



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO MHTP, UMA NOVA MOLÉCULA DO TIPO
ALCALOIDE TETRAHIDROISOQUILÍNICO**

JOÃO PESSOA- PARAÍBA

2014

MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO MHTP, UMA NOVA MOLÉCULA DO TIPO
ALCALOIDE TETRAHIDROISOQUILÍNICO**

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 a obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR, área de concentração: BIOLOGIA E FISILOGIA CELULAR.

**Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Piuvezam
ORIENTADORA**

JOÃO PESSOA- PARAÍBA

2014

O48e *Oliveira, Maria Talita Pacheco de.*

Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahydroisoquinólico / Maria Talita Pacheco de Oliveira.- João Pessoa, 2014.

113f. : il.

Orientadora: Marcia Regina Piuvezam

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO MHTP, UMA NOVA MOLÉCULA DO TIPO
ALCALOIDE TETRAHIDROISOQUILÍNICO**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Piuvezam (Orientadora)
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues (Examinador Externa)
(Departamento de Biotecnologia – UFPB)

Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua (Examinadora Interna)
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB)

JOÃO PESSOA – PB

2014

DEDICATÓRIA

Àqueles que amo.

Meus pais, minha irmã e minha sobrinha.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
— Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Deixo eternizada toda minha gratidão a Marcia Regina Piuvezam, minha orientadora, que foi sempre um pilar importante para a minha formação. Muito obrigada por todo o estímulo, paciência, orientação acadêmica e de vida, e principalmente por confiar na minha competência na realização de mais um trabalho.

Ao professor Dr. Luís Cezar Rodrigues por ter cedido gentilmente o MHTP que gerou esse trabalho, assim como sua aluna de mestrado Manuela Barbosa Cordeiro que sintetizou o alcaloide.

Aos membros da Banca Examinadora, Prof. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua e Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues por aceitar fazer parte e contribuir para o enriquecimento desse trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e suporte técnico através do Portal de Periódicos;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial, a secretária da Pós-Graduação, Ludmilla Maul, pela dedicação, boa vontade e excelência profissional.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, especialmente, a Professora Dra. Patrícia Mirella, pela oportunidade de vivenciar a experiência em sala de aula sob sua orientação.

À José Crispim Duarte, por sua dedicação incomparável ao biotério, por sua paciência, pelas conversas, conselhos e amizade.

À Mônica, que ao longo desse trabalho foi mais do que uma funcionária, uma dose diária de muita simpatia, humildade, humor e amizade no nosso laboratório.

Ao laboratório de Imunofarmacologia e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por possibilitar a infraestrutura necessária para a realização desta pesquisa;

Aos professores do Laboratório de Imunofarmacologia Sandra Mascarenhas, Giciane Carvalho Vieira e Cláudio Santos, obrigada por estarem presentes e contribuírem no que foi preciso.

A minha família científica, amigos e companheiros de experimento que contribuíram para esse momento: Adriano, Alisson, Ana Luiza, Danilo, Éssia, Fagner, Laércia, Talissa, Fagner, Giciane, Hermann, José Guilherme, Luiz, Raquel, Larissa, sobretudo a Rachel, que se doou junto comigo na realização desse trabalho, companheira fiel em todos os momentos que uma dissertação pode ter. Obrigada Filhote, por me ensinar o que sabia e me aguentar durante esses dois anos todo o santo dia!

Aos Professores Sandra Rodrigues Mascarenhas, Robson Cavalcante Veras, Demetrius Antonio Machado de Araújo e Marianna Vieira Sobral, que colaboraram com infraestrutura e apoio científico.

À minha querida turma de mestrado: Allane, Derek, Isis, Layanne, Pamella, Rachel e Sandro. Foi muito importante contar com a amizade e dedicação de todos vocês.

À Família Lima Araújo, principalmente Ana e Aline, muito obrigada pelo apoio, amor e amizade.

À Família Torrezan Nitão, não tenho palavras para agradecer por todo o amor construído todos esses anos. Dona Regina, Seu Hostilio, Pedro, Lara, Érick, Mana que me fizeram da família. E claro, a culpada por tudo isso, Elis. Obrigada amiga, por todos os momentos vividos, pelo imenso apoio, pela paciência, e por acreditar em mim quando eu achei que não dá certo.

À Jacqueline, uma grande amiga. Obrigada por estar perto sempre, e dar mais coerência pra minha vida.

As amigas de sempre, Renatta, Giselli, Jonázia e Laura.

À cada membro da Família Pacheco, que me apoiam em todos o meus projetos, e fazem de mim uma pessoa melhor.

À minha irmã, Lívia, que foi essencial em todas as fases da minha vida. Muito obrigada por ter sido sempre muito mais do que irmã. Ao meu cunhado, Júnior, que por todos os motivos é um irmão de coração. E finalmente aos dois, por ter me dado o prazer de ser tia de Alice.

Aos meus pais, razão de todo meu esforço, agradeço a educação que foi me dada, o amor, o incentivo, a compreensão, o cuidado e toda a base para crescer.

À todos que não citei, mas que fizeram parte dessa conquista.

À Deus pela dádiva da vida e pela oportunidade de evoluir todos os dias.

RESUMO

A inflamação é uma resposta imune que visa estabelecer a homeostase tecidual durante uma infecção ou lesão. Reconhecida como um processo benéfico, a inflamação pode tornar-se prejudicial quando em excesso. Assim, estratégias terapêuticas que possam atuar na resolução da inflamação são estudadas e desenvolvidas, tendo os produtos naturais e seus derivados um papel de destaque para as descobertas de novas moléculas anti-inflamatórias. Nesse contexto, o alcaloide 1-(3 metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4 tetrahidroisoquinolina (MHTP) foi sintetizado para prospecção de novos compostos com propriedades terapêuticas. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório do MHTP, *in vitro* e *in vivo*, utilizando modelo experimental de inflamação aguda em camundongos. Inicialmente, foi avaliada a viabilidade celular em cultura de macrófagos peritoniais tratados com várias concentrações de MHTP. Observou-se que o alcaloide não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 10, 25 ou 50 μM . Nestas concentrações o MHTP inibiu ($p < 0,001$) em 24%, 47% e 39% respectivamente, a produção de NO de macrófagos estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além disso, o tratamento com 10 μM de MHTP diminuiu ($p < 0,001$) os níveis das citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e IL-10 em 35,7%, 31,0% e 33,4% respectivamente, sem alterar os níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 no sobrenadante da cultura de macrófagos. Adicionalmente foi avaliado o efeito anti-inflamatório do MHTP *in vivo*. O pré-tratamento oral com MHTP (2,5, 5 ou 10 mg/kg) apresentou efeito anti-edematogênico ($p < 0,05$) no edema de pata induzido por carragenina inibindo a ação da prostaglandina mas independente da degranulação de mastócitos ou atividade da histamina. O alcaloide (2,5 mg/kg) também foi capaz de inibir ($p < 0,01$) a migração de leucócitos totais em 41,4% para a cavidade peritonal durante a inflamação induzida com carragenina, diminuindo o número de células polimorfonucleares (PMN) (59,6%) e proteínas totais (29,4%), sem alterar células mononucleares (MNs) e os níveis de MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6 e IL-10. Após caracterização do efeito anti-inflamatório, prosseguimos o estudo avaliando a atividade do MHTP no modelo experimental de lesão pulmonar aguda, onde o pré-tratamento com o MHTP (2,5 mg/kg) inibiu ($p < 0,001$) a migração de células inflamatórias totais e PMNs para os pulmões em 58% e 67,5%, respectivamente, sem alterar os MNs e a quantidade de proteínas totais. Os resultados obtidos nesse estudo nos permite concluir que a molécula MHTP apresenta efeito anti-inflamatório por inibir vários componentes do processo inflamatório inclusive parâmetros relacionados a lesão pulmonar aguda. Portanto, respaldamos o MHTP como um protótipo de molécula com atividade anti-inflamatória no desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados na resolução do processo inflamatórios.

Palavras chaves: Inflamação aguda; Alcaloide; MHTP; Anti-inflamatório; Prospecção de fármaco.

ABSTRACT

Inflammation is an immune response that aims to establish tissue homeostasis during infection or injury. Even as a beneficial process, the inflammation can become damaging when it is in excess. Thereby, therapeutic strategies that may act in the resolution of inflammation are studied and developed, having natural products and their compounds as main role in the discovery of new anti-inflammatory molecules. In this context, the alkaloid 1-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (MHTP) was synthesized to prospect new compounds with therapeutic properties. Thus, the goal of this study was to evaluate the MHTP anti-inflammatory effect using mice models of acute inflammation *in vitro* and *in vivo*. At first, we assessed cell viability in cultured peritoneal macrophages treated with a range of concentrations of MHTP. It was found that the alkaloid did not present cytotoxicity at concentrations of 10, 25 or 50 μ M. At these concentrations the MHTP inhibited ($p < 0.001$) the NO production in LPS-stimulated macrophages (1 μ g/mL) in 24%, 47% and 39% respectively. In addition, treatment with 10 μ M of MHTP decreased ($p < 0.001$) levels of IL-1 β , IL-6 and IL-10 in 35.7%, 31.0% and 33.4% respectively without changing the levels of the MCP-1/CCL2 chemokine in the macrophage culture supernatants. Additionally, the *in vivo* anti-inflammatory effect of MHTP was assessed. The oral pre-treatment with MHTP (2.5, 5 or 10 mg/kg) showed anti-edematogenic effect ($p < 0.05$) in carrageenan-induced paw edema by inhibiting the prostaglandin E₂ action independently of mast cell degranulation and histamine activity. The alkaloid (2.5 mg/kg) was also able to inhibit ($p < 0.01$) total leukocyte migration in 41.4% to the peritoneal cavity during inflammation induced by carrageenan, reducing the number of polymorphonuclear cells (PMN) (59.6%) and protein (29.4%), without altering the number of mononuclear cells (MNs) and MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6 and IL-10 levels. Following characterization of the anti-inflammatory effect, we proceed evaluating the activity of MHTP in an experimental model of acute lung injury, in which MHTP pre-treatment with 2.5 mg/kg inhibited ($p < 0.001$) total inflammatory cell migration into the lungs and PMNs in 58% and 67.5%, respectively, without changing the MNs and the amount of total protein. The results obtained in this study allow us to conclude that MHTP molecule has anti-inflammatory effect by inhibiting multiple components of the inflammatory process, including those related to the acute lung injury, therefore supporting the MHTP as a prototype molecule with anti-inflammatory activity in the development of new drugs to be employed to resolve inflammatory processes.

Key words: Acute inflammation; alkaloid; MHTP; Anti-inflammatory; Prospecting drug.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Características gerais da inflamação aguda.....	25
Figura 2:	Componentes da inflamação.....	26
Figura 3:	Via de sinalização da histamina via H1R.....	31
Figura 4:	Síntese de prostaglandinas.....	34
Figura 5:	Recrutamento leucocitário.....	39
Figura 6:	Estrutura química do MHTP.....	46
Figura 7:	Estrutura química das Criptostilinas I, II, III.....	47
Figura 8:	Estrutura química do alcaloide CKD712.....	47
Figura 9:	Estrutura química do alcaloide THI 52.....	48
Figura 10:	Representação da reação de síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.....	53
Figura 11:	Avaliação da atividade do MHTP em modelos <i>in vitro</i>	54
Figura 12:	Avaliação da atividade do MHTP em modelos <i>in vivo</i>	57
Figura 13:	Esquema do protocolo do edema de pata induzido por carragenina.....	58
Figura 14:	Esquema do protocolo do edema de pata induzido por PGE ₂	59

Figura 15:	Esquema do protocolo do edema de pata induzido pelo composto 48/80.....	60
Figura 16:	Esquema do protocolo do edema de pata induzido por histamina.....	61
Figura 17:	Esquema do protocolo da peritonite induzida por carragenina.....	63
Figura 18:	Esquema do protocolo da lesão pulmonar aguda indizada por LPS.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1:	Efeito do MHTP na viabilidade de macrófagos peritoneais murino.....	69
Gráfico 2:	Efeito do MHTP na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais murino estimulados ou não com lipopolissacarídeo.....	70
Gráfico 3:	Efeito do pré-tratamento com MHTP sobre os níveis de MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6 e IL-10 <i>in vitro</i>	72
Gráfico 4:	Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido por carragenina nos diferentes tempos analisados.....	74
Gráfico 5:	Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido por PGE2 em diferentes tempos analisados.....	76
Gráfico 6:	Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido pelo composto 48/80 em diferentes tempos.....	77
Gráfico 7:	Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido pelo composto 48/80 em diferentes tempos.....	78
Gráfico 8:	Efeito do pré-tratamento com MHTP no número de leucócitos total e diferencial e sobre alterações na permeabilidade vascular no modelo de peritonite induzida por carragenina.....	80
Gráfico 9:	Efeito do pré-tratamento com MHTP sobre os níveis de MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6 e IL-10 <i>in vivo</i>	82
Gráfico 10:	Efeito do pré-tratamento com MHTP no número de leucócitos total e diferencial e sobre alterações na permeabilidade vascular no modelo experimental de lesão pulmonar aguda.....	84

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Informações químicas do MHTP.....	53
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
5-HT	5 hidroxitriptamina (Serotonina)
5-LO	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
AP1	Ativador de proteína 1
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Difosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon de cálcio
cAMP	Adenosina-monofosfato cíclico
CaV	Canal de cálcio dependente de voltagem
CC	Beta quimiocina (possui duas cisteínas adjacentes)
CCL2	Quimiocina ligante do motivo CC 2
CKD712	(S)-1-(α -naftilmetil)-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclo-oxigenase -1
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CXC	Alfa quimiocina (possui um aminoácido entre duas cisteínas)
CXCL8	Quimiocina ligante do motivo CXC 8

Da	Daltons
DAG	Diacilglicerol
DC	Células dendríticas
DMSO	Dimetilsufóxido
e.p.m.	Erro padrão da média
ELISA	Do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP	Receptor de Prostaglandina
g/dl	Gramas por decilitro
Gli	Glicina
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Gq/11	Proteína regulatória ligada ao nucleotídeo guanínico tipo q ou 11 de ação estimulatória
H1R	Receptor 1 da Histamina
H2R	Receptor 2 da Histamina
H3R	Receptor 3 de histamina
H4R	Receptor 4 de histamina
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
i. m.	Intramuscular
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10

IL-10R	Receptor de IL 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-6Ra	Receptor de interleucina 6 (alfa)
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzível
IP3	1,4,5-trisfosfato de inositol
Ipl	Intraplantar
IRF-3	Fator de transcrição regulador interferon
IκB	Inibidor do κB
JAK-STAT	Janus kinase/ Sinal transdutor e ativador de transcrição
K ⁺	Íon de potássio
KC	Quimioatratante para neutrófilo da família CXC
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O	Tartarato de sódio e potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA ₄	Leucotrieno A 4
LTB ₄	Leucotrieno B 4
LTC ₄	Leucotrieno C 4
LTs	Leucotrienos
LXAs	Lipoxinas

MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
Mg	Miligramas
mg/kg	Miligrama/kilograma
MHTP	1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina
MIP-1 α/β	Proteína-1 inflamatória de macrófagos α/β
mL	Mililitro
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve de miosina
Mm	Milímetros
MNs	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
N	Número de animais
NALP3	Domínios proteicos para NACHT, LRR e PYD 3
NED	N-naftil-etilenodiamina
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
ng/pata	Nanograma por pata
NK	Células natural killer
Nm	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS-1	Óxido nítrico sintase 1 ou neuronal
NOS-2	Óxido nítrico sintase 2 ou induzível ou iNOS
NOS-3	Óxido nítrico sintase 3 ou endotelial

ONOO-	Peroxinitrito
p/v	Parte/volume
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução fosfato tamponado
PC	Fosfatidilcolina
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ ou Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PKC	Proteína cinase dependente de cálcio
PLA ₂	Enzima fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
PLC β	Isoforma β -1 da fosfolipase C
PMN	Polimorfonucleares
proteína G	Proteína de ligação de nucleotídeos guanina
PSGL1	Glicoproteína da P-selectina 1
RANTES	Quimiocina regulada na ativação, expressa e segregada em célula T normal ou CCL5
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos murinos
ROS	Espécies reativas do oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
RS	Retículo sarcoplasmático
SBF	Soro bovino fetal
sIL6R	Receptor solúvel de interleucina 6
STAT3	Sinal e ativador de transcrição 3

TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
THI52	1- naftiletil -6,7- dihidroxi -1,2,3,4- tetrahidroisoquinolina
TLRs	Receptores do tipo Toll (Toll-like)
TNF- α	Fator de necrose tumoral
U.I.	Unidade internacional de medida
v.o.	Via oral
v/v	Volume/volume
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
WPB	Corpos de Weibel-Palade
γ -Glu	Ácido gamma-glutâmico
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas/mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Inflamação.....	24
1.2	Inflamação aguda.....	25
1.3	Componentes da Inflamação.....	26
1.3.1	Indutores da inflamação.....	27
1.3.2	Sensores da inflamação (vias de sinalização).....	27
1.3.3	Mediadores da inflamação.....	28
1.3.3.1	Aminas vasoativas.....	29
1.3.3.2	Peptídeos vasoativos.....	32
1.3.3.3	Fragmentos do complemento.....	32
1.3.3.4	Mediadores lipídicos.....	33
1.3.3.5	Citocinas.....	35
1.3.3.6	Quimiocinas.....	37
1.3.3.7	Enzimas proteolíticas.....	38
1.3.3.8	Óxido Nítrico.....	38
1.4	Eventos celulares e teciduais na inflamação.....	39
1.4.1	Células da inflamação.....	40
1.4.1.1	Neutrófilos.....	40
1.4.1.2	Monócitos e Macrófagos.....	41
1.5	Resolução da Inflamação.....	42
1.5.1	Intervenção farmacológica na inflamação.....	42
1.6	Alcaloides.....	43

1.7	Exploração de produtos naturais versus Síntese química.....	45
1.8	A 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina.....	46
2	OBJETIVOS	49
2.1	Objetivo Geral.....	50
2.2	Objetivos Específicos.....	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Animais.....	52
3.2	Obtenção e preparo da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MHTP).....	52
3.3	Determinação da citotoxicidade do MHTP.....	54
3.4	Determinação da viabilidade celular.....	55
3.5	Determinação dos níveis de NO	56
3.6	Dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura.....	56
3.7	Edema de pata induzido por carragenina.....	57
3.8	Edema de pata induzido por Prostaglandina (PGE ₂).....	59
3.9	Edema de Pata Induzido Pelo Composto 48/80	60
3.10	Edema de Pata Induzido Histamina.....	61
3.11	Peritonite induzida por carragenina.....	62
3.11.1	Contagem de células total e diferencial do lavado peritoneal.....	63
3.11.2	Avaliação da permeabilidade microvascular.....	64
3.11.3	Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal.....	65
3.12	Modelo experiemetal de Lesão Pulmonar Aguda.....	65
3.13	Análise Estatística	67
4.	RESULTADOS	68
4.1	Avaliação do efeito do MHTP em modelos de inflamação aguda <i>in vitro</i>	69

4.1.1	Estudo da citotoxicidade do MHTP em macrófagos peritoneais murino.....	69
4.1.2	Efeito do MHTP na produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais murino.....	70
4.1.3	Efeito do MHTP sobre os níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 e das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda <i>in vitro</i>	71
4.2	Avaliação do efeito do MHTP em modelos de inflamação aguda <i>in vivo</i>	73
4.2.1	Efeito do MHTP no edema de pata induzido por carragenina.....	73
4.2.2	Efeito do MHTP no edema de pata induzido por prostaglandina E ₂ (PGE ₂).....	75
4.2.3	Efeito do MHTP no edema de pata induzido pelo composto 48/80.....	77
4.2.4	Efeito do MHTP no edema de pata induzido por histamina.....	78
4.2.5	Efeito do MHTP na migração celular e permeabilidade vascular induzida por carragenina.....	79
4.2.6	Efeito do MHTP sobre os níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 e das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda <i>in vivo</i>	81
4.2.7	Efeito do pré-tratamento com MHTP no modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA).....	83
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS	97
8	ANEXO	112

INTRODUÇÃO

1.Introdução

1.1 Inflamação

A Inflamação (do latim *inflammare* ou incendiar) é uma resposta imune, empregada por ambos os sistemas imunes inato e adaptativo, durante uma infecção ou lesão (SCOTT et al., 2004). O primeiro a definir os sintomas clínicos da inflamação foi o médico romano Cornélio Celsus (século I), conhecidos como os quatro sinais cardinais da inflamação: *rubor et tumor cum calore et dolore* (vermelhidão e inchaço com calor e dor). O quinto sinal cardinal, *functio laesa* (perturbação da função), foi adicionado por Rudolph Virchow em 1858 em seu livro *Cellular Pathologie* (MAJNO, 1975). Embora os quatro sinais cardinais de Celsus só se aplicam a inflamação que acompanha feridas e infecções agudas, *functio laesa* é o único sinal universal que acompanha todos os processos inflamatórios (MEDZHITOV, 2010). Hoje, está estabelecido que os sinais clínicos da inflamação são resultados da vasodilatação (calor e rubor), do acúmulo de leucócitos e do aumento do fluido intersticial (tumor ou edema), da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (dor) e inibição do reflexo muscular, rompimento da estrutura do tecido (perda da função) (SCOTT et al., 2004; ALLER et al., 2007).

Iniciada como uma resposta essencialmente adaptativa, o processo inflamatório visa restaurar a homeostase do organismo. Esse processo se dá, geralmente, à custa de uma diminuição transitória da função do tecido, com dano inevitável ao próprio, o que por sua vez pode contribuir para a patogênese de doenças de homeostase alterada (ASHLEY et al., 2012). Dessa forma entende-se que, a inflamação é um processo benéfico, quando acontece em proporções apropriadas, mas pode facilmente tornar-se prejudicial quando em excesso devido ao seu potencial em danificar o tecido (MEDZHITOV, 2010).

1.2 Inflamação aguda

A inflamação aguda trata-se de uma resposta imediata (minutos, horas e/ou dias), sendo, normalmente, benéfica para o hospedeiro. Desencadeada devido à presença de infecções ou lesão do tecido, envolve eventos vasculares e celulares como vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas de fase aguda, que leva a formação de edema, liberação de mediadores, migração de células, principalmente neutrófilos, para o sítio lesado, cuja função é erradicar o estímulo inicial e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação (Figura 1). Se a inflamação aguda for bem sucedida, restaurando a arquitetura do tecido normal ou formando uma cicatriz de tecido conjuntivo, a homeostasia é restabelecida (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004; KRISHNAMOORTHY; HONN, 2006; POBER; SESSA, 2007). O sucesso da resposta inflamatória aguda resulta na eliminação dos agentes infecciosos seguido por uma fase de resolução e reparação, que é mediada principalmente por monócitos que foram recrutados para o foco inflamatório bem como por macrófagos residentes dos tecidos (MEDZHITOV, 2010).

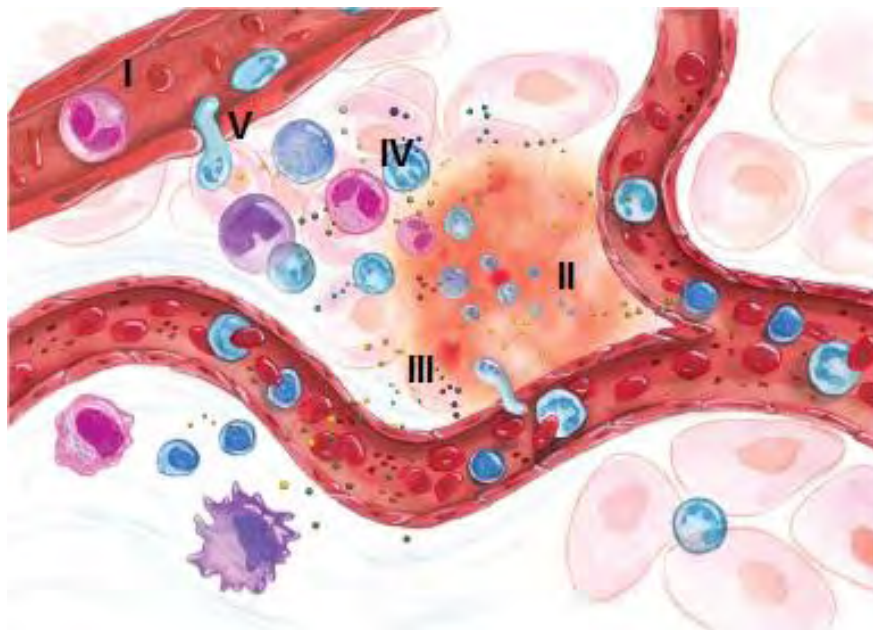


Figura 1: Características gerais da inflamação aguda. Visão geral do processo inflamatório agudo. Nos primeiros momentos após lesão ou infecção, observa-se o processo de vasodilatação do endotélio vascular (I), o que permite exsudação de fluido rico em proteínas de fase aguda (II). Nessa fase são liberados diversos mediadores inflamatórios que controlam a inflamação (III). Em adição, os leucócitos são recrutados para o local (IV), principalmente os neutrófilos.

Fonte: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/wp-content/uploads/2012/03/Citocinas.jpg>>

Porém, se o estímulo não é eliminado, o processo inflamatório irá persistir e evoluir. Neste caso, ocorrem alterações na composição dos leucócitos infiltrantes, que passam de neutrófilos, para uma mistura de células mononucleares, principalmente linfócitos e macrófagos (POBER; SESSA, 2007). Assim, caracteriza-se uma inflamação crônica que possui maior duração (semanas, meses e/ou anos) e está associada à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

1.3 Componentes da Inflamação

Atualmente sabe-se que a inflamação apresenta-se em muitas formas e modalidades que são regidas por diferentes mecanismos de indução, regulação e resolução. Porém, de uma forma geral pode-se dividir didaticamente a resposta inflamatória em quatro componentes principais: os **indutores inflamatórios**, os **sensores** que detectam os indutores, os **mediadores inflamatórios** induzidos pelos sensores, e **as células e tecidos-alvo** que são afetados pelos mediadores inflamatórios (Figura 2). Cada componente participa de múltiplas formas e em diferentes combinações, em função da ativação de vias inflamatórias distintas (MEDZHITOV, 2010).

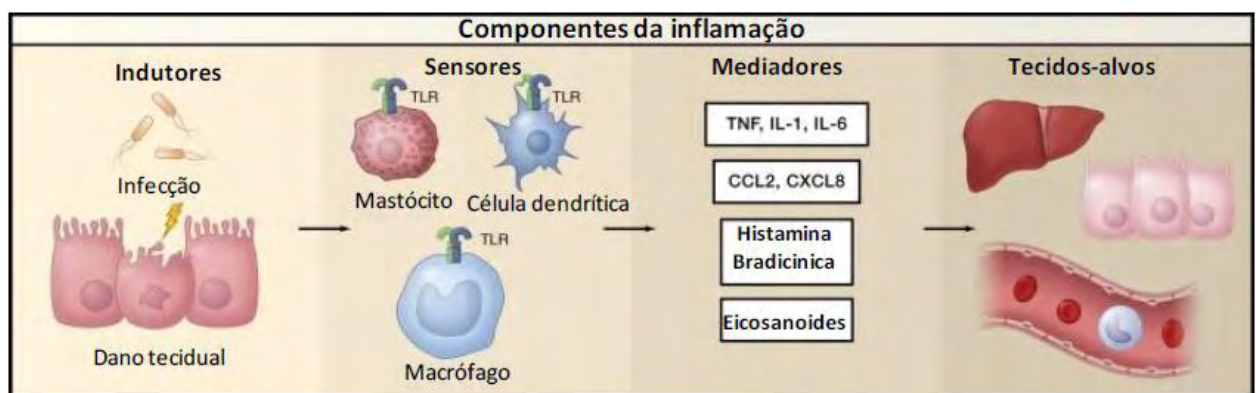


Figura 2: Componentes da inflamação. A via inflamatória consiste de indutores, sensores, mediadores, e os tecidos-alvos. Indutores iniciam a resposta inflamatória e são detectados por sensores (receptores) expressos em células especializadas, como macrófagos teciduais residentes, células dendríticas, e mastócitos. Elas induzem a produção de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas e eicosanoides bioativos. Estes mediadores inflamatórios agem em vários tecido-alvos para provocar alterações nos seus estados funcionais que otimizam a adaptação à condição nociva. Os componentes específicos apresentados representam apenas uma pequena amostra de uma miríade de diferentes sensores, mediadores, e os tecidos-alvos envolvidos na resposta inflamatória. (Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2010).

1.3.1 Indutores da inflamação

Os indutores são os sinais que iniciam a resposta inflamatória, podendo ser divididos em duas classes: exógenos e endógenos (MEDZHITOV, 2008). Os indutores exógenos são divididos em três classes: padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs, fatores de virulência e fatores de origem não microbiana. PAMPs é um conjunto limitado e definido de padrões moleculares conservados presente em todos os microorganismos de uma determinada classe e reconhecidos por um conjunto de receptores correspondentes no hospedeiro. Os fatores de virulência, em contraste com PAMPs, não são detectados por receptores específicos, mas pelos efeitos da sua atividade, capaz de desencadear uma resposta inflamatória. Os indutores de origem não microbiana que incluem alérgenos, irritantes, corpos estranhos e compostos tóxicos são detectados por mimetizarem a atividade de virulência de parasitas ou por atuar como agentes irritantes da mucosa. Os sensores para alérgenos são em grande parte desconhecidos. (MAJNO; JORIS, 2004). Indutores endógenos, também denominados alarminas ou “sinais de perigo” são constituintes de células normais que podem ser liberados no meio extracelular durante estresse celular ou danos teciduais (KLUNE et al., 2008). A identidade e as características desses sinais são mal definidas, mas estes provavelmente pertencem a diferentes classes funcionais de acordo com a natureza e o grau de anomalias do tecido. Por exemplo, durante a morte celular por necrose, a integridade da membrana plasmática é desfeita resultando na libertação de certos constituintes celulares, incluindo o ATP (trifosfato de adenosina), gerando uma resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2010).

1.3.2 Sensores da inflamação (vias de sinalização)

A resposta inflamatória é coordenada por uma grande variedade de mediadores e receptores expressos em células especializadas como macrófagos teciduais residentes, células dendríticas, e mastócitos, formando redes reguladoras complexas. Dependendo da natureza do estímulo, o processo inflamatório poderá ser induzido por diferentes vias, referente ao receptor específico para o estímulo (MEDZHITOV, 2008). Por exemplo, agentes patogênicos bacterianos são detectados pelos receptores do sistema imune inato, tais como receptores Toll-

like (TLRs), expressos em macrófagos teciduais residentes. Sua ativação induz a sinalização intracelular por várias vias que culminam na ativação do NF- κ B (fator nuclear kappa B), encontrado em praticamente todos os tipos de células em um estado inativado vinculado a um inibidor da proteína, I κ B (HAYDEN; GHOSH, 2008). O NF- κ B quando é liberado transloca-se para o núcleo, induzindo a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6) e quimiocinas (MCP-1/CCL2 e CXCL8), bem como prostaglandinas. Estes mediadores inflamatórios agem sobre os tecidos-alvo, incluindo os vasos sanguíneos locais, para induzir a vasodilatação, extravasamento de neutrófilos e plasma para o tecido infectado (MEDZHITOV, 2010; ASHLEY et al., 2012).

As infecções virais, por sua vez, vão atuar produzindo interferons (IFN- α , IFN- β) por células infectadas e ativando linfócitos citotóxicos. As atividades típicas de fatores de virulência podem ser detectadas por sensores especializados, como por exemplo, o inflamassoma NALP3, sensível ao efluxo de íons de K⁺ liberados pela formação de poros. Do mesmo modo, a atividade proteolítica de proteases produzidas por helmintos é detectada por receptores de basófilos ainda desconhecidos, que levam à produção de histamina, IL-4, IL-5, e IL-13 por mastócitos e basófilos. Essa última resposta também pode ser desencadeada por alérgenos, resultando em inflamação alérgica que afecta principalmente o epitélio da mucosa, músculos lisos, e vasculatura (MEDZHITOV, 2008; 2010). Com relação a via de sinalização iniciada pelos sinais de perigo, podemos citar o aumento de ATP no meio extracelular que induz uma resposta inflamatória ao ligar-se a purinoceptores na superfície dos macrófagos, aumentando o efluxo de íons de K⁺ e induzindo a secreção de interleucina-1 (MEDZHITOV, 2008; FERRARI et al., 2006).

1.3.3 Mediadores da inflamação

Diversos mediadores inflamatórios são produzidos e/ou liberados pela ação dos indutores do processo inflamatório, com efeito em comum sobre a vasculatura e sobre o recrutamento de leucócitos. Os mediadores podem ser derivados de proteínas do plasma ou secretados por células como leucócitos (macrófagos especializados residente no tecido residente e mastócitos) ou pelas células presentes nos tecidos locais. Alguns mediadores são pré-formados, armazenados em grânulos nos mastócitos e basófilos, ou circulando como precursores inativos no plasma. Outros mediadores são produzidos diretamente em resposta

ao estímulo (MAJNO; JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2008). Os mediadores inflamatórios podem ser classificados em oito grupos de acordo com a sua propriedade bioquímica: I- aminas vasoativas; II- peptídeos vasoativos; III- fragmentos de componentes do complemento; IV- mediadores lipídicos; V- citocinas; VI- quimiocinas; VII- enzimas proteolíticas e o VIII- óxido nítrico (MARCINKIEWICZ, et al. 2003; MEDZHITOV, 2008)

1.3.3.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas (histamina e serotonina), conhecidas como fatores edematogênicos, são liberados de maneira tudo-ou-nada na degranulação de mastócitos. Possuem efeitos complexos sobre a vasculatura, causando um aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo do contexto. As conseqüências imediatas de sua liberação pelos mastócitos podem ser altamente prejudiciais em organismos sensibilizados, resultando em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOV, 2008; KUMAR et al., 2009).

A histamina é mais conhecida por seus efeitos potentes sobre a vasodilatação e contração do músculo liso durante as respostas de hipersensibilidade imediata (SMUDA et al., 2011). Os mastócitos e basófilos são a principal fonte de grânulos armazenados com histamina, que é liberada quando as células desgranulam em resposta a diversos estímulos imunológicos e não imunológicos (por exemplo, o composto 48/80). Os efeitos pleiotrópicos de histamina são acionados por ativação de um ou vários receptores de membrana de histamina (H1, H2, H3 e H4) (JUTEL et al, 2009). O receptor H1 (H1R), acoplado a proteína Gq/11, é considerado o principal para o desenvolvimento dos eventos vasculares. A sua ligação com histamina leva a ativação da isoforma β -1 da fosfolipase C (PLC β), a qual hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3). Este última ativa seus receptores presentes no retículo sarcoplasmático (RS) promovendo a liberação de cálcio (Ca²⁺) desses estoques. O Ca²⁺ presente no citosol ativa a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) que fosforila e ativa os canais de cálcio dependentes de voltagem (CaV) na membrana plasmática permitindo a entrada de Ca²⁺ e dessa forma promovendo a elevação dos níveis de Ca²⁺ intracelular. O Ca²⁺ se liga a calmodulina formando o complexo 4Ca²⁺-calmodulina que por sua vez ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) a qual fosforila a cadeia leve de miosina e promove a

contração das células endoteliais (YUAN, 2000). Adicionado a isso a histamina induz a síntese de prostaciclina (PGI_2), do fator de ativação plaquetária (PAF), liberação de óxido nítrico (NO) e fosforilação seguido de rompimento de componentes da junção celular endotelial. Todos esses eventos convergem para o foco principal que é o aumento da permeabilidade vascular (Figura 3) (KUMAR et al., 2009; JUTEL et al, 2009).

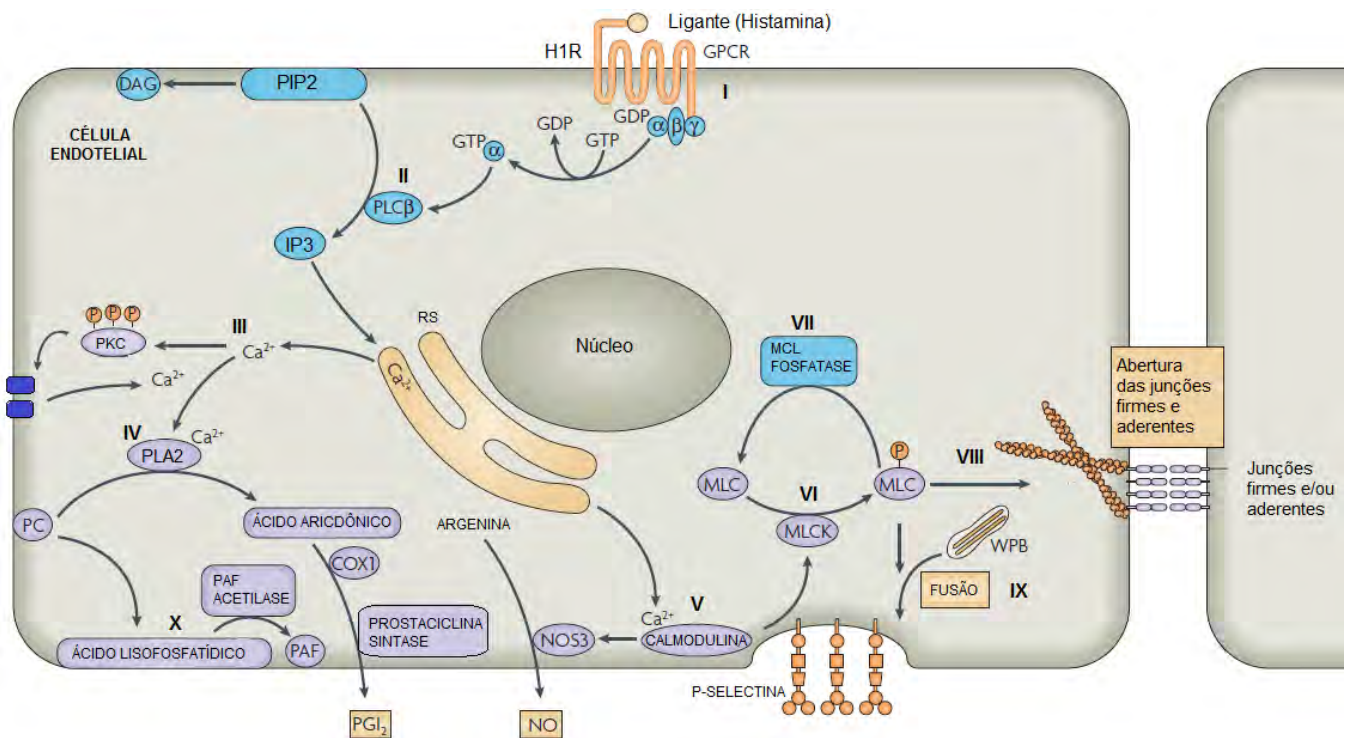


Figura 3: Via de sinalização da histamina via H1R-I. Em resposta à ligação da histamina no receptor H1 acoplado a proteína G (GPCR), a subunidade α troca GDP por GTP e subsequentemente ativa a fosfolipase C (PLC β); II- Esta enzima cliva o fosfatidilinositol - 4,5 - bifosfato (PIP₂) na membrana plasmática, liberando inositol- 1,4,5- trifosfato (IP₃), que por sua vez leva à liberação de íons de Ca²⁺ a partir do endoplasmático retículo (RS). Diacilglicerol (DAG) permanece na membrana como um subproduto desta reação. III- O Ca²⁺ presente no citosol ativa a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) que fosforila e ativa os canais de cálcio dependentes de voltagem (CaV) na membrana plasmática permitindo a entrada de Ca²⁺ e dessa forma promovendo a elevação dos níveis de Ca²⁺ intracelular. IV- O aumento no Ca²⁺ citosólico livre ativa a enzima fosfolipase A2 (PLA2), que cliva a fosfatidilcolina (PC) na membrana do plasma para produzir ácido araquidônico e lisofosfatidilcolina. Ácido araquidônico é convertido pela ciclo-oxigenase -1 (COX-1) e prostaciclina sintase em prostaglandina I₂ (PGI₂), um potente vasodilatador do músculo liso vascular. V- Níveis elevados de Ca²⁺ também leva à ativação da proteína adaptadora citosólica calmodulina. O complexo de Ca²⁺/calmodulina ativa a óxido nítrico sintase 3 (NOS3 ou iNOS) seguida da produção de óxido nítrico (NO), que pode sinergizar com PGI₂ para relaxar células musculares lisas. VI- Ao mesmo tempo, o complexo de Ca²⁺/calmodulina também ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve da miosina (MLC). VII- Normalmente, esta reação é rapidamente terminada por uma fosfatase MLC. VIII- Antes disso a MLC fosforila os filamentos de actina, que ligam às proteínas que formam as junções aderentes e complexos de junção apertadas. Isto abre as ligações, especialmente em células endoteliais venulares. IX- MLC também inicia a exocitose de corpos de Weibel-Palade (WPB), trazendo a P-selectina para a superfície da célula. X- Lisofosfatidilcolina é rapidamente acetilada a fator de ativação plaquetária PAF que pode residir na membrana plasmática e fornecer sinais de ativação a leucócitos. (Fonte: Adaptado de POBER; SESSA, 2007).

A serotonina ou 5 hidroxitriptamina (5-HT) é um importante neurotransmissor no cérebro, envolvida na sensibilização de nociceptores, regulação do sono, temperatura e pressão arterial. Na inflamação, a serotonina pode influenciar na mobilidade e proliferação de linfócitos, na fagocitose, nas propriedades citolíticas e na síntese de citocinas e quimiocinas. A diversidade dos seus efeitos imunomoduladores é devido a heterogeneidade dos receptores serotoninérgicos. Além dessas atividades, a serotonina apresenta ações periféricas similares àquelas da histamina: é produzida e liberada por mastócitos e plaquetas, promove a vasodilatação dependente de óxido nítrico para aumentar a permeabilidade vascular (JUTEL et al., 2009; SEPIASHVILI et al., 2013).

1.3.3.2 Peptídeos vasoativos

Peptídeos com propriedades vasoativas desempenham um papel fisiológico importante na regulação do tônus, reatividade e estrutura vascular. Em condições patológicas, alterações na regulação dos peptídeos vasoativos resultam em disfunção endotelial, remodelamento e inflamação vascular (CALLERA et al., 2007). Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados de forma ativa em vesículas secretoras (substância P) ou gerado pelo processamento proteolítico de precursores inativos do fluido extracelular (cininas, fibrinopeptídeo A, fibrinopeptídeo B e produtos de degradação da fibrina) (MEDZHITOV, 2008).

1.3.3.3 Fragmentos do complemento

O sistema complemento é composto por um grande número de proteínas (fragmentos) plasmáticas distintas que reagem entre si para opsonizar patógenos e induz uma série de respostas inflamatórias que contribuem para combater a infecção. O sistema complemento pode proteger contra a infecção das seguintes maneiras: gerando um grande número de proteínas do complemento ativadas que se ligam de forma covalente a agentes patogênicos, opsonizando-os para engolfamento pelos fagócitos; recrutando e ativando mais fagócitos para o local de ativação do complemento; destruindo bactérias pela criação de poros na sua

membrana (JANEWAY, 2001). Além disso, alguns fragmentos do complemento (C3a, C4a e C5a), conhecidos como anafilatoxinas, promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos e induz a degranulação dos mastócitos, afetando, assim, a vasculatura (MEDZHITOV, 2008; KUHR et al., 2010).

1.3.3.4 Mediadores Lipídicos

Os mediadores de lípidos (eicosanóides e fatores de ativação de plaquetas - PAF) são derivados a partir de fosfolípidos, tais como a fosfatidilcolina, presente na membrana interna da célula. Após um aumento nos níveis intracelular de Ca^{2+} , ocorre a ativação da enzima citosólica fosfolipase A_2 , que por sua vez cliva a fosfatidilcolina em ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico (Figura 3) (MEDZHITOV, 2008).

O ácido araquidônico (AA) é metabolizado para formar eicosanóides ou por ciclooxigenases (COX1 e COX2), que geram as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos ou por lipoxigenase, os quais geram os leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXAs) (MEDZHITOV, 2008; RAHNAMA et al., 2012). A COX-1 (ciclooxigenase 1) é a enzima responsável pela síntese basal e constitutiva de prostaglandina, enquanto que a COX-2 (ciclooxigenase 2) é induzível, e possui papel importante no processo inflamatório (FUNK, 2001). Ambas as isoformas da ciclooxigenase produzem PGH_2 , o qual está envolvido nas duas vias de síntese de prostanóides. Primeiro PGH_2 é o substrato para as enzimas que produzem as outras prostaglandinas e tromboxano A_2 . Em segundo lugar, PGH_2 sofre rearranjo espontâneo rapidamente em solução aquosa a PGE_2 , PGD_2 , $PGF_2\alpha$, PGI_2 (Figura 4) (RAHNAMA et al., 2012)

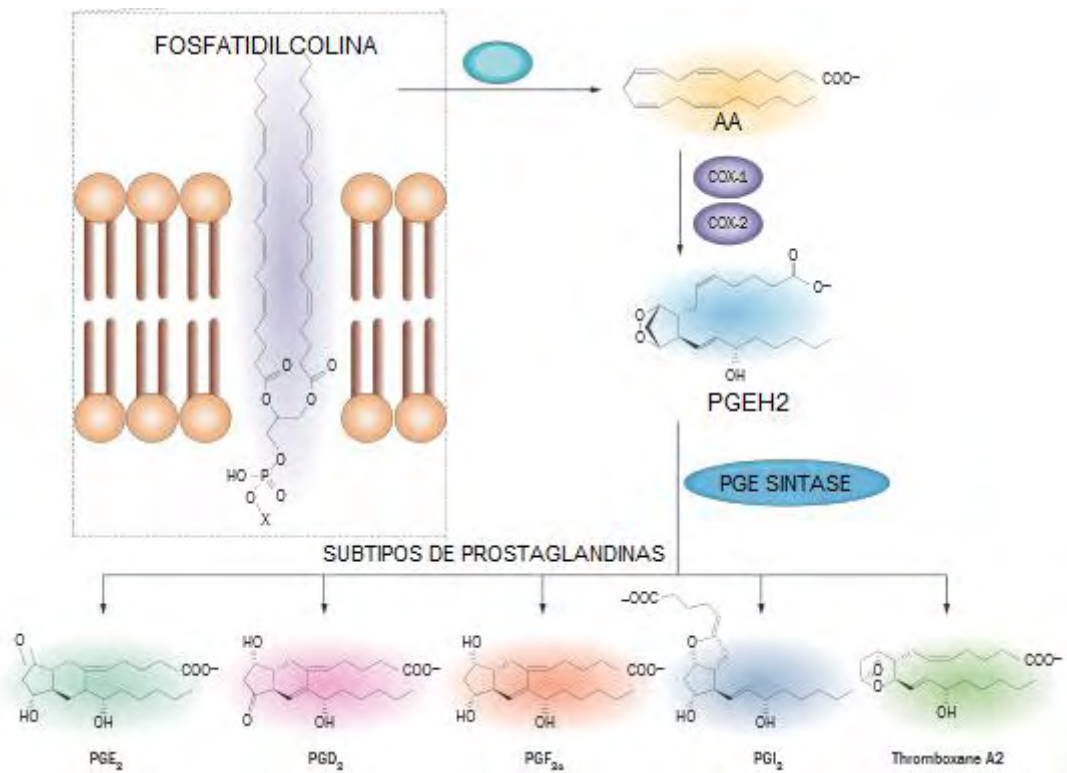


Figura 4: Síntese de prostaglandinas Uma visão geral da síntese de prostanóides. As enzimas COX-1 e COX-2 catalisam os passos chave na biossíntese da prostaglandina. Produzem PGH₂ a partir de ácido araquidônico (AA), o qual é posteriormente convertido em cinco prostanóides primários estruturalmente relacionados: as prostaglandinas: PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e tromboxano A₂. Fonte: Adaptado de RAHNAMA et al., 2012.

A PGE₂ e PGI₂ são os principais prostanóides com ação pró-inflamatória (SMYTH et al., 2009). A PGE₂ é dotada de potente atividade vasodilatadora, sendo umas das substâncias responsáveis pela vasodilatação e pelo eritema presentes na inflamação aguda (SOLOMON et al., 1968; MEDZHITOV, 2008). É considerada um dos componentes fundamentais na inflamação, na dor, no câncer, como também é conhecida por regular as funções fisiológicas do trato gastrointestinal e no rim, e quando produzida localmente, induz populações específicas de neurônios no sistema nervoso central, promovendo um comportamento de doença como: febre, anorexia, fadiga, sonolência e retraimento social (SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007; PECCHI et al., 2009). Altos níveis de PGE₂ são encontrados em exsudatos inflamatórios e a injeção desse mediador diretamente dentro do tecido, produz uma série de sinais clássicos da inflamação (WILLIAMS; HIGGS, 1988).

O metabolismo do AA por via das enzimas lipoxigenases produzem as lipoxinas (LXA) e leucotrienos. As lipoxinas são mediadores importantes para inibir a inflamação, além de promover a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual. As LXA (resolvinas e protectinas) apresentam uma atividade seletiva sobre leucócitos polimorfonucleares (PMN) e eosinófilos, impedindo a migração destas células para o foco da inflamação, além de induzir a apoptose dos neutrófilos. Contudo, elas são potentes ativadoras dos monócitos, favorecendo a migração e ativação da capacidade destas células em fagocitar corpos apoptóticos (GODSON et al., 2000; GILROY et al., 2004; MEDZHITOV, 2008). Além das lipoxinas, as lipoxigenases produzem os leucotrienos (LTs), mediadores inflamatórios responsáveis pela quimiotaxia de fagócitos e aumento da permeabilidade vascular. Na biossíntese dos LTs a 5-lipoxigenase (5-LO) catalisa a oxigenação do ácido araquidônico (AA) em LTA₄ a qual é convertida através de LTA₄ hidrolase para o LTB₄, e pela LTC₄ sintase em LTC₄. Os outros cisteinil-LTs são formados por remoção hidrolítica do γ -Glu e Gli de LTC₄ (originando LTD₄ e LTE₄). Em contextos pró-inflamatórias, os LTs tipicamente estimulam respostas celulares imediatas e de curta duração mediadas através de receptores acoplados à proteína G (RADMARK; SAMUELSSON, 2009)

A segunda classe de mediadores lipídicos, o fator de ativação plaquetária (PAF), gerado a partir da acetilação do ácido lisofosfatídico (Figura 3), é responsável por ativar vários processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de leucócitos, vasodilatação, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas (BOWDEN, 2004; MEDZHITOV, 2008; SERHAN, 2007).

1.3.3.5 Citocinas

As citocinas regulam o início, a manutenção e o término das reações inflamatórias. São substâncias pleiotrópicas capazes de modular a função de muitos tipos celulares, além de serem determinantes para o infiltrado celular e para os efeitos sistêmicos durante a inflamação aguda. Entre as citocinas mais estudadas, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas IL-1 β , IL-6 e a quimiocina CXCL8 (também conhecida como IL-8) são importantes na inflamação, devido aos seus papéis na patofisiologia de muitas doenças (LACY; STOW, 2011). São produzidas por diversos tipos de células, principalmente pelos macrófagos e mastócitos, possuindo diversas funções na resposta inflamatória, como a

ativação do endotélio e de leucócitos e indução de resposta de fase aguda (MEDZHITOV, 2008).

A citocina TNF- α produzida por células polimorfonucleares e mononucleares, está envolvida na patogênese de diversas doenças e exerce potentes efeitos inflamatórios, tais como: indução da expressão de moléculas de adesão no endotélio (ICAM-1 e VCAM-1) (EL ALWANI et al., 2006); ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares; aumento da permeabilidade vascular e fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese. A liberação sistêmica de TNF- α pode induzir febre e estimular a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, além de, ativar a cascata de coagulação, induzindo vasodilatação sistêmica com conseqüente hipotensão, catabolismo e hipoglicemia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A interleucina 1 β (IL-1 β) está envolvida em diversas desordens inflamatórias, incluindo diabetes, artrite reumatóide e câncer. Esta citocina é produzida em sua forma inativa, (pro-IL-1 β), que é transformada pela ação da proteína caspase-1 em sua forma ativa, e liberada no meio extracelular (EDER, 2009). IL-1 β ativa uma cascata de sinalização que induz a transcrição de outras citocinas (como exemplo: IL-6, IL-8 e IL-12) e quimiocinas, como o fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e a proteína-1 inflamatória de macrófagos α/β (MIP-1 α/β), favorecendo a migração de monócitos para o foco da inflamação. Em adição, a IL-1 β ativa a expressão de moléculas de adesão, o que favorece o recrutamento e ativação de linfócitos inflamatórios, além de aumentar a expressão de genes como a COX-2; fosfolipase A2 e iNOS (WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

A interleucina-6 (IL-6) também pró-inflamatória, desenvolve suas ações ao interagir com um receptor presente na membrana (IL-6Ra) que está ligado a via de sinalização JAK-STAT levando a produção de citocinas, quimiocinas e recrutamento de leucócitos inflamatórios. Entretanto, a IL-6, também desenvolve efeitos anti-inflamatórios, ao interagir com seu receptor solúvel (sIL6R) ativando uma via alternativa chamada de trans-sinalização, que está associada a proteína transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). A proteína STAT3 suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de leucócitos, inibição da ativação das células dendríticas, além de induzir a produção de IL-10, que apresenta propriedades anti-inflamatórias (HEINRICH et al., 2003; FIELDING et al., 2008; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

Além disso, a IL-1 β , TNF- α , e IL-6 podem ter efeitos sistêmicos quando segregados em quantidades suficientes. Tais citocinas induzem as células hepáticas (hepatócitos) a produzir proteínas de fase aguda, como fatores de coagulação e proteína C reativa, e ativam o

endotélio cerebral a produzir prostaglandinas, incluindo a principal prostaglandina pró-inflamatória, PGE₂ (PECCHI et al, 2009).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, e possui um papel central na infecção por limitar a resposta imunitária aos agentes patogênicos, e impedindo, assim, danos ao hospedeiro. É produzida por diversos tipos celulares, incluindo as células do sistema imune inato, células dendríticas (DC), macrófagos, mastócitos, células natural killer (NK), eosinófilos e neutrófilos. A resposta anti-inflamatória é mediada através do receptor de IL-10 (IL-10R) e ativação do sinal transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT3) (SARAIVA; O’GARRA, 2010).

1.3.3.6 Quimiocinas

As quimiocinas são produzidas por diversos tipos de células e controlam o extravasamento de leucócitos e quimiotaxia para os tecidos afetados (MEDZHITOV, 2008). São um grupo de proteínas segregadas dentro da família das citocinas cuja função genérica é induzir a migração de células do sistema imunológico para locais em todo o corpo (ABBAS et al., 2011; RAMESH et al., 2013). As duas maiores famílias de quimiocinas são do grupo CXC e CC, cuja atividade difere quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efectoras (HE et al., 2007). As quimiocinas CXC como a IL-8, atraem preferencialmente neutrófilos para o sítio inflamatório (KHAJAH et al., 2011). Enquanto que as quimiocinas do grupo CC como a eotaxina, a citocina regulada sob ativação que é expressa e secretada por células T normais (RANTES) e a proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1/CCL2) ativam predominantemente eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (FIGARELLA-BRANGER et al., 2003; HE et al., 2007; ANSARI et al., 2011).

As quimiocinas estão envolvidas na manutenção da homeostase e na indução da inflamação. Quimiocinas homeostáticas são produzidas de modo constitutivo nos tecidos e desempenham um papel na organização do tecido. As quimiocinas inflamatórias, por outro lado, são produzidas durante as infecções ou como uma resposta a um estímulo inflamatório e facilitam uma resposta imune por guiar as células do sistema imune inato e adaptativo (ABBAS et al., 2011; RAMESH et al., 2013).

1.3.3.7 Enzimas proteolíticas

As enzimas proteolíticas (incluindo elastina, catepsinas e metaloproteinases da matriz) têm diversos papéis na inflamação, através da degradação da matriz extracelular e proteínas da membrana. Estas proteases desempenham papéis importantes em muitos processos, incluindo a defesa do hospedeiro, remodelamento de tecidos e a migração de leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

1.3.3.8 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) desempenha diversos papéis em sistemas biológicos como mediador da vasodilatação, agregação plaquetária e neurotransmissão, e regula a função, a morte e a sobrevivência de vários tipos de células, tanto na resposta imune quanto na inflamação. As várias ações biológicas do NO são ditadas pelas suas propriedades físico-químicas. É uma pequena (30 Da) molécula sem carga que se difunde sem impedimentos para dentro e para fora das células, e entre os compartimentos celulares (COLEMAN, 2002; PACHER et al., 2007). Muitos tipos de células envolvidas direta ou indiretamente na imunidade e inflamação sintetizam NO, incluindo fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos e condrócitos, monócitos/macrófagos, células apresentadoras de antígenos, NK (natural killers), eosinófilos e mastócitos. Em sistemas vivos o NO é sintetizado a partir da L-arginina e de oxigênio molecular, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (COLEMAN, 2002; MACMICKING et al., 1997). Há três membros da família de NOS, duas constitutivamente expressas (NOS-1 ou neuronal e NOS-3 ou NOS endotelial), e uma expressa só após ativação celular (NOS-2 ou induzível ou iNOS) (MARCINKIEWICZ et al., 2003). A iNOS, foi originalmente descrita em macrófagos peritoneal de camundongos (MACMICKING, 1997) como a principal enzima para síntese de NO na imunidade e inflamação. O gene da iNOS, o qual está sob o controle do fator de transcrição NF- κ B, é induzido por lipopolissacarídeo bacteriano ou citocinas pró-inflamatórias clássicas, tais como a IL-1 β , TNF- α e de IFN- γ , muitas vezes atuando em sinergia (COLEMAN, 2002).

1.4 Eventos celulares e teciduais na inflamação

Os agentes efetores da resposta inflamatória são os tecidos e células, com funcionamentos especificamente afetados pelos mediadores inflamatórios (ASHLEY et al., 2012). A capacidade migratória das células do sistema imunológico é uma característica fundamental da resposta imune, na qual leucócitos, em geral, migram da circulação para tecidos adjacentes e são capazes de conter e destruir microorganismos patogênicos por meio da fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas presente em seus grânulos (YONEKAWA; HARLAN, 2005).

O processo de extravasamento de leucócitos a partir do vaso (especificamente das vênulas pós-capilares) para um tecido infectado, inflamado ou lesado, é mediado através de processos moleculares, mecânicos e químicos sequenciados temporalmente, que em conjunto é designado como cascata de adesão leucocitária e são, em geral, bastante semelhantes para as diferentes subpopulações de leucócitos (SCHMIDT et al., 2013). A passagem dos leucócitos do lúmen vascular para o tecido é guiada por interações específicas, dependentes da existência de diferentes famílias de moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas) e seus respectivos receptores nos leucócitos e nas células endoteliais (BARREIRO et al., 2010; SUNDD et al., 2011). Na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento leucocitário envolve comumente as seguintes etapas reconhecidas: **captura, rolamento, adesão e transmigração** (Figura 5).

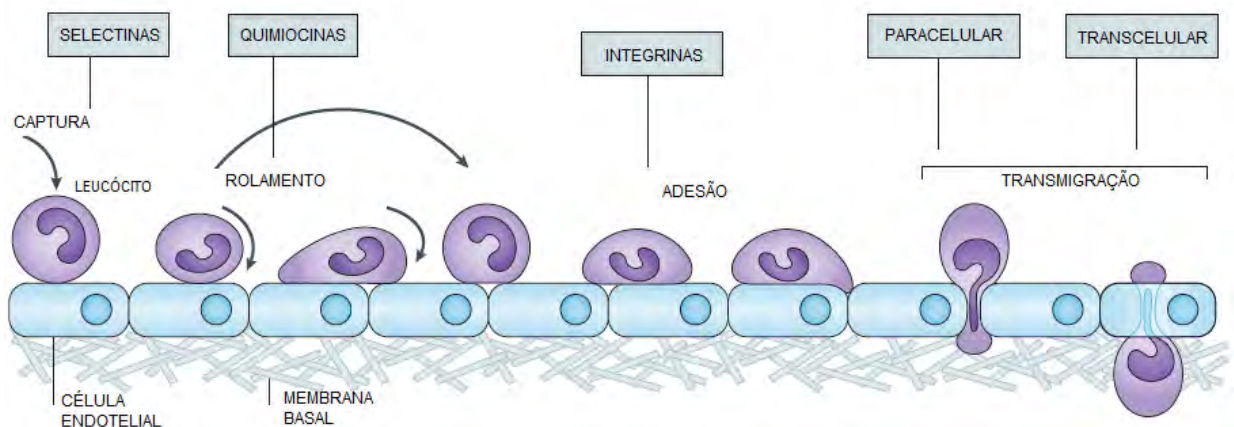


Figura 5: Recrutamento leucocitário Passos do recrutamento leucocitário: captura, mediado pelas selectinas; rolamento, por quimiocinas; adesão, mediada por integrinas e transmigração paracelular e transcelular. (Fonte: Adaptado de Ley et al, 2007).

O **recrutamento leucocitário** é iniciado por mudanças na superfície do endotélio, resultado da estimulação pelos mediadores inflamatórios incluindo a histamina, cisteinil leucotrienos e citocinas como TNF- α e IL-1 β que são liberados a partir de leucócitos sentinelas residentes no tecido quando estimulados (WILLIAMS et al., 2011). Em poucos minutos, as selectinas (P-selectina e E-selectina) são redistribuídas para a superfície da célula endotelial. Estas duas moléculas contribuem para rolamento dos leucócitos sobre a superfície endotelial via ligação com seus ligantes glicosilados presentes na membrana dos leucócitos, incluindo o ligante de glicoproteína da P-selectina 1 (PSGL1), levando à **captura de leucócitos** circulantes livres na superfície endotelial e seu subsequente rolamento ao longo do vaso em direção do fluxo sanguíneo (SUNDD et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

O processo de **rolamento** desacelera os leucócitos circulantes, aproximando-os das células endoteliais, permitindo a ligação de quimiocinas, como exemplo, os membros da família CXC (IL-8), aos seus receptores. A ativação dos receptores para quimiocinas desencadeia vias de sinalização intracelulares que ativam as integrinas dos leucócitos. A interação entre as integrinas e seus ligantes de imunoglobulinas expressas no endotélio promove uma forte **adesão** dos leucócitos ao endotélio, com posterior transmigração celular (WEBER et al., 2007). A **transmigração** (passagem através da camada de células endoteliais ocorre tanto paracelularmente (entre as células endoteliais) ou transcelularmente (através de uma célula endotelial). Os dois processos levam os neutrófilos para o espaço extravascular e permite que o leucócito alcance o local da inflamação através da matriz extracelular (HICKEY; KUBES, 2009; PETRI, et al., 2011)

1.4.1 Células da inflamação

1.4.1.1 Neutrófilos

Os neutrófilos também chamados de polimorfonucleares (PMN), devido ao seu núcleo segmentado (PORTH, 2010) são as primeiras células a alcançarem os sítios inflamatórios. Os PMN, durante a infecção dos tecidos, são recrutados do sangue e também mobilizados da medula óssea, o que resulta em neutrofilia sanguínea e um fornecimento adequado destas

células para os tecidos. Uma vez ativados, fagocitam o antígeno estranho e exercem suas ações bactericidas por meio da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e liberação de componentes tóxicos dos grânulos (NATHAN, 2006; PUELLMANN et al., 2006). A permanência e o número excessivo de neutrófilos nos tecidos exacerbam a inflamação, liberando proteases, ROS e mediadores pró-inflamatórios (SAVILL et al., 1989; SOUSA et al., 2010). O acúmulo de neutrófilos nos tecidos é uma característica de condições inflamatórias agudas, mas também de várias condições inflamatórias crônicas, tais como glomerulonefrite, doença inflamatória intestinal, vasculite autoimune, dermatite e artrite reumatóide (WEISSMANN; KORCHAK, 1984; KASAMA et al., 2005; LARSEN et al., 2009).

1.4.1.2 Monócitos e Macrófagos

Os monócitos compreendem 5-10% dos leucócitos periféricos circulantes. Estas células se desenvolvem na medula óssea, circulam no sangue periférico e migram para o tecido inflamado (VAN FURTH, 1985; PORTH, 2010). Durante o extravasamento para os tecidos os monócitos se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, por isso, estas células são comumente denominadas derivadas de monócitos (KUMAR; JACK, 2006; GEISSMANN et al., 2010). A diferenciação dos monócitos em macrófagos é influenciada por eventos de adesão durante o extravasamento e pelo meio inflamatório local (SUDHAKARAN et al., 2007).

Os macrófagos são células residentes dos tecidos, que são rapidamente ativadas na lesão tecidual ou na presença de microrganismos (MEDZHITOV, 2010; MORI et al., 2011) com funções de apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação por meio da produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α , IL-6) e quimiocinas (KC, IL-8, MCP-1/CCL2, RANTES,), desempenhando um papel fundamental na iniciação, resolução, e manutenção do processo inflamatório. Os sinais de ativação para estas células incluem citocinas tais como TNF- α , IFN- γ , IL-12, fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF), componentes bacterianos (LPS), proteínas da matriz extracelular e outros mediadores químicos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; MEDZHITOV, 2010). A fagocitose dos macrófagos induz a eliminação de células apoptóticas e microrganismos e apresentam peptídeos antigênicos às células T. Por isso, os macrófagos estão envolvidos na homeostase

tecidual, bem como na imunidade adaptativa (MEDZHITOV, 2008; SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

1.5 Resolução da Inflamação

A última fase da inflamação é a sua resolução, fundamental para limitar os danos colaterais para o hospedeiro. Após as primeiras horas de inflamação, um programa coordenado de resolução está definido por macrófagos residentes do tecido. Durante a inflamação aguda, estas células produzem prostaglandinas e leucotrienos pró-inflamatórios, mas mudam rapidamente para lipoxinas que são anti-inflamatórias (ASHLEY et al., 2012). A troca dos mediadores lipídicos de prostaglandinas pró-inflamatórias para lipoxinas é crucial para a transição de uma inflamação para resolução. As lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos, e promovem o recrutamento de monócitos. As resolvinas e protectinas, que constituem outra classe de mediador lipídico, bem como o fator de crescimento transformante- β (TGF- β) e fatores de crescimento produzidos por macrófagos, também têm um papel crucial na resolução da inflamação, incluindo o início de reparação tecidual (SERHAN, 2007; MEDZHITOV, 2008).

Para conseguir a resolução completa da inflamação além de desativar a produção de mediadores inflamatórios, é necessário inibir o acúmulo de células inflamatórias e remover detritos sem iniciar uma resposta autoimune. Nesse contexto, as células fagocíticas mononucleares, incluindo macrófagos residentes e recrutadas são as principais células responsáveis para restauração da homeostase do tecido inflamado (GOMEZ-MUÑOZ, 2013).

1.5.1 Intervenção farmacológica na inflamação

Dentre os principais fármacos utilizados na clínica para inflamação aguda destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como a indometacina, extensivamente comercializada por seu efeito analgésico e antifebril, e capacidade de reduzir a síntese de prostaglandinas, inibindo a ciclooxigenase (ENOS, et al., 2013); e a prometazina, um derivado fenotiazina com propriedades anti-histamínica, que atua inibindo a ligação da histamina ao seu receptor (JO et al, 2009). Os antiinflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides,

como a dexametasona, são amplamente utilizados para tratar doenças inflamatórias, tais como lesão pulmonar aguda (LPA), asma e artrite reumatóide. A dexametasona se liga ao receptor de glucocorticóides no citoplasma e induz a translocação do receptor para o núcleo (KIM et al., 2011), interferindo na sinalização da transcrição de importantes reguladores inflamatórios, exemplo o NF-kB (factor nuclear kappa B) (COUTINHO; CHAPMAN, 2011). Porém ambas as classes de anti-inflamatórios apresentam efeitos colaterais graves e geralmente são onerosos financeiramente para populações carentes (SCHIMMER; PARKER, 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 (WERMUTH, 2004). Como opção terapêutica, o uso de plantas medicinais como forma de curar os processos inflamatórios é de origem antiga e fundamentada no uso popular por sucessivas gerações (PEREIRA et al., 1999; ZAKARIA et al., 2010). 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 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, 2004).

A química de produtos naturais e a química orgânica sintética têm sido a força motriz para a pesquisa e descoberta de medicamentos (OJIMA, 2007). Historicamente, a maioria dos novos medicamentos tem sido gerada a partir de compostos derivados de produtos naturais principalmente dos metabolitos secundários (LAHLOU, 2013). Os metabolitos secundários de diversas formas de vida têm mostrado atividades biológicas potentes e vêm fornecendo compostos líderes na descoberta de medicamentos para o tratamento de câncer, infecções microbianas, inflamação, hipercolesterolemia e rejeição de tecidos em transplantes de órgãos. Além disso, esses produtos naturais têm proporcionado uma série de ferramentas extremamente úteis para a pesquisa (OJIMA, 2007).

1.6 Alcaloides

Alcaloides (*alcalino-like*) são metabolitos secundários produzidos por uma variedade de organismos como bactérias, fungos, animais marinhos, microrganismos e plantas. São

amplamente distribuídos na natureza, com uma gama de estruturas, rotas de biossíntese e importantes atividades farmacológicas (BHADRA; KUMAR, 2011). Representam um grupo de substâncias que influenciou muito a história médica, econômica, política e social da humanidade, apresentando tanto atividade terapêutica quanto tóxica (ROBERTS; WINK 1998). A maioria dos alcaloides são substâncias cristalinas bem definidas que se unem com ácidos para formar sais. Dessa maneira, formam um grande grupo de substâncias de difícil definição devido às grandes diferenças estruturais entre elas. Uma definição precisa do termo "alcaloide" é um pouco difícil, porque não há uma fronteira clara entre alcaloides e amins complexas naturais (TREASE; EVANS, 2009). A definição mais aceita para esta classe de compostos é de Peletier, reconhecida no ano de 1983, que propõe que "alcaloide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos" (ROBERTS; WINK 1998; PINTO, 2011).

Segundo Trease e Evans (2009) devido a grande variedade em sua origem botânica, bioquímica, na estrutura química e na sua ação farmacológica muitos sistemas diferentes de classificação são possíveis para os alcaloides. Uma classificação didática comum é baseada na origem dos alcaloides em relação aos aminoácidos. São consideradas duas categorias gerais: a) Alcaloides não-heterocíclicos ou atípicos, também chamados de 'proto-alcaloides' ou amins biológicas; b) Alcaloides heterocíclicos ou típicos, subdivididos de acordo a sua estrutura em anel. Os alcaloides típicos são derivados de fontes vegetais, possuem caráter básico, um ou mais átomos de nitrogênio (normalmente em um anel heterocíclico), demonstrando, geralmente, uma ação fisiológica sobre o homem ou outros animais. Um exemplo de um alcaloide típico são os alcaloides tetrahydroisoquinolínicos, comumente encontrados em numerosos produtos naturais estruturalmente diversos que exibem uma vasta gama de atividades biológicas e farmacológicas (AMAT et al., 2010; AWUAH; CAPRETTA, 2010).

Devido a sua capacidade de exercer atividades farmacológicas particularmente em mamíferos, os alcaloides têm sido estudados a mais de 4 mil anos na medicina, mas, apenas no século 19 foram isolados alguns exemplares com atividades terapêuticas, possibilitando a reintrodução de inúmeros fármacos no tratamento das mais diversas doenças. Atualmente, estima-se que são conhecidos cerca de 10.000 alcaloides, sendo destaques como fármacos nos dias atuais (TREASE; EVANS, 2009). Um dos exemplos mais famosos na literatura, como um pioneiro no estudo da ação medicinal dos alcaloides foi o opium (*Papaver somniferum*), devido suas propriedades anestésica e narcótica. Outros estudos com alcaloides isolados

demonstraram suas propriedades anti-hipertensiva, anti-arritmica, anticancerígena, antibiótica sendo essas apenas alguns exemplos ilustrando a importância do grupo (ROBERTS; WINK 1998).

Outro exemplo de alcalóide com efeitos farmacológicos diversos é a warifteína, uma molécula bisbenziloquinolínica isolada da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). Na literatura estão descritas sua ação bloqueadora neuromuscular com uma propriedade anestésica local (GORINSKY et al., 1972), atividade espasmolítica (CÔRTEZ et al., 1995) através da modificação metabolismo do cálcio (FREITAS et al., 1996); atividade microbicida sobre formas amastigotas de *Leishmania* sp. (SANTOS, 2001), bem como alteração na expressão dos seus genes (CAVALCANTI DA SILVA, 2004), propriedade antialérgica (BEZERRA-SANTOS, 2006), atividade anti-edematogênica e anti-hiperalgésicas (FERREIRA COSTA, 2008), inibidor de respostas de células B (ROCHA et al., 2009), atividade antidiarreica (FERREIRA COSTA, 2013).

Alguns alcaloides servem como modelo para a síntese química de moléculas análogas com propriedades melhoradas. Por exemplo, os alcaloides hiosciamina e escopolamina são modelos para a síntese de agentes capazes de reduzir a atividade do sistema nervoso parassimpático; a tubocurarina para relaxantes do músculo esquelético; a cocaína para anestesia local; a morfina para produção anestésica e a codeína para agente antitussígeno (ROBERTS; WINK 1998).

1.7 Exploração de produtos naturais versus Síntese química

Medicamentos baseados em produtos naturais, em particular, fármacos à base de plantas representou cerca de 80% de todos os medicamentos em uso por volta de 1990. Componentes de plantas representavam a principal fonte para o desenvolvimento de novas moléculas farmacologicamente interessantes. É comumente aceito que os produtos naturais são inerentemente melhor tolerados no organismo e apresentam vantagens inatas para o desenvolvimento de medicamentos e síntese de produtos químicos (ZAID et al., 2010). Os produtos naturais são as principais fontes de agentes terapêuticos inovadores para doenças infecciosas (tanto bacterianas e fúngicas), câncer, distúrbios lipídicos e imunomodulação. No entanto, a complexidade de muitos produtos naturais pode limitar a síntese química no intuito de otimizar o seu uso terapêutico. Além disso, a obtenção de uma fonte renovável de

compostos ativos a partir de fontes biológicas pode ser problemática (CLARDY; WALSH, 2004).

As dificuldades para obtenção e isolamento de quantidades significativas de alcaloides, indispensáveis para os ensaios *in vitro* e principalmente *in vivo*, vêm de encontro aos animadores resultados experimentais. O extrativismo vegetal, além de fornecer pequenas quantidades de substâncias, compromete a preservação da espécie vegetal e representa um método pouco atraente do ponto de vista econômico (CORDEIRO, 2012). Além disso, muitas vezes as moléculas de interesse são produzidas na natureza em quantidades muito pequenas, além de serem de difícil purificação, fazendo com que suas preparações sintéticas sejam de grande interesse (PINTO, 2011). Desta forma destaca-se a importância dos métodos sintéticos para obtenção destes compostos, que além de viabilizar a produção em média e larga escala, oferece a flexibilidade necessária à preparação de análogos e miméticos que viabilizam não só os estudos farmacológicos *in-vivo* como nos oferece a oportunidade de estudos da relação estrutura-atividade (CORDEIRO, 2012).

1.8 A 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MHTP)

A 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (Figura 6) (MHTP) é um alcaloide inédito, sintetizado experimentalmente para prospecção de novos compostos com propriedades terapêuticas, tendo em vista o histórico positivo do grupo dos alcaloides frente as diversas doenças (CORDEIRO, 2012).

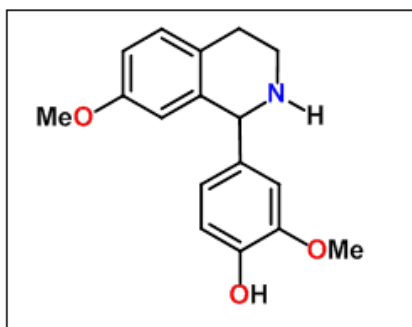


Figura 6: Estrutura química do MHTP. 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina. Fonte: CORDEIRO, 2012

O MHTP possui semelhança química com as criptostilinas I, II e III isoladas a partir da planta *Cryptostylis fulva* (Orchidaceae) (Figura 7) as quais possuem consideráveis significâncias biológicas. Numerosos análogos das criptostilinas foram descritos como antagonistas farmacológicos para o receptor D1 de dopamina (MINOR,1994; MUNCHHOF; MEYERS, 1995).

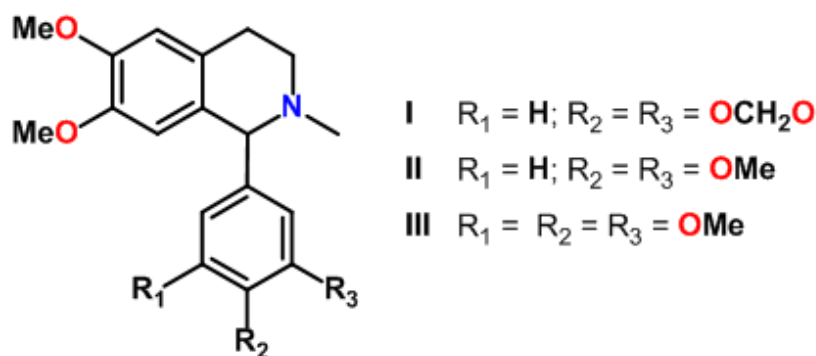


Figura 7: Estrutura química das Criptostilinas I, II, III Fonte: MUNCHHOF; MEYERS (1995)

Além das criptostilinas, o MHTP é quimicamente semelhante aos alcaloides isoquinolínicos sintéticos CKD712 [(S)-1-(α -naftilmetil)-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina] e THI52 (1- naftiletil -6,7- dihidroxi -1,2,3,4- tetrahidroisoquinolina) descritos na literatura por possuírem atividade anti-inflamatória (KANG et al., 2003; TSOYI et al., 2008).

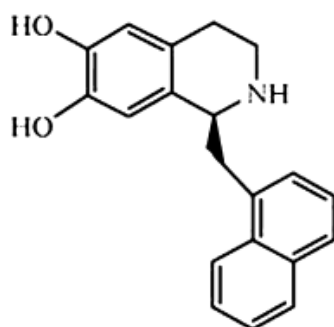


Figura 8: Estrutura química do alcaloide CKD712.Fonte: TSOYI et al.(2008)

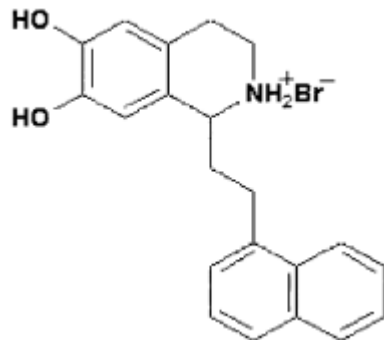


Figura 9: Estrutura química do alcaloide THI 52. Fonte: KANG et al.(2003)

Portanto o objetivo desse estudo foi caracterizar a resposta anti-inflamatória do MHTP utilizando modelos experimentais clássicos de inflamação aguda bem como um modelo experimental de doença denominado lesão pulmonar aguda (LPA). A LPA em humanos é uma condição inflamatória na qual se observa os principais eventos da inflamação aguda com taxas de mortalidade substanciais, em torno de 30-50% e que apesar das sofisticadas terapias intensivas baseadas em evitar as complicações e tratar a causa subjacente, a LPA não tem tratamento específico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Investigar o efeito do alcaloide sintético 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina (MHTP) em modelo experimental de inflamação aguda.

2.2 Objetivos Específicos:

- Investigar a citotoxicidade do MHTP em macrófagos peritoneais;
- Avaliar a produção de óxido nítrico em macrófagos na presença do MHTP;
- Analisar a inibição da produção de óxido nítrico e citocinas em macrófagos ativados;
- Avaliar o efeito do MHTP na formação do edema de pata induzido por carragenina;
- Estudar o efeito do MHTP no edema de pata induzido por prostaglandinas da série E₂;
- Verificar o efeito do MHTP na degranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 em modelo de edema de pata;
- Analisar o efeito do MHTP nos edemas de pata induzidos por histamina.
- Quantificar o número de células da inflamação, a concentração de proteínas e a liberação de citocinas no lavado peritoneal de camundongos estimulados com carragenina após tratamento com MHTP;
- Avaliar o efeito do MHTP na lesão pulmonar aguda experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos *swiss* fêmeas de 6-8 semanas com peso corporal entre 25-35 g foram utilizados nos experimentos *in vivo* e camundongos machos BALB/c de 6–8 semanas (20-25 g) foram utilizados nos protocolos experimentos *in vitro*. Os animais, foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação. Os camundongos foram fornecidos pelo biotério Professor Thomas George da UFPB. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA)/UFPB com o número de protocolo 0205/13. Cada grupo experimental apresentou número de 4 a 6 animais. 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 Obtenção e preparo do alcaloide 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi 1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MHTP)

O alcaloide 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (MHTP) é uma molécula inédita, sintetizado no Centro de Biotecnologia, UFPB sob responsabilidade do professor Dr. Luís Cezar Rodrigues que nos cedeu gentilmente a molécula. Os detalhes da metodologia de obtenção e caracterização química do MHTP estão disponíveis no trabalho de dissertação intitulado “Aplicação da reação de Pictet–Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos” (2012) do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB, João Pessoa, PB. Resumidamente, para a construção do MHTP foi utilizado como matéria prima a 4-metoxifeniletilamina (1) e a vanilina (2), baseado na metodologia de Cheng e colaboradores (2008) o qual aplica a reação de Pictet–Spengler (Fig. 10). Ao final da reação foi obtido 3,5 g do MHTP com rendimento de

93,45%, caracterizada como um líquido oleoso amarelado, tornando-se posteriormente muito viscoso e rosado (Cordeiro, 2012).

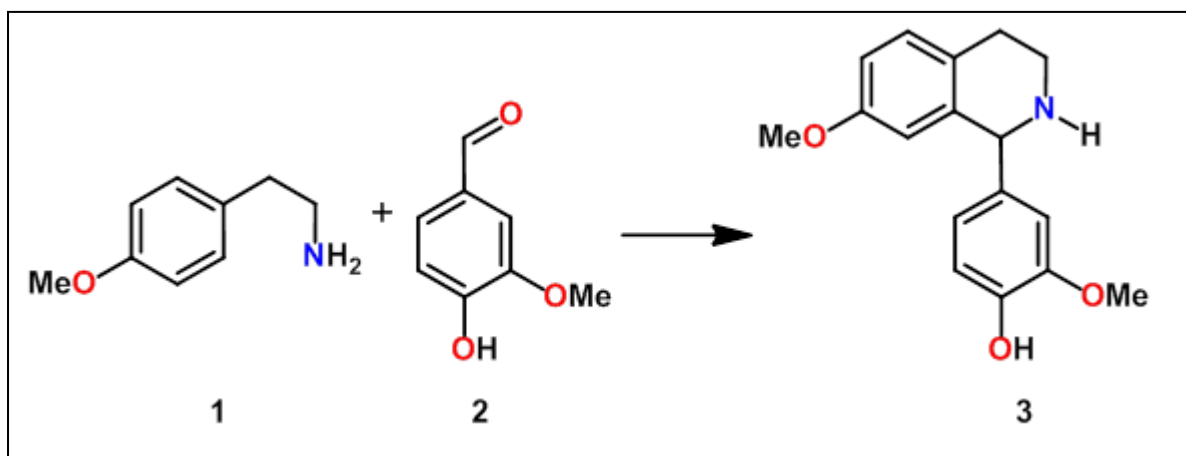


Figura 10: Síntese do MHTP. Síntese da 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina (3). Fonte: CORDEIRO, 2012.

Fórmula molecular	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃
Massa molecular	285 g/mol
Solubilidade	0,0010 g para 20µL de tween (20%) em 1mL de salina

Tabela 1: Informações químicas do MHTP. Fonte: Cordeiro, 2012.

Para a realização dos ensaios experimentais o MHTP foi pesado (g) em um gral de porcelana (almofariz), adicionado o solvente (Tween 20% - VETEC®) e mantido em repouso por 20 minutos sem exposição à luz, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi homogeneizada com auxílio do pistilo até obter uma única fase, antes da adição de salina, de acordo com a solubilidade do alcaloide descrito na tabela 1.

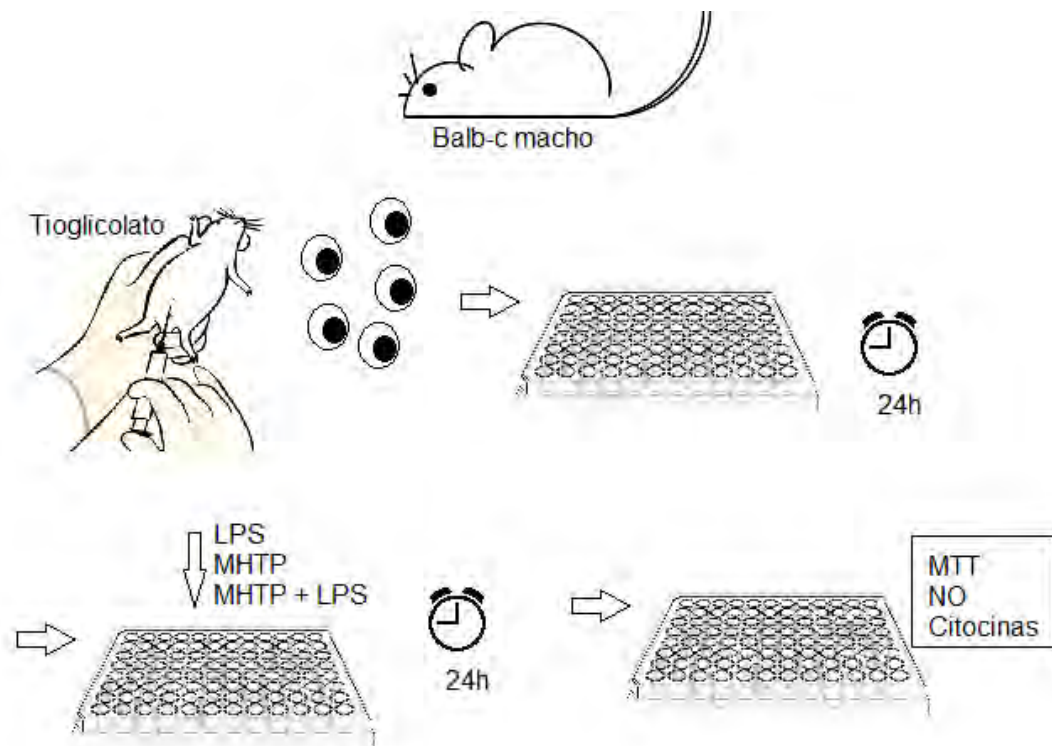


Figura 11: Avaliação da atividade do MHTP em modelos *in vitro*

3.3 Determinação da citotoxicidade do MHTP

A cultura celular pode ser utilizada para analisar a toxicidade de uma molécula pela estimativa das funções basais da célula ou por ensaios que medem as funções celulares especializadas, podendo os ensaios ser realizados em vários tipos de células (EKWALL et al., 1990). Para a avaliação da citotoxicidade, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (Fig.11). Os animais foram estimulados com 1 mL de tioglicolato de sódio (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) na cavidade peritoneal no dia 1 e mantidos por cinco dias com água e ração livre. No dia 5, os animais foram eutanasiados para obtenção dos macrófagos peritoneais com injeção de 8 mL de meio RPMI (GIBCO®) na cavidade peritoneal e após 30 segundos de massagem, o lavado foi recuperado. As células foram centrifugadas a 1200 rpm a 4 °C por 10 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio RPMI

completo (RPMI + 10% soro bovino fetal –SBF, 100 U.I. de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e a viabilidade determinada utilizando o corante Azul de Trypan (4% - 0,4 g de azul de Tripan -Merck®, PBS q.s.p. 10 mL). As células foram ressuspensas na concentração de 4×10^5 células/mL em meio RPMI completo e distribuídas em poços de placa de 96 poços (200 µL/poço). Em seguida, as células foram cultivadas por 24 horas para aderir. Após as 24h (6º dia do experimento) foi retirado o sobrenadante de cada poço da placa e adicionado 200 µL/poço de meio RPMI completo para garantir que a maioria das células presentes na placa fossem macrófagos, uma vez que apenas este tipo de leucócito presente no peritoneo tem a capacidade de aderir fortemente na superfície do poço. Após esse procedimento foram adicionados o MHTP (0,1, 1,10, 25,50, 100 e 200 µM) na presença ou na ausência de lipopolissacarídeo (LPS de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) a 1µg/mL. Após a incubação por 24 horas os sobrenadantes foram coletados para posterior análise da viabilidade celular, produção de NO e citocinas (FERREIRA COSTA et al., 2008).

3.4 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio- Sigma-Aldrich®) descrito por Mosmann (1983). Este método é baseado na capacidade das enzimas mitocondriais (desidrogenases) de células viáveis transformar o sal de tetrazólio (MTT), de cor amarela, no seu derivado formazan azul (cor violeta), solúvel em DMSO e em álcool ácidos (REILLY et al., 1998) dosado por espectrofotômetro. Dessa maneira, quanto maior a intensidade da cor violeta mais células metabolizaram o MTT, logo a intensidade da cor é proporcionalmente a viabilidade celular.

Após 24h de cultura celular, os sobrenadantes foram retirados como descrito acima. Às células que permaneceram nos poços da placa foram adicionados 90 µL de meio RPMI completo e 10 µL de uma suspensão de MTT a 5 mg/mL e incubadas por 4 horas, à temperatura de 37° C e 5 % de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi removido e 100 µL de DMSO adicionados em cada poço para dissolver os cristais de formazan formado. A viabilidade celular foi quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device). A média dos valores das absorbâncias obtida nas células não tratadas foi considerada como 100 % de viabilidade. Este ensaio foi realizado duas vezes de maneira independente em triplicata (WILSON, 2006).

3.5 Determinação dos níveis de NO

Durante a resposta inflamatória os macrófagos produzem diversos mediadores, tais como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (NO) que contribuem para o controle da inflamação (BRADLEY, 2008). A produção de NO foi avaliada pela dosagem do seu produto de degradação mais estável, o nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como reação de Griess (GREEN et al., 1982). Neste método, o nitrito, quando presente na amostra, reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm. Quanto maior a absorbância maior a produção de óxido nítrico pelas células, e o contrário é verdade. Para esse ensaio foram adicionados 100 µL de reagente de Griess (Sigma-Aldrich®) a 100 µL dos sobrenadantes obtidos da cultura com macrófagos peritoneais murino. Esse reagente é constituído pela mistura de duas soluções A e B na mesma proporção. A solução A é constituída por: naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a solução B por sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Após reagir por 10 minutos a temperatura ambiente, foi realizada a leitura utilizando filtro de 550 nm em leitor de microplaca (Spectramax 190 – Molecular Device). Os resultados (em µM) foram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio) (LEITE, 2012). Este ensaio foi realizado duas vezes de maneira independente em triplicata.

3.6 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas celulares

Pelo método de ELISA foram dosados, nos sobrenadantes das culturas celulares, a quimiocina MCP-1/CCL2, envolvida na migração de monócitos para o sítio inflamatório, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 com efeitos locais e sistêmicos durante a inflamação, e a citocina anti-inflamatória IL-10 envolvida na resolução da inflamação. As metodologias utilizadas foram àquelas recomendadas pelo fabricante dos Kits (BD Biosciences®) Este ensaio foi realizado com sobrenadante de dois experimentos independentes em duplicata.

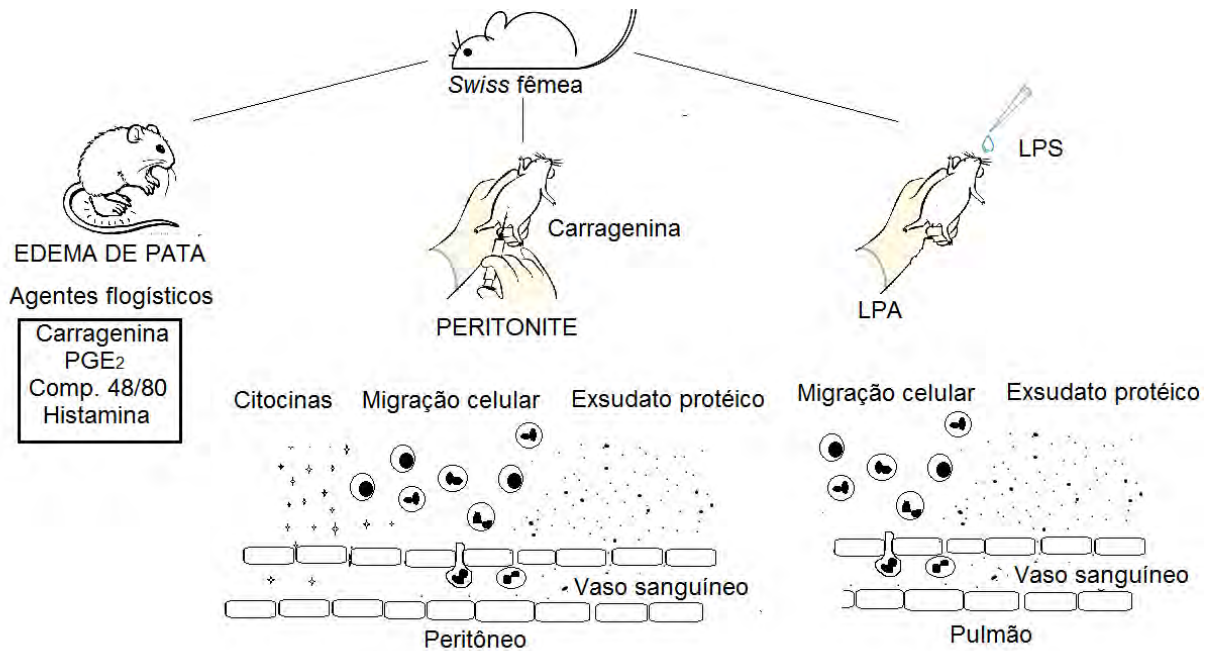


Figura 12: Avaliação da atividade do MHTP em modelos *in vivo*

3.7 Edema de pata induzido por carragenina

Para a avaliação a atividade anti-inflamatória *in vivo*, foram utilizados camundongos *swiss* em diferentes modelos experimentais (Fig.12). O edema de pata é um modelo experimental de fácil manipulação que tem sido bastante utilizado para triagem de substâncias com potenciais anti-inflamatórias e pode ser induzido por diversas substâncias denominadas agentes flogísticos (SUDIPTA DAS, 2010).

O edema de pata induzido por carragenina é um teste para determinar o efeito anti-inflamatório de uma determinada substância. A carragenina é um polissacarídeo, obtido a partir de algas vermelhas (Rhodophyceae), com diversas atividades biológicas, incluindo efeito imunomodulador, atuando através da ativação do receptor TLR-4 (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013; BHATTACHARYYA et al., 2008 a e b). A carragenina quando injetada na pata promove uma resposta inflamatória de longa duração liberando mediadores imediatos (histamina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, NO), migração de leucócitos e hiperalgesia (DAMAS; REMACLE-VOLON, 1992; HANDY; MOORE, 1998; MEDEIROS et al., 1995; VAZ et al., 1996).

Para a realização desse experimento camundongos *swiss* fêmeas (n=6), foram distribuídos em grupos MHTP (2,5 mg/kg), MHTP (5 mg/kg), MHTP (10 mg/kg), indometacina (10 mg/kg-Roche®), grupo controle negativo (100 µL de salina a cada 10 g de peso do animal) e controle positivo (100 µL de salina a cada 10 g de peso do animal). Todos os pré-tratamentos foram realizados pela via oral (v.o.) com auxílio de agulha de gavagem. As doses do MHTP foram escolhidas baseadas nos estudos *in vivo* preliminares (dados não mostrados), e da indometacina baseada na literatura (GOYAL, et al, 2013). Após o intervalo de 1h da administração dos compostos ou salina, foram administrados 20 µL intraplantar (ipl) de uma solução de carragenina (Sigma-Aldrich®) a 2,5% em PBS na pata posterior esquerda de cada animal e o mesmo volume de PBS na pata direita. O controle negativo recebeu injeção de 20 µL de PBS em ambas as patas, servindo como controle da eficácia na indução da inflamação pelo agente flogístico (REIS et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2011). A formação do edema de pata foi mensurada em milímetro (mm) com o auxílio de um paquímetro digital (GREAT, MT – 04513) nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 24 e 48h pós-estímulo, e os resultados foram registrados como a diferença entre as medidas das patas esquerda e direita (LIAO et al., 2013) (Fig. 13). Foram realizados dois experimentos de maneira independente.

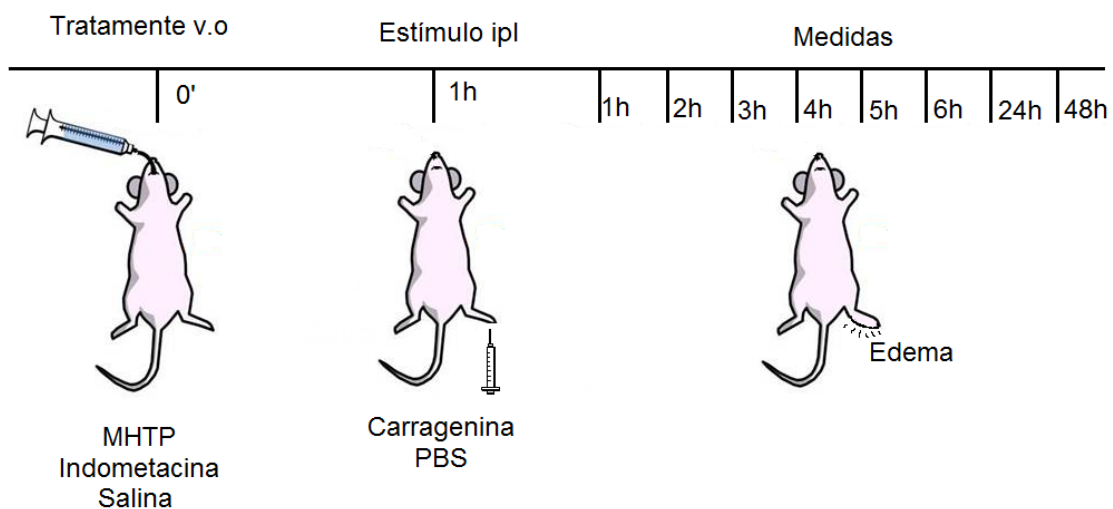


Figura 13: Esquema da metodologia do edema de pata induzido por carragenina

3.8 Edema de pata induzido por Prostaglandina (PGE₂)

A PGE₂ apresenta potente atividade vasodilatadora, sendo uma das substâncias liberadas por células residentes, sob estímulo, incluindo os agentes flogísticos. Sua liberação ocorre nas primeiras horas após o estímulo introduzido no organismo e é um dos mediadores responsáveis pela vasodilatação e pelo eritema presentes na inflamação aguda (SOLOMON et al., 1968). Esse mediador possui um papel fundamental na vasodilatação durante a formação do edema de pata induzido por carragenina. Para avaliar a atividade do MHTP sobre esse mediador da inflamação foi realizado o modelo experimental de edema de pata, através da injeção da PGE₂ diretamente no tecido (BUSNARDO et al., 2010). Os animais (n=5) foram tratados com o MHTP (2,5 mg/kg), droga padrão (indometacina 10 mg/kg-Roche®) ou salina nos grupos controle negativo e positivo. Uma hora depois, foram administrados 20 µL ipl de uma solução de PGE₂ (5 nmol/pata- Sigma-Aldrich®) em PBS na pata posterior esquerda de cada animal e o mesmo volume de PBS na pata direita. O controle negativo recebeu injeção de 20µL de PBS em ambas as patas. O edema foi mensurado como descrito anteriormente nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após o estímulo (BUSNARDO et al. 2010) (Fig.14).

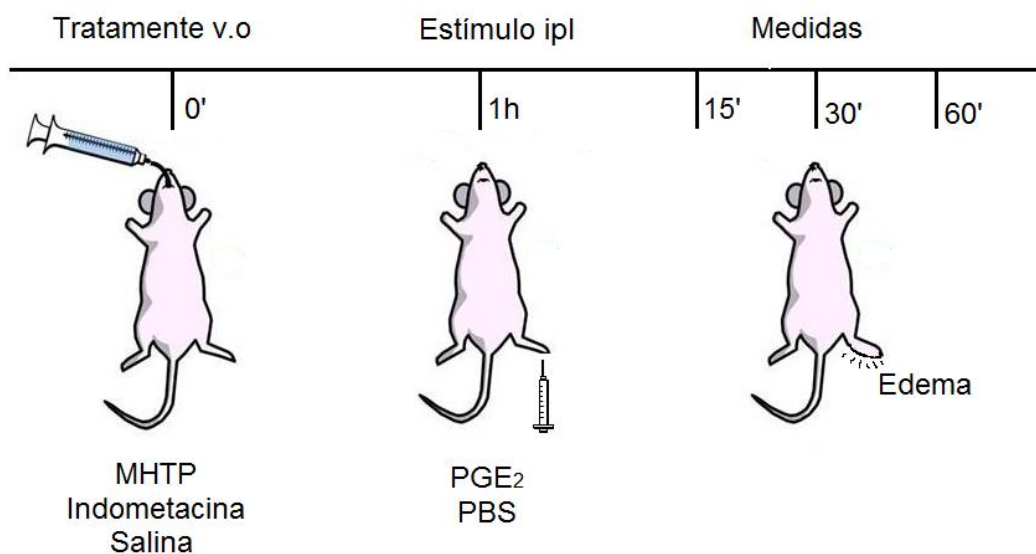


Figura 14: Esquema da metodologia do edema de pata induzido por PGE₂

3.9 Edema de Pata Induzido Pelo Composto 48/80

O composto 48/80 é um potente agente indutor da liberação de histamina (degranulação), principalmente por mastócitos, capaz de se inserir na membrana celular e ativar proteínas G no citoplasma ativando uma cascata bioquímica que resulta no aumento de cálcio intracelular e exocitose de mediadores pré-formados, como a histamina (TATEMOTO et al., 2006). Para avaliar a possível ação do MHTP no processo de liberação de histamina, os animais (n=6), uma hora após os tratamentos com MHTP (2,5 mg/kg), prometazina (10 mg/kg, intramuscular - i.v.- Roche®) ou veículo (salina, v.o.), receberam uma injeção de 20 µL ipl de uma solução do composto 48/80 (100 ng/pata- Sigma-Aldrich®) na pata posterior esquerda de cada animal e o mesmo volume de PBS na pata direita. O controle negativo recebeu injeção de 20 µL de PBS em ambas as patas. O diâmetro de cada pata foi medido como descrito anteriormente nos tempos de 30 e 60 minutos após o estímulo com o composto 48/80 (HENRIQUES, et al., 1987) (Fig. 15).

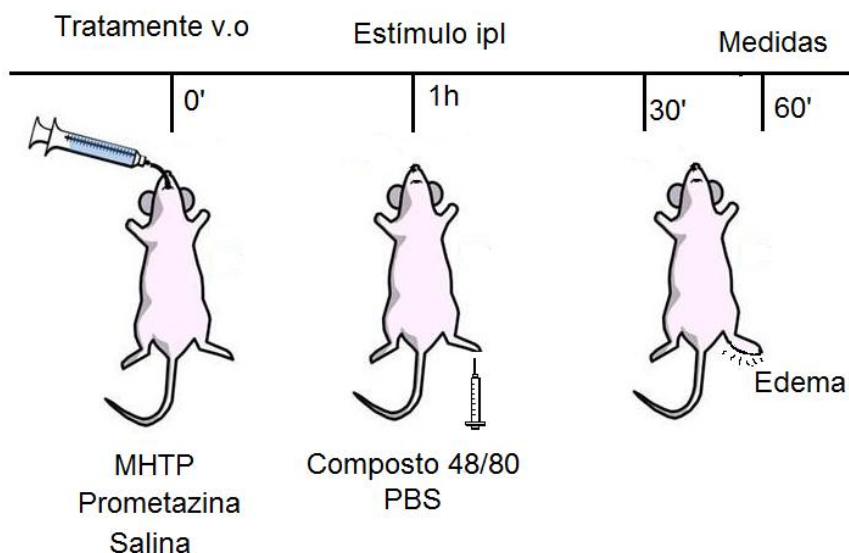


Figura 15: Esquema da metodologia do edema de pata induzido pelo composto 48/80

3.10 Edema de Pata Induzido Histamina

A histamina liberada, principalmente, por células residentes como o mastócito é um importante mediador inflamatório e vem sendo utilizada, experimentalmente, para induzir um processo inflamatório com formação de edema no local da sua administração sendo um modelo experimental clássico para verificar o efeito de drogas que tenham o potencial e inibir e/ou potencializar seu efeito (SUDIPTA DAS, 2010). Para avaliar a possível ação do MHTP na atividade da histamina, camundongos *swiss* (n=5) foram tratados com MHTP (2,5 mg/kg), prometazina (10 mg/kg- iv) ou salina (controle negativo e positivo). Uma hora depois receberam uma injeção ipl de uma solução contendo histamina (Sigma-Aldrich® - 100 µg/pata), dissolvida em 20 µl de PBS na pata esquerda e 20 µl de PBS na direita. O grupo salina recebeu 20 µL de PBS em ambas as patas. O edema foi avaliado nos tempos de 30 e 60 minutos após o estímulo com histamina, como descrito acima (HENRIQUES, et al., 1987) (Fig. 16).

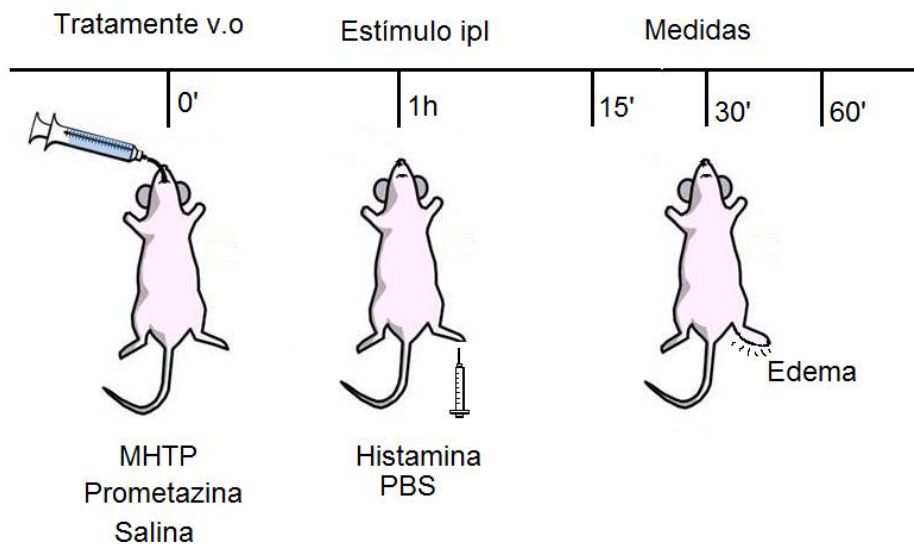


Figura 16: Esquema da metodologia do edema de pata induzido por histamina

3.11 Peritonite induzida por carragenina

Outros parâmetros importantes durante o processo inflamatório são a migração de células da inflamação para o sítio inflamado, extravasamento de proteínas para o tecido bem com a liberação de citocinas (MEDZHITOV, 2010) e, para avaliar tais parâmetros utilizou-se o modelo experimental de peritonite induzida por carragenina.

Com a finalidade de observar o efeito do MHTP nesses processos da inflamação aguda, os camundongos (n=6) foram tratados 1h antes do estímulo inflamatório, com MHTP (2,5 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo (salina) para os grupos controle negativo e controle positivo (carragenina). Decorrido o intervalo de 1h, a peritonite foi induzida pela injeção i.p. de 300 µL de uma suspensão de carragenina 1% em solução salina 0,9%. O grupo controle negativo recebeu injeção de 300 µL de solução salina i.p., servindo como controle da eficácia na indução da inflamação. A coleta do lavado peritoneal foi realizada quatro horas após a injeção da carragenina (Fig. 17). Os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Os peritônios dos animais foram expostos e 2 mL de PBS gelado foi injetado na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio foi massageado por 30 segundos e em seguida, realizado a punção do exsudato contendo fluidos e leucócitos (DA SILVA GUERRA et al., 2011; PINHEIRO et al, 2013). As amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas (1200 rpm, 10 min, 4° C). O *pellet* celular foi utilizado para contagem de células totais e diferenciais. Uma amostra dos sobrenadantes foi separada para a dosagem de proteína e outra amostra dos sobrenadantes congelada em freezer a uma temperatura de -20°C para posteriores dosagens de citocinas. Foram realizados dois experimentos de maneira independente.

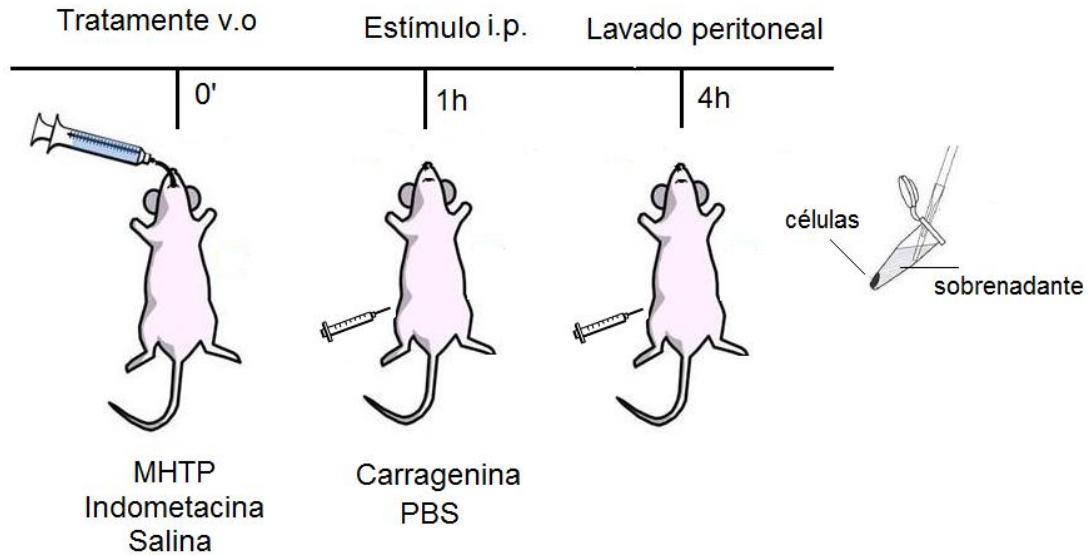


Figura 17: Esquema da metodologia de peritonite induzida por carragenina

3.11.1 Contagem de células total e diferencial do lavado peritoneal

As células sedimentadas foram ressuspensas em 1 mL de PBS gelado, diluídas em solução de Turk (10 mg cristal violeta -Merck®, 3 mL ácido acético glacial – Reagen-, q.s.p 100 mL água destilada) na proporção de 1:40 e quantificadas em microscopia óptica, com ajuda da câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial das células, 150 μ L da suspensão de células do lavado peritoneal foram centrifugadas em uma citocentrífuga (Citospin - BIO RESEARCH, Washington – USA) a 1500 rpm por 10 minutos para obtenção de lâminas. As células foram coradas com o kit Panótico (RenyLab) e a contagem diferencial foi realizada no microscópio ótico (NIKON E200, Melville, NY – EUA) com objetiva de imersão (100x), usando o padrão de critérios morfológicos para identificar os tipos de células (polimorfonucleares e mononucleares) (SOUSA et al., 2010).

3.11.2 Dosagem de proteínas para avaliação da permeabilidade microvascular

A injeção peritoneal de carragenina provoca uma reação inflamatória local envolvendo a liberação de mediadores que induzem o aumento da permeabilidade vascular levando ao extravasamento de líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício, que pode ser quantificada pela utilização de Kits específicos de dosagem de proteínas totais (PINHEIRO et al, 2013; DA SILVA, et al., 2011). A metodologia escolhida para este trabalho foi a do biureto, que se trata de um teste colorimétrico utilizado para diagnóstico *in vitro* de determinação de proteínas totais. O reagente de biureto é uma solução de hidróxido de potássio (KOH) e sulfato de cobre (CuSO₄), associada com tartarato de sódio e potássio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O). Este reagente de coloração azul torna-se violeta na presença de proteínas, pois as ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas no meio. O hidróxido de potássio e o tartarato de sódio e potássio não participam da reação, mas proveem um meio alcalino no qual a reação ocorre (HE; ZHANG, 2011; KROHN, 2011).

Após a centrifugação das amostras 50 µL de sobrenadantes foram transferidas para placas de 96 poços, juntamente com 150 µL do reagente de biureto (Labtest), assim como uma curva padrão de proteínas foi realizada conforme orientação do fabricante do Kit. A placa foi incubada por 10 min em estufa de 37°C e a medida do extravasamento vascular foi estimada indiretamente pela intensidade de cor azul, obtida com a determinação das absorvâncias a 540 nm, utilizando espectrofotômetro (LOH et al., 2013). Antes da comparação entre os grupos, a exata determinação das proteínas totais foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Proteínas totais (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 4$$

3.11.3 Dosagem de citocinas no sobrenadante do lavado peritoneal

Após o estímulo com LPS, os macrófagos produzem varias citocinas e quimiocinas desempenhando, portanto um papel fundamental no inicio da inflamação (MEDZHITOV, 2010). O lavado peritoneal foi centrifugado e os sobrenadantes foram analisados pelo Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e MCP-1/CCL2. As metodologias utilizadas foram aquelas recomendadas pelo fabricante dos Kits (BD Biosciences®).

3.12 Modelo experiemntal de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome respiratória caracterizada por aumento da permeabilidade alveolocapilar e influxo de células inflamatórias podendo levar a morte do paciente se não controlada. Os modelos experimentais de LPA podem ser iniciados por um conjunto diversificado de fatores precipitantes. Vários modelos animais para LPA têm sido desenvolvidos pela indução com lipopolissacarídeo (LPS), hiperóxia, embolia e ácido oléico (LEIKAUF et. al, 2002). Segundo Matute-Bello (2008), a utilização de LPS na indução da LPA é o segundo modelo com maior número de citações no banco de dados do PubMed no período de 2003 a 2007, menor apenas para o modelo de ventilação mecânica.

Com a finalidade de observar o efeito do MHTP na LPA, os camundongos (n= 6) foram tratados 1h antes do estímulo inflamatório, com MHTP (2,5 mg/kg, v.o.), dexametasona (5 mg/kg, i.p.) ou salina para os grupos controle negativo e positivo. Decorrido o intervalo de 1h os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina e xilazina (0,230 mg/kg e 1,152 mg/kg respectivamente) e receberam 50 μ L da solução de LPS intranasal (2,5 mg/kg- LPS de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich® – preparado em solução-estoque 1 mg/mL e sonicado por 10 minutos imediatamente antes da utilização). O grupo controle negativo recebeu 50 μ L do veículo (PBS) (Fig. 18).

O lavado broncoalveolar foi realizado 24h após a indução com LPS. Nessa etapa do experimento, as células inflamatórias contidas no pulmão foram retiradas e analisadas. Para a obtenção do lavado broncoalveolar os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico. Em seguida foi realizada a assepsia do animal com álcool 70° e feita uma incisão

longitudinal, utilizando pinça e tesoura, na região cérvico-ventral para expor a traquéia do animal. Para uma melhor visualização da traquéia, os lobos da glândula tireóide foram separados. Foi introduzida uma cânula de poliestireno na traquéia do camundongo, na qual foi conectada uma seringa de 1,0 mL contendo PBS gelado. Cuidadosamente, foram injetados 0,5 mL do tampão, e aspirado o mesmo volume, seguido do mesmo procedimento, mas dessa vez sendo injetado todo o conteúdo da seringa (BOZZA et al, 1994). Esse procedimento foi realizado duas vezes.

O fluido coletado dos pulmões foi armazenado em tubos tipo eppendorf mantidos em gelo para manter a viabilidade celular e posteriormente centrifugada (1200 rpm, 10 min, 4° C). O *pellet* celular foi utilizado para contagem de células totais e diferenciais e uma amostra dos sobrenadantes foi separado para dosagem do exsudato protéico, como descrito anteriormente para a metodologia de contagem de células e dosagem de proteínas no modelo de peritonite induzido por carragenina. Foram realizados dois experimentos de maneira independente.

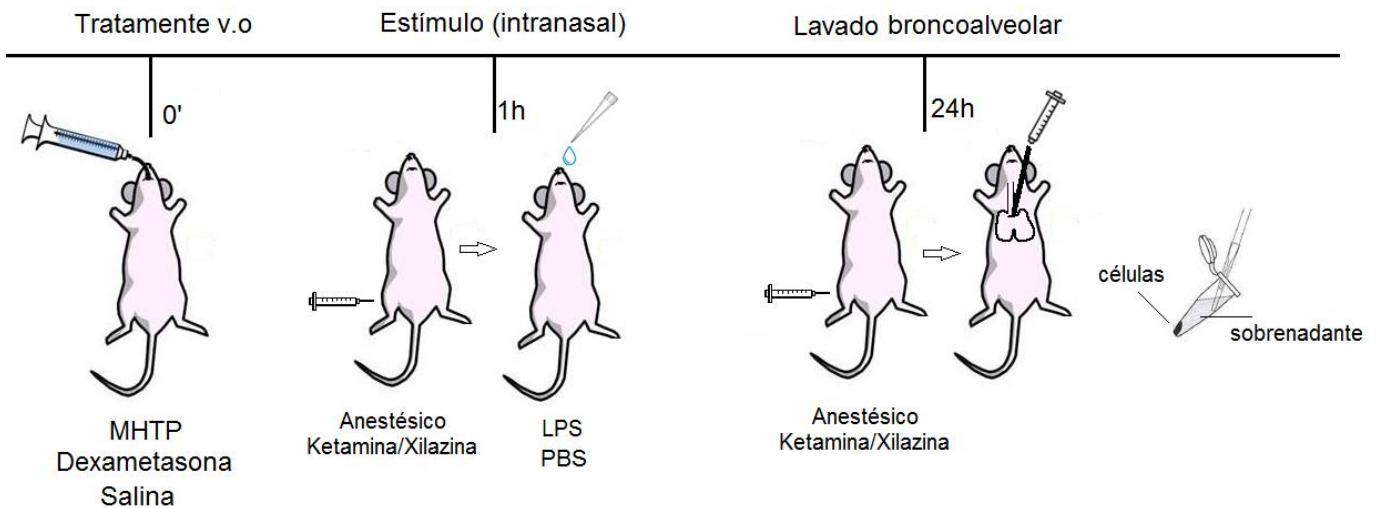


Figura 18: Esquema da metodologia da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

3.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (erro padrão da média). As variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, com distribuição Gaussiana dos dados; optando pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Ou foi utilizado o teste t one tailed (não pareado), quando os dados não passaram no teste de normalidade. Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism (v 5.00 para Windows, San Diego CA - EUA, disponível em (www.graphpad.com)), e os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito do MHTP em modelos de inflamação aguda *in vitro*

4.1.1 Estudo da citotoxicidade do MHTP em macrófagos peritoneais murino.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade para o MHTP estão expressos no gráfico A (Gráfico 1). O tratamento de macrófagos peritoneais com MHTP em concentrações entre 0,1 - 50 μM por 24h não alterou a viabilidade das células quando comparadas com as culturas de células sem estímulo (meio de cultura). Entretanto as concentrações de 100 e 200 μM foram tóxicas para os macrófagos peritoneais com morte de 29% e 71,2 % respectivamente.

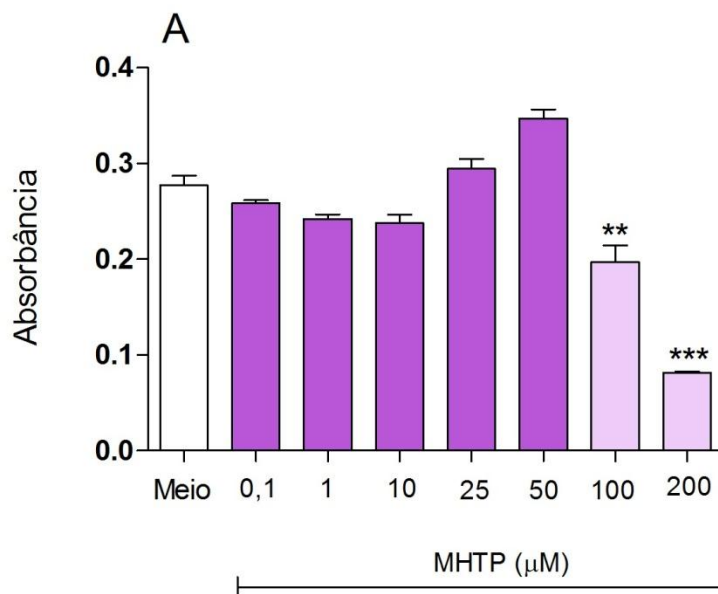


Gráfico 1: Efeito do MHTP na viabilidade de macrófagos peritoneais. As células foram mantidas em meio de cultura (RPMI) por 24h na ausência ou presença de diferentes concentrações de MHTP (0,1 a 200 μM). Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido e as células incubadas em meio completo com MTT por 4 h. Ao final, as células foram lisadas com DMSO e o formazan contido no citoplasma solubilizado. O gráfico representa as densidades ópticas de absorbância do formazan. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao meio. Os gráficos são representativos de 2 experimentos em triplicata.

4.1.2 Efeito do MHTP na produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais.

O gráfico 2, apresenta os resultados da produção de NO por macrófagos peritoneais na presença de MHTP e/ou LPS. O LPS promoveu o aumento em aproximadamente 80% ($p < 0,001$) na produção de NO pelos macrófagos, quando comparados com os macrófagos em meio de cultura (Gráfico 2A). As células estimuladas com LPS e tratadas com o MHTP nas concentrações de 10, 25 ou 50 μM reduziram, significativamente, os níveis de NO em 24%, 47% e 39% respectivamente, quando comparados com as células tratadas apenas com LPS. Além da avaliação da atividade do MHTP em células estimuladas com LPS, analisamos a produção basal de NO na presença do MHTP e como pode ser observado no Gráfico 2B o MHTP não induziu a produção de NO.

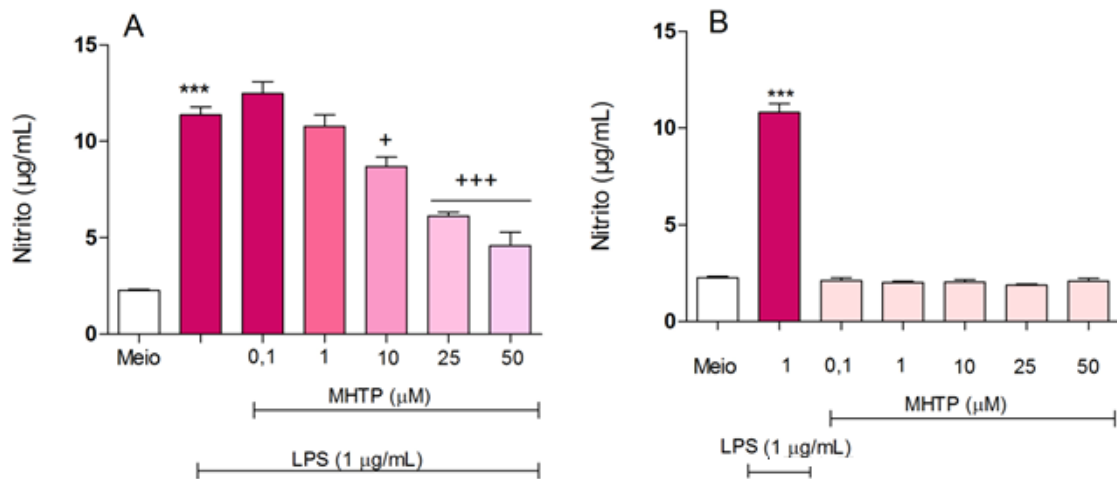


Gráfico 2: Efeito do MHTP na produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais murino estimulados ou não com lipopolissacarídeo. Macrófagos peritoneais murino foram mantidas em cultura por 24h na presença ou ausência de diferentes concentrações de MHTP (0,1 – 50 μM) e do LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido para dosagem do NO pelo método de Griess. O gráfico representa as concentrações de nitrito em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao meio; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo que recebeu apenas LPS. Os gráficos são representativos de 2 experimentos em triplicata.

4.1.3 Efeito do MHTP sobre os níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 e das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em modelo de inflamação aguda *in vitro*

O tratamento de macrófagos, estimulados com LPS, com MHTP (10 μ M) não promoveu a redução nos níveis de MCP-1/CCL2, entretanto macrófagos estimulados apenas com LPS apresentaram níveis aumentados (em 4x) de MCP-1/CCL2 quando comparados com os macrófagos em meio de cultura (Gráfico 3A). O tratamento com o MHTP reduziu em 35,7% e 31,0% ($p < 0,001$) os níveis de IL-1 β e de IL-6 respectivamente em macrófagos estimulados com LPS (Gráficos 3B e 3C). Resultados semelhantes foram observados como os níveis de IL-10 onde o tratamento das células com o MHTP inibiu em 33,4% essa citocina quando comparado com as células estimuladas apenas com LPS (Gráfico 4D).

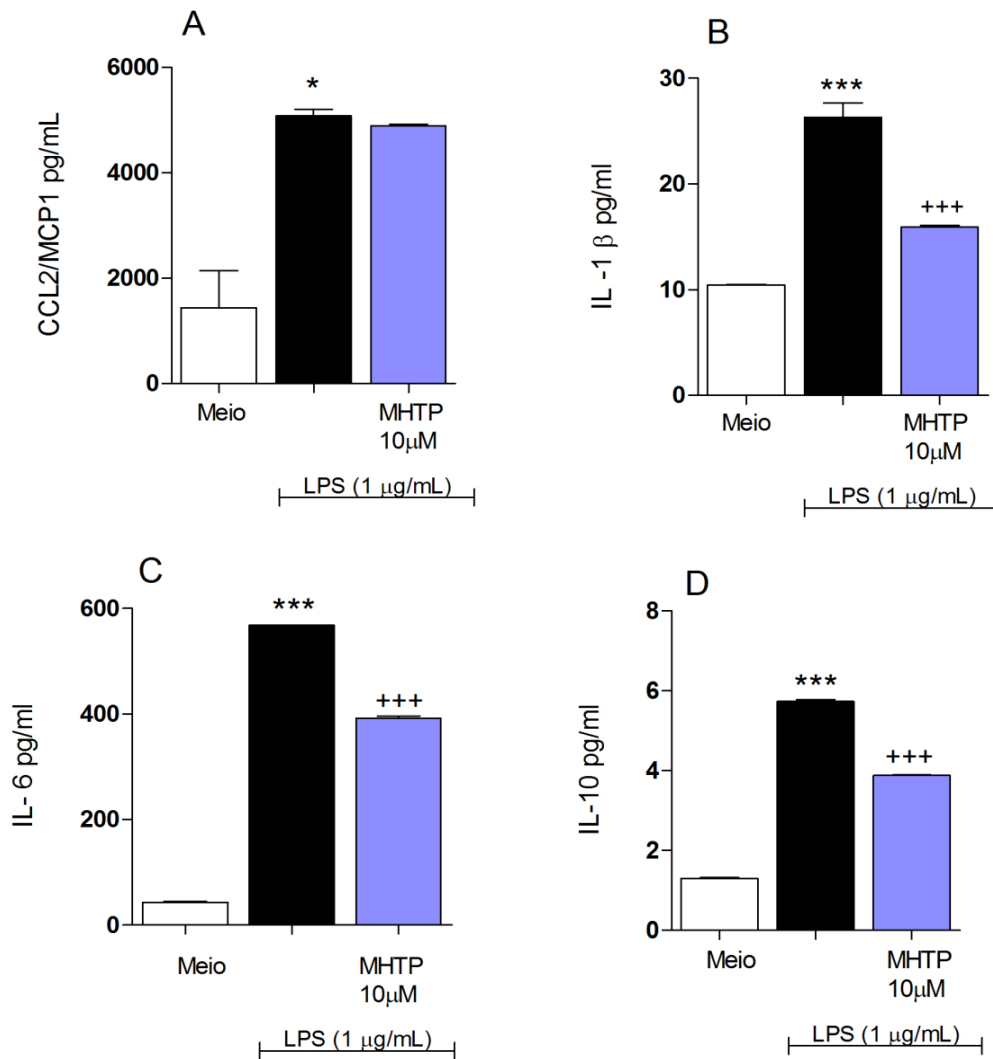


Gráfico 3: Efeito MHTP sobre os níveis de MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6 e IL-10 *in vitro* As células foram mantidas em cultura por 24h na presença ou ausência de diferentes concentrações de MHTP e do estímulo (1 µg/mL de LPS), em seguida o sobrenadante foi utilizado para mensurar os níveis das citocinas MCP-1/CCL2 (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) pelo método de ELISA. As barras representam dos níveis de citocinas no sobrenadante da cultura em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 quando comparados ao meio; + p<0,05, ++ p<0,01 e +++ p< 0,001 quando comparado ao grupo que recebeu apenas LPS. Os gráficos são representativos de 2 experimentos em duplicata.

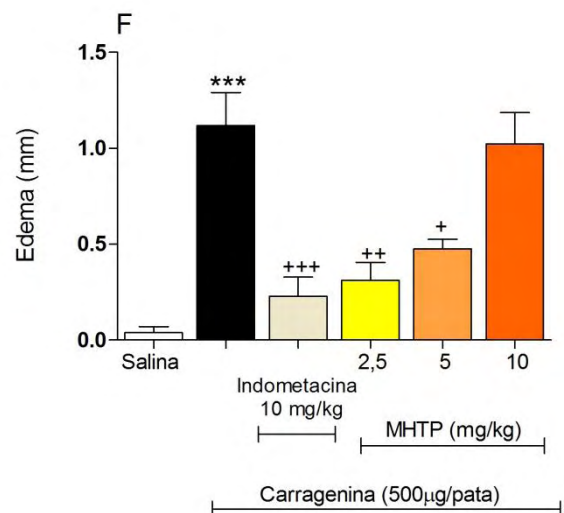
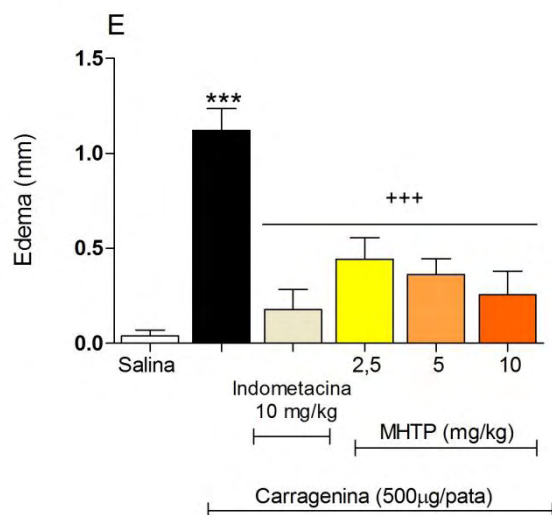
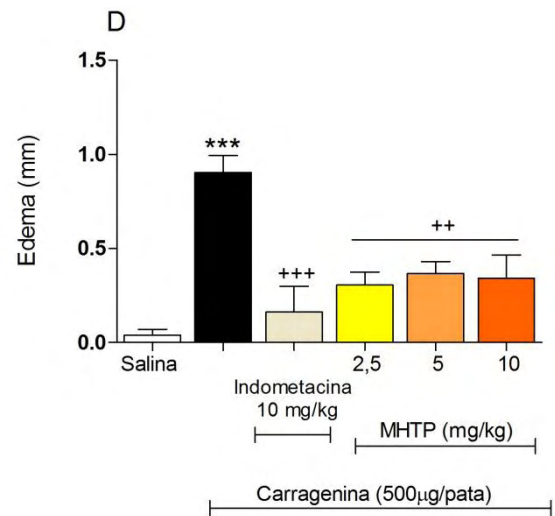
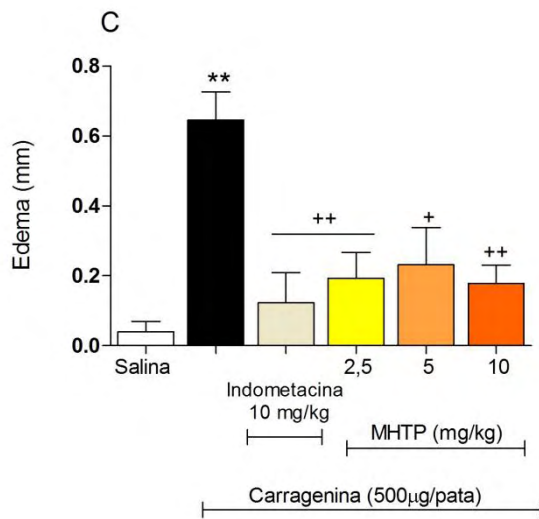
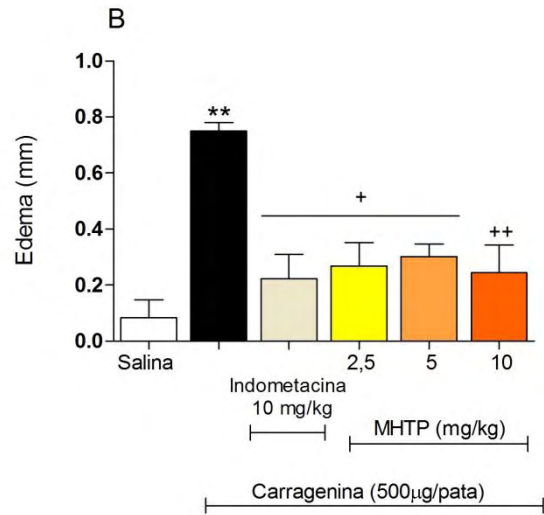
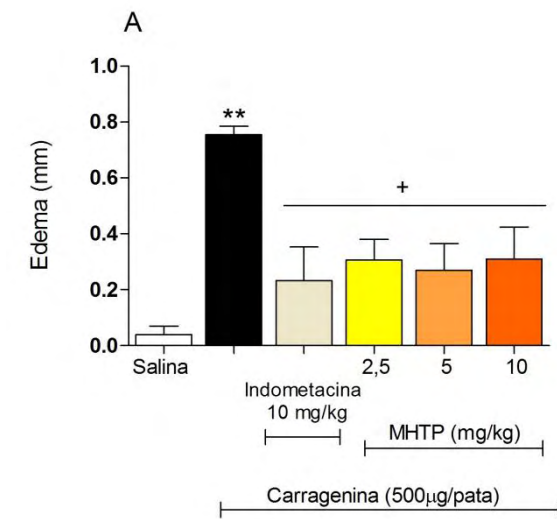
4.2 Avaliação do efeito do MHTP em modelos de inflamação aguda *in vivo*

4.2.1 Efeito do MHTP no edema de pata induzido por carragenina

Os resultados dos tratamentos com MHTP, em diferentes tempos, em animais desafiados com carragenina (agente flogístico) estão apresentados no Gráfico 4, onde os gráficos A, B, C, D, E, F, G e H representam os tempos de análise 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h e 48h respectivamente. A administração intraplantar (ipl) de carragenina induziu significativamente ($p < 0,01$), em todos os tempos analisados, o edema de pata no grupo de animais desafiados com a carragenina, quando comparado ao grupo de animais controle (salina), demonstrando a viabilidade da metodologia.

A indometacina, droga padrão anti-inflamatória, reverteu o processo inflamatório induzido pela carragenina com diminuição significativa ($p < 0,05$) do edema em 69,2%, 70,3%, 81,0%, 82,0%, 84,1%, 79,6%, 75,6% e 92,7% nos tempos de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h e 48h respectivamente. O tratamento com MHTP nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg inibiu a formação do edema de pata nos animais experimentais de maneira significativa ($p < 0,05$) no intervalo de 1-5 horas após a indução com carragenina sem diferença estatística entre as doses. Na dose de 2,5 mg/kg de MHTP os percentuais de inibição, nos diferentes tempos (1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 24h e 48h) foram de 59,4%, 64,2%, 70,1%, 66,2% e 60,4% respectivamente, para a dose de 5 mg/kg foram de 64,2%, 59,7%, 64,1%, 59,3% e 67,6% respectivamente e para a dose de 10 mg/kg foram de 58,9%, 67,5%, 72,4%, 62,2% e 77,1% respectivamente, quando comparadas com o grupo de animais carragenina.

A dose de 2,5 mg/kg de MHTP manteve a inibição, em 61,9%, da formação do edema até as 24h quando comparado com o grupo de animais carragenina porém esse efeito não perdurou em 48h. A dose de 5 mg/kg inibiu o edema em 57,4% nas 6h após indução do edema mas não sendo observado inibição do edema em 24 e 48. Por fim, a maior dose analisada (10 mg/kg) não demonstrou efeito inibitório na formação do edema de pata a partir das 6h após a indução com carragenina.



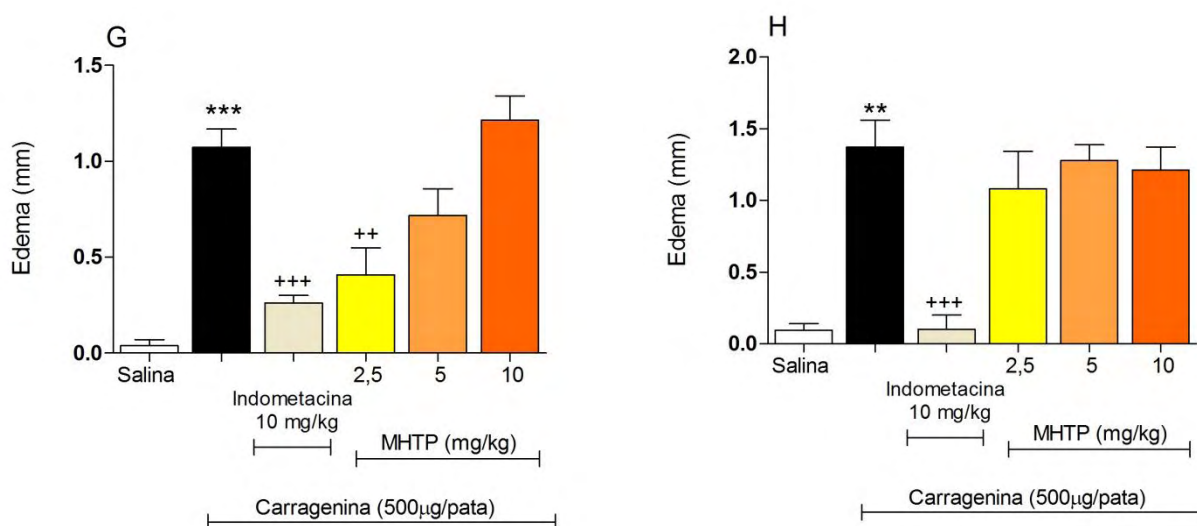


Gráfico 4: Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido por carragenina nos diferentes tempos analisados. MHTP (2,5; 5 ou 10 mg/kg), indometacina (10 mg/kg), ou solução salina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e o grupo controle positivo (carragenina) receberam injeção ipl (20 µL) de carragenina 2,5 % e PBS nas patas esquerdas e direitas, respectivamente. O grupo salina recebeu 20 µL de PBS em ambas as patas. As barras representam a média ± 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), 24 h e 48 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. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo salina; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo carragenina ou controle positivo. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes com $n=6$ (por grupo).

4.2.2 Efeito do MHTP no edema de pata induzido por prostaglandina E₂ (PGE₂)

A injeção ipl de PGE₂ induziu, significativamente ($p < 0,001$), a formação de edema de pata em 15, 30 e 60 minutos (Gráficos 5 A, B e C) quando comparado com o grupo de animais controle (salina). A indometacina inibiu em 45,8%, 51,3% e 50,1% respectivamente ($p < 0,05$) a formação do edema nos tempos de 15, 30 e 60 minutos quando comparada com o grupo de animais PGE₂. No grupo dos animais tratados com MHTP na dose de 2,5 mg/kg e desafiado com PGE₂ observou-se diminuição de 41,3 % (Gráfico 5A), 53,6 % (Gráfico 5B) e 57,8% (Gráfico 5C) ($p < 0,01$) respectivamente do edema de pata nos três tempos analisados quando comparado com o grupo de animais PGE₂. A dose de 2,5 mg/kg do MHTP foi escolhida para dar continuidade aos estudos devido aos resultados obtidos nos experimentos de formação de edema de pata induzido por carragenina onde observou-se que essa dose inibiu o edema de pata em todos os tempos analisados sem que fosse observado diferenças estatísticas com as doses mais elevadas.

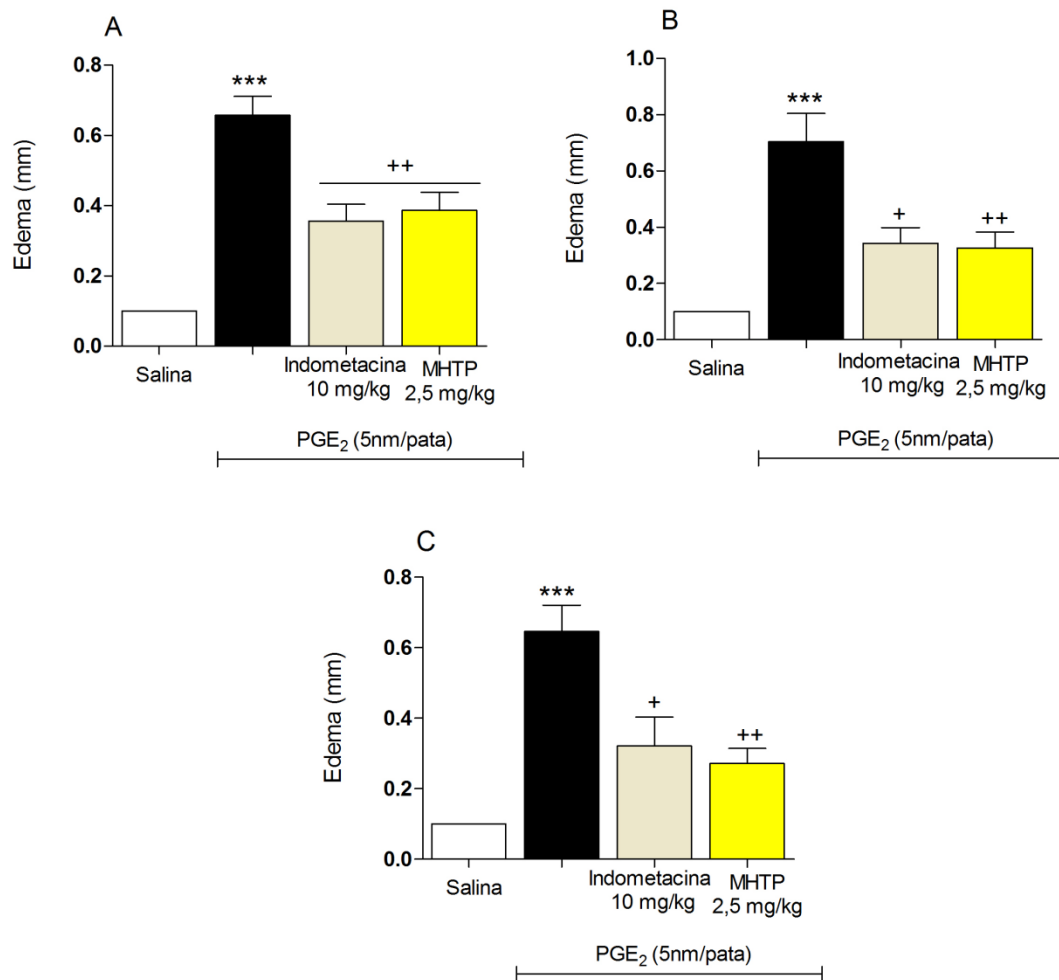


Gráfico 5: Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido por PGE₂ em diferentes tempos analisados. Camundongos *swiss* foram pré-tratados com MHTP (2,5 mg/kg), indometacina (10 mg/kg), ou solução salina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle positivo receberam injeção ipl (20 µL) de PGE₂ (5 nmol/pata) e PBS nas patas esquerdas e direitas, respectivamente. O grupo salina recebeu 20 µL de PBS em ambas as patas. As barras representam a média ± e.p.m. da diferença entre as patas, medida em 15 min (A), 30 min (B) e 60 min (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. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 quando comparados ao grupo salina; + p<0,05, ++ p<0,01 e +++ p< 0,001 quando comparado ao grupo carragenina ou controle positivo. Os gráficos são representativos de um experimentos com n=5 por grupo.

4.2.3 Efeito do MHTP no edema de pata induzido pelo composto 48/80

O composto 48/80 provocou, nos animais, aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro da pata em 30 e 60 minutos após a sua administração (Gráficos 6A e B) quando comparado com os animais do grupo controle (salina). O grupo de animais tratados com o anti-histamínico prometazina apresentou inibição de 87,6%, e 94,8%, ($p < 0,05$) na formação do edema em 30 e 60 minutos respectivamente após estímulo com o composto 48/80 quando comparado com o grupo de animais desafiados com o composto 48/80. Entretanto, não foi observado redução do edema de pata nos animais tratados com MHTP na dose de 2,5 mg/kg nos tempos analisados (Gráficos 6A e B).

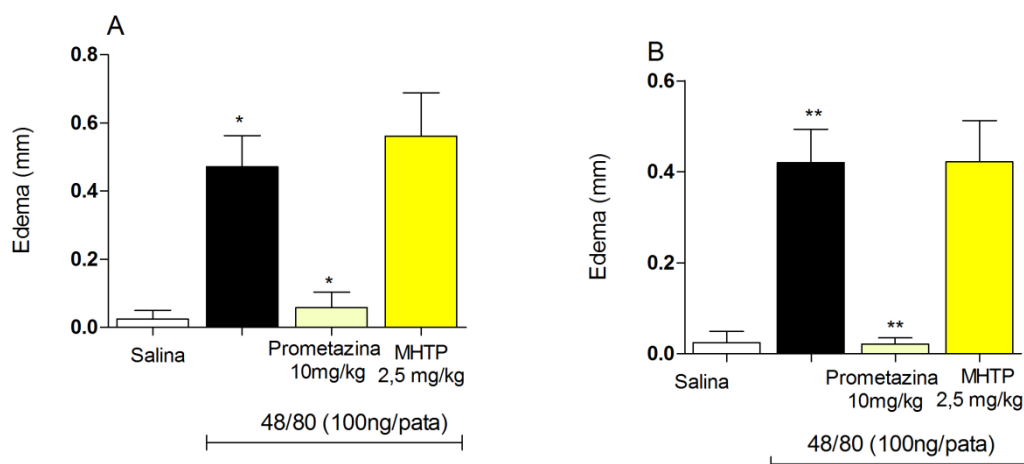


Gráfico 6: Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido pelo composto 48/80 em diferentes tempos. Camundongos *swiss* foram pré-tratados com MHTP (2,5 mg/kg), Prometazina (10 mg/kg), ou solução salina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle positivo receberam injeção ipl (20 μ L) do composto 48/80 (100 ng/pata) e PBS nas patas esquerdas e direitas, respectivamente. O grupo salina recebeu 20 μ L de PBS em ambas as patas. As barras representam a média \pm e.p.m. da diferença entre as patas, medida em 30 min (A) e 60 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. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo salina; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo carragenina ou controle positivo. Os gráficos são representativos de um experimentos com $n=6$ por grupo.

4.2.4 Efeito do MHTP no edema de pata induzido por histamina

A administração de histamina no coxim plantar do animal provocou o aumento significativo ($p < 0,001$) da pata, caracterizando o edema, quando comparado com os do grupo de animais controle (salina) nos tempos de 30 e 60 minutos (Gráficos 7A e B). O anti-histamínico prometazina inibiu em 71,0%, e 74,7% ($p < 0,001$), a formação do edema de pata em 30 e 60 minutos respectivamente, após estímulo com histamina quando comparado com o grupo de animais histamina (controle positivo). Entretanto, o grupo de animais tratados com o MHTP na dose de 2,5 mg/kg não apresentou inibição na formação do edema de pata nos tempos analisados (Gráficos 7A e B).

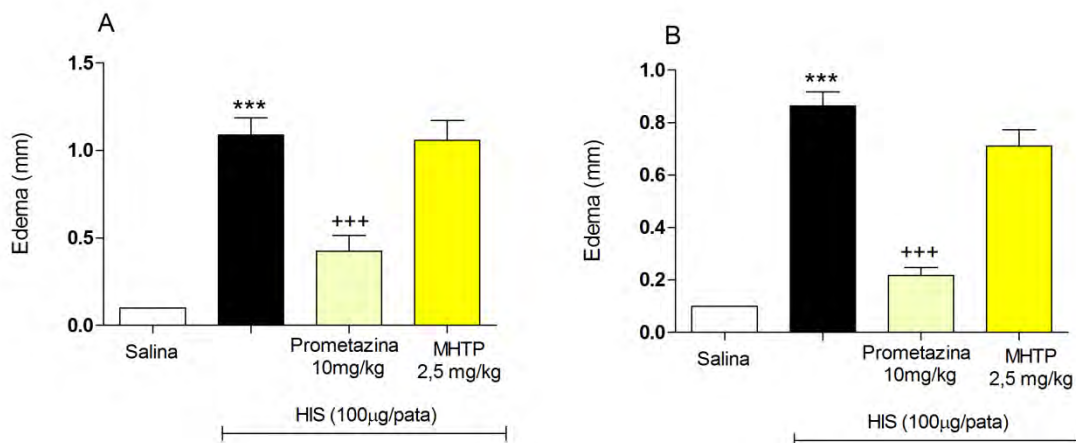


Gráfico 7: Efeito do pré-tratamento com MHTP no edema de pata induzido por histamina em diferentes tempos. Camundongos *swiss* foram pré-tratados com MHTP (2,5 mg/kg), prometazina (10 mg/kg), ou solução salina. Uma hora após os tratamentos, os grupos tratados e controle positivo receberam injeção ipl (20 µL) de histamina (HIS-100 µg/pata) e PBS nas patas esquerdas e direitas, respectivamente. O grupo salina recebeu 20 µL de PBS em ambas as patas. As barras representam a média ± e.p.m. da diferença entre as patas, medida em 30 min (A) e 60 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. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo salina; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo carragenina ou controle positivo. Os gráficos são representativos de um experimento com $n=5$ por grupo.

4.2.5 Efeito do MHTP na migração celular e permeabilidade vascular induzida por carragenina.

A administração de carragenina no peritônio dos animais induziu aumento em 41,1% ($p<0,001$) o número de leucócitos totais na cavidade peritoneal quando comparado ao do grupo de animais controle (salina) (Gráfico 8 A). Em adição, o pré-tratamento com a droga padrão indometacina reduziu em 44,1% ($p<0,001$) o número de células inflamatórias totais. Similar efeito foi observado nos animais tratados com o MHTP na dose de 2,5 mg/kg onde a molécula sintética inibiu em 41,4% ($p<0,001$) a migração leucocitária quando comparados com os do grupo de animais carragenina.

Com relação aos leucócitos polimorfonucleares (PMN), preferencialmente neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal durante as primeiras 4 hora após o estímulo observamos um aumento de 77,4% ($p<0,001$) dessas células no peritônio no grupo de animais estimulados com carragenina quando comparado ao grupo de animais controle (salina) (Gráfico 8 B). O tratamento dos animais com MHTP (2,5 mg/kg) inibiu em 59,6% ($p<0,001$) a migração destas células para o peritônio e de forma similar a indometacina inibiu essa população de células em 65,6% (Gráfico 8 B). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos de animais analisados quanto ao número de células mononucleares (MN), os monócitos, presentes no peritônio (Gráfico 8 C).

O gráfico 8 D representa o aumento de 77,5% ($p<0,001$) na permeabilidade vascular, demonstrada pela concentração de proteínas totais, quando comparado ao grupo de animais controle (salina). A droga padrão e o alcaloide sintético MHTP (2,5 mg/kg) induziram a diminuição significativa ($p<0,01$) do extravasamento de proteínas para a cavidade peritoneal com percentual de inibição de 51,3% e 29,4% respectivamente.

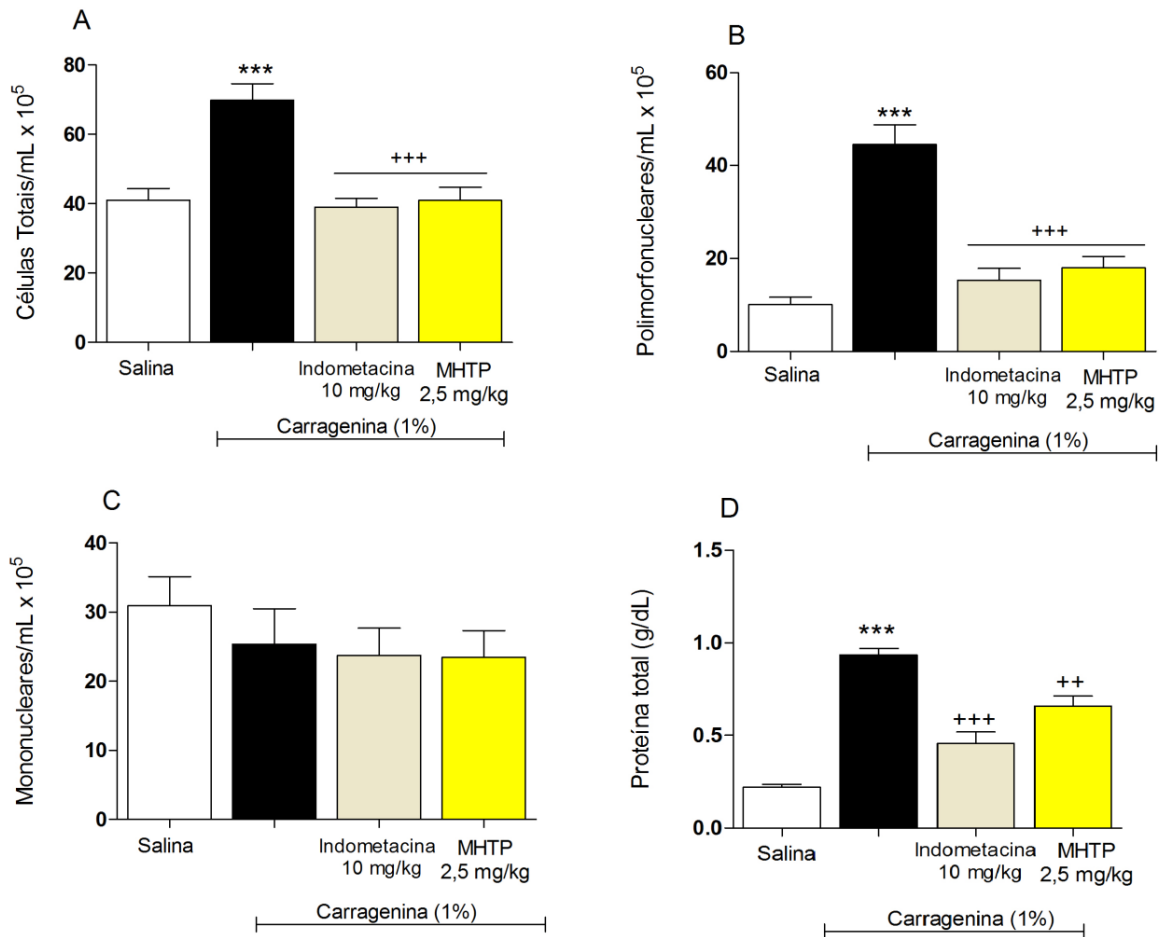


Gráfico 8: Efeito do pré-tratamento com MHTP no número de leucócitos total e diferencial e sobre alterações na permeabilidade vascular no modelo de peritonite induzida por carragenina. Camundongos *swiss* foram tratados com MHTP (2,5 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), ou salina. Uma hora após os tratamentos, os grupos indometacina e controle positivo (carragenina) receberam injeção intraperitoneal (i.p.) com 300 μ L de carragenina (1 % em solução salina 0,9 %). O grupo salina recebeu injeção i.p. (300 μ L) de salina. Quatro horas após o estímulo, foi realizado lavado peritoneal para determinação da celularidade total (A), diferencial, onde foi realizada a diferenciação entre polimorfonucleares (PMN) (B) e mononucleares (MN) (C), e extravasamento de proteínas (D). As barras representam a média \pm e.p.m. da contagem total e diferencial das células em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo salina; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo carragenina. Os gráficos são representativos de um experimento com $n=8$ por grupo.

4.2.6 Efeito do MHTP sobre os níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 e das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda *in vivo*.

Os sobrenadantes dos lavados peritoneais dos animais estimulados com carragenina apresentaram níveis elevados estatisticamente significantes ($p < 0,05$), de todos os mediadores avaliados, quando comparados aos do grupo de animais controle (salina) (Gráficos 9 A, B, C, D). O tratamento com o MHTP ou a droga padrão (indometacina) não promoveram diminuição nos níveis da quimiocina MCP-1/CCL2 e das citocinas pró-inflamatória IL-1 β e IL-6, (Gráficos 9 A, B e C). A citocina anti-inflamatória IL-10, também foi liberada durante a inflamação do peritônio induzida por carragenina com níveis, estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em comparação com os do grupo de animais controle (salina). Os camundongos tratados com a droga padrão, indometacina, apresentaram redução nos níveis da IL-10 em 77,7% ($p < 0,05$), porém esse fenômeno não foi observado nos animais tratados com o MHTP (Gráfico 9 D).

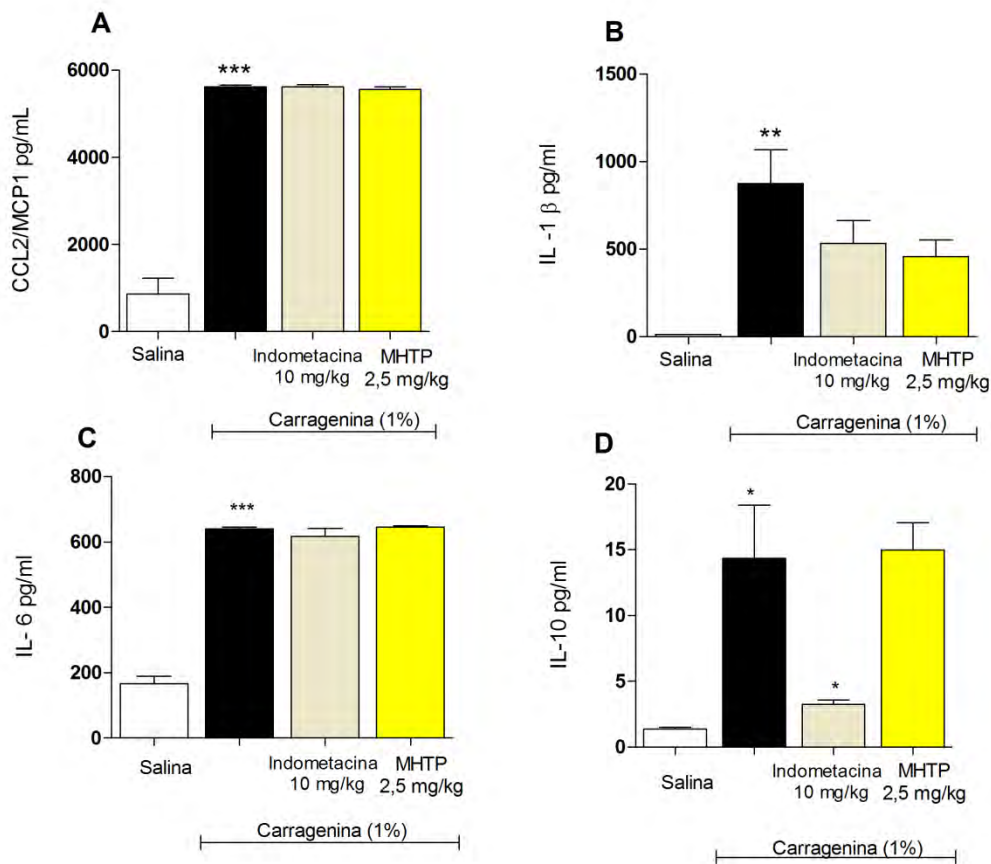


Gráfico 9: Efeito do pré-tratamento com MHTP sobre os níveis de MCP-1/CCL2, IL-1 β , IL-6 e IL-10 *in vivo*. Camundongos *swiss* foram tratados com MHTP (2,5 mg/kg), Indometacina (10 mg/kg), ou salina. Uma hora após os tratamentos, os grupos indometacina e controle positivo (carragenina) receberam injeção i.p. (300 μ L) de carragenina (1 % em solução salina 0,9 %). O grupo salina recebeu injeção i.p. (300 μ L) de salina. Quatro horas após o estímulo, o lavado peritoneal foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para mensurar os níveis das citocinas MCP-1/CCL2 (A), IL-1 β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) pelo método de ELISA. As barras representam a média \pm e.p.m. da contagem total e diferencial das células em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo salina; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo carragenina. Os gráficos são representativos de um experimento com $n=8$ por grupo.

4.2.7 Efeito do pré-tratamento com MHTP no modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA)

Animais estimulados com LPS desenvolveram a LPA com aumento significativo ($p < 0,001$) no número de células inflamatórias totais no lavado broncoalveolar quando comparados aos do grupo controle (salina) (Gráfico 10 A). O pré-tratamento com a dexametasona inibiu em 45,5% ($P < 0,001$) a migração de células inflamatórias totais para os pulmões quando comprado ao grupo de animais LPS. Resultados semelhantes foram observados no grupo de animais pré-tratamento com o MHTP onde se observa redução em 58% ($P < 0,001$) na migração de células inflamatórias para os pulmões quando comparados com os grupo se animais LPS.

Os tratamentos com o MHTP e a droga padrão dexametasona induziram nos animais com LPA diminuição em 67,5% e 57% ($p < 0,001$) respectivamente a migração dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) quando comparados com o grupo de animais LPA (Gráfico 10 B). Entretanto, a contagem diferencial para as células mononucleares (MN) não apresentou diferença estatística entre os grupos analisados (Gráfico 10 C).

A permeabilidade vascular nos animais com LPA foi demonstrada pela concentração de proteínas totais no lavado broncoalveolar e como pode ser observado no gráfico 10 D houve aumento de 12,5% ($p < 0,05$) na concentração proteica nesses animais quando comparados com os do grupo de animais controle (salina). A droga padrão dexametasona reduziu o extravasamento de proteínas em 12,8% ($p < 0,05$), porém o tratamento com o MHTP não interferiu no extravasamento de proteínas para o pulmão dos animais quando comparados com os animais com LPA.

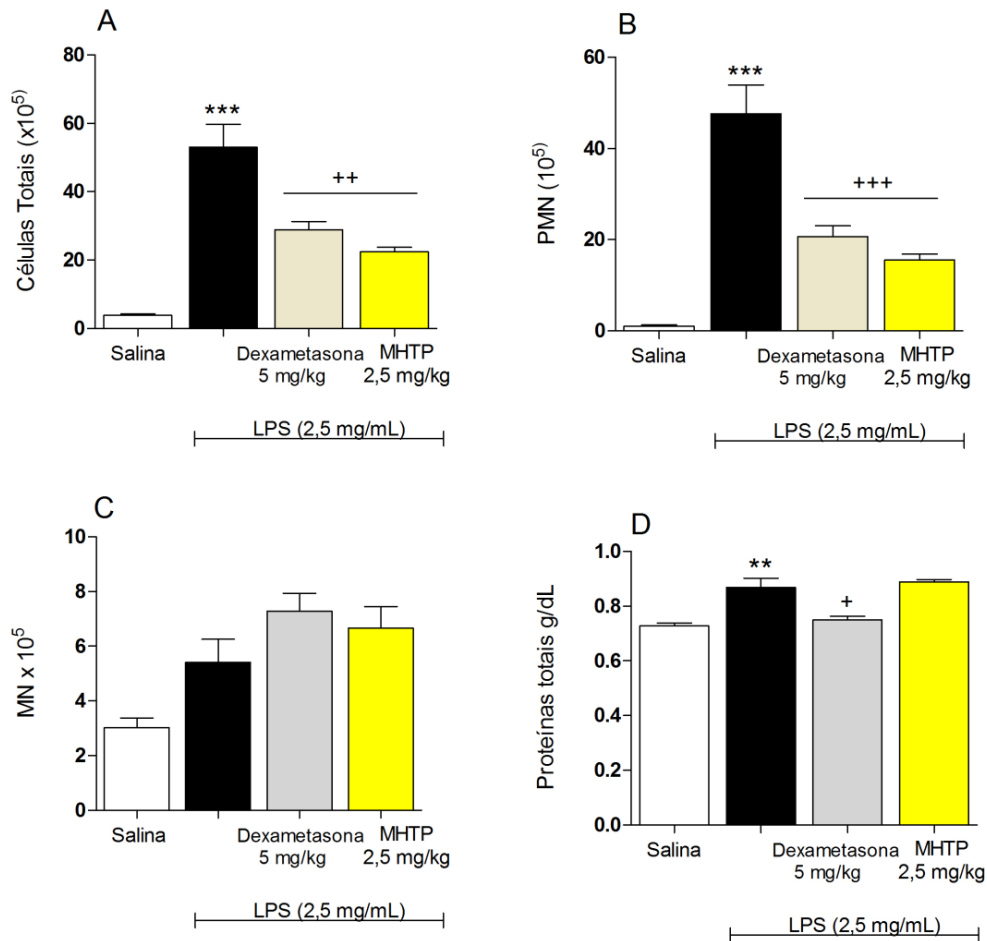


Gráfico 10: Efeito do pré-tratamento com MHTP no número de leucócitos total e diferencial e sobre alterações na permeabilidade vascular no modelo experimental de lesão pulmonar aguda. Os animais foram pré-tratados com injeção i.p. de dexametasona (5mg/kg) ou com MHTP 2,5 mg/kg ou salina por via oral uma hora antes da indução intranasal com 50 μ L da solução de LPS (2,5 mg/mL). O grupo controle salina recebeu 50 μ L do veículo (PBS). Os animais foram submetidos ao lavado broncoalveolar 24h após a indução. As barras representam a média \pm e.p.m. da diferença entre as patas, medida em 30 min (A) e 60 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. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo salina; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo carragenina ou controle positivo. Os gráficos são representativos de um experimentos com $n=5$ por grupo.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O MHTP em concentrações iguais ou acima de 100 μM foi tóxico para macrófagos em cultura, indicando que os testes posteriores devem ser realizados com concentrações abaixo das tóxicas. Resultados semelhantes foram descritos para o alcaloide tetrahydroisoquinolínico sintético CKD712 [(S)-1-(α -naftilmetil)-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina], onde a viabilidade celular não diminuiu até a concentração de 50 μM na linhagem de macrófagos RAW264.7, entretanto a viabilidade celular foi diminuída em cerca de 44% na concentração de 100 μM (TSOYI et al., 2008). Os dados mostram que moléculas sintéticas podem ser tóxicas para as células em baixas concentrações, reforçando a importância de uma triagem toxicológica antes de seu uso.

Os ensaios de cultura celular podem oferecer informações valiosas sobre a eficácia de moléculas com atividades anti-inflamatórias em diversos aspectos da inflamação. Os macrófagos em cultura podem responder a uma variedade de agentes, dentre eles o lipopolissacarídeo da parede de bactérias gram-negativas (LPS) que induz ativação celular (FERRARI et al., 1990). Em resposta ao LPS os macrófagos secretam uma ampla variedade de mediadores de respostas biológicas, como o PAF, prostaglandinas, enzimas, e óxido nítrico (NO) (FUJIHARA et al., 2003; BRADLEY, 2008). Para avaliar o possível efeito anti-inflamatório do MHTP, macrófagos peritoneais foram estimulados, ou não, com LPS e, imediatamente após, tratados MHTP por 24h. O alcaloide sintético administrado nos macrófagos em cultura celular, sem o estímulo do LPS, não induziu a ativação das células, evidenciado pela ausência de NO, indicando a ausência de endotoxinas ou qualquer outro agente capaz de iniciar uma resposta inflamatória. Entretanto o MHTP foi capaz de diminuir a produção de NO em macrófagos peritoneais estimulados com LPS, o que indica um efeito anti-inflamatório.

Em células de mamíferos o LPS atua via receptor Toll-like 4 (TLR4), desencadeando uma forte reação imunológica (MORRIS; LI, 2011) através da ativação de uma cascata de sinalizações com interações entre várias proteínas (LU et. al, 2008), incluindo o fator de transcrição nuclear-kappaB (NF- κ B), AP1, IRF-3 e numerosos outros fatores de transcrição (BRYANT et. al, 2010). Genes que codificam muitos mediadores pró-inflamatórios têm as sequências de ácidos nucleicos de reconhecimento de NF- κ B nos seus promotores, incluindo os genes responsáveis pela iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, e TNF- α (TSOYI et al., 2008).

Na literatura o alcaloide sintético tetrahydroisoquinolínico THI 52 (1- naftiletil -6,7-dihidroxi -1,2,3,4- tetrahydroisoquinolina) inibiu os níveis de NO e iNOS em células RAW 264.7 ativadas com LPS (KANG et al., 2003). Tsoyi e colaboradores (2008) estudando os efeitos anti-inflamatórios do alcaloide sintético também tetrahydroisoquinolínico, CKD712, observaram que em macrófagos de linhagem RAW264.7 estimulados com LPS, o alcaloide reduziu os níveis de NO, e essa diminuição foi devido a redução nos níveis da enzima iNOS. Considerando que o THI 52, o CKD712 e o MHTP são alcaloides sintéticos tetrahydroisoquinolínicos, com semelhanças estruturais, capazes de inibir a produção de NO em macrófagos, sugerimos que o MHTP possa estar atuando também pela inibição da enzima a iNOS e consequentemente inibindo a produção do NO em macrófagos peritoneais estimulados com LPS, como observamos no presente estudo. Experimentos adicionais medindo a expressão da iNOS devem esclarecer essa hipótese.

Além da produção de mediadores como o NO, o LPS ativa monócitos e macrófagos para produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e anti-inflamatória (IL-10), moléculas de adesão e quimiocinas como MCP-1/CCL2 pela via de ativação do NF- κ B e da proteína ativadora 1 (AP-1) (FUJIHARA et al., 2003; REMPPIS et al., 2010). O tratamento com o MHTP de macrófagos peritoneais com LPS foi capaz de diminuir os níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) se interferir nos níveis de quimiocina MCP-1/CCL2. A diminuição dos níveis de IL-1 e IL-6 na cultura celular indicam uma atividade anti-inflamatória do MHTP, uma vez que a manutenção dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode gerar problemas secundários ao local da inflamação e/ou ao organismo.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, devido à sua capacidade em suprimir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α por macrófagos, bem como induzir a síntese de antagonista do receptor de IL-1 β e dos receptores de TNF solúveis, os quais tornam o TNF- α biologicamente indisponível (BARTON; JACKSON, 1993). Um resultado interessante para um potencial fármaco é não diminuir, ou aumentar os níveis de IL-10. Entretanto essa capacidade não parece estar dentro das atividades do MHTP em relação a produção de citocinas pelos macrófagos em cultura.

A MCP-1/CCL2 é um potente fator quimiotático para os monócitos e é um dos membros mais estudados da família de quimiocinas, e foi demonstrado ser um ponto de intervenção para o tratamento de várias doenças (DESHMANE et al., 2009). A manutenção dos níveis de MCP-1/CCL2 nos experimentos com macrófagos tratados com o MHTP pode

ser considerada um fator positivo durante a inflamação aguda, pois os monócitos/macrófagos estão especialmente envolvidos na resolução da inflamação (SERHAN et al., 2007).

Em conjunto esses resultados sugerem uma atividade anti-inflamatória do alcaloide tetrahidroisoquinolínico, MHTP, por meio da modulação na via de ativação de produção das citocinas em macrófagos peritoniais, com a possibilidade de estar interagindo na ativação do NF- κ B, como um ponto em comum para a produção das citocinas analisados. Resultados que corroboram para os obtidos nesse trabalho vêm dos estudos com o alcaloide CKD712, onde foi demonstrado que esse alcaloide inibiu a ativação do NF- κ B (translocação da p65 para o núcleo) e das MAPK, JAK/STAT, na linhagem de macrófagos RAW 264.7 ativadas por LPS (TSOYI et al., 2008).

Para dar continuidade aos estudos com o MHTP e aprofundar nossos conhecimentos sobre a ação do alcaloide em vários aspectos e constituintes do processo inflamatório realizamos uma série de experimentos com modelos de inflamação aguda *in vivo*. Em estudos preliminares, no qual a toxicidade aguda do MHTP foi avaliada pela administração de 1000 mg/kg de MHTP por via oral, o alcaloide não apresentou alterações nos parâmetros bioquímicos e comportamentais, dessa forma não apresentando características tóxicas *in vivo* para a dose testada (PAIVA, 2014).

A metodologia escolhida para a triagem inicial do MHTP foi o edema de pata induzido por carragenina, por ser uma metodologia simples, rápida gerando resultados que foram obtidos com a maior parte das drogas clinicamente ativas como exemplos a aspirina, fenilbutazona, indometacina, hidrocortisona, etc (NAIK; SHETH, 1976). O desenvolvimento do edema induzido por carragenina tem sido descrito como um evento bifásico, idade e peso dependente, onde vários mediadores operam em sequência para produzir uma resposta inflamatória. Didaticamente, o edema é dividido em: primeira fase (0-24h) que é caracterizada por um edema de baixa intensidade e segunda fase (24-96h), caracterizada por um edema mais pronunciado (devido à migração celular) com um efeito máximo entre 48 e 72h.

Nas primeiras seis horas, os mediadores detectáveis são os eicosanoides (PGE₂), as aminas vasoativas (histamina, serotonina), bradicinina e NO. Após seis horas, ocorre migração leucocitária (principalmente neutrófilos), bem como os níveis de mieloperoxidase (MPO) que são considerados marcadores da migração neutrofílica e níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), as quais permanecem elevadas até 24h. As enzimas, principalmente COX-1, colaboram com a manutenção dos níveis de PGE₂ nos tecidos inflamados na primeira fase, e na segunda fase (72h) a PGE₂ é produzida pela COX-2, sendo considerada o principal mediador responsável pela manutenção do edema nos tempos tardios

(entre 24h e 96h). Os níveis de NO possuem um pico de concentração elevada na primeira fase produzido pela eNOS e um outro na segunda fase produzido pelas isoformas iNOS e eNOS (POSADAS et al., 2004).

O tratamento com o MHTP em camundongos desafiados com carragenina inibiu o edema de pata de maneira semelhante a droga padrão indometacina (10 mg/kg) nas primeiras cinco horas. Observamos que o MHTP (2,5 mg/kg) em uma dose quatro vezes menor demonstrou ser tão eficaz quanto o anti-inflamatório padrão na diminuição do edema de pata. Em adição, as três doses do alcaloide (2,5, 5 e 10 mg/kg) apresentaram efeito anti-edematogênico semelhante sem diferença estatística entre os tratamentos. Vem sendo farmacologicamente indicado que quando diferentes doses de uma substância apresentam efeitos semelhantes, a escolha da menor dose seja preferencial, como prevenção de efeitos colaterais. Portanto, escolhemos a menor dose (2,5 mg/kg) para dar continuidade aos efeitos anti-inflamatório do MHTP.

Resultado semelhante está descrito na literatura com alcaloide pirrolizidínico isolado das sementes de *Crotalaria laburnifolia* Linn (Fabaceae), denominado de crotalaburnine, no qual o pré-tratamento com 10 mg/kg inibiu o edema de pata em rato 3h após a indução por carragenina (GHOSH, 1974). O mesmo efeito foi observado na fração de alcaloide da *Ruta graveolens* L. (Rutaceae), uma planta medicinal vulgarmente conhecida como arruda, que também inibiu o edema de pata em rato 3h após a indução por carragenina, quando os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg (RATHEESH et al., 2010).

O efeito anti-edematogênico do MHTP observado nas primeiras horas sugere que o alcaloide esteja atuando na produção e/ou ação dos mediadores iniciais, liberados pelo estímulo da carragenina. Portanto, investigamos o efeito do MHTP (na menor dose 2,5 mg/kg) na formação do edema de pata induzido pelos mediadores prostaglandina da série E₂ (PGE₂), na liberação de histamina pela degranulação dos mastócitos, e por fim a influência direta do MHTP na formação de edema de pata pela histamina.

A PGE₂ produzidas pela quebra do ácido araquidônico por ciclooxigenases (COXs) é liberada imediatamente após a sua síntese e exerce suas funções biológicas via a ativação de seu receptor (EP) acoplado a proteína G. A diversidade nas funções celulares de PGE₂ é atribuída à sua ligação a quatro subtipos diferentes de receptores EP que, por sua vez propaga o sinal, através de alteração do cálcio intracelular (Ca²⁺) ou dos níveis de adenosina-monofosfato cíclico (cAMP). Esses mecanismos de ação da PGE₂ resultam na ativação de uma série de cinases que modulam diversas funções celulares, podendo induzir uma resposta inflamatória caracterizada pelo extravasamento de plasma e contração do músculo liso, além

de dor e febre (DEY et al., 2006; DEWITT, 1991). Das três isoformas de COXs a COX-2 é a única que pode ser induzida por estímulos inflamatórios incluindo zimosan, carragenina e LPS (NAOI et al., 2006; ALVAREZ et al., 2009; SCHLACHETZKI et al., 2010). O edema de pata induzido por PGE₂ é utilizado como um método para elucidar o papel de um potencial fármaco sobre a atividade desse mediador. Entretanto essa metodologia não permite considerar a atividade das ciclooxigenases, uma vez que a própria molécula é administrada no tecido. Os resultados obtidos no edema de pata induzido pela injeção de PGE₂, em camundongos pré-tratados com MHTP (2,5 mg/kg) mostram que o alcaloide inibiu o edema de maneira semelhante a indometacina (10 mg/kg), um inibidor da COX. Nossos dados mostram que o alcaloide inibiu a ação da PGE₂ e que esse efeito inibitório pode ser via ligação direta do MHTP ao receptor da PGE ou via bloqueio de algum ponto na via de sinalização induzida pela PGE₂.

Estudos com o alcaloide isolado crotalaburnine (20 mg/kg) demonstraram o efeito inibitório do alcaloide no edema de pata induzido por PGE₂ após 30 minutos de indução (GHOSH, 1974). Em outro estudo Tsoyi e colaboradores (2008) demonstram que camundongos pré-tratados com o alcaloide sintético CKD712 não diminuíram a produção de PGE₂ e ação da COX-2, e esses resultados foram confirmados em macrófagos de linhagem RAW 264.7, onde a produção de COX-2 induzida por LPS não foi afetada quando as células foram tratadas com CKD712. Essas informações, em conjunto com nossos dados indicam que o MHTP esteja atuando pós-produção de PGE₂, e nos permite sugerir que o alcaloide possa estar envolvido na inibição da ação da PGE₂, sem alterar a produção da molécula via COX-2.

O edema induzido por histamina no modelo experimental de edema de pata tem sido amplamente utilizado para explorar os efeitos anti-inflamatórios de algumas plantas medicinais (TAMADDONFARD et al., 2012). As fontes mais ricas de histamina são os mastócitos presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos, basófilos e plaquetas no sangue (KUMAR et al., 2010; YAKUGAKU Z. et al., 2011). A atividade de uma substância sobre a histamina pode ser observada via o processo de degranulação dos mastócitos (induzida por substâncias como a ionomicina e o composto 48/80) ou via a administração direta da histamina no tecido (GUO et al., 1997). 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 de NF-κB e da via da adenilato ciclase. Os receptores HR1 e HR2 são os responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela

histamina, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, como resultado da contração das células musculares, síntese de prostaciclina (PGI₂), síntese do fator de ativação plaquetária (PAF) e liberação de NO (JUTE et al., 2009; BORK, 2014). No nível juncional, a sinalização de histamina provoca a fosforilação e rompimento de componentes da junção aderentes (KUMAR et al., 2009).

O tratamento com o MHTP não reduziu a formação do edema induzido pelo composto 48/80 ou pela histamina, sugerindo que o MHTP não possui atividade sobre a degranulação de mastócitos (evitando a liberação do mediador inflamatório), assim como não interfere na atividade da histamina. Entretanto a droga padrão anti-histamínica prometazina como esperado diminuiu consideravelmente o efeito da histamina inibindo o edema de pata.

Os relatos na literatura apontam que a diminuição do edema por um alcaloide não necessariamente influencia a atividade da histamina. O alcaloide imidazol, episopiloturine, encontrado nas folhas de *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) (1 mg/kg) inibiu efetivamente o edema de pata em camundongo *swiss* induzido por sulfato de dextrano, serotonina, e bradicinina, mas não apresentou efeito inibitório na formação do edema de pata induzido por histamina (SILVA et al., 2013). Resultado semelhante foi descrito para o alcaloide warifteína (bisbenzilisoquinolínico) isolado da planta *Cissampelos sympodialis* EICHL. (Menispermaceae), onde o pré-tratamento com o alcaloide em ratos 1h antes do desafio com histamina não foi capaz de inibir a formação de edema de pata entre 15 a 180 min após indução (FERREIRA COSTA, 2007).

Como conclusões parciais de nossos estudos *in vivo* da atividade do MHTP na inflamação aguda, temos que a molécula foi capaz de reduzir a vasodilatação durante a resposta inflamatória aguda, inibindo a atividade da PGE₂ independente da ação sobre a liberação ou atividade da histamina.

No edema de pata induzido por carragenina observa-se, após 6 horas, a migração de células da inflamação para o sítio inflamado (POSADAS et al., 2004). O tratamento com o MHTP no modelo experimental provocou diminuição do edema no período de 6-24h onde predomina a presença de leucócitos, principalmente das células polimornucleares (POSADAS et al., 2004). Com o objetivo de estudar o efeito do MHTP na migração de células da inflamação para o sítio inflamado utilizamos o modelo experimental de peritonite induzida por carragenina. A administração intraperitoneal de carragenina produz um aumento sustentado da permeabilidade pós-capilar venular, levando a um aumento da infiltração celular, principalmente de neutrófilos (MALECH; GALLIN, 1987). Assim, este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade

peritoneal, sob a ação de agentes quimiotáticos, principalmente de leucotrienos e citocinas (BROOKS; DAY, 1991) e é considerado, por muitos pesquisadores, como um ensaio experimental completo uma vez que se pode avaliar o efeito de substâncias tanto sobre os eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (RIBEIRO et al., 1997).

Nossos resultados demonstram que os animais pré-tratados com o MHTP apresentaram redução significativa no número de leucócitos totais principalmente pela redução dos polimorfonucleares, entretanto sem alterar o número de células mononucleares que migraram para a cavidade peritoneal. Os PMNs (neutrófilos) constituem as primeiras células sanguíneas a serem recrutadas para o tecido contribuindo com a destruição do patógeno e pela cicatrização do tecido, porém seu acúmulo no tecido poderá levar a danos teciduais como se observa nas maiorias das doenças inflamatórias crônicas como as autoimunes e asma (MEDZHITOV, 2010). A manutenção dos monócitos pode ser uma característica positiva, uma vez que essas células estão envolvidas nos processos de resolução da inflamação (MEDZHITOV, 2008). Os resultados também revelaram que o MHTP diminuiu a quantidade de proteínas totais no lavado peritoneal, corroborando com resultados anteriores onde foi demonstrado que o MHTP esteja atuando em nível de endotélio inibindo a vasodilatação.

Estudos com o alcaloide epiisopiloturine demonstraram inibição da migração de leucócitos total e de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina, confirmado pela redução da enzima mileoperoxidase, considerada como indicador da migração neutrofílica (SILVA et al., 2013). O mesmo foi observado para a caulerpina, um alcaloide bisindol extraído de algas marinhas, que foi capaz de inibir a migração de células da inflamação para o peritônio de camundongos desafiados com carragenina (DE SOUZA, 2009).

Durante a peritonite induzida por carragenina também se observa a produção de mediadores, tais como NO, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (SALVEMINI et al., 1996; LORAM et al., 2007), que induzem, entre várias outras funções, a expressão de moléculas de adesão nos leucócito e células endoteliais (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2010). O tratamento com MHTP no modelo experimental de peritonite não alterou os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 e MCP-1/CCL2, sugerindo que a atuação *in vivo* do alcaloide não seja pela inibição desses mediadores.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com um papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e auto-imunes (SARAIVA; O’GARRA, 2010). Os níveis de IL-10, não alterados no tratamento com MHTP, diferente do verificado no ensaio *in vitro*, é considerado um efeito positivo na inflamação, considerando as características anti-

inflamatórias dessa citocina. As quimiocinas estão envolvidas no processo de migração leucocitária durante a inflamação, controlando seletivamente a adesão, quimiotaxia e ativação de muitos tipos de populações e subpopulações de leucócitos. Algumas quimiocinas estão primariamente envolvidas em processos inflamatórios agudos como a peritonite induzida por carragenina, por exemplo, a quimiocina de MCP-1 (CCL2), que regula a migração e infiltração de monócitos para o sítio inflamatório (KULKARNI et al., 2009).

A inibição da migração celular, principalmente de células polimorfonucleares, além da diminuição do exsudato proteico (proteínas totais) observadas nos animais tratados com o MHTP indicam a eficácia da molécula na resolução do processo inflamatório agudo. Baseado nesses resultados anti-inflamatórios do MHTP decidiu-se estudar o potencial terapêutico dessa molécula em um modelo de doença inflamatória aguda denominada lesão pulmonar aguda experimental (LPA).

A lesão pulmonar aguda (LPA), uma síndrome de insuficiência, é uma condição inflamatória na qual observamos os principais processos e agentes da inflamação aguda, como o influxo de células inflamatórias, aumento da permeabilidade alveolocapilar com formação de edema pulmonar rico em proteínas e fatores pró-inflamatórios (LEIKAUF et. al, 2002; GROENEVELD, 2003). Os neutrófilos desempenham um papel central na patogênese da LPA, combinado com uma miríade de mediadores, incluindo citocinas (TNF- α , IL-1 β), PAF, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO) e fatores de crescimento. Macrófagos ativados, por exemplo, liberam uma variedade de citocinas, ROS, NO e enzimas proteolíticas (SILLIMAN et. al, 1998; LEIKAUF et. al, 2002). Os distúrbios que levam ao desenvolvimento da LPA afetam pacientes de todas as idades, com taxas de mortalidade substanciais, em torno de 30-50%. E apesar das sofisticadas terapias intensivas baseadas em evitar as complicações e tratar a causa subjacente, a LPA não tem tratamento específico (WHEELER; BERNARD, 2007; RAGHAVENDRAN et. al, 2008).

A LPA se desenvolve a partir da perturbação de células epiteliais e endoteliais do pulmão, do influxo de células inflamatórias para o tecido resultando na interrupção da produção do surfactante (mistura lipoproteica com propriedades tensoativas), no edema pulmonar e na atelectasia (colapso do parenquima pulmonar). Vários modelos animais para LPA têm sido desenvolvidos via a indução com lipopolissacarídeo (LPS), hiperóxia, embolia, e ácido oléico (LEIKAUF et. al, 2002). Segundo Matute-Bello (2008), a utilização de LPS na indução da LPA é o segundo modelo com maior número de citações no banco de dados do PubMed no período de 2003 a 2007.

O tratamento de animais com LPA induzida com LPS com MHTP inibiu a migração de leucócitos totais e PMNs no lavado bronco-alveolar desses animais corroborando com os resultados obtidos no modelo experimental de peritonite induzida com carragenina. Entretanto, o alcaloide não foi capaz de inibir o extravasamento proteico no tecido pulmonar após 24h do estabelecimento da doença. Esse resultado, portanto não corrobora com aquele obtido no modelo e peritonite onde o tratamento com o MHTP diminuiu o extravasamento de proteínas no peritoneo após 4h do estabelecimento da peritonite. A contradição desses resultados nos diferentes modelos experimentais deve-se provavelmente a severidade da doença LPA e também ao tempo de duração do modelo de doença -24h.

Estudos utilizando o modelo experimental de LPS mostrou que o alcaloide quinolizidínico matrine isolado da planta *Sophora flavescens Ait (Kushen)* foi eficaz na supressão da inflamação pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS, em camundongos, pela redução acentuada do edema pulmonar, dos níveis da MPO, da migração de células totais e teor de proteínas (ZHANG, et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados no tratamento de camundongos com LPA com a fração de alcaloides total da planta *Corydalis denticulato-bracteata* Fedde, onde foi observado a diminuição do edema pulmonar e de alterações histopatológicas, além de inibir a produção de TNF- α e NO no soro e no lavado broncolaveolar desses animais. Os resultados foram comprovados no nível molecular pela redução dos níveis da iNOs e p65 no pulmão (NIU et al., 2014).

Portanto, este trabalho demonstrou o potencial anti-inflamatório do alcaloide sintético MHTP em modelos experimentais de inflamação aguda, *in vitro* e *in vitro*, pela resolução de alguns processos inflamatórios bem como pela inibição da ação de alguns componentes da inflamação. A atividade anti-inflamatória do alcaloide foi observada em doses similares aquelas utilizadas com drogas padrão no tratamento de inflamação. Os resultados obtidos nesse trabalho nos encorajam a dar continuidade nos estudos com o MHTP para que, no futuro possa ser uma droga de escolha no tratamento de inflamações agudas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- O MHTP possui atividade anti-inflamatória por diminuir a produção de óxido nítrico e a produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias em culturas de macrófagos peritoneais;
- O MHTP apresenta atividade anti-edematogênica pela inibição da atividade da PGE₂ independente da degranulação de mastócitos ou atividade da histamina.
- O MHTP apresenta atividade anti-inflamatória por inibir a migração de leucócitos, principalmente as células polimorfonucleares para o tecido inflamado bem como por reduzir o exsudato proteico no modelo experimental de peritonite.
- O MHTP apresenta potencial para fármaco devido ao seu efeito anti-inflamatório na lesão pulmonar aguda inibindo a migração de leucócitos para o tecido pulmonar.

Portanto:

- O MHTP foi eficaz na redução de três dos cinco sinais cardinais da inflamação: *rubor* (vermelhidão), *calore* (temperatura) e *tumor* (edema) evidenciados pela redução da vasodilatação, formação de edema e migração de leucócitos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Sexta Edição. Rio de Janeiro. **Elsevier**, 2008.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Sétima Edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2011.

ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Med Hypotheses**. 68(1):202-9, 2007.

ALVAREZ, Y.; MUNICIO, C.; ALONSO, S. et al. Cyclooxygenase-2 induced by zymosan in human monocyte-derived dendritic cells shows high stability, and its expression is enhanced by atorvastatin. **J Pharmacol Exp Ther**. 329(3):987-94, 2009.

AMAT, M., ELIAS, V., LLOR, N. A General Methodology for the Enantioselective Synthesis of 1-Substituted Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. **Euro JOC**. 2010(21):4017 – 4026, 2010.

ANSARI, A. W., HEIKEN, H., MEYER-OLSON, D. et al. CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. **Eur J Immunol**. 41 (12): 3412-3418, 2011.

ASHLEY, N. T., WEIL, Z. M., NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annu Rev Ecol Systemat**. 43:385–406, 2012.

AWUAH, E., CAPRETTA A. Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **Org. Chem**. 75 (16): 5627–5634, 2010.

BARREIRO, O., MARTIN, P., GONZALEZ-AMARO, R. et al. Molecular cues guiding inflammatory responses. **Cardiovasc Res**. 86(2):174-82, 2010.

BARTON, B. E., JACKSON, J. V. Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. **Infect. Immunol**. 61(4): 1496–1499., 1993.

BEZERRA-SANTOS, C.R., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOSA-FILHO J.M., et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int Immunopharmacol**. 6:1152-60, 2006.

BHADRA, K., & KUMAR, G. S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. **Med Res Rev**. 31(6):821-62, 2011.

BHATTACHARYYA, S., DUDEJA, P. K., TOBACMAN J. K., Carrageenan-induced NF κ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **Biochim Biophys Acta**. 1780(0): 973–982, 2008.

- BHATTACHARYYA, S., RAVINDER, G., CHEN, M.L. et al. Toll-like Receptor 4 Mediates Induction of Bcl10-NF κ B-IL-8 Inflammatory Pathway by Carrageenan in Human Intestinal Epithelial Cells. **J Biol Chem.** 283(16): 10550–10558, 2008.
- BORK, K. Angioedema. **Immunol Allergy Clin North Am.** 34(1):23-31, 2014.
- BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO H.C., SILVA, A. R., et al. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. **Eur J Pharmacol.** 270(2-3):143-9, 1994.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Patho.** 214(2):149-60, 2008.
- BROOKS, P.M., DAY, R.O. Non-steroidal anti-inflammatory drugs differences and similarities. **N Engl J Med.** 324(24):1716-25, 1991.
- BRYANT, C. E., SPRING, D. R., GANGLOFF, M., GAY, N. J. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. **Nat Rev Microbiol.** 8(1):8-14, 2010.
- BUSNARDO, T.C., PADOANI, C., MORA, T.C., et al. Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice. **J Ethnopharmacol.** 28(2):519-25, 2010.
- CALLERA, G., TOSTES, R., SAVOIA, C., et al. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. **Expert Rev Cardiovasc Ther.** 5(3):531-52, 2007.
- CAVALCANTI DA SILVA, E. **Expressão diferenciada de genes de *Leishmania chagasi* em presença de warifteína : uma abordagem genômica.** 2004. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- CHEN, Y., YAO, Y., SUMI, Y., et al. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. **Sci Signal.** 3(125): ra45, 2010.
- CHENG, P., HUANG, N., JIANG, Z.Y., et al. 1-Aryl-tetrahydroisoquinoline analogs as active anti-HIV agents in vitro. **Bioorg Med Chem Lett.** 18(7):2475-8, 2008.
- CLARDY, J., WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature.** 432(7019):829-37, 2004.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clin Exp Immunol** 129(1):4-10, 2002.
- CORDEIRO, M. B. **Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012.
- CÔRTEZ, S.F.; ALENCAR, J.L.; THOMAS, G.; BARBOSA FILHO, J.M. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. **Phytoterapy Research.** 9 (8):579-583, 1995.

- COUTINHO, A.E., CHAPMAN, K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol.** 335(1):2-13, 2011.
- DA SILVA, M.D., GUGINSKI, G., WERNER, M.F., et al. Involvement of Interleukin-10 in the Anti-Inflammatory Effect of Sanyinjiao (SP6) Acupuncture in a Mouse Model of Peritonitis. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2011:217946, 2011.
- 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.** 211(1):81-6, 1992.
- DE FREITAS, M.R., CORTES, S.F., THOMAS, G., BARBOSA-FILHO, J.M. Modification of Ca²⁺ metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **J Pharm Pharmacol.** 48 (3):332-6, 1996.
- DE SOUZA, E.T., DE LIRA, D.P., DE QUEIROZ, A.C. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Mar Drugs.** 7(4):689-704, 2009.
- DE VASCONCELOS, D.I., LEITE, J.A., CARNEIRO, L.T., PIUVEZAM, M.R. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Ouabain in Mice. **Mediators Inflamm.** 2011:912925, 2011.
- DESHMANE, S.L., KREMLEV, S., AMINI, S., SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **J Interferon Cytokine Res.** 29(6):313-26, 2009.
- DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochim Biophys Acta.** 1083(2):121-34, 1991.
- DEY, I., LEJEUNE, M., CHADEE, K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **Br J Pharmacol.** 149(6): 611–623, 2006.
- EDER, C. Mechanisms of interleukin-1beta release. **Immunobiology,** 214(7):543-53, 2009.
- EKWALL, B., SILANO, V., PAGANUZZI-STAMMATI, A., ZUCCO, F. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures - Short-Term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects. **John Wiley & Sons Ltd. P,** 1990.
- EL ALWANI, M., WU, B. X., OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol Ther.** 112(1):171-83, 2006.
- ENOS, R.T., DAVIS, J.M., MCCLELLAN, J.L., MURPHY, E.A. Indomethacin in Combination with Exercise Leads to Muscle and Brain Inflammation in Mice. **J Interferon Cytokine Res.** ;33(8):446-51, 2013.
- EVANS, W. C. Trease and Evans Pharmacognosy. Décima-sexta Edição. Reino Unido. Saunders, Elsevier, 2009.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J Immunol.** 176(7):3877-83, 2006.

FERRARI, M., FORNASIERO, M.C., ISETTA, A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. **J Immunol Methods.** 7;131(2):165-72, 1990.

FERREIRA COSTA H., BEZERRA-SANTOS C.R. , Barbosa Filho J.M. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **Int Immunopharmacol.** 8, 519–525, 2008.

FERREIRA COSTA, H. **Investigação do efeito anti-inflamatório dos alcaloides warifteina e metil-warifteina de cissampelos sympodialis eichl. (menispermaceae) em modelos de inflamação aguda e crônica.** Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2013.

FERREIRA COSTA, H. **Warifteína, alcaloide bisbenzylisoquinolínico, inibe o edema e a hiperalgesia em modelo experimental de alergia.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2007.

FIELDING, C. A., MCLOUGHLIN, R. M., MCLEOD, L., et al. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. **J Immunol.** 181(3):2189-95.

FIGARELLA-BRANGER, D., CIVATTE, M., BARTOLI, C. et al. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle Nerve.** 28(6):659-82, 2003.

FUJIHARA, M., MUROI, M., TANAMOTO, K. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacol Ther.** 100(2):171-94, 2003.

FUJIWARA, N., KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** 4(3):281-6, 2005.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science** 294(5548):1871-5, 2001.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science.** 327(5966):656-61, 2010.

GHOSH, M.N., SINGH, H. Inhibitory effect of a pyrrolizidine alkaloid, crotalaburnine, on rat paw oedema and cotton pellet granuloma. **Br J Pharmacol.** 51(4):503-8, 1974.

GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** 3(5):401-16, 2004.

GODSON, C., MITCHELL, S., HARVEY, K., et al. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphagocytic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. **J Immunol.** 164(4):1663-7, 2000.

- GOMEZ-MUÑOZ, A.; GANGOITI, P.; ARANA, L.; et al. New insights on the role of ceramide 1-phosphate in inflammation. **Biochim Biophys Acta**. 1831(6):1060-6, 2013.
- GORINSKY, C., LUSCOMBE, D.K., NICHOLLS, P.J. Neuromuscular blocking and local anesthetic activities of warifteine hydrochloride, an alkaloid isolated from *Cissampelos ovalifolia*. **J Pharm Pharmacol**. 24:147-88, 1972.
- GOYAL, M., GHOSH, M., NAGORI, B.P., SASMAL, D. Analgesic and anti-inflammatory studies of cyclopeptide alkaloid fraction of leaves of *Zizyphus nummularia*. **Saudi J Biol Sci**. 20(4):365-71, 2013.
- GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**. 126(1):131-8, 1982.
- GROENEVELD, A. B. J. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Vascul Pharmacol**. 39(4-5):247-56, 2003.
- GUERRA, A.S., MALTA, D.J., LARANJEIRA, L.P., et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole–imidazolidine derivatives. **Int Immunopharmacol**. 11(11):1816-22, 2011.
- GUO, Y., MOCHIZUKI, T., MORII, E. et al. Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: A microdialysis study. **Eur J Pharmacol**. 331(2-3):237-43, 1997.
- HANDY, R. L., MOORE, P. K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and LNIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **Br J Pharmacol**. 123(6):1119-26, 1998.
- HAYDEN, M. S., GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, 132(3):344-62, 2008.
- HE, M., ZHANG, J. Evaluation of four commercial biuret reagent kits of serum total protein by the American Association for Clinical Chemistry reference measurement procedure. **Clin Chem Lab Med**. Vol. 6, p. 989-92, 2011.
- HE, M.; LAU, H. Y.; NG, S. W. et al. Chemokines in acute inflammation: regulation, function and therapeutic strategies. **International Journal of Integrative Biology**. 1(1):10, 2007.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J**. 374(Pt 1):1-20., 2003.
- HENRIQUES, M. G., SILVA, P. M., MARTINS, M. A. et al. Mouse paw oedema. A new model for inflammation. **Braz J Med Biol Res**. 20(2):243-9, 1987.
- HICKEY MJ, KUBES P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. **Nat Rev Immunol**. 9(5):364-75, 2009.

- IYER, S.S., GHAFARI, A.A., CHENG, G. Lipopolysaccharide-Mediated IL-10 Transcriptional Regulation Requires Sequential Induction of Type I IFNs and IL-27 in Macrophages. **J Immunol.** 185(11):6599-607, 2010.
- JANEWAY CA, JR., TRAVERS, P., WALPORT, M. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Quinta Edição. Nova York. **Garland Science**, 2001.
- JO, SH., HONG, H.K., CHONG, S.H., LEE, H.S., CHOE, H. H(1) antihistamine drug promethazine directly blocks hERG K(+) channel. **Pharmacol Res.** 60(5):429-437, 2009.
- JUTEL, M., AKDIS, M., AKDIS, C.A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clin Exp Allergy.** 39(12):1786-800, 2009.
- KANG, Y.J., LEE, B.K., LEE, Y.S., et al. Suppression of tumor necrosis factor-alpha and inducible nitric oxide synthase gene expression by THI 52, a new synthetic naphthyl-benzylisoquinoline alkaloid. **Biochem Pharmacol.** 65(3):457-64, 2003.
- KASAMA, T., MIWA, Y., ISOZAKI, T. et al. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** 4(3):273-9, 2005.
- KHAJAH, M.; MILLEN, B., CARA, D. C. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. **J Leukoc Biol.** 89(6):945-53, 2011.
- KIM, H. A.; PARK, J. H.; LEE, S.; CHOI, J.S.; RHIM, T.; LEE, M. Combined delivery of dexamethasone and plasmid DNA in an animal model of LPS-induced acute lung injury. **Journal of Controlled Release** (2011);
- KLUNE, J. R., DHUPAR, R., CARDINAL, J., et al. HMGB1: endogenous danger signaling. **Molecular Medicine**, 14(7-8): 476–484, 2008.
- KOLACZKOWSKA, E., KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol.** 13(3):159-75, 2013.
- KRISHNAMOORTHY, S., HONN, K. V. Inflammation and disease progression. **Can Metast Rev.** 25:481–491, 2006.
- KROHN, R.I. The colorimetric detection and quantitation of total protein. **Curr Protoc Cell Biol.** Appendix 3:3H, 2011.
- KUHR, F., LOWRY, J., ZHANG, Y., et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. **Neuropeptides.** 44(2):145-54, 2010.
- KULKARNI, O., EULBERG, D., SELVE, N. et al. Anti-Ccl2 Spiegelmer permits 75% dose reduction of cyclophosphamide to control diffuse proliferative lupus nephritis and pneumonitis in MRL-Fas(lpr) mice. **J Pharmacol Exp Ther.** 328(2):371-7, 2009.
- KUMAR, P., SHEN, Q., PIVETTI, C. D., et al. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. **Expert Rev Mol Med.** 11:e19, 2009.

KUMAR, S., JACK, R. Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. **J Endotoxin Res.** 12(5):278-84, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. Inflamação aguda e crônica. (eds.) Robbins e Conran. **Patologia – bases patológicas das doenças.** Oitava Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 43-77. 2010.

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

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacol Pharmacy.** 4 (3):17-31, 2013.

LARSEN, J. M., BONEFELD, C. M., POULSEN, S. S. et al. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. **J Allergy Clin Immunol.** 123(2):486-92, 2009.

LEIKAUF, G. D., MCDOWELL, S. A., WESSELKAMPER, S. C., et al. Acute Lung Injury: Functional Genomics and Genetic Susceptibility. **Chest.** 121(3 Suppl):70S-75S, 2002.

LEITE, J. A. **Atividade imunomoduladora da ouabaína no processo inflamatório.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Lif sci.** 8 (11): 601-6, 1969.

LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol.** 7(9):678-89, 2007.

LIAO, J.C., TSAI, J.C., PENG, W.H., et al. Anti-Inflammatory Activity of *N*-(3-Florophenyl)ethylcaffeamide in Mice. **Int. J. Mol. Sci.**, 14(8):15199-211, 2013.

LOH, T.P., LEONG, S.M., SETHI, S.K. High concentration of IgM- κ paraprotein causes over-estimation of serum total protein by certain biuret method. **Clin Chem Lab Med.** 51(9):e205-7, 2013.

LORAM, L.C., FULLER, A., FICK, F.G., et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **J Pain.** 8(2):127-36, 2007.

LU, Y., YEH, W., OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine.** 42(2):145-51, 2008.

MACMICKING, J., XIE, Q.W., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol.** 15:323-50, 1997.

MAJNO, G. The Healing Hand - Man and wound in the ancient world. **Med Hist.** 20(4): 461, 1975.

MAJNO, G., JORIS, I. Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. Segunda Edição. Nova York. **Oxford Univ. Press.** 2004.

MALECH, H.L., GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **N Engl J Med.** 317(11):687-94, 1987.

MARCINKIEWICZ E., CHŁOPICKI, S., MARCINKIEWICZ, J. Nitric oxide- a pro-inflammatory and anti-inflammatory mediator. **Centr Eur J Immunol.** 28(2): 74–78, 2003.

MATUTE-BELLO, G., FREVERT, C. W., MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 295(3):L379-99, 2008.

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. **Eur J Pharmacol.** 285(2):109-14, 1995.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell.** 19;140(6):771-6, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature.** (454) 428-435, 2008.

MINOR, D. L., WYRICK, S. D., CHARIFSON, P. S. et al. Synthesis and Molecular Modeling of 1-Phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and Related 5,6,8,9 Tetrahydro-13bH-dibenzo[a,h]quinolizines as D1 Dopamine Antagonists. **J. Med. Chem.** 37 (25): 4317–4328, 1994.

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. **Int Immunol.** 23(11):701-12, 2011.

MORRIS, M., LI, L. Molecular Mechanisms and Pathological Consequences of Endotoxin Tolerance and Priming. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 60(1):13-8, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** 65(1-2):55-63, 1983.

MUNCHHOF, M. J., MEYERS, A. I. A Novel Route to Chiral, Nonracemic 1-Alkyl- and 1-Aryl-Substituted Tetrahydroisoquinolines. Synthesis of (-)-Salsolidine and (+)-Cryptostyline II. **J. Org. Chem.** 60 (22): 7086–7087, 1995.

NAIK, S.R., SHETH, U.K. Inflammatory process and screening methods for anti-inflammatory agents- a review. **J Postgrad Med.** 22(1):5-21, 1976.

NAKAMURA, K., TSUCHIYA, S., SUGIMOTO, Y. et al. Histamine release inhibition activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. **Planta Med.** 58(6):505-8, 1992.

NAOI, K.; KOGURE, S.; SAITO, M. et al. Differential effects of selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors on anorexic response and prostaglandin generation in various tissues induced by zymosan. **Biol Pharm Bull.** 29(7):1319-24, 2006.

- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol.** 6(3):173-82, 2006.
- NATHAN, C., DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell.** 140(6):871-82, 2010.
- NECAS, J., BARTOSIKOVA, L Carrageenan: a review. **Vet Med.** 58 (4): 187–205, 2013.
- NIEMAND, C., NIMMESGERN, A., HAAN, S., et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling 3. **J Immunol.** 170(6):3263-72, 2003.
- NILE, S.H., PARK, S.W. Optimized Methods for In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Assays and Its Applications in Herbal and Synthetic Drug Analysis. **Mini Rev Med Chem.** 13(1):95-100, 2013.
- NIU, X., HU, H., LI, W. et al. Protective effect of total alkaloids on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Surg Res.** 189(1):126-34, 2014.
- OJIMA, I. Mini-Perspective: Modern Natural Products Chemistry and Drug Discovery. **J Med Chem.** 51(9): 2587–2588, 2008.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev.** 87(1):315-424, 2007.
- PADMANABHAN, J., GONZALEZ, A. L. The Effects of Extracellular Matrix Proteins on Neutrophil-Endothelial Interaction — A Roadway To Multiple Therapeutic Opportunities. **Yale J Biol Med.** 85(2):167-85, 2012.
- PAIVA FERREIRA, L. K. L. (Trabalho de conclusão de graduação- Farmácia). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.
- PECCHI, E., DALLAPORTA, M., JEAN, A. et al. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiol Behav.** 97(3-4):279-92, 2009.
- PEREIRA, R. L., IBRAHIM, T., LUCCHETTI, L. et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology.** 43(1):31-7, 1999.
- PETRI, B., PHILLIPSON, M., KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an *in vivo* perspective. **J. Immunol.** 180(10):6439-46., 2008.
- PHANSE, M. A., PATIL, M. J.; ABBULU, K., et al. In-vivo and in-vitro screening of medicinal plants for their anti-inflammatory activity: an overview. **J Appl Pharmac Sci.** 2 (6): 19-33, 2012.
- PHILLIPSON, M., KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med.** 17(11):1381-90, 2011.

- PINHEIRO, M.M., FERNANDES, S.B., FINGOLO, C.E, et al. Anti-inflammatory activity of ethanol extract and fractions from *Couroupita guianensis* Aublet leaves. **J Ethnopharmacol.** 146(1):324-30, 2013.
- PINTO, G. C. (Trabalho de conclusão de graduação- Instituto de Química). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, 2011.
- POBER, J.S., SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol.** 7(10):803-15, 2007.
- PORTH, C. M. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. Terceira Edição. Philadelphia. **Lippincott Williams & Wilkins**, 2010.
- 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. **Br J Pharmacol.** 142(2):331-8, 2004.
- PUELLMANN, K., KAMINSKI, W. E., VOGEL, M. et al. A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103(39):14441-6, 2006.
- RAGHAVENDRAN, K., PRYHUBER, G. S., CHESS, P. R., et al. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Curr Med Chem.** 15(19):1911-24, 2008.
- RAHNAMA, I.M.S., VAN KERREBROECK, P.E.V., DE WACHTER, S.G., VAN KOEVERINGE, G.A. The role of prostanoids in urinary bladder physiology. **Nat Rev Urol.** 9(5):283-90, 2012.
- RAMESH, G., MACLEAN, A.G., PHILIPP, M.T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators Inflamm.** 2013:480739, 2013.
- RATHEESH, M., SHYNI, G.L, SINDHU, G., HELEN, A. Protective effects of isolated polyphenolic and alkaloid fractions of *Ruta graveolens* L. on acute and chronic models of inflammation. **Inflammation.** 33(1):18-24, 2010.
- REILLY, T. P., BELLEVUE, F.H. 3RD, WOSTER, P. M., SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol.** 55(6):803-10, 1998.
- REIS, E.F., CASTRO, S.B., ALVES, C.C., et al. Lipophilic amino alcohols reduces carrageenan-induced paw edema and anti-OVA DTH in BALB/c mice. **Int Immunopharmacol.** 17(3):727-32, 2013.
- REMPPIS, A., BEA, F., GRETEN, H.J., et al. Rhizoma coptidis Inhibits LPS-Induced MCP-1/CCL2 Production in Murine Macrophages via an AP-1 and NF B-Dependent Pathway. **Mediators Inflamm.** 2010:194896, 2010.
- REN, K., TORRES. R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. **Brain Res Rev.** 60(1):57-64, 2009.

- RIBEIRO, R. A., SOUZA-FILHO, M.V., SOUZA, M.H., et al. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int Arch Allergy Immunol.** 112(1):27-35, 1997.
- ROBERTS, M. F., WINK, M. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Nova York. **Plenum Press**, 1998.
- ROCHA, J. D. B., D. DECOTÉ-RICARDO, REDNER, P. et al., Inhibitory effect of the alkaloid warifteína purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Planta Med**, 76 (4):325–330, 2010.
- RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.** 21(1):61-5, 2010.
- SALVEMINI, D., WANG, Z.Q., WYATT, P.S., et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol.** 118(4):829-38, 1996.
- SANTOS, R. A. N. **Efeitos do Extrato da Folhas de Cissampelos Sympodilis Eichl. e do Alcaloide Warifteína sobre a Leishmaniose Cutânea em Modelos Experimentais.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.
- SARAIVA, M, O’GARR, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol.** 10(3):170-81, 2010.
- SAVILL, J. S., HENSON, P. M., HASLETT, C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. **J Clin Invest.** 84(5): 1518–1527, 1989.
- SCHIMMER, B.P., PARKER, K.L. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Décima Edição. Rio de Janeiro: **Mc Graw Hill**, 2003.
- SCHLACHETZKI, J. C.; FIEBICH, B. L.; HAAKE, E. et al. Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE₂ in primary rat microglia. **J Neuroinflammation.**7:2, 2010.
- SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng.** 8:93-131, 2006.
- SCHMIDT, S., MOSER, M., SPERANDIO, M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. **Mol Immunol.** 55(1):49-58, 2013.
- SCOTT, A., KHAN, K., COOK, J., DURONIO, V. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? **Br J Sports Med.** 38(3): 248–249., 2004
- SEPIASHVILI, R.I., BALMASOVA, I.P., STAURINA, L.N. Serotonin and its immune and physiological effects. **Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova.** 99(1):17-32, 2013.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol.** 25:101-37, 2007.

SERHAN, C.N., BRAIN, S.D., BUCKLEY, C.D., et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J.** 21(2):325-32, 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol.** 18(3):385-405, 2004.

SILLIMAN, C. C., VOELKEL, N. F., ALLARD, J. D., et al. Plasma and Lipids from Stored Packed Red Blood Cells Cause Acute Lung Injury in an Animal Model. **J Clin Invest.** 101(7): 1458–1467, 1998.

SILVA, V.G., SILVA, R.O., DAMASCENO, S.R. et al. Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Epiisopiloturine, an Imidazole Alkaloid Isolated from *Pilocarpus microphyllus* Valdele. **J Nat Prod.** 276(6):1071-7, 2013.

SMUDA, C., WECHSLER, J.B., BRYCE, P.J. TLR-induced activation of neutrophils promotes histamine production via a PI3 kinase dependent mechanism. **Immunol Lett.** 141(1):102-8. 2011.

SMYTH, E. M., GROSSER, T., WANG, M. et al. Prostanoids in health and disease. **J Lipid Res.** 50 Suppl:S423-8, 2009.

SOEHNLEIN, O., LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.** 10(6):427-39, 2010.

SOLOMON, L. M., JUHLIN, L., KIRSCHENBAUM, M. B. Prostaglandin on cutaneous vasculature. **J Invest Dermatol.** 51(4):280-2, 1968.

SOUSA, L. P., LOPES, F., SILVA, D. M. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **J Leukoc Biol.** 87(5):895-904, 2010.

STÖCKIGT, J., ANTONCHICK, A. P., WU, F., WALDMANN, H. The Pictet-Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. **Angew Chem Int Ed Engl.** 50(37):8538-64, 2011.

SUDHAKARAN, P. R., RADHIKA, A., JACOB, S. S. Monocyte macrophage differentiation in vitro: Fibronectin-dependent upregulation of certain macrophage-specific activities. **Glycoconj J.** 24(1):49-55, 2007.

SUDIPTA DAS, HALDAR, K. P., PRAMANIK, G. SURESH, R.B. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Clerodendron infortunatum* Linn. Extract in Rats. **Glob J Pharmacol.** 4 (1): 48-50, 2010, 2010.

SUGIMOTO, Y., NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J Biol Chem.** 282(16):11613-7, 2007.

- SUNDD, P., POSPIESZALSKA, M. K., CHEUNG, L. S. et al. Biomechanics of leukocyte rolling. **Biorheology**. 48(1):1-35, 2011.
- TAMADDONFARD, E., FARSHID, A. A., HOSSEINI, L. Crocin alleviates the local paw edema induced by histamine in rats **Avic J Phytomed**. 2(2): 97-104, 2012.
- TATEMOTO, K.; NOZAKI, Y.; TSUDA R. et al. Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 349(4):1322-8, 2006.
- TSOYI, K., KIM, H.J., SHIN J.S., et al. HO-1 and JAK2/STAT-1 signals are involved in preferential inhibition of iNOS over COX-2 gene expression by newly synthesized tetrahydroisoquinoline alkaloid, CKD712, in cells activated with lipopolysaccharide. **Cell Signal**. 20 (2008): 1839–1847, 2008.
- VAN FURTH, R. Monocyte production during inflammation. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 8(2):205-11, 1985.
- 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 xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J Pharmacol Exp Ther**. 278(1):304-12, 1996.
- WEBER, C., FRAEMOHS, L., DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. **Nat Rev Immunol**. 7(6):467-77, 2007.
- WEISSMANN, G., KORCHAK, H. Rheumatoid arthritis. The role of neutrophil activation. **Inflammation**, 8 Suppl:S3-14, 1984.
- WERMUTH, C. G. Selective optimization of side activities: Another way for drug discovery. **J Med Chem**. 47(6):1303-14, 2004.
- WHEELER, A. P., BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **Lancet**. 369(9572):1553-64, 2007.
- WILLIAMS, K. I., HIGGS, G. A. Eicosanoids and inflammation. **J Pathol**. 156(2):101-10, 1988.
- WILLIAMS, M. R., AZCUTIA, V., NEWTON, G., et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunol**. 32(10):461-9, 2011.
- WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nat Rev Immunol**. 6(2):93-106, 2006.
- WITKAMP, R., MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **Vet Q**. 22(1):11-6, 2000.
- YAKUGAKU Z. et al. [Roles of histamine in the pathogenesis of bronchial asthma and reevaluation of the clinical usefulness of antihistamines]. **Pharmac soc Japan**. 131(2):185-91, 2011.

YONEKAWA, K., HARLAN, J. M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. **The J Leukoc Biol.** 77(2):129-40, 2005.

YUAN, S. Y. Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability. **Microcirculation.** 7(6 Pt 1):395-403, 2000.

ZAID, H., RAIYN, J., NASSER, A. et al. Physicochemical Properties of Natural Based Products versus Synthetic Chemicals. **Open Nutraceuticals J.** 3, 194-202 , 2010.

ZAKARIA, Z. A., PATAHUDDIN, H., MOHAMAD, A. S. et al. In vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of Piper sarmentosum. **J Ethnopharmacology.** 128(1):42-8, 2010.

ZHANG, B., LIU, ZY., LI, YY. et al. Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice. **Eur J Pharm Sci.** 44(5):573-9, 2011.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 26 de junho de 2013.

CEUA N° 0205/13

Ilmo(a). Prof^ª. Dr^ª. Márcia Regina Piuvezam
Departamento Fisiologia e Patologia - CCS - UFPB

Orientando(a): **Maria Talita Pacheco de Oliveira, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **25/06/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Estudo do efeito anti-inflamatório da fração alcoólica das folhas de Cissampelos sympodialis Eichl (Menispermaceae) na lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos Swiss.**

Com previsão de empregar **300 Camundongos SWISS Fêmeas;**
ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **20/05/13 a 01/08/14**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB