

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA –
PPGFAR**

Eduarda Talita Bramorski Mohr

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS DAMNACANTHAL E
RUBIADIN-1-METIL, UTILIZANDO MODELOS
EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Florianópolis
2019**

Eduarda Talita Bramorski Mohr

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DOS COMPOSTOS DAMNACANTHAL E
RUBIADIN-1-METIL ÉTER, UTILIZANDO MODELOS
EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco.

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mohr, Eduarda Talita Bramorski Mohr

Avaliação pré-clínica da atividade anti-inflamatória dos compostos Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter, utilizando modelos experimentais in vivo e in vitro / Eduarda Talita Bramorski Mohr; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2019.

94 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui bibliografia

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Efeito anti-inflamatório 4. Antraquinona 5. Lesão aguda pulmonar. I. Dalmarco, Eduardc Monguilhott. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

“Avaliação pré-clínica da atividade anti-inflamatória dos compostos Damnacanthal e Rubiadin-1-metil-éter, utilizando modelos experimentais in vitro e in vivo”

POR

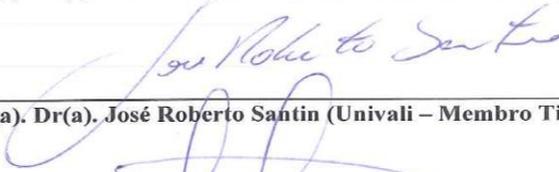
Eduarda Talita Bramorski Mohr

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

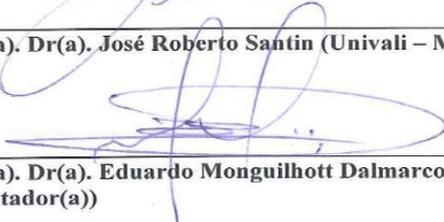
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Flávio Reginatto (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). José Roberto Santin (Univali – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC – Orientador(a))



Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2019.

*Dedico este trabalho aos
meus pais, Raquel e Valdir, pelo
incentivo e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu mentor e anjo da guarda por toda a vida e caminhada.

Aos meus pais Valdir Mohr e Raquel Amélia Bramorski Mohr, pelo companheirismo e paciência ao longa de toda a minha vida.

À minha avó Maria Alice Pasold Alves Bramorski, pelo amor e incentivo.

Agradeço à minha família e amigos, em especial à minha madrinha (Mônica Maria Bramorski) e ao meu amigo, Diego Freiner pela caminhada desde a graduação.

Aos professores Iara Fabricia Kretzer e Alessandro Conrado de Oliveira Silveira, pelo apoio e ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim.

Meu muito obrigada a todos os alunos e companheiros de caminhada do LAPI (Laboratório de Pesquisa em Imunologia), em especial aos colegas Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento e Júlia Salvan da Rosa.

À CAPES, pelo apoio financeiro, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia por todo o suporte.

*“Na vida, o que possuímos de
verdade é aquilo que doamos”.*
(Pai João de Aruanda)

RESUMO

Plantas da família *Rubiaceae* são empregadas largamente na medicina tradicional, principalmente no continente africano, sendo são utilizadas no tratamento de infecções, alívio de cólicas abdominais, parasitoses, disenteria, gonorreia, sífilis, hepatite B, e como antídoto para picada de cobras. A *Pentas schimperi* se destaca por exibir altas concentrações de antraquinonas como o Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter em sua composição. Estudos anteriores apontam que estes compostos, apresentam ação antimicrobiana, antimalárica, analgésica e também anti-inflamatória. Neste contexto, nosso objetivo foi avaliar a ação anti-inflamatória dos compostos Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter utilizando modelo experimental *in vitro* e *in vivo*. O modelo de triagem *in vitro* utilizou macrófagos de camundongos murinos RAW 264.7, para primeiramente determinar a citotoxicidade dos compostos. Em seguida, com as CC₁₀ obtidas, foi verificada a capacidade inibitória dos mesmos sobre a produção de óxido nítrico (NO_x). Desta forma o composto que apresentou efeito sobre este mediador inflamatório foi submetido a etapa seguinte, onde foi verificada sua capacidade em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α). Nesta etapa, utilizamos os compostos na sua dosagem correspondente a CC₁₀. Os resultados demonstraram que apenas o composto Rubiadin-1-metil éter foi capaz de reduzir de forma significativa a produção de óxido nítrico (NO_x) e também as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β , com exceção ao TNF- α . Dando sequência aos experimentos, o composto Rubiadin-1-metil-éter foi submetido a comprovação da atividade anti-inflamatória através de experimentação *in vivo* pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) intranasal em camundongos. Nestes experimentos o lavado bronco alveolar (BALF) foi coletado após 12 horas da indução do modelo experimental e o tratamento dos animais com Rubiadin-1-metil éter administrado por via oral (*v.o.*) nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, foi realizado 1 h antes da indução do modelo experimental. O BALF coletado foi utilizado para a avaliação o efeito do composto sobre a produção de diversos marcadores inflamatórios, como migração leucocitária total e diferencial, exsudação, atividade da mieloperoxidase (MPO), produção de NO_x e citocinas (IL-6, TNF- α , IL-12p70, IL-10, MCP-1 e IFN- γ). Nossos resultados revelaram que o Rubiadin-1-metil éter foi capaz de diminuir a atividade da MPO, a exsudação, a contagem total e diferencial de leucócitos e NO_x, além de exercer efeitos inibitórios significativos na produção de

citocinas pró-inflamatórias, sendo elas: IL-6, TNF- α , IL-12p70, MCP-1 e IFN- γ . Já a citocina IL-10 apresentou aumento significativo em sua produção, com o tratamento dos animais com o composto em estudo. Desta forma, os resultados demonstraram que o composto Rubiadin-1-metil éter possui importante efeito anti-inflamatório por ser capaz de inibir vários mediadores e enzimas pró-inflamatórios, e ainda aumentar significativamente a produção de um mediador com característica anti-inflamatória (IL-10). Esses resultados sugerem que o composto Rubiadin-1-metil éter pode ser um potencial candidato ao desenvolvimento futuro de um fármaco para tratar doenças de caráter inflamatório, onde os mediadores estudados possuam papel de destaque.

Palavras-Chave: Inflamação, *Pentastemonis schimperi*, *Damnacanthal*, Rubiadin-1-metil éter, *in vitro*, *in vivo*, lesão aguda pulmonar, macrófagos RAW 264.7

ABSTRACT

Plants of the *Rubiaceae* family are used extensively in traditional medicine, mainly in the African continent, being used in the infections treatment, relief of abdominal cramps, parasitoses, dysentery, gonorrhea, syphilis, hepatitis B, and also as antidote for snake bite. *Pentas schimperi* is known for exhibiting high concentrations of anthraquinones like the Damnacanthal and Rubiadin-1-methyl ether in its composition. Previous studies indicate that these compounds present antimicrobial, antimalarial, analgesic and also anti-inflammatory action. In this context our objective was to evaluate the anti-inflammatory activity of Damnacanthal and Rubiadin-1-methyl ether using an experimental models *in vitro* and *in vivo*. The *in vitro* screening model was used RAW 264.7 murine mouse macrophages to first determinate the cytotoxicity of the compounds. Then with the obtained CC₁₀ the inhibitory capacity of the compounds on the nitric oxide (NO_x) production was verified. In this way the compound that shown an effect on the NO_x production was submitted to evaluation of its capacity to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β and TNF- α). The results shown that only the compound Rubiadin-1-methyl ether was able to significantly reduce the production of nitric oxide (NO_x), and also the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β , with the exception of TNF- α . Following the experiments, the compound Rubiadin-1-methyl ether was tested for anti-inflammatory activity by *in vivo* experimentation using intranasal administration of lipopolysaccharide (LPS) in mice. In these experiments alveolar bronchial lavage (BALF) was collected after 12 hours of induction of the experimental model and the treatment of animals with oral doses of 3 mg/kg, 10 mg/kg and 30 mg/kg, was performed 1 h prior to LPS induction. The BALF collected was used to evaluate the effect of the compound on the production of several inflammatory markers such as: total and differential leukocyte migration, exudation, myeloperoxidase activity (MPO) and production of NO_x and cytokines (IL-6, TNF- α , IL-12p70, IL-10, MCP-1 and IFN- γ). Our results showed that Rubiadin-1-methyl ether was able to decrease MPO activity, exudation, total and differential leukocyte counts and Nox levels and also exert significant inhibitory effects on the production of pro-inflammatory cytokines: IL-6, TNF- α , IL-12p70, MCP-1 and IFN- γ . The IL-10 cytokine showed a significant increase in its production. Thus, the results demonstrated that the compound Rubiadin-1-methyl ether has an important anti-

inflammatory effect with a possible immunomodulatory profile, inhibiting several pro-inflammatory mediators and significantly increasing the production of an anti-inflammatory mediator (IL -10). These results suggest that the compound Rubiadin-1-methyl ether may be a potential candidate for the future development of a drug to treat inflammatory diseases where the mediators studied play a highlight role.

Keywords: Inflammation, *Pentas schimperi*, *Damnacanthal*, Rubiadin-1-methyl ether, in vitro, in vivo, acute lung injury, macrophages RAW 264.7

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pentas schimperi como produtora de antraquinonas, dentre elas Damnacanthal e Rubiadin 1-metil éter.....	32
Figura 2 - Formação de EROs pela enzima MPO.....	37
Figura 3 - Principais efeitos durante a liberação das diferentes isoformas de NO no organismo humano.....	38
Figura 4 - Estrutura química do Damnacanthal e Rubiadin 1-metil éter.....	47
Figura 5 - Produção de NO decorrente da isoformas iNOS e sua posterior redução pela reação de Griess.....	50
Figura 6 - Esquema do tratamento utilizando modelo de lesão aguda pulmonar (ALI) induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em camundongos.....	53
Figura 7 - Representação da intensidade de cada fluorescência relacionada com cada citocina pesquisada.....	57
Figura 8 - Viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7.....	60
Figura 9 - Dosagem dos metabólitos do NO em macrófagos de camundongos RAW 264.7.....	62
Figura 10 - Quantificação de IL-6 em macrófagos RAW 264.7....	63
Figura 11 - Quantificação de IL-1 β em macrófagos RAW 264.7.....	64
Figura 12 - Quantificação de TNF- α em macrófagos RAW 264.7.....	65
Figura 13 - Contagem total e diferencial de leucócitos.....	67
Figura 14 - Determinação da exsudação através da quantificação de proteínas.....	68
Figura 15 - Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) e das concentrações de Nitrito e Nitrato (NOx).....	69
Figura 16 - Quantificação das citocinas IL-6 e IL-12p70.....	70
Figura 17 - Quantificação das citocinas INF- γ e MCP-1.....	71
Figura 18 - Quantificação de TNF- α	72
Figura 19 - Quantificação de IL-10.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de citotoxicidade determinados.....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LO: 5-lipoxigenase

12-LO: 12-lipoxigenase

15-LO: 15-lipoxigenase

ALI: lesão pulmonar aguda

ANOVA: análise de variância

ARDS: síndrome da angustia respiratória aguda

BALF: lavado bronco alveolar

CBA: *Cytometric Bead Array*

CC₁₀: concentração mínima para matar 10%

CC₅₀: concentração mínima para matar 50%

CCL2: proteína quimiotática de monócitos 2

Cl⁻: ânion cloreto

Células Th: células *T helper* (Th-1, Th-2, Th-17)

Células NK: células *natural killers*

CEUA: comitê de ética no uso de animais

COBEA: colegiado brasileiro de experimentação animal

COX: cicloxigenase

COX 2: cicloxigenase 2

DCs: células dendríticas

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetil sulfoxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HOCl: ácido hipocloroso
HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamonio
IFN- γ : interferon gama
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
IL-10R1: receptor de interleucina 10, subunidade 1
IL-10R2: receptor de interleucina 10, subunidade 2
IL: Interleucinas (IL-1, IL-1 β , IL-4 IL-6, IL-8, IL-12, IL-13 IL-12p70, IL-23, IL-27, IL-35, IL-p35)
i.p.: via intra peritoneal
LPS: lipopolissacarídeo
JNK: cinase c-Jun N-terminal
MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógenos
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1MEF-2: fator otimizador de miócitos 2
MHC-II: complexo principal de histocompatibilidade 2
MMP9: matriz metaloproteinase 9
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
MPO: mieloperoxidase
MyD88: fator de resposta primária de diferenciação mieloide 88
NADPH: adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B: fator de transcrição nuclear kappa B
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO₂: nitrito
NO₃⁻: nitrato
NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NOx: metabólitos do óxido nítrico

•O₂⁻: ânion superóxido

O₂: oxigênio molecular

•OH: radical hidroxila

p65: subunidade (p65) do fator nuclear NF-κB

PAMPS: padrões moleculares associados a patógenos

PGE2: prostaglandina E2

PLA2: enzima fosfolipase A2

PRRS: receptores de reconhecimento padrão

RAW 264.7: Linhagem celular murina

SOD: superóxido dismutase

TGF-β: fator de crescimento transformante beta

TLR: receptores tipo Toll-like

TLR-4: receptores tipo Toll-like 4

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

TNFR1: receptor 1 de TNF-α

TNFR2: receptor 2 de TNF-α

v.o.: via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. Produtos naturais.....	29
1.2. Antraquinonas.....	31
1.3. Processo inflamatório.....	33
1.4. Macrófagos.....	34
1.5. Neutrófilos.....	35
1.6. Mieloperoxidase.....	36
1.7. Óxido nítrico.....	37
1.8. Citocinas.....	38
1.8.1. Interleucinas	38
1.8.2. TNF- α	40
1.8.3. Interferon- γ	40
1.8.4. MCP-1	41
1.9. Modelo <i>in vitro</i> para triagem de atividade anti-inflamatória, utilizando macrófagos de camundongos (Raw 264.7).....	42
1.10. Modelo experimental de Lesão aguda pulmonar induzida por LPS (ALD).....	42
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
2.2.1. <i>In vitro</i>	45
2.2.2. <i>In vivo</i>	45
3. METODOLOGIA.....	47
3.1. Compostos naturais.....	47
3.2. <i>In vitro</i>	48
3.2.1. Cultura de macrófagos RAW 264.7	48
3.2.2. Determinação da viabilidade prévia com azul de Tripan.....	48
3.2.3. Viabilidade celular (citotoxicidade)	49
3.2.4. Dosagem de metabólitos do óxido nítrico	49

3.2.5. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α).....	50
3.3. <i>In vivo</i>	51
3.3.1. Animais.....	51
3.3.2. Modelo de lesão aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS e obtenção do lavado bronco-alveolar.....	51
3.3.3. Anestesia e eutanásia dos animais.....	53
3.3.4. Contagem total de diferencial de leucócitos.....	54
3.3.5. Determinação da exsudação.....	54
3.3.6. Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	55
3.3.7. Determinação das concentrações de nitrito e nitrato (NOx).....	55
3.3.8. Quantificação das citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ , e TNF- α).....	56
3.4. Análise estatística.....	57
3.4.1. <i>In vitro</i>	57
3.4.2. <i>In vivo</i>	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1. <i>In vitro</i>	59
4.1.1. Viabilidade celular (citotoxicidade).....	59
4.1.2. Dosagem dos metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	61
4.1.3. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α):.....	62
4.2. <i>In vivo</i>	65
4.2.1. Contagem total e diferencial de leucócitos.....	66
4.2.2. Determinação da exsudação.....	67
4.2.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e das concentrações de Nitrito e Nitrato (NOx).....	68
4.2.4. Quantificação de citocinas envolvidas no processo inflamatório (IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ , e TNF- α):.....	69

5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

Os primeiros registros sobre o uso e aplicação de plantas medicinais datam de 2600 a.C. e remetem a um sofisticado sistema medicinal na Mesopotâmia, compreendendo mais de 1000 plantas e medicamentos derivados. A medicina utilizada no antigo Egito ficou preservada no papiro de Ebers (1550 a.C.) com um catálogo de mais de 700 remédios naturais, principalmente de origem vegetal. O conhecimento sobre a aplicação medicinal no ocidente baseia-se principalmente na cultura grega e romana com as obras e compêndios escritos pelo médico grego Dioscórides (século I d.C.), e pelos romanos Plínio (século I d.C.) e Galeno (século II d.C.). Durante todo esse tempo as plantas foram utilizadas de maneira empírica, sem conhecimento de seus mecanismos de ação ou sobre suas reais atividades farmacológicas. O início do uso racional dos fármacos começou no século 19 com a descoberta e isolamento do agente analgésico e indutor do sono proveniente do ópio e denominado morfina (ATANASOV et al., 2015). A maioria das plantas datadas desta época são empregadas até hoje para o tratamento de doenças parasitárias, inflamatórias e diversas outras comorbidades (NEWMAN, CRAGG, 2016).

Nos últimos anos o mercado mundial de Fitoterápicos apresentou um lucro de aproximadamente US\$ 60 bilhões para a indústria farmacêutica, com taxas de crescimento anual entre 5-15%, representando uma parcela significativa deste mercado. Os produtos naturais tem sido amplamente utilizados como medicamentos, produtos dietéticos e suplementos nutricionais. Esses mesmos produtos são ricos em bioativos e servem como base para a criação de moléculas sintéticas e semi-sintéticas. Cerca de 50% dos fármacos comercializados atualmente foram baseados em moléculas e estruturas naturais e além disso, o uso de plantas medicinais ainda é essencial para países e comunidades subdesenvolvidas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 70% da população ainda utiliza produtos e derivados naturais no tratamento de doenças primárias (DAVID, WOLFENDER, DIAS, 2015).

O Brasil é o país com maior biodiversidade de fauna e flora do mundo. Este fato juntamente com a grande influência étnica de diversos povos colonizadores, fez com que o povo brasileiro se tornasse um ávido consumidor de produtos naturais e fitoterápicos. Apesar desta

abundante biodiversidade e do grande interesse da população no uso da medicina tradicional, o mercado brasileiro de fitoterápicos representa menos de 5% do mercado de medicamentos mundiais provenientes do Brasil, com uma participação de cerca de \$ 28 bilhões em 2014 – e mesmo com esta pequena parcela a área de produtos naturais chama a atenção dos pesquisadores. Nos últimos 25 anos o número de estudos pré-clínicos realizados por pesquisadores relacionando efeitos anti-inflamatórios e plantas medicinais imunomoduladoras, cresceu surpreendentemente quando comparado a pouca representação de estudos de fase clínica (DUTRA et al., 2016).

A urgência por novos tratamentos para câncer, HIV e outras doenças infecciosas demanda uma vigorosa exploração para a descoberta de novos fármacos. Neste contexto, está claro que a natureza foi e, ainda é, de vital importância neste processo de reinvenção e melhoramento de fármacos. Entre 1981 e 2014 as maiores áreas investigadas dentro da indústria farmacêutica, em termos de novos medicamentos aprovados, mantiveram-se em torno das doenças infecciosas, anticancerígenos, anti-hipertensivos, antidiabéticos e anti-inflamatórios – com mais de 50 novos fármacos aprovados. Neste mesmo período, 51 novos compostos anti-inflamatórios foram descobertos, sendo que 13 destes são derivados de produtos naturais. Os mesmos autores afirmam que em um período de 29 anos, 34% dos novos medicamentos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) foram moléculas baseadas em produtos naturais ou derivadas diretamente dos mesmos (NEWMAN, CRAGG, 2016).

Existem várias categorias que surgem a partir de produtos naturais, sendo que estes podem ser classificados como material natural não modificado, dando origem a compostos isolados, compostos semi-sintéticos derivados ou estruturas sintéticas (PATRIDGE et al., 2015). Produtos derivados de plantas, bactérias e fungos são uma rica fonte para obtenção de medicamentos imunossupressores, antibióticos, quimioterápicos, anestésicos e anti-hiperlipêmicos. Essas moléculas derivam de um grande número de classes químicas, como policetídeos, peptídeos não ribossômicos, sacarídeos, alcaloides e terpenoides, que juntos representam uma grande diversidade de estruturas químicas (MEDEMA, FISCHBACH, 2015).

Dentro desse nicho de novas descobertas destacam-se a utilização de metabólitos secundários provenientes das mais diversas plantas. Cada família, gênero e espécie apresenta uma composição característica que pode ser utilizada na produção de medicamentos, aromas, drogas recreativas, corantes e óleos essenciais. Estes metabólitos podem ser

divididos de acordo com sua estrutura, sendo que os principais grupos de metabólitos utilizados na modelação e extração de novos fármacos são da classe dos terpenos, alcalóides, xantonas, flavonóides e quinonas (KABERA et al., 2014).

Já as quinonas são substâncias coloridas e semivoláteis, sendo subdivididas de acordo com a presença de um ou mais anéis aromáticos em benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas. Apresentam alto poder antioxidante, além de serem reativas para nucleófilos presente nas cadeias laterais de proteínas, tais como cisteína e lisina. Além disso, antraquinonas como a Mitoxantrona apresentam ação contra câncer de mama, leucemias e linfoma não-Hodgkin (BAELL, 2016). Emodin, outra antraquinona, encontrada no Ruibardo (*Rheum officinale* Baill), é caracterizada pela sua capacidade analgésica e anti-inflamatória (SOARES-BEZERRA et al., 2013).

1.2. Antraquinonas

Segundo o Dicionário de Produtos Naturais existem cerca de 200.000 metabólitos secundários provenientes de plantas previamente catalogadas. Entre esses metabólitos destacam-se as antraquinonas presentes em diversos gêneros de plantas como metabólitos majoritários (HARVEY, EDRADA-EBEL, QUINN, 2015).

Antraquinonas constituem uma importante classe de compostos sintéticos e naturais, com uma vasta e diversificada gama de atuações. Além da sua utilização como corantes apresentam uma alta diversidade farmacológica, possuindo ação laxativa, anti-inflamatória, anticancerígena, antiarrítmica, antibacteriana, antifúngica, antiviral e como um potente adjuvante no tratamento de malária e esclerose múltipla. Na clínica sua maior aplicação está relacionada a constipação [Sene (*Cássia angustifolia*), Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), Ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*) e *Aloe vera*], artrite (Diacereína) e no tratamento de leucemias e outros cânceres (Daunorrubicina, Doxorubicina, Epirrubicina, Idarrubicina) (MALIK, MULLER, 2016).

As antraquinonas são caracterizadas pela presença de três anéis aromáticos e planos, que contém duas cetonas na posição 9 e 10 localizadas no anel central da molécula. São comumente biosintetizadas como metabólitos secundários através da via do ácido clorismato/O-succinilbenzóico em todas as plantas pertencentes à família *Rubeaceae*. Dentre os 450 gêneros desta família, o gênero *Pentas* é conhecido por

possuir uma das maiores quantidades de antraquinonas e piranonaftoquinona. O uso desse gênero no tratamento da malária em países africanos, como o Quênia, é notadamente conhecido, sendo que suas propriedades antiplasmódicas são atribuídas à presença de antraquinonas em suas raízes (ENDALE et al., 2013).

O gênero *Pentas* apresenta 40 espécies distintas, sendo que a maioria é usada rotineiramente na medicina tradicional, especialmente no continente africano. Seu uso é variado, sendo empregado no tratamento de parasitoses, disenteria, gonorreia, sífilis, hepatite B, analgesia, cólicas abdominais e como antídoto para picada de cobras. A *Pentas schimperi* é um arbusto ou erva que pode chegar aos 3 metros de altura, possui hastes horizontais de cor escura e folhas peludas. Suas inflorescências são ramificadas, com tonalidades que variam da cor branco para a cor rosa. (SWEELAM et al., 2018). Quando isoladas, as antraquinonas presentes nesta planta apresentam comprovadas ações anticancerígenas, antimicrobianas, antimaláricas e anti-inflamatórias. Além disso, também demonstram possuir efeito hipotensivo e analgésico. Dentre os metabólitos produzidos, destacam-se dois compostos: Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter (KUETE et al., 2015).

Figura 1 - *Pentas schimperi* como produtora de antraquinonas, dentre elas Damnacanthal e Rubiadin 1-metil éter

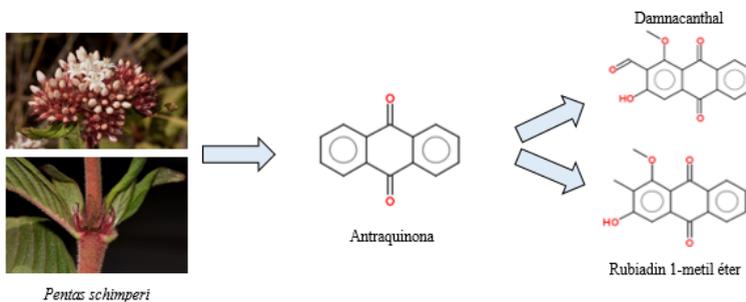


Figura 1 - *Pentas schimperi* é conhecida por apresentar grandes quantidades de antraquinonas. Dentre as antraquinonas produzidas encontram-se o Damnacanthal e Rubiadin 1-metil éter que se diferenciam pela presença de uma cetona. FONTE: Elaborada pela autora.

Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter são facilmente isoladas de plantas da família *Rubiaceae*. Damnacanthal é conhecida por apresentar ação antitumoral e anti-inflamatória, regulando a expressão de NF- κ B, iNOS e COX-2. Apresenta ainda, efeito apoptótico em diversas linhagens de células tumorais (ABU et al., 2014). Rubiadin 1-metil éter, apresenta ação antifúngica contra *Candida tropicalis* (MARIONI et al., 2016) e ação anti-inflamatória, demonstrando capacidade de diminuir a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos de camundongos (KUETE et al., 2015).

1.3. Processo inflamatório

A inflamação é uma resposta protetora contra diversos fatores que desequilibram a homeostasia do hospedeiro. Seu curso normal protege os tecidos contra infecções, estresse tecidual e injúrias diversas. Os sinais modulatórios deste processo incluem produção de citocinas, quemocinas e eicosanóides que induzem uma miríade de acontecimentos biológicos. (KOTAS, MEDZIHITOV, 2015).

Células da imunidade inata, presentes nos tecidos, como macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células dendríticas, assim como leucócitos circulantes (principalmente neutrófilos e monócitos) tem a capacidade de reconhecer os patógenos e agentes causadores do dano tecidual, servindo como percussores e responsáveis pela modulação do processo inflamatório (NEWTON, DIXIT, 2012). Os eventos celulares que precedem a resposta inflamatória são caracterizados pelo aumento do fluxo sanguíneo, dilatação dos vasos, infiltrado leucocitário e produção de mediadores pró-inflamatórios. A resolução inadequada deste processo gera quadros de inflamação crônica, dano tecidual irreversível e desregulação da capacidade cicatricial do órgão atingido (SUGIMOTO et al., 2016).

Vários mediadores inflamatórios produzidos durante este processo derivam da oxidação do ácido araquidônico pela enzima fosfolipase A2 (PLA2) e são classificados como eicosanóides. O ácido araquidônico regula propriedades físicas das membranas fosfolipídicas de células, mas quando é liberado como um ácido livre, passa a desempenhar um papel essencial durante a inflamação, servindo como precursor das vias biosintéticas que levam a produção dos eicosanóides. Esta é uma grande família de potentes hormônios representada principalmente pelos prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e

tromboxanos), sintetizados pela via da cicloxigenase (COX), leucotrienos, derivados da via 5-lipoxigenase (5-LO) e lipoxinas, originadas da interação entre 5-LO, lipoxigenase -12 (12-LO) e lipoxigenase -15 (15-LO) (CAPRA et al., 2015).

As prostaglandinas e os leucotrienos são produzidos rapidamente após o início da inflamação e promovem a indução precoce da vasodilatação e, conseqüentemente, do edema e recrutamento de leucócitos para locais afetados. Além disso, são responsáveis por quadros de broncoconstrição, alergia e febre. Os eicosanóides, juntamente com outros mediadores como as citocinas, são responsáveis pela formação dos sinais cardinais de inflamação, que incluem calor, rubor, inchaço, dor e perda de função (DENNIS, NORRIS, 2015).

Outra classe de mediadores inflamatórios, também é produzida durante o processo e são mediadores de natureza proteica, denominadas citocinas, como exemplo as interleucinas (IL-6, IL-1 β , IL-12), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ). São sintetizadas principalmente por macrófagos e mastócitos e ativam a migração leucocitária, aumentam a vasodilatação endotelial conduzindo o organismo a uma resposta inflamatória aguda (MEDZIHITOV, 2008). Além disso, as citocinas controlam a produção e a liberação de outros mediadores, como o óxido nítrico (NO) pela ação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (BOGDAN, 2015). Altas concentrações de NO tem ação citotóxica, causando lise e fragmentação do DNA (ácido desoxirribonucleico) celular. Concomitantemente, colabora para a vasodilatação, migração leucocitária e exsudação dos tecidos (SUKUMARAN et al., 2012).

1.4. Macrófagos

Uma das características predominantes durante o processo de inflamação são os infiltrados compostos por macrófagos, linfócitos e plasmócitos no local lesionado. Macrófagos são uma população heterogênea de fagócitos mononucleares, sendo as principais células envolvidas no processo de inflamação, com papel importante na progressão do dano tecidual e sua conseqüente deficiência funcional (ZHENG et al., 2013).

Os macrófagos podem ser classificados através de sua ação pró ou anti-inflamatória. Macrófagos M1 tem capacidade reparatória, defendendo o organismo contra diversos patógenos como bactérias,

protozoários e vírus. Alternativamente, macrófagos M2 possuem função anti-inflamatória e papel regulador no processo de cicatrização tecidual (MURRAY, WYNN, 2011). Estas células são as maiores produtoras de mediadores pró-inflamatórios durante o desencadeamento de processos autoimunes e durante doenças inflamatórias. Apresentam a capacidade de responder rapidamente aos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) que incluem Lipopolissacarídeos (LPS) liberados pela parede celular de bactérias Gram-negativas (HAMIDZADEH, 2017).

Um dos responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs são os receptores do tipo Toll (TLRs), pertencentes à família dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Sendo assim, macrófagos M1 ativados via TLRs passam a expressar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, além de iniciar a síntese de grandes quantidades de óxido nítrico (YANG et al., 2016). Dentro da família dos receptores do tipo Toll, encontram-se os TLR-4, principais responsáveis pelo reconhecimento das moléculas de LPS. Após distinguir este PAMP, os TLR-4 ativam diversas vias, incluindo MyD88 e membros da família IL-1, que culminam na migração do NF- κ B para o núcleo. Além disso, ocorre a ativação das MAPK e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (KAWAI, AKIRA, 2011).

1.5. Neutrófilos

Os neutrófilos constituem aproximadamente 40-60% da população de glóbulos brancos circulantes e se apresentam como a linha de defesa primária do organismo contra diversos patógenos como vírus, protozoários e bactérias. Quando a inflamação se instala os neutrófilos presentes na circulação, passam pelo endotélio, migrando para o tecido lesionado através de gradientes quimiotáticos. Quando chegam no foco da inflamação geram espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o processo de fagocitose e eliminação do patógeno. Entretanto, por serem altamente tóxicas, essas moléculas podem lesionar o tecido do hospedeiro quando existe uma ativação inapropriada e exacerbada dos neutrófilos. Além disso, são responsáveis por sintetizar e secretar citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β , TNF- α), quemocinas, leucotrienos e prostaglandinas (PGE2) (WRIGHT et al., 2010).

Três tipos de grânulos são formados consecutivamente durante a maturação dos neutrófilos, sendo preenchidos com proteínas pró-

inflamatórias: grânulos primários (azurófilos), contendo Mieloperoxidase (MPO); grânulos secundários (específicos), ricos em lactoferrina; e grânulos terciários (gelatinase), que carregam matriz metaloproteinase 9 (MMP9) (KOLACZKOWSKA, KUBES, 2013). Devido ao seu papel de recrutamento celular e de manutenção do processo inflamatório, os neutrófilos estão presentes nas mais diversas patologias, destacando-se em doenças degenerativas com artrite reumatóides, enfermidades do trato respiratório, nos quadros de lesão aguda pulmonar (ALI) e síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) (GROMMES, SOEHNLEIN, 2011).

1.6. Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima muito conhecida dentro do processo inflamatório. É liberada por células da resposta inata e possui alta atividade pró-inflamatória e pró-oxidativa. Fica armazenada dentro dos grânulos primários (azurófilos) de células polimorfonucleares, principalmente de neutrófilos e, em menor concentração, no interior de macrófagos (DATO, GRAZIANI, BIASUCCI, 2008).

Pertence ao grupo das Heme peroxidases, apresentando papel essencial na resposta inflamatória ao catalisar e produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), que estão intimamente envolvidas na morte de patógenos (bactérias). Sendo assim, a MPO apresenta a capacidade de catalisar peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), oxidando ânions cloreto (Cl^-) em ácido hipocloroso (HOCl). Tal processo ocorre durante a fagocitose e está relacionado com a ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase (NADPH), uma vez que esse é responsável por produzir superóxido (O_2^-) que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (VANHAMME et al., 2018).

Figura 2 - Formação de EROs pela enzima MPO

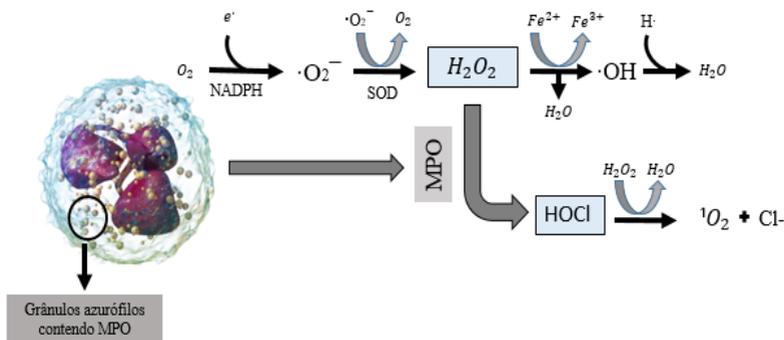


Figura 2 - As enzimas responsáveis pela geração de H_2O_2 são a NADPH oxidase e a SOD. O produto gerado é substrato para a MPO que age convertendo H_2O_2 em HOCl onde, Cl^- : cloreto; e^- : elétron; H^+ : hídrion; H_2O : água; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; MPO: mieloperoxidase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; $\bullet O_2^-$: ânion superóxido; O_2 : oxigênio molecular; $\bullet OH$: radical hidroxila; SOD: superóxido dismutase. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de WINTERBOURN, KETTLE (2013).

1.7. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical gasoso altamente reativo ao oxigênio, tendo papel fundamental na regulação do tônus muscular, agregação plaquetária, neurotransmissão e vasodilatação (GARCIA-ORTIZ, SERRADOR, 2017). É produzido pela ação de enzimas, em especial no processo inflamatório, pela ação da iNOS (óxido nítrico sintase induzida). Sua produção é intracelular e ocorre pela oxidação de L-arginina, resultando em NO e L-citrulina. São conhecidas três isoformas de enzimas conversoras: Endotelial e neuronal NOS (eNOS e nNOS) são constitutivas e dependentes de Ca^{2+} . A iNOS é considerada induzível e independente de Ca^{2+} . A enzima iNOS é expressa em grandes quantidades em resposta a estímulos pró-inflamatórios (PRADHAN, 2018). A expressão de óxido nítrico induzível (iNOS) ocorre também em condições patológicas, sendo produzida de maneira rápida e contínua. Durante a inflamação a iNOS é considerada como uma enzima prejudicial, responsável por causar danos teciduais, formação de edemas e infiltrado celular (LIND et al., 2017).

Figura 3 - Principais efeitos durante a liberação das diferentes isoformas de NO no organismo humano

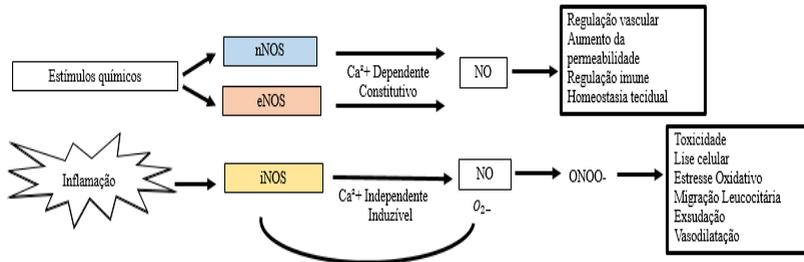


Figura 3 - Efeito da produção de diferentes isoformas de NO. FONTE: Elaborado pela autora, adaptado de LIND et. al (2017)

1.8. Citocinas

O processo inflamatório é controlado por reguladores extracelulares que incluem citocinas e quemocinas, que medeiam tanto o recrutamento de células para o tecido lesionado quanto os mecanismos complexos que controlam a sinalização intracelular que caracterizam a inflamação. Cada citocina liga-se a receptores específicos, gerando uma cascata de sinalizações que afetam e alteram a função celular. Isto inclui a regulação, tanto positiva quanto negativa, de diversos genes e seus fatores de transcrição. Dentre as citocinas envolvidas na deflagração e manutenção, bem como resolução do processo inflamatório, destacam-se as interleucinas: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o interferon gama (IFN- γ) e a proteína quimioatraente para monócitos 1 (MCP-1) (TURNER et al., 2014).

1.8.1. Interleucinas

Quando macrófagos ou demais células fagocíticas são expostas a estímulos inflamatórios, acabam liberando diversas citocinas pró-inflamatórias representadas em sua grande maioria, pela expressão das interleucinas IL-1 β e IL-6. A família das interleucinas 1 (IL-1) é

composta por 11 membros, incluindo a IL-1 β , uma das principais responsáveis pela instalação e manutenção de processos inflamatórios (DUQUE, DESCOTEAUX, 2014). A IL-1 β é uma citocina induzível e geralmente não é expressa em tecidos saudáveis. Sua produção é induzida nas células pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) tais como TLRs. A partir desse momento acumulam-se no citosol das células até que essas recebam um sinal específico para que ocorra sua liberação (BORTHWICK, 2016). Está relacionada a resistência antimicrobiana, em doenças autoimunes, infecciosas e degenerativas e aumenta a resposta das células Th17 (GARLANA, DINARELLO, MANTOVANI, 2013).

A interleucina 6 (IL-6) produzida em condições normais também ajuda na resposta a infecções e lesões teciduais, contribuindo para a defesa do hospedeiro durante a resposta inflamatória aguda. Embora sua produção seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a síntese contínua e desregulada de IL-6 exerce um efeito patológico durante processos de inflamações crônicas e de cunho autoimune (TANAKA, NARAZANI, KISHIMOTO, 2018). É uma citocina pleiotrópica, envolvida em inflamações crônicas, produção de anticorpos, permeabilidade vascular, regeneração tecidual e hematopoese. É produzida por células estromais, monócitos e linfócitos, tendo sua expressão aumentada na presença de IL-1 β , TNF- α e durante a estimulação de TLRs. Altos níveis dessa citocina são marcadores para artrite reumatóide, Lúpus eritematoso e esclerose múltipla. Contribui também para o desenvolvimento de respostas das células T CD4 pró-inflamatórias autorreativas, promovendo a linhagem e a função das células Th17 e inibindo a indução de células T reguladoras (JONES, MAERZ BUCKNER, 2018).

A família das IL-12 englobam 4 interleucinas (IL-12p70, IL-23, IL-27 e IL-35) que, embora sejam estruturalmente parecidas, desempenham papéis bem diferentes dentro do organismo. Estão presentes no processo de desenvolvimento da imunidade inata para a adaptativa e são importantes reguladores da resposta das células T. A IL-12 é constituída por duas subunidades (IL-12p35 e IL-12p40) que juntas dão origem a forma ativa desta citocina: IL-12p70, um potente modulador da resposta de células T *helper* tipo 1 (Th1) (THOMPSON, ORR, 2018). Sua expressão ocorre durante infecções, regulando a resposta da imunidade inata e determinando o tipo e duração da resposta adaptativa. Além disso, induz a produção de IFN- γ em células NK, macrófagos, células dendríticas e células T promove ainda, a

diferenciação de células *naive* CD4⁺ em células Th1 (WATFORD et al., 2003).

A IL-10, por sua vez, apresenta um papel totalmente diferente das demais citocinas mencionadas, pois exibe a capacidade de reduzir e finalizar o processo inflamatório. É expressa por diferentes tipos de células, que incluem macrófagos, células dendríticas e células T (Th1, Th2 e Th17), ligando-se a um receptor específico, composto por duas subunidades IL-10R1 e IL-10R2 (NI et al., 2015). São imunorreguladores durante infecções desencadeadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, produzindo efeito anti-inflamatório em diversos leucócitos inibindo, por exemplo, a produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias (MANZANILLO, EIDENSCHENK, OUYANG, 2015).

1.8.2. TNF- α

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é secretado, na sua grande maioria, por macrófagos ativados, mas pode ser liberado também por monócitos, linfócitos T, mastócitos, células *natural killer* e fibroblastos. É um potente mediador pró-inflamatório, desempenhando função central no desenvolvimento da resposta imune inata, na produção de demais citocinas e na ativação e expressão de moléculas de adesão. O TNF- α liga-se a dois receptores específicos: TNFR1 e TNFR2, sendo que o último é expresso predominantemente em células endoteliais e leucocitárias (TURNER et al., 2014).

Promove papel importante na inflamação via transcrição do fator nuclear kB (NF-kB), regulando sua migração para o núcleo intracelular e nos processos de apoptose celular. Sua participação no desenvolvimento de diversas patologias de ordem autoimune e inflamatória inclui artrite reumatóide, sepse, lupus, esclerose múltipla, psoríase, vasculite, câncer, diabetes tipo 1, inflamações intestinais e desordens respiratórias (BRENNER, BLASER, MAK, 2015).

1.8.3. Interferon- γ

O interferon- γ pertence à família II dos interferons sendo seu único representante e é essencial na regulação da resposta imune contra

infecções virais e intracelulares. Seus efeitos incluem imunomodulação e resposta pró-inflamatória. É liberado em grandes quantidades por células Th1, linfócitos T e células NK durante infecções ativas. Apresenta efeito importante na regulação da apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas. Ativa diretamente as células fagocitárias e estimula a liberação de EROs e enzimas degradativas, além de induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (ROFF, NOON-SONG, YAMAMOTO, 2014).

Apresenta-se como um potente ativador de macrófagos e induz a expressão de molécula do complexo principal de histocompatibilidade 2 (MHC II). Seus efeitos antivirais têm papel crucial contra bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* e protozoários como o *Toxoplasma gondii*. Demonstra ainda atividade antitumoral que é exercida diretamente nas células cancerígenas ou através da modulação de células dendríticas (DCs), células T e células NK (ROZMOZ, SVAJGER, 2018).

1.8.4. MCP-1

Monócitos são células versáteis que expressam múltiplos receptores, podendo alterar seu fenótipo funcional em resposta a estimulação ambiental. Após dano ou infecção tecidual são rapidamente recrutados para o tecido, onde podem se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas. Quando ativados trafegam seletivamente para os locais lesionados, produzindo citocinas pró-inflamatórias e contribuindo para a inflamação local e sistêmica. Possuem alta capacidade de infiltração e, quando diferenciados, removem PAMPs e restos celulares (YANG et al., 2014).

Quemocinas são classificadas como uma classe de citocinas de baixo peso molecular que controlam a migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos para o local da infecção, coordenando seu recrutamento durante a resposta imune. Proteínas de quimioatração de monócitos (MCP-1) são membros da subfamília CC e apresentam potente ação quimiotática para monócitos. Seu principal receptor denomina-se CCL2 e está presente em várias células, constitutivamente ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. A principal fonte de MCP-1 são monócitos e macrófagos e

sua atividade é controlada por IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 (YADAV, SAINI, ARORA, 2010).

1.9. Modelo *in vitro* para triagem de atividade anti-inflamatória, utilizando macrófagos de camundongos (Raw 264.7)

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi isolada em 1978, sendo estabelecida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson em camundongos da espécie BAB/14 (RASCHKE et al., 1978). São aderentes e apresentam fácil propagação e multiplicação, sendo utilizadas em diversos modelos pró e anti-inflamatórios. Em modelos de estudo para doenças respiratórias as células RAW 264.7 foram consideradas eficientes na propagação do agente causador de pneumonia e para medir infecções correlacionando sua intensidade e a quantidade de mediadores pró-inflamatórios. Além disso, sua sensibilidade a interferência de RNA e a grande gama de receptores para diversos ligantes fazem desta linhagem um dos principais sistemas experimentais para estudo em larga escala de vias de sinalização (HARTLEY et al., 2008).

Estes macrófagos são frequentemente utilizados no processo de triagem e rastreamento de produtos naturais, ajudando na predição de sua bioatividade e para prever o seu potencial efeito em modelos *in vivo* ou em culturas de células primárias. A resposta e desempenho destes novos compostos a partir de modelos experimentais com células RAW 264.7 reflete seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e, conseqüentemente, seu teste em humanos (MERLY, SMITH, 2017).

Pelo conjunto de características e pela facilidade de manutenção destas células, escolhemos realizar a triagem da possível atividade anti-inflamatória dos compostos Damnacathal e Rubiadin-1-metil éter utilizando-se desta linhagem celular.

1.10. Modelo experimental de Lesão aguda pulmonar induzida por LPS (ALI)

A lesão pulmonar aguda (ALI) e sua forma mais grave, denominada síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), representa um quadro clínico de desenvolvimento e resolução complexa,

com tratamentos pouco específicos e alta taxa de mortalidade. É caracterizado pelo recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) para o pulmão, com subsequente aumento da permeabilidade vascular e edema alveolar, originando um quadro de hipóxia, com danos teciduais e inflamação generalizada (sepse) que culmina em falência múltipla dos órgãos. Diversos patógenos podem desencadear este quadro incluindo bactérias que liberam endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da parede celular de bactérias gram-negativas (WANG et al., 2014).

Modelos animais servem como ponte entre os pacientes e a bancada de laboratório. Hipóteses criadas ao longo de estudos em seres humanos podem ser testadas diretamente em modelos animais. Dentre estes modelos destacam-se os de lesão aguda pulmonar induzida por LPS, que apresentam sua relevância ao mimetizarem quadros clínicos de pneumonia e sepse, com pico de inflamação e edema pulmonar grave entre 24 a 48 horas após a indução, com um período auto limitante de 7 dias (SU et al., 2004). A instilação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos por receptores específicos (TLRs) e causam inflamação pulmonar reprodutível (ALTEMEIER, HUNG, MATUTE-BELLO 2017). Neste modelo o parênquima pulmonar é danificado pela liberação de proteases, pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos ativados e neutrófilos que migram para os compartimentos intersticiais e alveolares. Os resultados envolvem lesões microvasculares e dano alveolar difuso com hemorragia intrapulmonar, edema e deposição de fibrinas (RITTIRSCH et al., 2015).

Neste estudo utilizamos um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos administrado pela via intranasal, baseado nos protocolos descritos por ALTEMEIER, HUNG, MATUTE-BELLO (2017).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação anti-inflamatória dos compostos Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter provenientes da *Pentas schimperi*, utilizando modelo experimental *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. *In vitro*

- I) Realizar testes de citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos RAW 264.7;
- II) Avaliar o efeito dos compostos isolados sobre a produção dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) em macrófagos RAW 264.7;
- III) Avaliar o efeito dos compostos isolados na produção de citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1-beta (IL-1 β), em macrófagos RAW 264.7.

2.2.2. *In vivo*

- I) Avaliar o efeito dos compostos isolados sobre a migração leucocitária e exsudação, no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos;
- II) Investigar os efeitos dos compostos sobre a atividade da Mieloperoxidase (MPO), no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos;
- III) Avaliar o efeito dos compostos isolados sobre a produção dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos;

IV) Determinar os efeitos dos compostos sobre a produção das citocinas: IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ e TNF- α , no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos.

3. METODOLOGIA

3.1. Compostos naturais

Os compostos foram gentilmente cedidos pelo professor visitante do programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Dr. Louis P. Sandjo. Estes compostos foram extraídos e isolados a partir da raiz da planta *Pentas Schimperi*. Resumidamente, as raízes secas da planta foram utilizadas para extração com metanol a temperatura ambiente durante 72 horas para produzir um extrato bruto após filtração e evaporação a vácuo. Este extrato foi submetido a cromatografia em coluna para a separação dos compostos, segundo a metodologia descrita em detalhes por Kuete e colaboradores (2015) (KUETE et al., 2015).

Figura 4 - Estrutura química do Damnacanthal e Rubiadin 1-metil éter

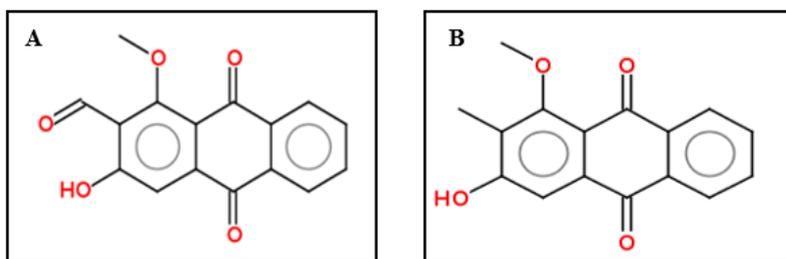


Figura 4 – Representação da estrutura química dos compostos estudados Damnacanthal (A) e Rubiadin-1-metil éter (B)

3.2. *In vitro*

3.2.1. Cultura de macrófagos RAW 264.7

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 utilizados foram cedidos gentilmente pela Professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As células utilizadas para os testes foram mantidas em estufa de CO₂ a 5% e com temperatura controlada de 37°C. O meio de escolha foi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com suplementação de Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e antibióticos a 1%. Todos os experimentos foram conduzidos entre a 3^a e 7^a passagem, com material devidamente esterilizado, em local apropriado e isento de microrganismos contaminantes.

3.2.2. Determinação da viabilidade prévia com azul de Tripan

Todos os experimentos foram conduzidos após verificação da viabilidade celular através da quantificação de células viáveis pela técnica de azul de Tripan. Esta, por sua vez, baseia-se na capacidade que o corante apresenta em atravessar o citoplasma de células mortas, corando-as de azul. Sendo assim, antes de cada experimento as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 mL de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada em um *ependorf*, onde foi acrescentado o azul de Tripan (1:2). Após homogeneização, 10 µL foram transferidos para uma câmara de Neubauer. Todas as células não coradas (viáveis) foram contadas nos 4 quadrantes com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400 vezes). O número obtido foi utilizado para realização dos plaqueamentos em placas de ELISA de 96 poços (5 x 10⁴).

3.2.3. Viabilidade celular (citotoxicidade)

Como primeiro teste os compostos em estudo passaram por um ensaio para avaliação de seu potencial de citotoxicidade, onde a viabilidade dos macrófagos foi mensurada após o tratamento dos mesmos com Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter. Foi utilizado o teste de MTT, composto amarelo que, ao entrar em contato com mitocôndrias ativas tem seu anel tetrazólico clivado, transformando-se em um composto de coloração azul escuro, denominado formazan. Sendo assim, este teste colorimétrico mensura a quantidade de células viáveis a partir da formação de cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983).

Utilizou-se uma placa de 96 poços com concentração estimada de 5×10^4 células/poço. Após o plaqueamento a mesma foi incubada durante 24 horas (temperatura 37°C e CO₂ a 5%) para a adesão e proliferação dos macrófagos. Posteriormente a incubação, cada poço foi tratado com as concentrações estipuladas para os compostos (1, 3, 10, 30, 100 e 300 µM). Seguindo-se a incubação de 24 horas, o sobrenadante foi descartado e substituído pela solução de MTT. Decorridas duas horas o MTT foi retirado e os cristais ressuspensos com DMSO para a leitura em 450 nm com auxílio de leitor de ELISA.

A partir deste teste foi possível determinar a CC₁₀ e a CC₅₀ de cada composto, ou seja, a dose mínima para matar 10% e 50% da linhagem de células utilizadas, e conseqüentemente manter uma viabilidade de 90% e 50%, respectivamente. Suas concentrações foram calculadas através de uma análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular).

3.2.4. Dosagem de metabólitos do óxido nítrico

A produção do NO foi mensurada indiretamente, sendo quantificada pela formação de seus metabólitos nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) através da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Os reagentes empregados na reação apresentam a capacidade de reduzir o nitrato a nitrito e, então, produzir um composto de tonalidade rósea que representa a soma de todos os metabólitos presentes na amostra

quantificada, através de comprimento de onda de 540 nm (DIRSCH et al., 1998).

Placas de 96 poços foram utilizadas com uma concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas por 24 horas. Posteriormente, os macrófagos foram pré-tratados com a CC₁₀ de cada composto e após uma espera de 30 minutos, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS (1 µg/mL) por um período de 24 horas. Os grupos foram divididos em branco (veículo), em controle negativo (LPS 1 µg/mL), em controle positivo (Dexametasona 7 µM) e em tratamento. Foram utilizados 50 µL de sobrenadante para a realização da dosagem dos metabólitos do NO.

Figura 5 - Produção de NO decorrente da isoformas iNOS e sua posterior redução pela reação de Griess

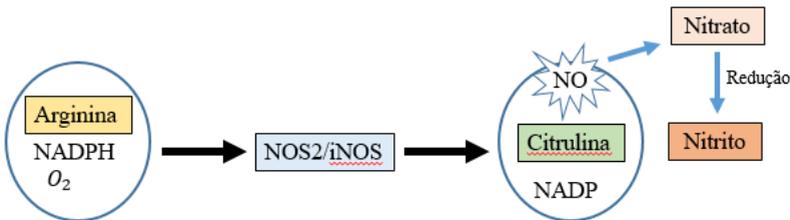


Figura 5 - Produção de NO decorrente da isoformas iNOS onde Arginina, na presença de NADPH e O₂ é convertida em Citulina e NO com posterior redução do nitrato em nitrito pela ação redutora dos reagentes de Griess. FONTE: Elaborado pela autora, adaptado de GUZIK, KORBUT, ADAMEK-GUKIK (2003)

3.2.5. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β e TNF-α)

Os macrófagos foram pré-tratados com a dose de CC₁₀ do melhor composto (Rubiadin-1-metil éter) por 30 minutos, seguido de indução por LPS (1 µg/mL). Após incubação por 24 horas o sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis das citocinas pesquisadas. Todas as citocinas foram mensuradas através de kits comerciais pelo método inmoenzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante. Nestes protocolos foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, sendo que suas concentrações foram estimadas através da interpolação da curva padrão de cada kit. Para o doseamento

de IL-6 e TNF- α os kits de escolha foram da Peprotech (Rocky Hill, Estados Unidos da América), enquanto que para IL-1 β utilizou-se um kit da BD Biosciences (San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América). As densidades ópticas foram determinadas em comprimento de onda de 450 nm e os resultados para cada citocina foram expressos em pg/mL.

3.3. *In vivo*

3.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos com aproximadamente 1 mês de idade e pesando cerca de 20-25g. Estes foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e acomodados no biotério setorial em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem, em condições de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclos claro/escuro de 12h) controladas. Além disso, receberam alimentação (ração) e água à vontade (*ad libitum*) em bebedouros e comedouros apropriados e trocados com frequência, durante todos os experimentos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo nº 6118110417 e os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.3.2. Modelo de lesão aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS e obtenção do lavado bronco-alveolar

Para executar esse modelo experimental (ALI) os animais foram divididos em grupos distintos, sendo eles: Salina (5% Tween 20 e 5% DMSO), Controle negativo (LPS 5 mg/kg), Controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Tratamento com os compostos (Damnacanthal e Rubiadin-1-metil éter) analisados nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg.

Nos dias dos experimentos os animais foram tratados via oral (gavagem) respeitando os grupos pré-definidos. Após 1 h os

camundongos foram anestesiados para a correta instilação de LPS via intranasal (5 mg/kg em 50 μ L de PBS). Os animais foram acompanhados de perto até sua recuperação por completo da anestesia. Após 12 h os camundongos sofreram eutanásia por *overdose* de Cetamina e Xilasina e foram preparados para a coleta do lavado bronco alveolar (BALF). O único grupo que não sofreu instilação com LPS foi o grupo Salina e cada grupo foi representado por seis animais (n=6).

Após a eutanásia os animais foram fixados em mesa cirúrgica, onde foi realizada uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Seu diafragma foi gentilmente aberto para que as costelas e clavícula fossem cortados com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Todo esse procedimento teve como intuito, expor a traqueia do animal e facilitar o processo de lavagem pulmonar realizado de maneira intratraqueal.

A lavagem dos pulmões foi procedida com o auxílio de uma cânula amarrada ao início da traqueia de cada animal, por onde foi introduzido 1 mL de solução salina com citrato (1%, p/v). O lavado bronco alveolar (BALF) coletado foi utilizado para a contagem total e diferencial de leucócitos, para a mensuração da exsudação, para a determinação da atividade da MPO e para as concentrações de NO e diversas citocinas inflamatórias.

Figura 6 - Esquema do tratamento utilizando modelo de lesão aguda pulmonar (ALI) induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em camundongos

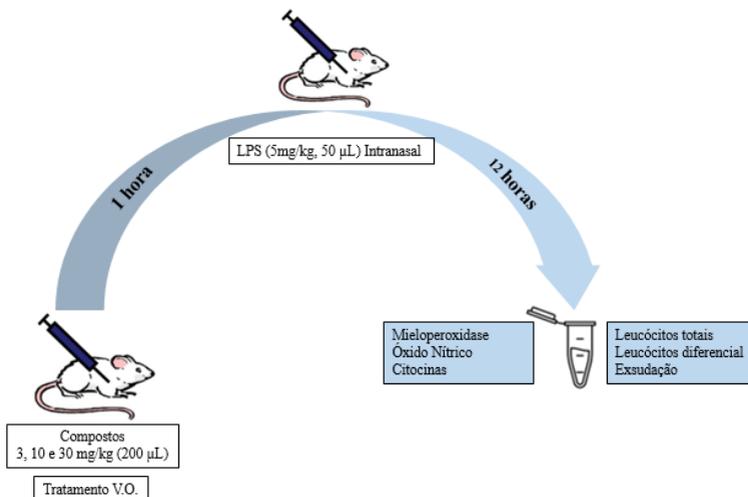


Figura 6 - Esquema simplificado do protocolo utilizado para a indução de lesão aguda pulmonar utilizando LPS. Os tratamentos com Rubiadin 1-metil éter ou Damnacanthal (doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg) e demais grupos (salina, controle positivo e negativo) foram realizados v.o. (via oral) com o auxílio de gavagem. Após 1 hora, os animais foram anestesiados para a instilação de LPS (via intranasal), com posterior espera de 12 horas para a realização da eutanásia indolor dos camundongos, visando a coleta do lavado bronco-alveolar (BALF), utilizado para a determinação de parâmetros pró- e anti-inflamatórios. FONTE: Elaborado pela autora.

3.3.3. Anestesia e eutanásia dos animais

Para o processo de anestesia dos camundongos durante a instilação de LPS utilizou-se cetamina (10 %) e xilasina (2 %) nas concentrações de 50 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente administradas por via intraperitoneal (i.p.).

A eutanásia foi realizada com os mesmos fármacos [cetamina (10 %) e xilasina (2%)] mas nas concentrações de 300 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente também administradas pela via intraperitoneal (i.p.).

3.3.4. Contagem total de diferencial de leucócitos

Logo após a eutanásia e a coleta do BALF alíquotas foram separadas para a contagem total de leucócitos. Para isso utilizou-se líquido de Türk (1:4) e a câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400 vezes) para a contagem dos 4 quadrantes da câmara.

Para a contagem diferencial foram realizados esfregaços celulares (50 μ L BALF) com o ajuda de uma citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA). As lâminas foram coradas com corante Panótico® (NewProv, Pinhais-PR, Brasil) com posterior contagem e identificação por microscópio óptico comum, com objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes) contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

3.3.5. Determinação da exsudação

A concentração de exsudato foi mensurada pela quantificação de proteínas presentes no BALF, partindo dos pressupostos da técnica descrita por LOWRY et al. (1951). Basicamente, o lavado foi centrifugado e uma alíquota de 5 μ L (diluída em 95 μ L de água destilada) foi utilizada para a detecção e quantificação de proteínas.

O princípio do método é baseado na adição de 100 μ L de reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na_2CO_3 - 10%, sulfato de cobre: CuSO_4 0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada) com uma breve incubação de 10 minutos, seguido pelo acréscimo de 50 μ L do reagente Folin. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos com posterior leitura em leitora de microplacas em comprimento de onda de 630 nm (Organon, Technica Roseland, New Jersey, EUA).

A primeira reação ocasiona a redução do íon cobre formando um complexo com as ligações peptídicas. A segunda reação envolve a redução do reagente Folin, causando uma mudança na coloração da solução para azul. Paralelamente, foi construída uma curva de calibração utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. Todos os

experimentos para exsudação, incluindo a curva, foram realizados em placas de ELISA de 96 poços.

3.3.6. Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da MPO foi realizada seguindo os procedimentos descritos por RAO et al. (1993). Brevemente após a coleta do BALF, 100 μ L de cada amostra foram tratadas com 100 μ L de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB 0,5%) e submetidas a 3 ciclos de *vórtex/freeze-thaw* com posterior centrifugação em centrífuga refrigerada (250 g por 5 min a 4 °C) (Sorvall™ ST 40, ThermoScientific®, Swedesboro, NJ, EUA). Partindo desta etapa 20 μ L deste sobrenadante foram transferidos para uma placa de ELISA de 96 poços.

A estas alíquotas de 20 μ L foram adicionados 180 μ L de meio de reação (0,167 mg/mL dihidroclorato de o-dianisidina 2 HCl e 0,0005 % H₂O₂). Em seguida as amostras foram incubadas por 15 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 15 μ L de azida (NaN₃ 1 %). A mensuração da quantidade de MPO presente foi realizada com auxílio de leitor de placa de ELISA (Organon Teknika, Roseland, Nova Jersey, EUA) com comprimento de onda ajustado em 450 nm. Uma curva-padrão foi utilizada (0,7 a 140 mU/mL) permitindo a quantificação dos valores desconhecidos. Os valores da MPO foram expressos em mU/mL, com o auxílio da equação da reta.

3.3.7. Determinação das concentrações de nitrito e nitrato (NO_x)

A quantidade de óxido nítrico (NO) presente em cada amostra foi mensurada pela presença de seus metabólitos nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻), seguindo a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Desta forma, utilizou-se 150 μ L de BALF para o processo de desproteinização, que foi realizado com a adição de 15 μ L de sulfato de zinco (ZnSO₄) a 20%, com posterior incubação *overnight* das amostras em *freezer* a -20°C. Após o descongelamento das alíquotas, foram adicionados 3 μ L de

hidróxido de sódio (2,5 N) com centrifugação de 15 minutos (2500 RPM). Como resultado desta primeira etapa obteve-se um sobrenadante límpido.

A seguir 100 μL destes sobrenadantes foram transferidos para placas de ELISA de 96 poços, com a adição de 100 μL de solução saturada de cloreto de vanádio III (VCl_3 , 0,8%) (p/v) e ácido clorídrico (HCl , 5%) (v/v) (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Após uma incubação de 20 minutos em temperatura ambiente, foram acrescentados mais 100 μL de solução de Griess [sulfonamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 1%), ácido fosfórico (H_3PO_4 , 5%) e N-(1-naftil) etilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, 0,1%)] e esta mistura foi incubada durante 40 minutos a 37°C . Esta reação origina uma coloração rósea, que foi mensurada através de um leitor de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) com comprimento de onda ajustado para 540 nm. Foi realizada uma curva-padrão com concentrações conhecidas de NO_2^- (0 -150 μM), permitindo a determinação dos valores de nitrito/nitrato (μM) a partir da equação da reta.

3.3.8. Quantificação das citocinas (IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ , e TNF- α)

Para esta etapa foram utilizadas alíquotas de BALF (Lavado Broncoalveolar) previamente coletadas dos camundongos nos dias dos experimentos e optou-se pelo uso de *Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse inflammation kit* (BD Biosciences, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América). Este sistema oferece um método de captura de um ou mais analitos solúveis, com tamanho e fluorescência conhecida, podendo ser utilizado em citometria de fluxo. A fluorescência varia de acordo com cada citocina marcada e pesquisada. Em nosso protocolo, uma alíquota de 50 μL de BALF foi utilizada para mensurar todas as citocinas desejadas, sendo elas: IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ e TNF- α .

Resumidamente, o kit apresenta seis *beads* (esferas marcadas) de populações diferentes com diferentes intensidades de fluorescência que estão marcados com anticorpos de captura específicos para cada citocina listada. Esses diferentes marcadores de população foram misturados revelando picos de ondas e intensidades específicos para cada citocina. A intensidade da fluorescência formada ao longo do processo de

conjugação da amostra com o anticorpo na forma sanduiche, revelará a concentração final de cada citocina pesquisada. Para a quantificação de cada uma das citocinas foi utilizado o software FCAP Array® (BD Biosciences, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América).

Figura 7 - Representação da intensidade de cada fluorescência relacionada com cada citocina pesquisada

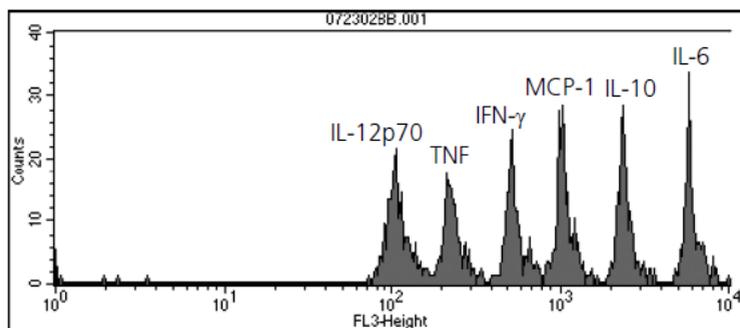


Figura 7 - Representação dos picos e diferentes intensidades da fluorescência relacionada com cada citocina, sendo elas IL-12p70 (Interleucina 12p70), TNF (Fator de necrose tumoral Alfa), IFN-γ (Interferon Gama), MCP-1 (Proteínas de quimioatração de monócitos), IL-10 (Interleucina 10) e IL-6 (Interleucina 6). FONTE: Manual de Instruções *Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse inflammation kit* (BD, Biosciences, San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América)

3.4. Análise estatística

3.4.1. *In vitro*

Todos os resultados dos experimentos *in vitro* foram analisados pelo programa GraphPad Prism®, versão 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA). As diferenças dos parâmetros analisados entre os grupos controles e grupos tratados foram realizados por meio da análise de variância ANOVA de uma via (*one-way* ANOVA) complementada pelo pós-teste de Tukey. Os resultados dos parâmetros foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m). As análises estatísticas com um *p* menor que 0,05 foram consideradas significativas.

3.4.2. *In vivo*

Os resultados dos experimentos *in vivo* foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®], versão 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA) e pelo IBM[®] SPSS[®] Statistics Base V22 (EUA). As diferenças dos parâmetros analisados entre os grupos controles e grupos tratados foram realizados por meio da análise de variância ANOVA de uma via (*one-way* ANOVA) complementada pelo pós-teste de Tukey. Para os resultados que apresentaram diferença significativa nas médias (Bartlett significativo) aplicou-se o pós-teste de Games-Howell. Os resultados dos parâmetros foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m), e p menor que 0,05 foi considerado sinal de diferença significativa.

4. RESULTADOS

4.1. *In vitro*

4.1.1. Viabilidade celular (citotoxicidade)

Para a determinação da viabilidade celular dos macrófagos de camundongos RAW 264.7 após tratamento com os compostos em estudo utilizou-se o teste colorimétrico com MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}. Os compostos foram avaliados nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μM e os experimentos foram realizados em triplicatas, com repetições em dias diferentes.

Analisando os resultados obtidos, podemos verificar que o composto Damnancanthal apresentou significativa toxicidade em macrófagos de camundongos a partir da dose de 3 μM , com uma maior redução da viabilidade celular entre as doses de 10 a 300 μM (% de redução de viabilidade: 3 μM : $16,2 \pm 2,3$; 10 μM : $64,4 \pm 3,1$; 30 μM : $45,6 \pm 0,3$; 100 μM : $39,8 \pm 0,3$; 300 μM : $48,2 \pm 3,6$) ($P < 0,05$) (Figura 8A). Já o Rubiadin-1-metil éter apresentou valores de maior segurança, com toxicidade significativa em concentrações consideradas altas. Tal característica foi evidenciada somente nas doses de 100 e 300 μM (% de redução da viabilidade: 100 μM : $64,5 \pm 0,3$; 300 μM : $54,2 \pm 2,3$ μM) ($P < 0,001$) (Figura 8B).

Figura 8 - Viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7

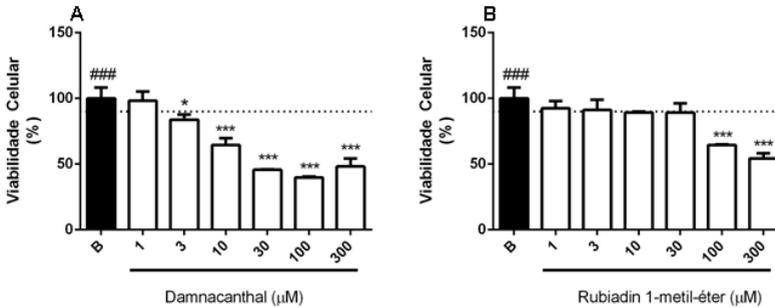


Figura 8 - Avaliação da viabilidade celular dos compostos nas doses de 1 a 300 µM frente a macrófagos RAW 264.7 através do ensaio colorimétrico de MTT. A) Damnacanthal e B) Rubiadin-1-metil éter. Cada barra representa a média de sobrevida dos macrófagos em experimentos independentes \pm erro padrão da média (n=3) ($P > 0,05$), onde * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e * $P < 0,001$.**

A partir da curva de viabilidade determinou-se a CC_{10} e CC_{50} de cada um dos compostos. Sabe-se que a CC_{10} representa a concentração mínima de cada composto necessária para causar a morte de 10% da população de células, garantindo uma viabilidade segura de 90%. O mesmo vale para a CC_{50} , onde a dose apresenta a capacidade de manter uma viabilidade de 50% das células submetidas ao tratamento com os compostos. Em modelos de inflamação onde o objetivo é manter uma viabilidade alta de células durante os experimentos, buscam-se compostos que apresentem baixa citotoxicidade.

Sendo assim, trabalhar com as doses correspondentes a CC_{10} de cada composto ajuda a minimizar os riscos que poderiam estar relacionados diretamente a citotoxicidade dos compostos, garantindo que as diminuições dos parâmetros inflamatórios ocorreram por efetiva ação dos compostos, e não por morte celular causada pela citotoxicidade do mesmo (CHAN et al., 2017).

Tabela 1- Valores de citotoxicidade determinados

Compostos	CC₁₀ (µM)	CC₅₀ (µM)
Damnacanthal	4,6	41
Rubiadin-1-metil éter	29	260

Tabela 1 - Valores calculados através de análise de regressão não linear, utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular). Realizados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

4.1.2. Dosagem dos metabólitos do óxido nítrico (NOx)

O doseamento de NOx foi realizada através dos reagentes de Griess, com comparação entre o controle negativo (LPS 1µg/mL) e positivo (Dexametasona 7 µM). Os experimentos foram conduzidos em quadruplicata e em dias diferentes. As doses de escolha para este teste e posteriores foram baseadas no valor da CC₁₀ de cada composto, sendo assim, utilizou-se as concentrações de 4,6 µM para o Damnacanthal e de 29 µM para o Rubiadin-1-metil éter.

Os dois compostos estudados e o fármaco utilizado como controle positivo demonstraram redução na produção de NOx. Entretanto, apenas o composto Rubiadin-1-metil éter e a Dexametasona apresentaram reduções consideradas significativas (% de inibição: Rubiadin-1-metil éter CC₁₀: 44,7±9,6, e Dexametasona 7 µM: 58,1±4,9) (P < 0,01) (Figura 9).

Figura 9 - Dosagem dos metabólitos do NO em macrófagos de camundongos RAW 264.7

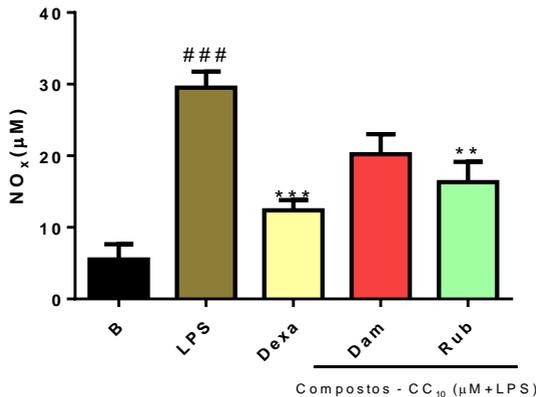


Figura 9 - Efeito dos compostos Damnacanthal (Dam) (4,6µM) e Rubiadin-1-metil éter (Rub) (29 µM) sobre os níveis de metabólitos de NO_x. Onde B (Branco) representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril), LPS representa células tratadas apenas com LPS (1µg/mL) e DMSO (1%) e Dexa representa o grupo pré-tratado com Dexamentasona (7 µM) e induzido após 30 minutos com LPS. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n = 4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.1.3. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β e TNF-α):

Levando-se em consideração que anteriormente apenas o Rubiadin-1-metil éter apresentou a capacidade de reduzir de forma significativa a produção de NO_x, somente este composto foi utilizado para avaliar a inibição das citocinas pró-inflamatórias estudadas (IL-6, IL-1β e TNF-α). Nestes experimentos a concentração de 29 µM indicada como CC₁₀ foi mantida.

A partir da avaliação destes parâmetros inflamatórios, o Rubiadin-1-metil éter e o fármaco de controle Dexametasona, demonstraram redução significativa na produção de IL-6 (% de inibição: Rubiadin-1-metil éter 29 µM: 52,1±3,2 e Dexametasona 7 µM: 59,7±5,4) ($P < 0,01$) (Figura 10).

Figura 10 - Quantificação de IL-6 em macrófagos RAW 264.7

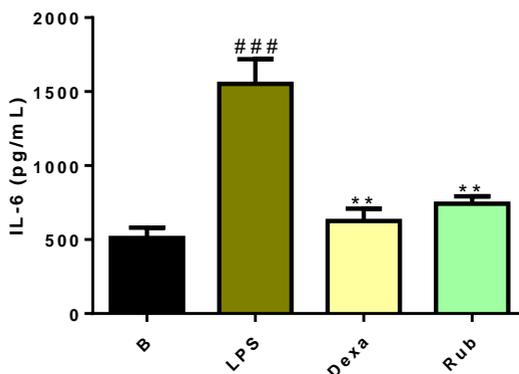


Figura 10 - Mensuração da inibição de IL-6, Onde B (Branco) representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril), LPS é o controle negativo (1 $\mu\text{g/mL}$) e Dexa representa o controle positivo (pré-tratado com Dexametasona, 7 μM com posterior indução com LPS após 30 minutos). Rub representa Rubiadin-1-metil éter com dose definida de 29 μM . Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; $n=6$; ### $P < 0,001$ (Branco vs. LPS); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

O mesmo perfil inibitório foi evidenciado sobre a citocina IL-1 β (% de inibição: Rubiadin-1-metil éter 29 μM : $78,01 \pm 4,13$ e Dexametasona 7 μM : $77,4 \pm 9,3$) ($P < 0,001$) (Figura 11).

Figura 11 - Quantificação de IL-1 β em macrófagos RAW 264.7

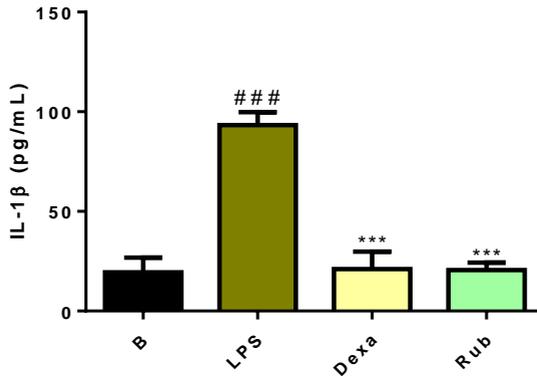


Figura 11 - Inibição de IL-1 β , Onde B (Branco) representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril), LPS é o controle negativo (1 μ g/mL) e Dexa representa o controle positivo (pré-tratado com Dexametasona, 7 μ M com posterior indução com LPS após 30 minutos). Rub representa Rubiadin-1-metil éter com dose definida de 29 μ M. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; n =6; ### $P < 0,001$ (Branco vs. LPS); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

A determinação dos níveis de TNF- α apresentou um perfil diferente, visto que o composto Rubiadin-1-metil éter não exibiu a capacidade inibitória esperada sobre esta citocina, de forma diferente ao observado pelo fármaco de controle Dexametasona (7 μ M) (% de inibição Dexametasona 7 μ M: 88,7 \pm 2,2) ($P < 0,001$) (Figura 12).

264.7 **Figura 12** - Quantificação de TNF- α em macrófagos RAW

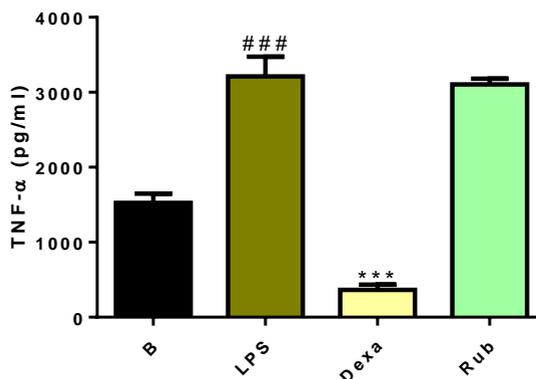


Figura 12 - Inibição de TNF- α . Onde B (Branco) representa células tratadas apenas com os veículos (DMSO e PBS estéril), LPS é o controle negativo (1 μ g/mL) e Dexa representa o controle positivo (pré-tratado com Dexametasona, 7 μ M com posterior indução com LPS após 30 minutos). Rub representa Rubiadin-1-metil éter com dose definida de 29 μ M. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; n =6; ### P < 0,001 (Branco vs. LPS); * P < 0,05; ** P < 0,01 e *** P < 0,001.

4.2. *In vivo*

Modelos animais são considerados os mais eficientes para mimetizar doenças humanas. Estes estudos são válidos para comprovar conceitos e resultados extraídos de culturas *in vitro*, tentando assim, comprovar sua veracidade em sistemas de vida complexos, como camundongos e ratos. A utilização de animais deve seguir um princípio lógico, passando pelas etapas de substituição e refinamento para assim, reduzir o número de animais utilizados em cada experimento (MATUTE-BELLO, FREVERT, MARTIN, 2008).

Durante a nossa experimentação *in vitro*, o Rubiadin-1-metil éter apresentou-se como um composto menos citotóxico em comparação ao Damnacanthal, com capacidade de inibir a grande maioria dos parâmetros inflamatórios analisados. Desta forma, a continuidade dos experimentos *in vivo* foram conduzidos apenas com ele, nas doses pré-definidas de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg administradas por via oral.

4.2.1. Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos foi realizada logo em seguida a coleta do lavado bronco-alveolar, respeitados os tempos de pré-tratamento e indução do processo inflamatório – já citados anteriormente. Desta forma, a contagem total de leucócitos foi significativamente reduzida nos grupos de animais tratados com Dexametasona (5 mg/kg) e também nos animais tratados com o composto Rubiadin-1-metil éter.

As doses de 10mg/kg e 30 mg/kg de Rubiadin-1-metil éter foram capazes de diminuir significativamente a migração leucocitária e, conseqüentemente, a contagem total de leucócitos (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 43,6±5,4; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg: 55,3±5,8) ($P < 0,001$) (Figura 13A). O fármaco de referência Dexametasona (5mg/kg) apresentou perfil similar (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: 87,7±1,4) ($P < 0,001$) (Figura 13A).

O mesmo padrão de inibição pode ser observado na contagem diferencial dos leucócitos, com diminuição significativa de neutrófilos no BALF nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 48,1±5,6; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg: 68,8±4,7) ($P < 0,001$) (Figura 13B). E como esperado, a Dexametasona também inibiu este parâmetro inflamatório (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: 91,7±1,2) ($P < 0,001$) (Figura 13B).

Figura 13 - Contagem total e diferencial de leucócitos

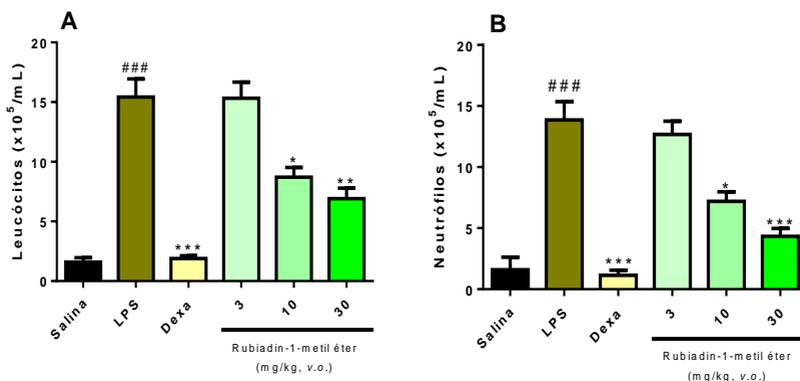


Figura 13 - Contagem total (A) e diferencial (B) de leucócitos. LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, tratamento v.o. e coleta realizada 12 horas após a indução i.p. dos camundongos com LPS. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; n =6; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.2.2. Determinação da exsudação

A determinação do efeito do composto sobre a exsudação ocorreu de forma indireta, através da dosagem das concentrações de proteínas presentes no BALF. Nestes experimentos a determinação foi realizada através da técnica de Lowry, onde verificou-se que o Rubiadin-1-metil éter apresentou a capacidade de reduzir significativamente a exsudação nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 3 mg/kg: $55,5 \pm 4,9$; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: $81,9 \pm 6,9$; e % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg $82,9 \pm 4,5$). O controle positivo Dexametasona (5 mg/kg) também foi capaz de reduzir o parâmetro inflamatório de exsudação (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: $74,2 \pm 9,2$) ($P < 0,001$) (Figura 14).

Figura 14 - Determinação da exsudação através da quantificação de proteínas

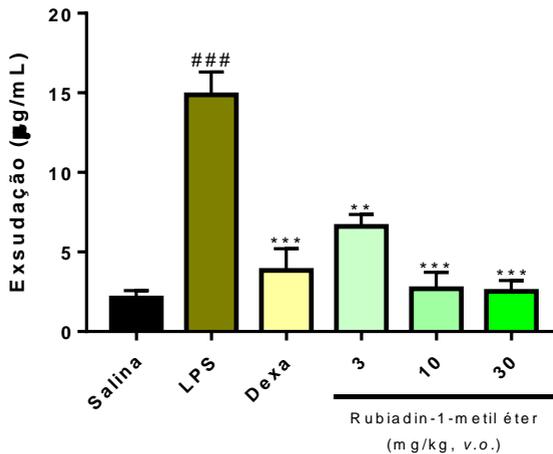


Figura 14 - Mensuração da exsudação através da quantificação de proteínas do lavado bronco alveolar, onde LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, tratamento v.o. e coleta realizada 12 horas após a indução i.p. dos camundongos com LPS. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; n =6; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.2.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e das concentrações de Nitrito e Nitrato (NOx)

O composto Rubiadin-1-metil éter mostrou eficácia ao diminuir a atividade da MPO nas 3 doses testadas de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 3 mg/kg: $41,8 \pm 4,5$; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: $50,1 \pm 2,5$; e % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg $54,7 \pm 3,5$) ($P < 0,001$) (Figura 15A). De forma similar, o fármaco de referência Dexametasona na dose de 5 mg/kg, produziu o mesmo efeito, diminuindo a atividade da MPO (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: $47,8 \pm 3,6$) ($P < 0,001$) (Figura 15A).

O tratamento prévio dos animais com esse composto também demonstrou efetividade na diminuição da quantidade de metabólitos do óxido nítrico (NOx) presente no BALF coletado. Avaliando os

resultados podemos verificar que o composto foi eficaz em reduzir este parâmetro nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 3 mg/kg: 46,3±12,0; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 51,8±3,7; e % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg 60,1±8,7) ($P < 0,001$) (Figura 15B). De forma similar, o fármaco de referência Dexametasona (5 mg/kg) também demonstrou perfil anti-inflamatório sobre este parâmetro analisado (% Dexametasona de inibição 5 mg/kg: 82,73±6,5) ($P < 0,001$) (Figura 15B).

Figura 15 - Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO) e das concentrações de Nitrato e Nitrito (NO_x)

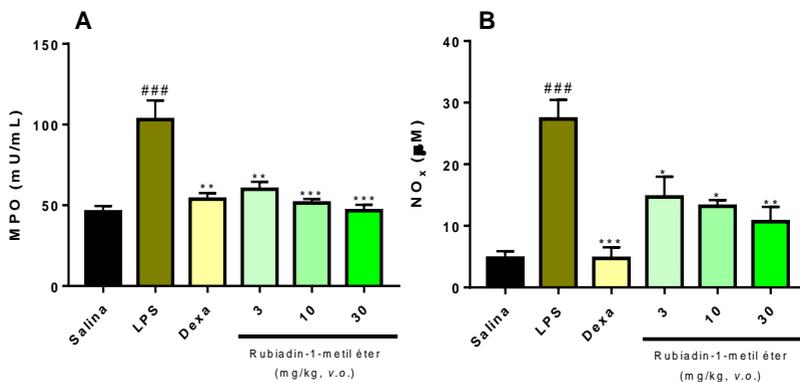


Figura 15 - Mensuração dos parâmetros MPO (A) e NO (B), onde LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, tratamento v.o. e coleta realizada 12 horas após a indução dos camundongos com LPS. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n =6; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.2.4. Quantificação de citocinas envolvidas no processo inflamatório (IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, INF- γ , e TNF- α):

Dentre as 6 citocinas pesquisadas todas apresentaram modificações significativas em suas concentrações, em pelo menos uma das doses, quando os animais foram pré-tratados com o composto Rubiadin-1-metil éter (3, 10 ou 30 mg/kg, v.o.). Da mesma forma, todas

as citocinas sofreram modificações significativas no grupo controle com o fármaco de referência Dexametasona (5 mg/kg).

Inicialmente, a citocina IL-6 apresentou inibição significativa em sua produção nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 3 mg/kg: 33,7±10,5; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 49±6,9; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg 79,5±6,8) ($P < 0,001$) (Figura 16A). Este mesmo parâmetro foi inibido de forma significativa pelo fármaco de referência Dexametasona quando utilizado na dose de 5 mg/kg (% Dexametasona de inibição 5 mg/kg: 94±0,6) ($P < 0,001$) (Figura 16A).

Um perfil similar de inibição pode ser observado durante a dosagem da IL-12p70, onde as doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg foram efetivas na inibição desta citocina (% de inibição 3mg/kg Rubiadin-1-metil éter: 37,1±11,3; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 47,4±13,9; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg 79,5±8,2) ($P < 0,001$) (Figura 16B). O parâmetro foi inibido significativamente pelo fármaco de referência Dexametasona na dose de 5 mg/kg (% inibição Dexametasona 5mg/kg 90,2±2,3) ($P < 0,001$) (Figura 16B)

Figura 16 - Quantificação das citocinas IL-6 e IL-12p70

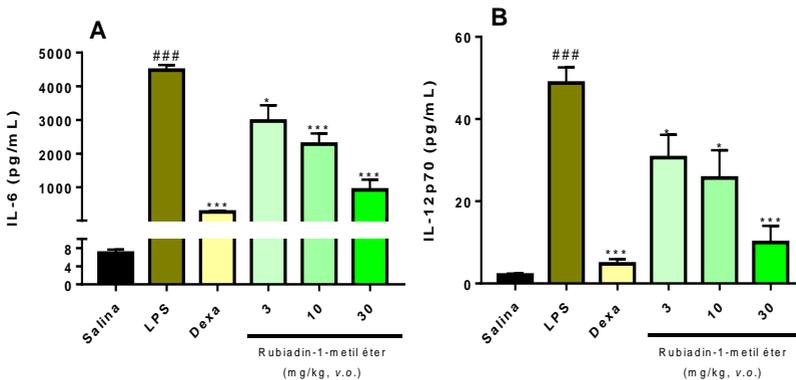


Figura 16 - Inibição das citocinas IL-6 (A) e IL-12p70 (B) através da quantificação de lavado bronco alveolar (BALF) por citometria de fluxo, utilizando *Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse inflammation kit*, onde LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n =6; ### $P < 0,001$ (Salina vs. LPS); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e * $P < 0,001$.**

Outras citocinas pró-inflamatórias inibidas foram o INF- γ e a MCP-1. Os resultados obtidos demonstraram que o Rubiadin-1-metil éter nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg foram capazes de inibir a produção de INF- γ (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 64,5 \pm 5,6; e % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg: 88,4 \pm 1,8) ($P < 0,001$) (Figura 17A). Este mesmo parâmetro foi inibido de forma significativa pelo fármaco de referência Dexametasona quando utilizado na dose de 5 mg/kg (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: 99,3 \pm 0,2) ($P < 0,001$) (Figura 17A). Já a quemocina MCP-1 foi inibida apenas quando os animais foram tratados na maior dose do composto Rubiadin-1-metil éter (30 mg/kg) (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg: 82,6 \pm 7,2) ($P < 0,001$) (Figura 17B). O controle positivo Dexametasona (5 mg/kg) também foi capaz de reduzir a concentração desta quemocina (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: 96,6 \pm 0,8) ($P < 0,001$) (Figura 17B).

Figura 17 - Quantificação das citocinas INF- γ e MCP-1

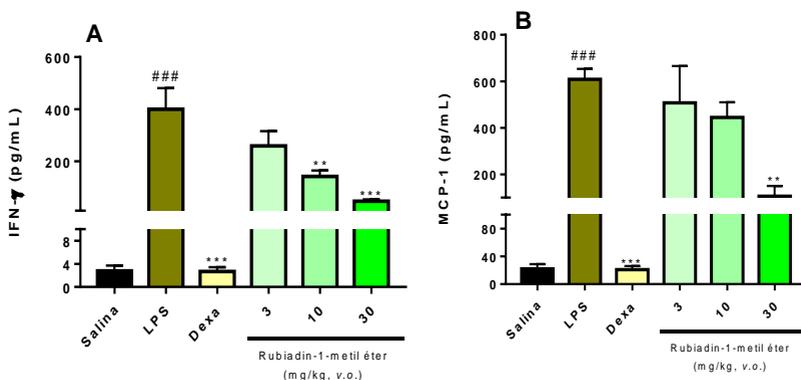


Figura 17 - Inibição das citocinas IFN- γ (A) e MCP-1 (B) através da quantificação de lavado bronco alveolar (BALF) por citometria de fluxo, utilizando *Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse inflammation kit*, onde LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; n=6; ### $P < 0,001$ (Salina vs. LPS); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e * $P < 0,001$.**

Diferente dos resultados obtidos *in vitro*, a mensuração de TNF- α *in vivo* partindo da coleta e utilização do lavado bronco-alveolar de camundongos apresentou inibição significativa quando os animais foram tratados nas duas maiores doses de Rubiadin-1-metil éter (10 e 30 mg/kg) (% de inibição Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 27,7 \pm 6,6; % de inibição Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg: 69,2 \pm 11,4) ($P < 0,001$) (Figura 18). A Dexametasona na dose de 5 mg/kg também inibiu este parâmetro de forma significativa (% de inibição Dexametasona 5 mg/kg: 95,8 \pm 1,1) ($P < 0,001$) (Figura 18).

Figura 18 - *Quantificação de TNF- α*

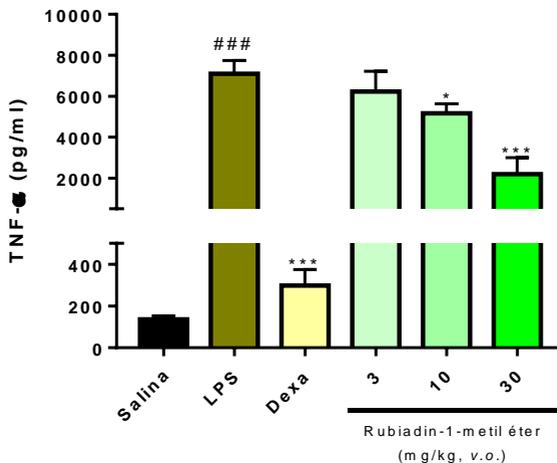


Figura 18 - Dosagem da citocina TNF- α através da quantificação de lavado bronco alveolar (BALF) por citometria de fluxo, utilizando *Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse inflammation kit*, onde LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; n = 6; ### $P < 0,001$ (Salina vs. LPS); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

A citocina anti-inflamatória IL-10 apresentou um perfil de modificação em suas concentrações bem diferente das outras citocinas analisadas até o momento. Já que o Rubiadin-1-metil éter foi responsável por um aumento significativo desta citocina em suas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg quando comparados ao grupo controle negativo (LPS) (% de aumento Rubiadin-1-metil éter 10 mg/kg: 324,8 \pm 67,8 e %

de aumento Rubiadin-1-metil éter 30 mg/kg: $360,5 \pm 74,8$) ($P < 0,001$) (Figura 19). O fármaco de referência Dexametasona também apresentou este mesmo perfil (% de aumento Dexametasona 5 mg/kg: $184,6 \pm 60,9$) ($P < 0,001$) (Figura 19).

Figura 19 - Quantificação de IL-10

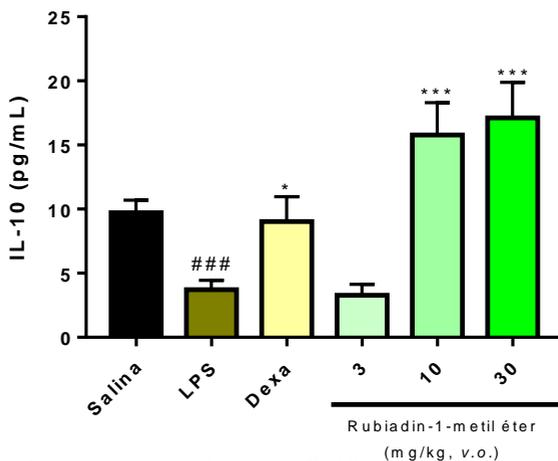


Figura 19 - Dosagem da citocina anti-inflamatória IL-10 através da quantificação de lavado bronco alveolar (BALF) por citometria de fluxo, utilizando *Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse inflammation kit*, onde LPS é o controle negativo (5 mg/kg), Dexa representa o controle positivo (Dexametasona 5 mg/kg) e Rubiadin-1-metil éter nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg. Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão; $n = 6$; ### $P < 0,001$ (Salina vs. LPS); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

O estudo sobre a possível citotoxicidade *in vitro* de compostos naturais, derivados naturais ou derivados sintéticos, é uma ferramenta imprescindível nos estudos pré-clínicos e farmacológicos atuais. Compostos com boa atividade biológica que não apresentam segurança molecular não seguem em frente para as posteriores fases de pesquisa. Neste sentido, a confirmação de informações bibliográficas sobre toxicidade é quase sempre recomendada, uma vez que muitos compostos já testados apresentam resultados publicados muito conflitantes. É o caso do composto Damnacanthal que segundo estudos realizados por NUALSANIT e colaboradores (2011), apresenta toxicidade significativa sobre macrófagos de camundongos RAW 264.7, quando utilizado em concentrações superiores a 50 μM (NUALSANIT et al., 2011). Outros pesquisadores afirmam que com uma concentração de 20 μM o composto já apresenta toxicidade importante sobre a mesma linhagem celular (DZOYEM et al., 2016).

Para confirmar ou refutar os resultados apresentados na literatura, testamos também este composto sobre a mesma linhagem celular citada pelos autores: macrófagos murinos RAW 264.7. Nossos resultados demonstraram que o Damnacanthal apresenta toxicidade em concentrações mais baixas do que as descritas anteriormente por ambos os autores, exibindo efeito tóxico importante quando utilizado em concentrações acima de 4,6 μM .

Já o composto Rubiadin-1-metil éter, em nossos experimentos, apresentou uma segurança toxicológica muito maior, visto que o composto demonstrou toxicidade significativa apenas em concentrações superiores a 100 μM . No entanto, a bibliografia é escassa quanto a informações sobre a toxicidade deste composto, visto que DZOYEN e colaboradores (2016) declaram que o composto já apresenta toxicidade elevada em concentrações superiores a 5 μM , quando testado em macrófagos murinos RAW 264.7 (DZOYEN *et al.*, 2016) - o que novamente conflita com nossos resultados. Observando com maior atenção os procedimentos experimentais dos autores em questão, verificamos algumas diferenças importantes, que podem ser explicadas, pelo menos em parte, por diferenças na composição dos meios de cultura utilizados, além da administração do agente flogístico (LPS) que em nossos experimentos, ao contrário dos autores, não foi adicionado durante a avaliação da citotoxicidade dos compostos.

A comprovação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais, de seus derivados ou mesmo de compostos sintéticos, se inicia pela determinação da capacidade que estes compostos apresentam em inibir a produção de mediadores inflamatórios importantes para a iniciação e manutenção do processo inflamatório. Um dos exemplos mais recorrentes é a verificação do efeito de compostos sobre a produção de óxido nítrico, que pode ser produzido pela ação de uma das 3 isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (eNOS, nNOS e iNOS), sendo que a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é a principal responsável pela produção de NO durante o processo inflamatório.

As isoformas constitutivas que incluem a nNOS e eNOS quando ativadas, produzem apenas concentrações nanomolares de NO por segundos ou minutos, enquanto que a isoforma induzível iNOS gera maiores quantidades de NO, na faixa de micromolares e em intervalos mais longos (VANINNI, KASHFI, NATH, 2015). A síntese da iNOS é diretamente regulada pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ), endotoxinas (LPS), estresse oxidativo e presença de hipóxia tecidual produzida durante o processo de inflamação. Após a indução, a iNOS passa a produzir continuamente NO até que todas as enzimas sejam degradadas, processo que é responsável pelo maior dano tecidual, pelo recrutamento celular contínuo e pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção aberrante de iNOS está envolvida em diversas fisiopatologias humanas, que incluem asma, artrite, esclerose múltipla, colite, psoríase, doenças neurodegenerativas, desenvolvimento de tumores, rejeição de transplante e choque séptico (PAUTZ *et al.*, 2010; XUE *et al.*, 2018).

Neste sentido, nossos estudos constataram que o composto Damnacanthal não apresentou atividade significativa sobre a produção de óxido nítrico, ao contrário do composto Rubiadin-1-metil éter que apresentou habilidade em reduzir de forma significativa a produção deste mediador. Novamente, de forma conflitante, estudos anteriores reportaram que tanto o composto Damnacanthal como o Rubiadin-1-metil éter exibem a capacidade de reduzir a produção de NO_x em macrófagos de camundongos RAW 264.7 quando induzidos por LPS (DZOYEM *et al.*, 2016).

Além disso, nos ensaios conduzidos por NUALSANIT e colaboradores (2011), concentrações de Damnacanthal entre 10 μ M e 20 μ M produziram uma diminuição da expressão de iNOS em macrófagos de camundongos, o mesmo estudo que não considerou estas doses como citotóxicas, fato que nos leva a pensar que tal redução do óxido nítrico apresentada neste experimento citado acima, deve-se a citotoxicidade do

Damnacanthal. Desta forma, podemos presumir que a diminuição do número de células viáveis, pode ter sido a verdadeira responsável pela redução significativa na dosagem de óxido nítrico no referido experimento (NUALSANIT et al., 2011).

Além de regularem a produção de óxido nítrico, as citocinas pró-inflamatórias afetam diversos processos biológicos de nosso organismo. Sua liberação controla a patogênese de diversas doenças, atua na resposta não específica a infecções, na resposta específica a antígenos, contribuindo também para o desenvolvimento de processos degenerativos e de envelhecimento. Sua correlação com doenças crônicas, inflamação, câncer e doenças autoimunes é extensamente pesquisada, sendo o foco da maioria dos estudos relacionados (DINARELLO, 2007).

Para assegurar uma possível ação anti-inflamatória, novos compostos sintéticos ou naturais, devem apresentar a capacidade de diminuir a expressão das principais citocinas envolvidas neste processo. Sabemos de antemão que o composto Damnacanthal não apresentou capacidade significativa de inibir a produção de óxido nítrico, sendo assim, optou-se por não testar sua ação sobre as citocinas aqui descritas. Nesta direção e corroborando com nossa opção de não o testar, estudos realizados por GÜNAY e colaboradores (2016) demonstraram que o composto Damnacanthal não exerce ação inibitória significativa sobre a produção de IL-1 β e TNF- α em células de linhagem pulmonar humanas A549 (GÜNAY *et al.*, 2016). Em contrapartida, nossos resultados mostraram que o composto Rubiadin 1-metil éter foi capaz de modificar o padrão de produção de todas as citocinas estudadas, com exceção para o TNF- α no modelo *in vitro*.

Sabemos que citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas, são responsáveis pela regulação e manutenção do processo inflamatório, sendo um dos precursores do início de quadros clínicos de inflamação aguda. Nossos estudos *in vitro* demonstraram que a dose de 29 μ M de Rubiadin-1-metil éter foi eficaz na redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β . A literatura encontrada sobre a ação do composto Rubiadin-1-metil éter é escassa, sendo que nenhum trabalho até então, evidenciou qualquer tipo de ação deste composto sobre estas ou demais citocinas envolvidas no processo inflamatório. Entretanto, outros compostos pertencentes à classe das antraquinonas já apresentam sua ação anti-inflamatória relacionada a inibição de citocinas.

Estudos conduzindo por HU e colaboradores (2014) demonstram que a antraquinona Aloe-emodin isolada do Ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*), planta comum em formulações da medicina tradicional

chinesa, utilizada para tratamento de inflamações agudas como apendicite e colecistite, apresentou a capacidade de diminuir a produção e expressão das citocinas IL-6 e IL-1 β com concentrações mínimas de 5 μ M de Aloe-emodin em macrófagos de camundongos RAW 264.7 induzidos por LPS. Além disso, o mesmo estudo comprova a inibição de iNOS e NO nas mesmas concentrações e evidencia uma ação reguladora na fosforilação do NF- κ B, bem como nas vias de sinalização de MAPK como ERK e JNK (HU et al., 2014).

Outro exemplo é o composto 8-O- β -Glucopiranosídeo, antraquinona extraída da *Rumex japonicas*, que apresenta ação inibitória significativa e dose dependente contra IL-1 β , TNF- α e IL-6 em modelo experimental *in vitro*, utilizando macrófagos de camundongos RAW 264.7 (WEI-JUN et al., 2017). Experimentos *ex vivo* utilizando mastócitos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c, demonstraram que a Citreoseína, antraquinona isolada da planta *Polygoni cuspidati*, também apresenta ação frente à IL-6, IL-1 β e TNF- α (LU et al., 2012). O composto Antraquinona-2-ácido carboxílico isolado do Ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*), denominado como taheebo pela maioria da população andina e sul-americana, apresenta a capacidade de inibir a produção e expressão gênica de iNOS, COX-2 e TNF- α em macrófagos RAW 264.7 (PARK et al., 2016).

Estudos conduzidos por GAO e colaboradores (2014) em macrófagos de camundongo RAW 264.7, demonstra que a Reína (Rhein) reduz a produção dos mediadores pró-inflamatórios NO e IL-6, além de inibir a ativação gênica suprimindo a transcrição do NF- κ B, pela inibição de IKK β (GAO et al., 2014). Estudos realizados por WEN et al. (2018), utilizam a mesma linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 para demonstrar a ação benéfica do Crisofanol (Chrysophanol) perante a inibição da expressão de NO, IL-1 β e TNF- α (WEN et al., 2018). Outro estudo utilizando macrófagos de camundongos RAW 264.7 induzidos por LPS (1 μ g/mL), demonstrou a diminuição da expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em células pré-tratadas com Aloína, antraquinona derivada da *Aloe vera*, sendo que doses a partir de 25 μ M foram suficientes para inibir estes parâmetros (JIANG et al., 2018).

Nossos resultados ainda confirmaram a ação do composto Rubiadin-1-metil éter sobre diversos parâmetros inflamatórios analisados no modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS em camundongos (ALI). O processo inflamatório desencadeado pela ALI pode ser classificado em três estágios: exsudativo, proliferativo e fibrótico. A fase exsudativa é caracterizada por intenso infiltrado neutrofílico, por edema e por líquido rico em proteínas devido ao

extravasamento de capilares dos pulmões. Diante deste quadro, marcadores como contagem de leucócitos, atividade da enzima mieloperoxidase e concentração de proteína no BALF são indicativos para o monitoramento e determinação do potencial anti-inflamatório de novas moléculas, compostos e protótipos de fármacos (AGHASAFARI, GEORGE, PIDAPARTI, 2019). Além disso, o aumento e acúmulo de neutrófilos está associado a exacerbação e a liberação de uma complexa rede de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, quemoquinas, proteases e agentes oxidantes – que também podem ser mensurados durante a avaliação da potencial ação de novos fármacos ou compostos (FAVARIN et al., 2013).

O composto Rubiadin-1-metil éter apresentou a capacidade de diminuir a migração leucocitária total e diferencial, impedindo o acúmulo de neutrófilos no BALF, e conseqüentemente, a atividade da MPO foi reduzida. O doseamento de proteínas pela técnica de Lowry também demonstrou efeitos positivos contra a exsudação pulmonar. Até o momento, nenhuma literatura para comparação dos efeitos anti-inflamatórios destes marcadores para o composto Rubiadin-1-metil éter em modelo animal foi encontrada. Nossos experimentos ainda demonstraram diminuição significativa de NOx e diversas citocinas, incluindo o TNF- α , que não foi verificado durante a experimentação *in vitro* na linhagem de macrófagos RAW 264.7. Esta diferença observada pode estar relacionada com a dose escolhida para realizar o procedimento *in vitro*, bem como, pela diferença de complexidade entre os dois modelos utilizados.

O Rubiadin-1-metil éter também foi capaz de aumentar as concentrações de IL-10 presentes no BALF dos animais, o que chama a atenção para uma característica interessante do composto – a imunomodulação. Neste contexto, a IL-10 é uma das citocinas com características anti-inflamatórias que mais se destaca durante o processo inflamatório devido ao seu caráter regulador, equilibrando e suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α . Além disto, a IL-10 contribui para a redução do dano tecidual, atenuação de respostas excessivas e está envolvida na redução da expressão do MHC-II, fator que interfere diretamente na apresentação de antígenos às células T (OUYANG et al., 2011). Em outros estudos já foi demonstrado que esta citocina previne a apoptose e aumenta a expressão de fatores antiapoptóticos. A IL-10 é expressa por células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo células dendríticas (DCs), macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células natural killer (NK), eosinófilos e células T, e sua modulação e expressão é complexa e

orquestrada por mecanismos moleculares reguladores específicos e em comum entre as células que produzem IL-10 (LOBO-SILVA et al., 2016).

Os compostos naturais têm contribuído há muito tempo para o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias, sendo na sua grande maioria, medicamentos com capacidade de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios. Mais recentemente, começaram também a aparecer na literatura científica, relatos da ação de compostos de origem natural na estimulação da síntese de mediadores com caráter anti-inflamatório, como o TGF- β e a IL-10 (NETEA et al., 2017; MOLLAZADEH et al., 2017). Neste sentido, diversos estudos já confirmaram que alguns compostos naturais apresentam a capacidade de influenciar o sistema imunológico, afetando funções celulares, secreção de anticorpos e até aumentando a síntese de mediadores anti-inflamatórios. A relevância destas pesquisas é crucial para a busca de novos e melhores tratamentos, tanto para complementar aqueles que já existem, como para desenvolver novas estratégias contra doenças relacionadas ao sistema imune (ORTUÑO-SAHAGÚN, et al., 2017).

Neste contexto, estudos *ex vivo* conduzidos em esplenócitos de camundongos tratados previamente com Emodin antes da provocação com Concanavalina A demonstraram que a referida antraquinona apresentava ação imunomodulatória por inibir a síntese de IL-6, TNF- α e IFN- γ e aumentar significativamente a expressão de IL-10 (SHARMA, TIKU, 2016). Em outro trabalho, conduzido por SHENG e colaboradores (2011), foi demonstrado que a ação da Reína (antraquinona) sobre células T derivadas de células mononucleares esplênicas (SMC) retiradas de camundongos C57BL/6J e estimuladas com anticorpos anti-CD3/CD28, apresentaram expressões de mRNA reduzidas para TNF- α , IFN- γ e IL-12 e aumentadas para IL-4 e IL-10, duas citocinas com características anti-inflamatórias (SHENG et al., 2011).

Embora exista pouca bibliografia citando efeito anti-inflamatório do Rubiadín-1-metil éter, outras antraquinonas de estrutura química semelhante como a Aloína (Barbaloin), composto antraquinônico encontrado na *Aloe vera*, vem tendo sua atividade farmacológica comprovada. Um exemplo a ser citado é o estudo conduzido por JIANG e colaboradores (2018) que utilizaram um modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS em camundongos BALB/c para a determinação de diversos parâmetros inflamatórios relacionados ao efeito terapêutico da Aloína. Neste estudo, cortes histológicos do pulmão evidenciaram a diminuição da atividade da MPO no tecido,

além de demonstrar efeito protetor. A diminuição da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, foram também confirmadas. (JIANG et al., 2018). A 6-hidroxiurubidin, a antraquinona extraída da *Rubia cordifolia* L., também exibiu a capacidade de diminuir a produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β quando testada em camundongos C57BL/6 em lesão aguda pulmonar induzida por LPS (WU et al., 2017).

Antraquinonas mais extensamente pesquisadas, como a Reína (Rhein), encontrada em diversas plantas como *Rheum palmatum* L., *Cassia tora* L., e *Polygonum multiflorum*, servem de comparativo por apresentarem atividade semelhante em diversos modelos de inflamação. A Reína já apresenta farmacocinética conhecida e possui vários efeitos farmacológicos catalogados, incluindo atividades hepatoprotetoras, nefroprotetoras, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e antimicrobianas. Além disso, a Reína é o metabólito ativo da Diacereína (Diacerin), fármaco já patetando e comercializado no Brasil (ARTRODAR®). Este composto já é empregado na clínica para tratamento de artrose, mas sua relevância terapêutica vem aumentando, visto que experimentos conduzidos em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, demonstraram sua capacidade de inibir diversos marcadores pró-inflamatórios relacionados a falência renal de pacientes em estudo (PIOVESAN et al., 2017). Experimentos conduzidos *in vivo* com o uso de ratos diabéticos não obesos (NOD) demonstraram que Diacereína, apresenta ação inibitória de IL-1 β e TNF- α (MALAGUTI et al., 2008). Outro fator importante é a pouca ação laxativa deste composto em pacientes clínicos que fazem uso da Diacereína. Apesar da maior incidência de diarreia e amolecimento fecal, o efeito laxativo da Diacereína é bem tolerado em humanos (ZHOU et al., 2015).

A *Hedyotis diffusa* Willd, planta utilizada na medicina popular, também é rica em compostos antraquinônicos, dentre eles, o 2-hidroxi metil antraquinona (HMA). Estudos conduzidos por TAN et al. (2018) em camundongos BALB/c induzidos com LPS em modelo de lesão aguda pulmonar, demonstraram que o composto possui a capacidade de diminuir a migração leucocitária total e diferencial, além de inibir citocinas como TGF- β 1 e IL-6 em material bronco alveolar (BALF). Em adição, a 2-hidroxi metil antraquinona (HMA) foi capaz de diminuir a atividade da MPO e a área de edema no tecido pulmonar. A diminuição da expressão de receptores do tipo TLR-4 no tecido analisado também foi comprovada através de imunofluorescência (TAN et al., 2018).

Outro composto denominado *Auratio-obtusin*, antraquinona majoritária obtida da espécie *Cassiae sêmen*, apresentou efeito significativo sobre a contagem total e diferencial (neutrófilos) no BALF coletado de camundongos ICR machos, após indução de lesão aguda pulmonar por LPS. O mesmo estudo demonstrou efeito inibitório significativo sobre as citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β (KNOW et al., 2017).

Assim, os resultados obtidos no presente estudo apontam que o composto Rubiadin-1-metil éter apresenta importantes propriedades anti-inflamatórias, e que pelo menos em parte, tal efeito, observado em animais tratados com o composto, deve-se a capacidade do mesmo em atuar de forma imunomoduladora, aumentando as concentrações de IL-10. Fato bastante interessante no contexto atual do desenvolvimento de fármacos com o intuito de tratar doenças inflamatórias refratárias ao tratamento convencional.

6. CONCLUSÃO

Com os experimentos realizados, fomos capazes de evidenciar que o composto Rubiadin-1-metil éter apresenta significativa atividade anti-inflamatória *in vitro*, que foi comprovada pela experimentação *in vivo*. Porém, mais estudos com intuito de elucidar com precisão seu mecanismo de ação anti-inflamatório ainda são necessários, já que o composto além de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios, apresentou caráter imunomodulador.

REFERÊNCIAS

- ABU, N. et al. Damnacanthal: A promising compound as a medicinal anthraquinone. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 750-755, 2014.
- AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation Research**, v. 68, n. 1, p. 59-74, 2019.
- ALTEMEIER, W. A; HUNG, C. F; MATUTE-BELLO, G. **Acute lung injury and repair: scientific fundamentals and methods**. 1 ed. Switzerland: Springer Nature, 2017. 5-24 p.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2013.
- BAELL, J. B. Feeling nature's PAINS: Natural products, natural product drugs, and pan assay interference compounds (PAINS). **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 616–628, 2016.
- BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015.
- BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, T. W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 362-374, 2015.
- CAPRA, V. et al. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 4, p. 377-382, 2015.
- CHAN, C. et al. Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2017.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends.

Phytochemistry Reviews, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511-523, 2015.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 34-45, 2017.

DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. M. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. :423-426, 1998.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 491, p. 1-12, 2014.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

DZOYEM, J. P. et al. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages and 15-LOX activity by anthraquinones from *Pentas schimperi*. **Planta Medica**, v. 82, n. 14, p. 1246-1251, 2016.

ENDALE, M. et al. Anthraquinones of the roots of *Pentas micrantha*. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 311-321, 2013.

FAVARIN, D. C. et al. Potential effects of medicinal plants and secondary metabolites on acute lung injury. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

GAO, Y. et al. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKK β inhibition in LPS-activated macrophages. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 72, p. 104-112, 2014.

GARCÍA-ORTIZ, A.; SERRADOR, J. M. Nitric oxide signaling in T cell-mediated immunity. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 4, p. 412-427, 2017.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Cell Press**, v. 39, n. 6, p. 1003-1018, 2013.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 4, p. 293-307, 2011.

GÜNAY, E. et al. Comparison of the anti-inflammatory effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthal on benzo(a)pyrene exposed A549 alveolar cell line. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 744-751, 2016.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HAMIDZADEH, K. et al. Macrophages and the recovery from acute and chronic inflammation. **The Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 567-592, 2017.

HARTLEY J. W. et al. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. **Retrovirology**, v. 5, p. 1-6, 2008.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R. A.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Review - Drug Discovery**, v. 16, p. 111-129, 2016.

HU, B. et al. Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 846-853, 2014.

JIANG, K. et al. Barbalion protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated

PI3K/AKT/NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 64, p.140-150, 2018.

JONES, B. E.; MAERZ, M. D.; BUCKNER, J. H. IL-6: a cytokine at the crossroads of autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 55, p. 9-14, 2018.

KABERA, J. N. et al. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Cell Press - Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 159-175, 2013.

KOTAS, M.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity of anthraquinones from the roots of *Pentas schimperi* towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Investigational New Drugs**, v. 33, n. 4, p. 861-869, 2015.

KWON, K. S. et al. Aurantio-obtusin, an anthraquinone from cassiae semen, ameliorates lung inflammatory responses. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 1537–1545, 2017.

LIND, M. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 370–375, 2017.

LOBO-SILVA, D. et al. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2016.

LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: A New biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, n. 135625, p. 1-4, 2008.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LU, Y. et al. Citreorosein inhibits production of proinflammatory cytokines by blocking mitogen activated protein kinases, nuclear factor- κ B and activator protein-1 activation in mouse bone marrow-derived mast cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 6, p. 938–945, 2012.

MALAGUTI, C. et al. Diacerein downregulate proinflammatory cytokines expression and decrease the autoimmune diabetes frequency in nonobese diabetic (NOD) mice. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 782–791, 2008.

MALIK, E.; MULLER, C. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 4, p. 705–748, 2016.

MANZANILLO, P.; EIDENSCHENK, C.; OUYANG, W. Deciphering the crosstalk among IL-1 and IL-10 family cytokines in intestinal immunity. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 8, p. 471-478, 2015.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. 379–399, 2008.

MEDEMA, M. H.; FISCHBACH, M. A. Computational approaches to natural product discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 9, p. 639-648, 2015.

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

MERLY, L.; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: Are we missing something. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n.2, p.55-58, 2017.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

MOLLAZADEH, H. et al. Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 11, p. 1-13, 2017.

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

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826-831, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWTON, K.; DIXIT, V. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 3, 2012.

NI, G. et al. Manipulating IL-10 signalling blockade for better immunotherapy. **Cellular Immunology**, v. 293, p. 126–129, 2015

NUALSANIT, T. et al. Damnacanthal-induced anti-inflammation is associated with inhibition of NF- κ B activity. **Inflammation**, v. 10, n. 6, p. 455-463, 2011.

ORTUÑO-SAHAGÚN, D. et al. Natural immunomodulators. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1-2, 2017.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71-109, jan. 2011.

PARK, J. G. et al. Anti-Inflammatory and antinociceptive activities of Anthraquinone-2-Carboxylic Acid. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 75–93, 2010.

PIOVESAN, F. et al. Effect of diacerein on renal function and inflammatory cytokines in participants with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: A randomized controlled trial. **Plos One**, v. 12, n. 10, p. 1-13, 2017.

PRADHAN, A. A.; BERTELS, Z.; AKERMAN, S. Targeted nitric oxide synthase inhibitors for migraine. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2018.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.

RASCHKE W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, p. 261-267, 1978.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 57-64, 2009.

RITTIRSCH, D. et al. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7664-7672, 2008.

ROFF, S. R.; NOON-SONG, E. N.; YAMAMOTO, K. J. The significance of interferon- γ in HIV-1 pathogenesis, therapy, and prophylaxis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 498, p. 1-12, 2013.

ROZMAN, P.; SVAJGER, U. The tolerogenic role of IFN- γ . **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 41, p. 40-53, 2018.

SHARMA, R.; TIKU, A. B. Emodin inhibits splenocyte proliferation and inflammation by modulating cytokine responses in a mouse model system. **Journal of Immunotoxicology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2016.

SHENG, X. et al. Rhein ameliorates fatty liver disease through negative energy balance, hepatic lipogenic regulation, and immunomodulation in diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 5, p. 886-893, 2011.

SCHUMACHER, M. et al. Natural compounds as inflammation inhibitors. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 89-92, 2011.

SCHNAPP, L. M.; FEGHALI-BOSTWICK, C. **Acute lung injury and repair: Scientific Fundamentals and Methods**. 8 eds.: Springer International Publishing, 2017. 5-23 p.

SOARES-BEZERRA, R. J. et al. Natural products as a source for new anti-inflammatory and analgesic compounds through the inhibition of purinergic P2X receptors. **Pharmacelticals**, v. 6, n. 5, p. 650-658, 2016.

SUGIMOTO, M. A. et al. Resolution of inflammation: What controls its onset?. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 160, p. 1-18, 2016.

SUKUMARAN, S. et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of Methylprednisolone effects on iNOS mRNA expression and nitric oxide during LPS-induced inflammation in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 8, p. 2060–2069, 2012.

SWEELAM, H. M. et al. Secondary metabolites and biological activity of *Pentas* species: A minireview. **Journal of Advanced Research**, v. 10, p. 21-30, 2012.

TAN, J. et al. Protective effect of 2-hydroxymethyl anthraquinone from *Hedyotis diffusa* Willd in lipopolysaccharide-Induced acute lung injury mediated by TLR4-NF- κ B Pathway. **Inflammation**, v. 41, n. 6, p. 2136-2148, 2018.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. 1-17, 2014.

THOMPSON, A.; ORR, S. J. Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. **Cytokine**, v. 111, p. 398-407, nov. 2018.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563-2582, 2014.

VANHAMMEA, L. et al. The other myeloperoxidase: Emerging functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 1, n. 649, p. 1-14, 2018.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 334-343, 2015.

XUE, Q. et al. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1-13, 2018.

WANG, J. et al. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2085-2090, 2014.

WATFORD, W. T. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 361-368, 2003.

WEI-JUN, F. et al. In vivo and in vitro anti-sepsis effects of physcion 8-O- β -glucopyranoside extracted from *Rumex japonicus*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 7, p. 534-539, 2017.

WEN, Q. et al. Chrysophanol demonstrates anti-inflammatory properties in LPS-primed RAW 264.7 macrophages through activating PPAR- γ . **International Immunopharmacology**, v. 56, p. 91-97, 2018.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 1-19, 2013.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, 2010.

WU, Y. et al. In vitro and in vivo inhibitory effects of 6-hydroxyrubiadin on lipopolysaccharide-induced

inflammation. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, n. 3, p. 107-116, 2017.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 22, p. 1570-1579, 2010.

YANG, J. Y. L. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v. 2, n. 1, p. 1-9, 2014.

YANG, Y. et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. **Cell Death and Disease**, v. 7, p. 1-10, 2016.

ZHENG, Y. et al. Lipopolysaccharide regulates biosynthesis of cystathionine γ -lyase and hydrogen sulfide through toll-like receptor-4/p38 and toll-like receptor-4/NF- κ B pathways in macrophages. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 49, p. :679–688, 2013.

ZHU, K. et al. Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 500, p. 1-16, 2018.

ZHOU, Y. et al. Rhein: A review of pharmacological activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p.1-10. 2015.