, recent studies have demonstrated that borneol reduces the release of IL-1 β and IL-6 in intestinal inflammatory models,⁽⁶⁰⁾ corroborating the data demonstrated in our study. An interesting observation in this study was that BS did not interfere with IL-10 production, different from ASA, which profoundly reduced the production of this anti-inflammatory cytokine in this experimental model. Since IL-10 participates in regulatory mechanisms of inflammation⁽⁶¹⁾ the maintenance of higher levels of this cytokine appears to be beneficial to the resolution of inflammatory processes. The ASA effect in the release of IL-10 varies in several studies: dendritic cells treated with ASA and stimulated with LPS reduced the production of IL-10.^(62,63) In contrast it was demonstrated, in distinct tumor cell lines, that ASA can increase or decrease IL-10 levels⁽⁶⁴⁾ clearly demonstrating that its role in IL-10 modulation is not completely understood. Additional studies are essential to show whether BS is able to keep the physiological levels of IL-10 in different experimental

models of inflammation, thus representing a therapeutic advantage in acute inflammatory conditions.

Macrophages activated by different stimuli, among them LPS, produce great amounts of NO.^(65,66) NO is able to cause tissue damage by several mechanisms, including inhibition of mitochondrial function and reduction of DNA replication.^(67,68) Additionally, NO promotes the inflammatory reaction by increasing the synthesis and release of inflammatory molecules as cytokines, reactive oxygen species (ROS) and derivatives of arachidonic acid including PGE2.^(69,70) The BS treatment of LPS-stimulated macrophage reduced NO release *in vitro*. Such finding is important, considering that the presence of NO in the inflammatory site may lead to tissue injury; induces vasodilation and vascular plasma extravasation.⁽⁷¹⁾ Additionally, correlating this data with those obtained from carrageenan-induced paw edema model, in which the edema was significantly smaller in BS-treated animals 6h after carrageenan injection, and the fact that NO was the main mediator associated with PGE2 in the maintenance of edema at that time, we strongly believe that the mechanisms involved in reducing inflammation by BS are dependent on NO and PGE2 synthesis inhibition.

Conclusions

Therefore, we demonstrated that bornyl salicylate presents anti-inflammatory properties by reducing the production of eicosanoid mediators; inhibiting the bradykinin pathway and reducing levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6) without interfering with IL-10 levels, and finally by decreasing neutrophil migration into the inflammatory site with reduction of NO synthesis by macrophages.

Acknowledgments

The authors are indebted to Hermann Ferreira Costa, Gláucia Faheina, Adriano Alves, Anne Abreu, Laércia Paiva, Victor Brito, Priscila Jacob and José Crispim Duarte for the valuable technical assistance.

Declaration of interest

This work had financial support of Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PRONEX/CNPq MCT/Brasil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brasil). The authors report no declarations of interest.

References

- Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010, 140, 771–776.
- Majno, G. *The Healing Hand - Man and wound in the ancient world*. Cambridge: MA: Harvard University Press; 1975.
- Nathan, C., Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010, 140, 871–882.
- Vane, J.R., Botting, R.M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998, 104, 2S–8S; discussion 21S.
- Burian, M., Geisslinger, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther* 2005, 107, 139–154.
- Morrow, J.D., Roberts, II L.J. Lipid-Derived Autacoids: Eicosanoids and Platelet-Activating Factor. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, ed. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12e. New York: McGraw – Hill, 2010: 911–936.
- Amann, R., Peskar, B.A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur J Pharmacol* 2002, 447, 1–9.
- Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M., Spano, P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science* 1996, 274, 1383–1385.
- Frantz, B., O'Neill, E.A. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF-kappa B. *Science* 1995, 270, 2017–2019.
- Kopp, E., Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994, 265, 956–959.
- Pillinger, M.H., Capodici, C., Rosenthal, P., Kheterpal, N., Hanft, S., Philips, M.R., Weissmann, G. Modes of action of aspirin-like drugs: salicylates inhibit erk activation and integrin-dependent neutrophil adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95, 14540–14545.
- Wermuth, C.G. Selective optimization of side activities: another way for drug discovery. *J Med Chem* 2004, 47, 1303–1314.
- Passos, C.S., Arbo, M.D., Rates, S.M.K., Poser, G.L.V. Terpenoides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Rev Bras Farmacogn* 2009; 19:140–149.
- Lewis, R.J. Synonym Cross-Index. Hazardous Chemicals Desk Reference: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. p. 1487–1945.
- Hattori, A. [Camphor in the Edo era - camphor and borneol for medicines]. *Yakushigaku Zasshi* 2000, 35, 49–54.
- Hattori, A. [Historical study of a moth repellent, "Fujisawa Camphor" (2) manufacture of borneol]. *Yakushigaku Zasshi* 2001, 36, 108–112.
- Stockman, R. The Physiological Action of Borneol. A Contribution to the Pharmacology of the Camphor Group. *J Physiol (Lond)* 1888, 9, 65–91.
- Liu, R., Zhang, L., Lan, X., Li, L., Zhang, T.T., Sun, J.H., Du, G.H. Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor KappaB signaling pathway. *Neuroscience* 2011, 176, 408–419.
- Chen, X.H., Lin, Z.Z., Liu, A.M., Ye, J.T., Luo, Y., Luo, Y.Y., Mao, X.X., Liu, P.Q., Pi, R.B. The orally combined neuroprotective effects of sodium ferulate and borneol against transient global ischaemia in C57 BL/6J mice. *J Pharm Pharmacol* 2010, 62, 915–923.
- Horváthová, E., Slamenová, D., Marsálková, L., Sramková, M., Wsóllová, L. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. *Food Chem Toxicol* 2009, 47, 1318–1323.
- Silva-Filho, J.C., Oliveira, N.N., Arcanjo, D.D., Quintans-Junior, L.J., Cavalcanti, S.C., Santos, M.R., et al. Investigation of Mechanisms Involved in (-)-Borneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110:171–177.
- Food and drugs analysis. *Analyst* 1914; 39(465).
- Thomas, M.R. Salicylic Acid and Related Compounds. [Online] In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/0471238961.1901120920081513.a01.pub2>
- Almeida, R.N., Falcão, A.C.G.M., Diniz, R.S.T., Quintans-Júnior, L.J., Polari, R.M., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Duarte, J.C., Ferreira, C.D., Antonioli, A.R., Araújo, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farm* 80, 1999:72–76.
- de Vasconcelos, D.I., Leite, J.A., Carneiro, L.T., Piuvezam, M.R., de Lima, M.R., de Moraes, L.C., Rumjanek, V.M., Rodrigues-Mascarenhas, S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. *Mediators Inflamm* 2011, 2011, 912925.

26. Marinho, M.G.V., Brito, A.G., Carvalho, K.A., Bezerra-Santos, C.R., Andrade, L.H.C., Barbosa-Filho, J.M., et al. Amburana cearensis e cumarina imunomodulam os níveis de anticorpos antígeno-específico em camundongos BALB/c sensibilizados com ovalbumina. *Lat Am J Pharm* 2004; 23:5.
27. Doherty, N.S., Poubelle, P., Borgeat, P., Beaver, T.H., Westrich, G.L., Schrader, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1985, 0, 769–789.
28. Kolaczowska, E., Koziol, A., Plytycz, B., Arnold, B. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. *Immunobiology* 2010, 215, 492–504.
29. Costa, H.F., Bezerra-Santos, C.R., Barbosa-Filho, J.M., Martins, M.A., Piuevezam, M.R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. *Int Immunopharmacol* 2008, 8, 519–525.
30. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982, 126, 131–138.
31. Tim M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55–63.
32. Lai, L.H., Chan, F.K. Nonsteroid anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal injury. *Curr Opin Gastroenterol* 2009, 25, 544–548.
33. Anderson, G.D. Gender differences in pharmacological response. *Int Rev Neurobiol* 2008, 83, 1–10.
34. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962, 111, 544–547.
35. Levy, L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci* 1969, 8, 601–606.
36. Vaz, Z.R., Filho, V.C., Yunes, R.A., Calixto, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 278, 304–312.
37. Medeiros, M.V., Binhara, I.M., Moreno Júnior, H., Zatz, R., De Nucci, G., Antunes, E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. *Eur J Pharmacol* 1995, 285, 109–114.
38. Handy, R.L., Moore, P.K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br J Pharmacol* 1998, 123, 1119–1126.
39. Damas, J., Remacle-Volon, G. Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. *Eur J Pharmacol* 1992, 211, 81–86.
40. Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 2004, 142, 331–338.
41. Falcão, E.P., de Melo, S.J., Srivastava, R.M., Catanho, M.T., Do Nascimento, S.C. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. *Eur J Med Chem* 2006, 41, 276–282.
42. Rinaldi, S., Silva, D.O., Bello, F., Alviano, C.S., Alviano, D.S., Matheus, M.E., Fernandes, P.D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Cocos nucifera* L. (Palmae). *J Ethnopharmacol* 2009, 122, 541–546.
43. Claudino, R.F., Kassuya, C.A., Ferreira, J., Calixto, J.B. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 318, 611–618.
44. Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., Tanaka, T., Yoshida, N., Narumiya, S. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 1998, 395, 281–284.
45. DiPasquale, G., Rassaert, C., Richter, R., Welaj, P., Tripp, L. Influence of prostaglandins (Pg) E2 and F2 on the inflammatory process. *Prostaglandins* 1973, 3, 741–757.
46. Maurer, M., Bader, M., Bas, M., Bossi, F., Cicardi, M., Cugno, M., Howarth, P., Kaplan, A., Kojda, G., Leeb-Lundberg, F., Lötvall, J., Magerl, M. New topics in bradykinin research. *Allergy* 2011, 66, 1397–1406.
47. Kaplan, A.P., Joseph, K., Silverberg, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 2002, 109, 195–209.
48. Campos, M.M., Calixto, J.B. Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol* 1995, 114, 1005–1013.
49. Buritova, J., Chapman, V., Honoré, P., Besson, J.M. The contribution of peripheral bradykinin B2 receptors to carrageenan-evoked oedema and spinal c-Fos expression in rats. *Eur J Pharmacol* 1997, 320, 73–80.
50. Gardes, J., Michineau, S., Pizard, A., Alhenc-Gelas, F., Rajerison, R.M. Aspirin inhibits human bradykinin B2 receptor ligand binding function. *Biochem Pharmacol* 2008, 75, 1807–1816.
51. Jutel, M., Akdis, M., Akdis, C.A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 2009, 39, 1786–1800.
52. Skidgel, R.A., Erdős, E.G.. Histamine, Bradykinin, and Their Antagonists. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, ed. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12e. New York: McGraw–Hill, 2010:937–958.
53. Whittle, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br J Pharmacol Chemother* 1964, 22, 246–253.
54. Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallée, F., Flahaut, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol* 1980, 61, 17–24.
55. Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 1968, 32, 295–310.
56. Leite, D.F., Echevarria-Lima, J., Ferreira, S.C., Calixto, J.B., Rumjanek, V.M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. *J Leukoc Biol* 2007, 82, 630–637.
57. El Alwani, M., Wu, B.X., Obeid, L.M., Hannun, Y.A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacol Ther* 2006, 112, 171–183.
58. Zheng, Z., Li, H., Zhang, Z., Meng, J., Mao, D., Bai, B., Lu, B., Mao, P., Hu, Q., Wang, H. Enterovirus 71 2C protein inhibits TNF- α -mediated activation of NF- κ B by suppressing I κ B kinase β phosphorylation. *J Immunol* 2011, 187, 2202–2212.
59. Sun, S.C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res* 2011, 21, 71–85.
60. Juhás, S., Cikós, S., Czikková, S., Veselá, J., Il'ková, G., Hájek, T., Domaracká, K., Domaracký, M., Bujnáková, D., Rehák, P., Koppel, J. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. *Folia Biol (Praha)* 2008, 54, 1–7.
61. Oswald, I.P., Wynn, T.A., Sher, A., James, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 8676–8680.
62. Hackstein, H., Morelli, A.E., Larregina, A.T., Ganster, R.W., Papworth, G.D., Logar, A.J., Watkins, S.C., Falo, L.D., Thomson, A.W. Aspirin inhibits *in vitro* maturation and *in vivo* immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells. *J Immunol* 2001, 166, 7053–7062.
63. Bufan, B., Mojsilovic, S., Vucicevic, D., Vučević, D., Vasilijic, S., Balint, B., Colic, M. Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human

- monocyte-derived dendritic cells *in vitro*. *Int Immunopharmacol* 2009, 9, 910–917.
64. Bergman, M., Djaldetti, M., Salman, H., Bessler, H. Inflammation and colorectal cancer: does aspirin affect the interaction between cancer and immune cells? *Inflammation* 2011, 34, 22–28.
65. Lin, C.F., Tsai, C.C., Huang, W.C., Wang, C.Y., Tseng, H.C., Wang, Y., Kai, J.I., Wang, S.W., Cheng, Y.L. IFN-gamma synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10. *J Cell Biochem* 2008, 105, 746–755.
66. Kröncke, K.D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1997, 1, 107–120.
67. Drapier, J.C., Hibbs, J.B. Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988, 140, 2829–2838.
68. Aller, M.A., Arias, J.L., Sánchez-Patán, F., Arias, J. The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit* 2006, 12, RA225–RA234.
69. Marcinkiewicz, J., Grabowska, A., Chain, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Eur J Immunol* 1995, 25, 947–951.
70. Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., Salvemini, D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005, 57, 217–252.
71. Hibbs, J.B. Jr, Taintor, R.R., Vavrin, Z. Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 123, 716

