

INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta do sistema imune aos danos celulares e teciduais causados por infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física. Desta forma, o processo inflamatório é geralmente uma resposta que visa estritamente a proteção do organismo contra infecções, bem como o reparo, após eventuais danos teciduais (Haanen e Vermes, 1995; Weiss, 2002). Entretanto, em alguns casos, o processo inflamatório prossegue até tornar-se crônico, levando a doenças como a artrite. Já em outros casos, como no choque séptico, um processo inflamatório local agudo pode resultar em uma resposta generalizada, associada à falência múltipla de órgãos e morte (Weiss, 2002; Tracey, 2002).

Atualmente, sabe-se que além das patologias tipicamente inflamatórias, como por exemplo, a artrite, a colite e a asma, outras doenças como a aterosclerose, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla, a psoríase, o diabetes tipo 1 e a dermatite atópica possuem componentes inflamatórios, fazendo da inflamação um processo comum a várias patologias aparentemente distintas (Nathan, 2002; Cirino et al., 2003).

A extensão dos eventos inflamatórios observados está diretamente relacionada à intensidade do estímulo inicial e aos mecanismos imunológicos que são ativados (McIntyre et al., 1997). As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sangüíneo e da permeabilidade vascular, dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório. As principais células envolvidas na fase aguda da inflamação são os neutrófilos, enquanto que, na fase tardia, monócitos/macrófagos e algumas linhagens de linfócitos migram para o sítio inflamatório (Huerre e Gounon, 1996). Vários aspectos do processo inflamatório são regulados por mediadores

produzidos por células do sistema imune e células endoteliais. Estes mediadores em questão podem ser definidos como moléculas solúveis e difusíveis, e são representados por produtos da degranulação de mastócitos (histamina e serotonina), componentes do sistema complemento, citocinas, leucotrienos, prostaglandinas e outros mediadores lipídicos. Além destes, o gás óxido nítrico (NO), também exerce papel fundamental no processo inflamatório.

O fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)/NO foi descoberto em 1980 por Furchgott e Zawadzki (Furchgott e Zawadzki, 1980). Neste estudo pioneiro, Furchgott e Zawadzki demonstraram que o relaxamento de preparações de anéis de aorta de coelho, pré-contraídas com fenilefrina, requeria a presença de endotélio íntegro, sendo este, a fonte de algum fator responsável pelo relaxamento observado nos anéis de aorta. Um ano após a descoberta do EDRF, demonstrou-se que vários agentes vasodilatadores, incluindo o ionóforo de cálcio A-23187, trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), bradicinina (BK) e substância P (SP), produziam relaxamento através de um mecanismo dependente do endotélio e do acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (Furchgott, 1981). Simultaneamente, foi observado que a ação vasodilatadora do EDRF era bastante semelhante a dos nitrovasodilatadores. Por esta razão, Murad denominou o EDRF de nitrato endógeno ou nitrovasodilatador endógeno (Murad, 1986). Logo após, Moncada propôs que o EDRF era equivalente ao NO (Palmer et al., 1987).

Simultânea, embora independentemente dos estudos sobre EDRF/NO e sistema cardiovascular, o papel dos compostos de nitrogênio na resistência antimicrobiana de mamíferos foi elucidada. Assim, em 1981, Tannenbaum et al., observaram que em humanos, a excreção de óxidos de nitrogênio excedia a quantidade de nitrogênio

ingerida (Nathan et al., 1997). Da mesma forma, Green et al. (1981), utilizando ratos livres de germes, demonstraram que a origem dos óxidos de nitrogênio estava relacionada ao hospedeiro e não à sua flora bacteriana. Estudos demonstraram que particularmente os macrófagos podiam produzir nitrito e nitrato e que o metabolismo oxidativo destas células era acoplado à síntese de um intermediário citostático, resultando na produção de nitrito e nitrato (Stuehr e Marletta, 1985; Hibbs et al., 1987; Iyengar et al., 1987). Desta forma, foi sugerido que o efeito citotóxico dos macrófagos e os efeitos vasodilatadores poderiam ser mediados através dos mesmos sistemas de produção de NO (Stuehr et al., 1989). Com base nesta idéia, vários estudos foram realizados na tentativa de elucidar as vias bioquímicas envolvidas na síntese do NO.

Atualmente, sabe-se que o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular por um processo enzimático que utiliza elétrons doados pela nicotinamida adenina difosfato reduzida (NADPH). As enzimas óxido nítrico sintases (NOS) oxidam o nitrogênio contido no grupo guanidino do aminoácido L-arginina, utilizando para isto, o oxigênio molecular, em duas reações seqüenciais de monooxigenação, passando pelo intermediário N-hidroxil-L-arginina e gerando NO e citrulina. Para sua atividade as NOS requerem como co-fatores a tetrahydrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina adenina mononucleotídeo (FMN) assim como a ligação à calmodulina. Uma molécula de L-arginina dá origem a uma molécula de NO, sendo que o átomo de nitrogênio provém de um grupo guanidino terminal da cadeia lateral da arginina (Coleman, 2001). Além disso, 1,5 moléculas de NADPH e duas moléculas de O_2 , ambos co-substratos, são convertidos em 1,5 moléculas de NAD^+ e duas moléculas de água como co-produtos (MacMicking et al., 1997).

Nos mamíferos, foram descritas até hoje, três isoformas funcionais de NOS, cada uma codificada por um gene (Knowles e Moncada, 1994; Coleman, 2001) (ver TABELA 1). As isoformas humanas possuem homologia de 55% na seqüência de aminoácidos (Michel e Feron, 1997; Coleman, 2001).

A nNOS (NOS I) e a eNOS (NOS III) foram originalmente identificadas em neurônios de rato e células endoteliais bovinas, respectivamente. Entretanto, sabe-se que sua distribuição é bem mais ampla do que a sugerida por seus nomes. Assim, a nNOS não é somente expressa em neurônios, mas pode ser encontrada na musculatura esquelética, epitélio bronquiolar e traquéia (Kobzik et al., 1993; Feihl et al., 2001). Da mesma forma, a eNOS foi detectada em plaquetas e algumas populações neuronais, além das células do endotélio vascular (Nathan e Xie, 1994; Murad, 1999; Feihl et al., 2001). Nestes tecidos, a expressão da nNOS e da eNOS é constitutiva, embora sua expressão possa ser alterada em algumas situações (Michel e Feron, 1997). Como exemplo, os níveis de eNOS podem ser aumentados pelo estresse de cisalhamento (Fleming et al., 1998) ou exercício (Wang et al., 1997), assim como podem ser reduzidos por estímulos inflamatórios como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Nathan e Xie, 1994). A nNOS assim como a eNOS têm sua atividade regulada primariamente pelos níveis de cálcio, uma vez que só se ligam à calmodulina na presença de concentrações de cálcio intracelular aumentadas (Knowles e Moncada, 1994). Quando estimuladas, estas isoformas produzem pouca quantidade de NO (concentrações picomolares) durante alguns minutos, o suficiente para que o NO exerça seus efeitos fisiológicos nos sistemas cardiovascular e nervoso (Stuehr, 1999).

A terceira isoforma, uma NOS indutível (iNOS ou NOS II) pode ser encontrada de forma constitutiva em alguns tecidos, incluindo o epitélio pulmonar (Dweik et al., 1998), mas é tipicamente expressa em resposta a estímulos como radiação ultravioleta, ozônio, trauma, produtos bacterianos (como LPS e enterotoxinas) (McKay et al., 1999), além de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Kroncke et al., 1995; Hierholzer et al., 1998; Feihl, 2001). Uma vez expressa, a iNOS produz grandes quantidades de NO por períodos prolongados de tempo (concentrações nano a micromolares por até 5 dias) (MacMicking et al., 1997; Davis et al., 2001; Mendes et al., 2002). Originalmente descoberta em macrófagos, a iNOS também pode ser induzida em neutrófilos, hepatócitos, células da musculatura lisa vascular, fibroblastos e células epiteliais, dentre outras (Davis et al., 2001; Feihl et al., 2001). Ao contrário das isoformas constitutivas, a iNOS encontra-se ligada à calmodulina mesmo em baixas concentrações de cálcio intracelular, tornando sua atividade independente do aumento das flutuações dos níveis de cálcio (Davis et al, 2001).

Tabela 1 – Características das NOS

Enzimas constitutivas		Enzima induzida
nNOS	eNOS	iNOS
134 kDa	160 kDa	130 kDa
Citosólica ou ligada à membrana celular	Citosólica	Citosólica ou ligada a organelas
Dependente de NADPH e BH ₄	Dependente de NADPH e BH ₄	Dependente de NADPH e BH ₄
Dioxigenase	Dioxigenase	Dioxigenase
Dependente de Ca ²⁺ /calmodulina	Dependente de Ca ²⁺ /calmodulina	Independente de Ca ²⁺ /calmodulina
Concentração de NO produzido: pmol	Concentração de NO produzido: pmol	Concentração de NO produzido: nmol
Liberação de curta duração	Liberação de curta duração	Liberação prolongada
Cromossomo 12	Cromossomo 7	Cromossomo 17

(Adaptado de Moncada et al., 1991)

A combinação enzimática de um átomo de nitrogênio com um de oxigênio forma o menor produto sintético das células de mamíferos. O NO é uma espécie reativa de nitrogênio radicalar cujas propriedades físico-químicas e biológicas são determinadas por seu pequeno tamanho (30 Da), ausência de carga e um elétron desapareado (Coleman, 2001). O elétron desapareado torna o NO um radical livre à procura de moléculas que aceitem ou compartilhem este elétron. Moléculas-alvo incluem grupos tióis, metais, oxigênio molecular (ver FIGURA 1) e outros radicais (Timothy e Billiar, 1995). As últimas duas classes de reação originam compostos que, dependendo do caso, são muito mais reativos que o próprio NO, capazes de iniciar cascatas de eventos coletivamente chamadas de efeitos indiretos do NO (TABELAS 3 e 4). Estes podem ser contrastados com os efeitos diretos (ver TABELA 2), em sua maior parte, representados pela

interação do NO com o ferro contido nos grupos prostéticos de enzimas, resultando na modulação da atividade enzimática.

O NO é um mediador fisiológico importante. No sistema nervoso, o NO é conhecido como um neurotransmissor “não-clássico”, e é responsável pela neurotransmissão em neurônios não-adrenérgicos não-colinérgicos da periferia que medeiam o relaxamento da musculatura lisa e regula a motilidade gastrointestinal (Bryk e Wolff, 1999). Além disso, centralmente, o NO modula a percepção dolorosa, a plasticidade neuronal (Christopherson e Bredt, 1997), além de estar envolvido na potencialização de longo prazo (Wilson et al., 1997). Nos vasos, o NO produzido pela eNOS controla a pressão e o fluxo sanguíneo através da interação com a guanilato ciclase solúvel e conseqüente relaxamento da musculatura lisa vascular (Rapoport e Murad, 1983). Já no sistema imune, o NO é necessário para defesa do hospedeiro, ajudando a erradicar patógenos invasores e células tumorais (Moncada et al., 1991; Nathan, 1997). Mais ainda, a presença de NO é crítica para a cicatrização normal, uma vez que promove a síntese de colágeno e a angiogênese (MacMicking et al., 1997).

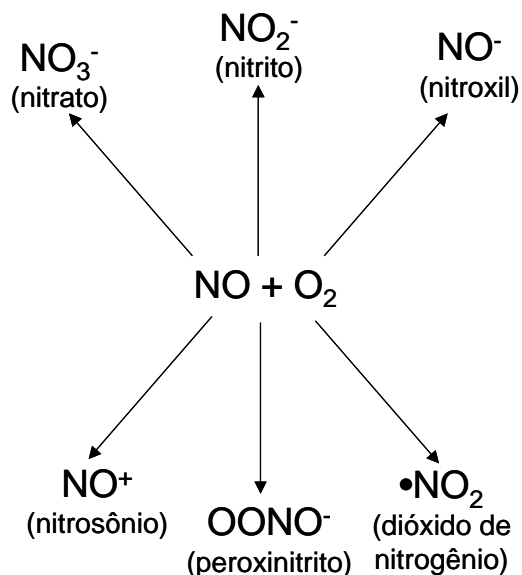


Figura 1. Produtos originados a partir da reação do NO com o O₂ (adaptado de Crow e Beckman, 1995).

Tabela 2. Efeitos diretos do NO

Reação	Alvo molecular	Efeito	Conseqüências fisiológicas	
1. Metais	Ferro do grupamento heme	Guanilato ciclase	Ativação	Vasodilatação Adesão reduzida de plaquetas e leucócitos Transdução de sinal no sistema nervoso
		Citocromo P450	Inibição	Regulação do metabolismo de esteróides e eicosanóides Metabolismo alterado de drogas
		COX Citocromo oxidase	Ativação ou inibição Inibição	Modulação da resposta inflamatória Controle fisiológico da respiração celular
	Ferro não-heme Reações redox	NOS Hemoglobina	Inibição Formação de nitrosil-hemoglobina	Auto-regulação da produção de NO Regulação alostérica da liberação de O ₂
		Tromboxano sintetase Hemoglobina	Inibição Ligação ao grupo heme	Formação reduzida de tromboxanos Formação de metahemoglobina; catabolismo do NO
		Metais polivalentes Hidroperóxidos lipídicos	Redução Seqüestro	Redução do estresse oxidativo Redução do estresse oxidativo
2. Radicais livres	Radical superóxido	Seqüestro com formação de peroxinitrito Formação de N ₂ O ₃	Redução do estresse oxidativo Efeitos indiretos Efeitos indiretos	
3. O ₂				

(Adaptado de Feihl et al., 2001)

Tabela 3. Efeitos indiretos do NO via S-nitrosação

Alvo molecular	Efeito	Conseqüências fisiológicas
Receptor de glicocorticoide	Dessensibilização	Efeito reduzido dos corticóides
Canais iônicos		
Receptores rianodine	Ativação	Liberação de Ca ²⁺ do retículo sarcoplasmático cardíaco e esquelético
Canais de Ca ²⁺ dependentes de K ⁺	Ativação	Vasodilatação
Proteínas metabólicas		
GAPDH	Inibição	Inibição da glicólise
Creatina quinase	Inibição	Geração anaeróbica de ATP reduzida
Álcool desidrogenase	Inibição	Redução do metabolismo do etanol
Enzimas do metabolismo da GSH	Inibição	Diminuição das defesas antioxidantes
Sistemas de amplificação de sinal		
PKC ¹	Inibição	Inibição das cascatas de sinalização dependentes de PKC Modulação sináptica, regulação do batimento cardíaco
Proteínas-G	Variável	
Fatores de transcrição		
NF-κB ²	Inibição	Modulação da cascata inflamatória
AP-1, c-jun, c-Myb	Inibição	Redução da atividade transcricional

(Adaptado de Feihl et al., 2001)

¹Ativação da PKC pode resultar de um efeito direto do NO²Aumento da atividade do NF-κB pode resultar de um efeito direto do NO

Tabela 4. Efeitos do peroxinitrito

Alvo molecular	Efeito	Conseqüências fisiológicas
Reações de oxidação		
DNA	Quebra da fita Modificação de bases	Ativação de PARP Mutagênese
Tióis	Oxidação de GSH Inibição de proteínas com dedos de zinco	Defesa antioxidante diminuída Inibição de fatores de transcrição
Lipídeos	Peroxidação	Dano de membrana, desmielinização, oxidação de LDL
Enzimas mitocondriais	Inibição da aconitase e complexos I, II e V	Inibição da respiração celular
Reações de nitração		
SOD	Inibição	Defesas antioxidantes diminuídas
Prostaglandina I ₂ sintase	Inibição	Efeito antiagregante e vasodilatador dependentes da PGI ₂ diminuídos
Tirosina hidroxilase	Inibição	Deficiência de dopamina
Proteínas do citoesqueleto	Estrutura alterada	Desorganização da arquitetura celular
Substrato de quinases	Estrutura alterada	Inibição da sinalização

Adaptado de Feihl et al., 2001

Embora muito importante para a sinalização fisiológica, o excesso de NO é extremamente citotóxico. Assim, a produção desregulada de NO pela nNOS está associada a várias doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e Huntington (Dawson, 1991; Christopherson e Bredt, 1997). Além disso, o NO também está envolvido no dano neuronal associado à toxicidade do glutamato (Dawson et al., 1996). Em condições inflamatórias crônicas, a iNOS é induzida, produzindo grandes quantidades de NO, que acaba lesando as células do hospedeiro, como observado em doenças autoimunes (Moilanen e Vapaatalo, 1995). Existem evidências de que a indução da iNOS medeia o dano tecidual observado na artrite reumatóide, psoríase, glomerulonefrite, diabetes, disfunção miocárdica e lúpus sistêmico (Evans et al., 1995; Dusting e MacDonald, 1995; Klahr e Morrissey, 1995). Mais ainda, a hipotensão e vasodilatação profundas observadas durante o choque séptico ou endotóxico é resultado da produção exacerbada de NO pela iNOS em resposta às citocinas e outros mediadores inflamatórios circulantes (Cobb e Danner, 1996; Johnson e Billiar, 1998).

No processo inflamatório, o papel do óxido nítrico é bastante controverso e tem sido descrito como dual. Assim, o NO exerce efeitos tóxicos, regulatórios, apoptóticos e anti-apoptóticos sobre diferentes tipos celulares em diferentes estágios do processo inflamatório (Coleman, 2001). Vários estudos mostram que o NO inibe a ativação e degranulação assim como a síntese de mediadores mastocitários, desta forma inibindo processos inflamatórios dependentes desta célula, como por exemplo, a asma (Coleman, 2002). Adicionalmente, a administração de inibidores das NOS aumenta a degranulação de mastócitos na mucosa intestinal e a adesão de leucócitos ao endotélio

vascular de ratos (Kanwar et al., 1994; Kimura et al., 1999). Fernandes et al. (2002) demonstraram que o tratamento prévio (4 h) de camundongos com doadores de NO foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela carragenina, dextrana, BK e histamina, sendo que os efeitos inibitórios parecem depender da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio. Outras evidências do papel antiinflamatório do NO são fornecidas por Paul-Clark et al. (2001) que mostram que a administração local de inibidores das NOS aumenta a exsudação e o influxo de células inflamatórias no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em ratos. Os autores afirmam que a inibição da produção de NO intensifica o processo inflamatório pelo aumento da liberação de histamina, leucotrieno B₄ (LTB₄) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Adicionalmente, o NO diminui a liberação de proteína quimioatrativa para monócitos (MIP-1) assim como inibe a expressão da molécula de adesão VCAM-1 em células endoteliais humanas em cultura (Walley et al., 1999).

Por outro lado, o NO dilata a microvasculatura promovendo assim o aumento da permeabilidade vascular que culminará na formação de edema (Giraldelo et al., 1994). Mais ainda, a administração de inibidores não-seletivos das NOS inibe o edema de pata de rato induzido pela injeção intraplantar de adjuvante de Freund, fragmentos da parede de estreptococos e carragenina, além da pleurisia induzida por este último agente em ratos (Handy e Moore, 1998). Estudos realizados com camundongos cujo gene da iNOS foi deletado sugerem que esta isoforma está envolvida na inflamação, uma vez que os camundongos mutantes são resistentes ao dano pulmonar e à pleurisia induzidos pela carragenina (Rossi, 2003; Cuzzocrea et al., 2000). Vários trabalhos mostram que o

NO aumenta a síntese/liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, ROS (ver TABELA 5) e prostanóides (Omote et al., 2001). A relação do NO com os prostanóides foi amplamente estudada, ficando estabelecido que o NO é capaz de ativar a ciclooxigenase (COX) aumentando a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Sautebin et al., 1998). Neste mesmo artigo, os autores mostraram que o inibidor não-seletivo da NOS, o L-NAME assim como o seqüestrador de NO, a hemoglobina, são capazes de diminuir o aumento dos níveis de PGE₂ no exsudato pleural decorrente da injeção de carragenina. Em células sinoviais de pacientes com artrite ou osteoartrite, foi demonstrado que o NO exógeno (proveniente de um doador desta molécula) induz a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Honda et al., 2000). Além disso, foi visto que o NO aumenta a expressão de COX-2 induzida pela interleucina-1 β (IL-1 β) em células mesangiais de ratos (Tetsuka et al., 1996). Já na linhagem de macrófagos murinos ANA-1, o NO não é requerido para a síntese *de novo* de COX-2 mas é muito importante para a expressão prolongada da enzima (Perkins e Kniss, 1999). A relação entre NOS e COX também foi demonstrada em camundongos deficientes em iNOS. Nestes animais, o aumento significativo dos níveis de prostaglandinas não é observado após a injeção intrapleural de carragenina, ficando claro que a geração de prostaglandinas no sítio inflamatório encontra-se, pelo menos em parte, sob o controle do NO (Rossi et al., 2003). A constatação de que o NO possui efeito bifásico sobre a atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Connelly et al., 2001) é bastante importante e explica, pelo menos em parte, as ações duais do NO durante o processo inflamatório. Através deste mecanismo, que depende de sua

concentração local, o NO pode ativar ou inibir a expressão de diversas proteínas reguladas pelo NF- κ B, modulando assim o perfil de ativação de células imunes. Assim, em estágios iniciais do processo inflamatório, o NO possui papel pró-inflamatório, ativando o NF- κ B, conseqüentemente aumentando a expressão de proteínas inflamatórias, dentre elas a iNOS, enquanto que em fases mais tardias, sendo produzido em maiores quantidades, o NO possui um efeito inibitório sobre a ativação do NF- κ B, iniciando a fase de resolução do processo inflamatório (Connelly et al., 2001).

Tabela 5. Exemplos de espécies reativas de oxigênio (ROS) radicalares e não radicalares.

Radicalares	Não radicalares
$O_2^{\bullet -}$ superóxido	H_2O_2 peróxido de hidrogênio
OH^{\bullet} hidroxil	HOCl ácido hipocloroso
$RO_2^{\bullet -}$ peroxil	O_3 ozônio
RO^{\bullet} alcoxil	$^{\bullet}\Delta g$ oxigênio singlet
HO_2^{\bullet} hidroperoxil	

(Adaptado de Halliwell, 1997)

O papel ainda controverso do NO na inflamação é apenas uma dentre as muitas evidências da complexidade do processo inflamatório. Por ter uma regulação complexa, o tratamento ideal da inflamação é igualmente complicado. Neste sentido, para o tratamento de doenças inflamatórias, o arsenal terapêutico atual é composto quase que exclusivamente por fármacos antiinflamatórias não-esteroidais, cuja ação se dá pela inibição da produção de prostaglandinas decorrente do bloqueio das enzimas ciclooxigenases (Kouroumakis et al., 1999; Sautebin, 2000). Entretanto, esta estratégia terapêutica freqüentemente apresenta

resultados insatisfatórios assim como possui efeitos colaterais gástricos e renais (Sautebin et al., 2000). Desta forma, torna-se necessária a procura por novas moléculas com ação antiinflamatória.

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, habitação, utilidades domésticas e como meio restaurador da saúde. Nos dias de hoje, representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo homem (Schenkel et al., 1999).

As plantas são uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais podem servir como modelo para a síntese de um grande número de fármacos, devido à imensa diversidade em termos de estrutura, propriedades físico-químicas ou biológicas. Considerando-se a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos principais distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade dos produtos naturais é muito maior do que aquela de produtos derivados de processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda são limitados. Além disso, como são produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais àquelas particularmente estudadas (Nodari e Guerra, 1999). Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais. A descoberta das substâncias ativas presentes nas plantas medicinais juntamente com o início da síntese

orgânica alavancaram uma revolução científica e tecnológica, alterando muito rapidamente o arsenal terapêutico (Schenkel et al., 1999).

Estima-se que 25% de todos os medicamentos do mercado atual são derivados direta ou indiretamente de plantas. Como exemplo de agentes terapêuticos atualmente importantes obtidos de fontes naturais, podem ser citados a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, a quinina, a artemisina, a atropina, a escopolamina e o captopril, além de fármacos usados no tratamento do câncer como a vinblastina, a vincristina e o paclitaxel (Calixto et al., 2001). Além disso, várias moléculas derivadas de plantas com grande potencial de ação antiinflamatória encontram-se descritas na literatura; a maioria delas em fase pré-clínica de pesquisa, mas algumas já na fase clínica (ver para revisão Calixto et al., 2003a e b). Como exemplo pode-se citar a curcumina, um pigmento amarelo presente nos rizomas da planta *Curcuma longa* L., encontrada no sul da Ásia. Além de seu uso como condimento alimentício, a curcumina é empregada para o tratamento de várias desordens inflamatórias e no auxílio da cicatrização. Foi descrito que a curcumina possui ações antioxidantes, hepatoprotetoras e antitumorais, além de exibir efeitos antiinflamatórios em modelos animais de doença de Alzheimer, artrite e pancreatite (Calixto et al., 2003a). Recentemente avaliada em seres humanos, a curcumina demonstrou ser segura e promissora para o tratamento de doenças inflamatórias (Calixto et al., 2003b).

De forma similar aos microorganismos, as plantas produzem uma grande diversidade de compostos químicos, sendo que estes produtos podem ser divididos em 2 grandes grupos. O primeiro deles é o grupo dos metabólitos primários, que abrange substâncias essenciais a todos os seres vivos como

lipídeos, proteínas e glicídeos. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas e freqüentemente desconhecidas, originam o segundo grupo de compostos químicos, os metabólitos secundários, que geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcante atividade biológica e, diferentemente dos metabólitos primários, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas. Sabe-se atualmente que embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, os metabólitos secundários garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie produtora (Santos, 1999). Diversas ações já foram descritas para os metabólitos secundários, incluindo a de defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores e dispersores de sementes (Santos, 1999).

Os metabólitos secundários também possuem amplo espectro de ações biológicas em organismos outros que não o produtor. Assim, foi visto que a maioria destas substâncias interfere direta ou indiretamente com as seguintes moléculas e/ou mecanismos: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas aminoácidos excitatórios, dentre outros), produção e/ou ação de segundos mensageiros como monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), GMPc, diversas proteínas quinase, cálcio, dentre outros, ativação de fatores de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B) e proto-oncogenes (*c-jun*, *c-fos* e *c-myc*), assim como a expressão de diversas moléculas pró-inflamatórias como a iNOS, a COX-2, citocinas (IL-1 β , TNF- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (Calixto et al., 2003a).

Os fenilpropanóides são metabólitos secundários, produzidos a partir da L-fenilalanina ou da L-tirosina pela via do chiquimato e caracterizados por uma cadeia lateral de 3 átomos de carbono ligada a um anel aromático (Santos, 1999). Vários trabalhos descrevem ações antimicrobianas, antialérgicas, antiinflamatórias e anti-mutagênicas *in vitro* e *in vivo* para compostos pertencentes à classe dos fenilpropanóides (Castelluccio et al., 1995; Andreasen et al., 2001; Youdim et al., 2002; Kern et al., 2003).

O ácido 3,4-di-hidroxi-cinâmico, também chamado de ácido caféico, é um fenilpropanóide derivado do ácido cinâmico, amplamente distribuído nos tecidos vegetais (Nardini et al., 1998). Este composto é conhecido como um potente antioxidante, capaz de fazer o seqüestro de radicais DPPH (Silva et al., 2000; Kikuzaki et al., 2002) e peroxil (Castelluccio et al., 1995) além de inibir a oxidação do LDL *in vitro* em diferentes condições (Castelluccio et al., 1995; Andreasen et al., 2001; Cartron et al., 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que o ácido caféico é capaz de impedir a formação de compostos mutagênicos como as nitrosaminas (Andreasen et al., 2001; Nardini et al., 2001; Tapiero et al., 2002), além de inibir as enzimas 5 e 12 lipooxigenases, diminuindo a formação de leucotrienos *in vitro* (Koshihara et al., 1984). Ademais, Nardini et al. (2000 e 2001) demonstraram que o ácido caféico inibe a proteína quinase C (PKC) e a proteína quinase A (PKA) além de diminuir a ativação do NF- κ B induzida por ceramidas em células U937. Derivados do ácido caféico como, por exemplo, o ácido caféico fenetil ester (CAPE) também possuem um amplo espectro de ações biológicas. Originalmente isolado da propolis, o CAPE é um inibidor potente e específico do

NF- κ B (Natarajan et al., 1996). Além disso, assim como o ácido caféico, o CAPE possui atividade antioxidante (Sud'ina et al., 1993; Russo et al., 2002), sendo capaz de inibir a peroxidação lipídica e a atividade de xantina oxidase além de fazer o seqüestro do ânion superóxido e radicais DPPH (Russo et al., 2002). Adicionalmente, foi relatado que o CAPE é capaz de inibir a atividade da 5-lipooxigenase (5-LOX) extraída da cevada (Sud'ina et al., 1993), assim como a produção de prostagladina E₂ (PGE₂) estimulada por forbol miristato acetato (PMA) em células epiteliais orais humanas (Michaluart et al., 1999). Quando administrado a ratos, o CAPE foi capaz de inibir a migração de leucócitos induzida pela carragenina no modelo da bolha de ar (Orban et al., 1999) bem como o aumento de volume da pata quando da aplicação de carragenina intradérmica (Borrelli et al., 2002). Em um modelo de dano vascular em ratos, a administração crônica de CAPE foi capaz de inibir a expressão de COX-2, a ativação do NF- κ B e a restenose (proliferação da neoíntima) (Maffia et al., 2002).

Recentemente, foi demonstrado que um segundo derivado do ácido caféico, o octil cafeato foi capaz de inibir a expressão da iNOS induzida por lipopolissacarídeo bacteriano/interferon- γ (LPS/IFN- γ) em células musculares lisas de aorta de rato sendo que esta inibição parece ser decorrente da inibição da fosforilação de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) envolvidas na indução da iNOS (Hsiao et al., 2003).

As ações antioxidantes e antiinflamatórias já descritas para o ácido caféico e alguns de seus derivados fazem destes compostos interessantes moléculas providas de grande potencial terapêutico. Esta última constatação aliada à

necessidade de novas moléculas antiinflamatórias levou-nos a examinar o efeito de alguns derivados do ácido caféico em modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Estudar os efeitos dos derivados do ácido caféico sobre o acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS.
2. Comparar a potência de inibição do acúmulo de nitrito dos diferentes derivados do ácido caféico.
3. Estabelecer uma relação estrutura / atividade para a inibição do acúmulo de nitrito.
4. Avaliar alguns mecanismos envolvidos na inibição do acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.
5. Verificar se as ações biológicas obtidas *in vitro* se estendem ao modelo *in vivo* de edema de pata induzido pela carragenina, comparando os efeitos observados com os da dexametasona, um antiinflamatório esteroide clássico.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolos experimentais *in vitro*

Compostos estudados

Os compostos estudados foram 6 ésteres derivados do ácido caféico, sintetizados pelo Prof. Rivaldo Niero (NIQFAR/CCS/UNIVALI). São eles: ácido caféico metil éster (metil), ácido caféico etil éster (etil), ácido caféico butil éster (butil), ácido caféico octil éster (octil), ácido caféico benzil (benzil) éster e ácido caféico fenetil ester (fenetil). Os nomes dos derivados foram abreviados conforme indicado pelos parênteses acima. As estruturas dos compostos encontram-se representadas na tabela 6 na sessão de resultados.

Cultura celular

A linhagem celular de macrófagos/monócitos murinos RAW 264.7 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC – Rockville, USA). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 2 mM de L-glutamina, suplementado com 5 % de soro de bezerro, 150 U/ml de penicilina, 150 µg/ml de estreptomicina e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5 % de CO₂.

Ensaio de produção de NO por células RAW 264.7

As células RAW 264.7 foram colocadas em placas para cultura de 96 poços e incubadas até atingir a confluência. Doze horas antes dos experimentos, o DMEM original (com soro) foi substituído por DMEM sem soro. As células foram

expostas a diferentes concentrações de um dos dos seguintes derivados do ácido caféico: metil (6,25 – 50 μ M), etil (6,25 – 50 μ M), butil (3,125 – 50 μ M), octil (1,5625 – 25 μ M), benzil (1,5625 – 25 μ M) e fenetil (1,5625 – 25 μ M) 30 min antes da adição de LPS (0,5 μ g/ml). Decorridas 24 h, 100 μ l do sobrenadante celular foram misturados ao mesmo volume de reagente de Griess (1% sulfanilamida em ácido fosfórico 5% e 0,1 % de diidrocloreto de naftiletlenodiamina em água; 1:1). A absorbância da mistura foi determinada em leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) em 550 nm. As concentrações de nitrito nas amostras foram calculadas por regressão linear utilizando-se uma solução padrão de nitrito de sódio preparada em DMEM.

Em outro grupo de experimentos, a fim de verificar se os compostos estariam reduzindo os níveis de nitrito por transformarem NO em nitrato, uma alíquota de 100 μ l do sobrenadante foi misturada a 20 μ l de formiato de amônio (2,4 M), 20 μ l de fosfato de sódio (0,5 M) e *E. coli* (12 μ g/proteína/ml; fonte de nitrato redutase). A mistura foi incubada a 37°C por 3 h, centrifugada (2500 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi misturado ao reagente de Griess. As concentrações de nitrito foram determinadas como descrito acima.

Incubação dos derivados do ácido caféico com solução de nitrito de sódio

Para verificar a possibilidade da interação dos compostos estudados com o nitrito, foram realizados experimentos onde uma solução de nitrito de sódio a 17 μ g/ml em DMEM foi incubada na presença ou ausência dos derivados do ácido

caféico por 24 h a 37 °C, em tubos Eppendorf™. Decorrido este tempo, o nitrito foi quantificado pela reação de Griess conforme a descrição anterior.

Ensaio da viabilidade celular

Com o objetivo de verificar se os compostos estudados afetam a viabilidade das células RAW 264.7, foi realizado o ensaio de MTT [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio], de acordo com o método descrito por Van de Loosdrecht et al. (1991). O princípio deste método reside no fato de que o MTT é capaz de entrar na célula e ser oxidado a MTT-formazan pelo superóxido produzido durante a atividade mitocondrial. Desta forma, a oxidação do MTT em seu produto corado MTT-formazan é proporcional à atividade mitocondrial e por conseguinte, à viabilidade celular. Após a coleta do sobrenadante para quantificação de nitrito, o meio restante nos poços foi desprezado e substituído por 100 µl de DMEM novo contendo 10% v/v de uma solução de MTT 5 mg/ml (PBS). A seguir, as células foram incubadas por 3 h em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi novamente desprezado e os poços foram preenchidos com 100 µl de solução de álcool isopropílico/HCl 0,04 N. Após centrifugação da placa para obtenção de um sobrenadante livre de material particulado, a absorbância foi quantificada em leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) em 550 nm. A viabilidade celular foi calculada considerando-se a absorbância dos grupos-controle como 100%.

Ensaio da produção de nitrito por SNAP

Para verificar se os derivados do ácido caféico interagem diretamente com o NO, foi utilizado um sistema de liberação de NO sem células, onde a fonte de NO é um doador desta molécula (Virgili et al., 1998, Xiong et al., 2000, Creczynski-Pasa, 2001). Para isso, 1 ml de uma solução 300 μ M de S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) foi incubado em DMEM na presença ou ausência dos derivados estudados, nas mesmas condições da cultura celular (24 h, 37°C, 5% de CO₂). Após este período de tempo, alíquotas de 100 μ l da solução foram retiradas e os níveis de nitrito foram medidos pela adição do reagente de Griess.

Preparação e medida da atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) de macrófagos RAW 264.7

A iNOS foi obtida a partir de células RAW 264.7 estimuladas com LPS (0,5 μ g/ml) por 8 h. Após este período, as células foram removidas das garrafas de cultura, centrifugadas (2000 x g, 5 min), ressuspensas em tampão de lise (320 mM de sucrose, 50 mM de Tris-HCl, 2 mM de DTT, 10 μ g/mL de inibidor da tripsina derivado da soja, 10 mg/mL de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 20 mM de molibdato de sódio, 10% v/v de glicerol, pH 7.2) e mantidas a -70 °C até o uso. No dia dos experimentos, as células foram lisadas por ultrassom, o lisato foi centrifugado (30.000 x g, 30 min) e o sobrenadante utilizado como fonte de iNOS. A atividade da iNOS foi medida através da conversão de ³H-L-arginina em ³H-L-citrulina, onde o produto é separado do substrato por uma resina de troca iônica (Bredt e Snyder, 1990). Cinquenta microlitros de sobrenadante (200 μ g de proteína) foram

adicionados a uma mistura contendo 50 mM de KH_2PO_4 ; 1,2 mM de MgCl_2 ; 0,25 mM de CaCl_2 ; 60 mM de L-valina; 1,2 mM de L-citrulina, 1 mM de DTT, 5 μM L-arginina, 4 μM de FAD, 4 μM de FMN, 10 μM de BH_4 , 200 μM de NADPH e o equivalente a 0,1 μCi de (^3H)-L-arginina (pH 7.2), e incubadas por 1 h a 37°C, sendo a reação foi terminada com a adição de 500 μl de resina Dowex (AG-50 x 8, forma sódica, 1:1 em água, pH 6.7). Depois de cetrifugação a 10.000 x g por 3 min a temperatura ambiente, 100 μl do sobrenadante foram misturados a 1 ml de líquido de cintilação (58% de fluido de cintilação [6 g/l de PPO + 0,2 g/l de POPOP em tolueno], 34% de Triton X-100 e 8% de água de milli-Q). O tubo de ensaio foi vigorosamente agitado e a radioatividade foi quantificada em um contador β de cintilação líquida (1600 TR - Packard). A determinação protéica do sobrenadante foi feita através de absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm em cubetas de quartzo. Para a quantificação da atividade cálcio-independente (atividade da iNOS), o EGTA (1mM) foi adicionado ao tampão de ensaio. Para cada amostra, foi incluído um tubo branco contendo 1 mM de EGTA, 1 mM de L-NIO e 1 mM de aminoguanidina (AMG) no tampão de ensaio. Os resultados encontram-se expressos em pmol de citrulina / min / mg de proteína.

Determinação da expressão da iNOS

O extrato citoplasmático utilizado para a determinação da expressão da iNOS foi preparado pelo método descrito por Wadsworth e Koop (1999), com algumas modificações. Dois ml contendo 10^6 células RAW 264.7 foram colocados em cada poço de uma placa de 6 poços. Decorridas 32 h, as células foram

lavadas e 3 ml de DMEM sem soro foram colocados em cada poço. O veículo, os compostos ou a cicloheximida (controle positivo) foram adicionados às células 30 min antes da estimulação com LPS (0,5 µg/ml). Após 16 h de incubação, as células foram coletadas em tampão fosfato (PBS) e centrifugadas (1000 x g, por 10 min, 4 °C). Os pellets foram ressuspensos em tampão de lise (10 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de ditioneitol (DTT), 0,5 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 10 mM de HEPES, pH 7,6) e deixadas em gelo por 20 min. Posteriormente, as amostras foram sonicadas por 5 segundos e novamente centrifugadas (12 000 x g, 5 min, 4 °C). O sobrenadante (extrato citosólico) foi utilizado para o ensaio da expressão da iNOS, sendo que a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Os extratos foram fervidos com quantidades equivalentes (v/v) de tampão de Laemmli (125 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol e 0,1% de azul brilhante de Comassie, pH 6,8) e 3 µg de proteínas foram colocadas em cada poço do gel de poliacrilamida 10%. Depois de separadas no gel por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) por 4 h a 300 mA. As membranas foram bloqueadas com solução de leite desnatado a 5% (p/v) em salina tamponada com Tris e acrescida com *tween* 20 (TBS-T) por 16 h, sendo posteriormente incubadas com IgG de coelho anti-iNOS diluído 1:10000 ou com IgG de bode anti-actina por 2 h. Após lavagem com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de coelho ou anticorpo anti-IgG de bode ligados à peroxidase diluídos 1:2000 e 1:5000, respectivamente por 1 h. As bandas

imunorreativas foram visualizadas usando-se um kit de aumento de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences) e filme radiográfico.

Protocolos experimentais *in vivo*

Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando camundongos machos Suíços pesando entre 20 – 30 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os camundongos foram mantidos em estantes ventiladas para animais, em sala com temperatura ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (60-80 %) controladas e ciclo de claro/escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas de manejo com animais de laboratório e normas éticas para investigação em animais conscientes (Zimmerman, 1983).

Edema de pata

Os experimentos de edema de pata foram realizados conforme descrito por Campos e Calixto (1995) com algumas modificações. Os animais foram pré-tratados com os derivados do ácido caféico (30 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.), -1 h), com dexametasona (0,5 mg/kg, por via subcutânea (s.c.), -4 h) -doses determinadas com base em estudos anteriores (Russo et al., 2002)- ou ainda com veículo (dimetilsulfóxido - DMSO 2% em solução salina, i.p., -1 h). Uma vez que o peso molecular dos derivados não é o mesmo, quando expressa em $\mu\text{mol/kg}$, a dose dos derivados butil, octil e fenetil foi de: 127, 105 e 102, respectivamente. O

edema de pata foi induzido pela injeção intradérmica (i.d.) de 50 μ l de solução salina (0,9%) contendo 300 μ g de carragenina na pata traseira direita. A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina (50 μ l) e foi usada como controle. O edema foi avaliado em pletismômetro (Ugo Basile, Itália) em vários intervalos de tempo (0,5 a 96 h) após a injeção de carragenina. O edema de pata foi expresso em μ l como a diferença de volume entre as patas direita e esquerda.

Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO) na pata

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e em outras células de origem mielóide, e é utilizada como um indicativo indireto da migração de neutrófilos para o sítio da inflamação (Miotla et al., 1998). Com o objetivo de quantificar os neutrófilos que migraram para o tecido das patas após a injeção de carragenina, utilizou-se a medida da atividade da mieloperoxidase, como descrito previamente por De Young e colaboradores (1989). Os animais foram pré-tratados com os derivados do ácido caféico (30 mg/kg, por via i.p., -1 h), com dexametasona (0,5 mg/kg, por via s.c., -4 h) ou ainda com veículo (DMSO 2% em solução salina, pela via i.p., -1 h) e a migração de neutrófilos foi induzida pela injeção i.d. de 50 μ l de solução salina (0,9%) contendo 300 μ g de carragenina na pata traseira direita. Após 360 min, os animais foram sacrificados e o tecido subcutâneo das patas foi retirado e homogeneizado em tampão fosfato 0,08 M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio. O homogenato obtido foi centrifugado (11000 x g, 4°C, 20 minutos) e a atividade da MPO foi avaliada no sobrenadante através da mudança

na densidade ótica (D.O.) em 650 nm, utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM). Os resultados foram expressos em D.O./mg de tecido.

Determinação dos níveis de IL-1 β na pata

Os níveis da citocina pró-inflamatória interleucina-1 β (IL-1 β) foram medidos utilizando-se uma metodologia similar àquela descrita previamente (Francischi et al., 2000). Os animais foram pré-tratados com os derivados do ácido caféico (30 mg/kg, por via i.p., -1 h), com dexametasona (0,5 mg/kg, por via s.c., -4 h) ou ainda com veículo (DMSO 2% em solução salina, pela via i.p., -1 h) e o aumento dos níveis de IL-1 β foi induzido pela injeção i.d. de 50 μ l de solução salina (0,9%) contendo 300 μ g de carragenina na pata traseira direita. Decorridos 360 min, o tecido subcutâneo da pata direita traseira dos animais foi removido e homogeneizado com PBS contendo Tween 20 0,05%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, cloreto de benzametônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e aprotinina 2 μ g/ml. O homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 10 min e o sobrenadante armazenado a -70 °C por no máximo 7 dias. Os níveis de IL-1 β foram medidos utilizando-se kits de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante.

Drogas e reagentes

Garrafas e placas de cultura foram adquiridas da Costar (New York, U.S.A.). Meio de cultura - DMEM, soro e reagentes utilizados na cultura celular foram obtidos da GIBCO BRL Life Technologies (Rockville, MD, U.S.A.). Os reagentes de Griess, formiato de amônio e o sulfato de zinco são da Merck (Rahway, NJ, U.S.A.). O Tween 20 e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram adquiridos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). A membrana de PVDF é da Millipore (Bredford, MA, U.S.A.). A arginina radioativa ([³H]-L-arginina) assim como os reagentes usados na separação de proteínas por eletroforese e na reação de quimioluminescência são da Amersham Biosciences (São Paulo, Brasil). Os anticorpos anti IgG de coelho e de bode ligados à peroxidase assim como o anticorpo anti-actina são da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). O LPS (sorotipo O111:B4), carragenina (lambda IV), cicloheximida, dexametasona, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), ácido caféico fenetil éster, anticorpo policlonal de coelho contra a iNOS, Tris, sucrose, ditioneitol (DTT), inibidor da tripsina derivado da soja, fluoreto de fenilmetilsulfonil, molibdato de sódio, glicerol, KH₂PO₄, MgCl₂, CaCl₂, L-valina, L-citrulina, resina Dawex, EGTA, L-NIO e AMG foram adquiridos da Sigma Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). O S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Jamil Assrey (Departamento de Farmacologia, UFSC). O kit de ELISA para IL-1 β foi adquirido da R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.). Os derivados do ácido caféico foram dissolvidos imediatamente antes dos

experimentos em DMSO em concentrações finais abaixo de 0,1% para os ensaios *in vitro* e iguais a 2% para os experimentos *in vivo*.

Análise estatística

Todos os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M), exceto os valores das concentrações inibitórias 50% (CI50) que são apresentados como média geométrica acompanhada por seus respectivos limites de confiança 95%. Estes valores foram determinados pelo método dos quadrados mínimos para experimentos individuais. A comparação estatística dos dados foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Dunnett. Valores de p menores que 0,05 foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS

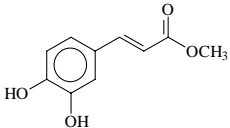
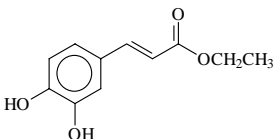
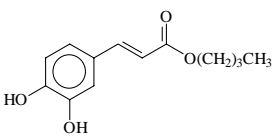
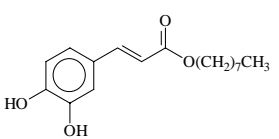
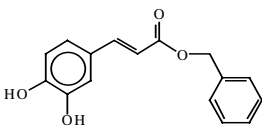
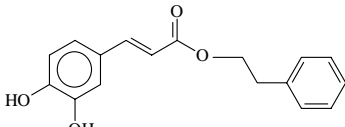
A exposição de macrófagos RAW 264.7 ao LPS (0,5 µg/ml) por 24 h resultou em um aumento marcante (30 a 40 vezes) dos níveis de nitrito no sobrenadante celular (Fig. 2). A pré-incubação (- 30 min) dos derivados do ácido caféico foi capaz de reduzir de forma significativa e de forma dependente da concentração o aumento dos níveis de nitrito. As inibições máximas observadas foram $61\pm 3\%$, $76\pm 1\%$, $93\pm 1\%$, $89\pm 3\%$, $88\pm 2\%$ e $94\pm 5\%$, respectivamente, para os derivados metil (50 µM), etil (50 µM), butil (25 µM), octil (12,5 µM), benzil (25 µM) e fenetil (12,5 µM), respectivamente. Como mostra a tabela 6, as CI50 calculadas encontram-se na faixa de µM e diminuem a medida em que o tamanho da cadeia alquílica lateral aumenta, sugerindo que a cadeia lateral é um determinante importante da potência dos compostos na inibição do nitrito. Além disso, as CI50 obtidas para os derivados foram menores do que aquelas reportadas para os inibidores aminoguanidina e o L-NAME (54 µM e 61 µM, respectivamente) (Noguchi et al., 2003).

Quando testados em concentrações iguais ou superiores a 25 µM, os derivados octil e fenetil apresentaram toxicidade significativa quando avaliados nos experimentos de viabilidade celular através do método do MTT (tabela 7). Entretanto, é importante salientar que não foi observada toxicidade para nenhum dos compostos em concentrações próximas aos valores das CI50.

O NO produzido é oxidado espontaneamente em nitrito e nitrato (Virgili et al, 1998). Uma vez que a reação de Griess detecta somente nitrito, e a fim de verificar se os derivados do ácido caféico não estariam convertendo todo o NO

produzido em nitrato, diminuindo assim os níveis de nitrito, os sobrenadantes dos macrófagos foram incubados com *E. coli* para conversão de todo nitrato em nitrito, antes da reação de Griess. Como pode ser observado na figura 3, em amostras incubadas com *E.coli*, os níveis de nitrito duplicam (de $20,7 \pm 4,5 \mu\text{M}$ para $39,2 \pm 6 \mu\text{M}$). Entretanto, a inibição decorrente do pré-tratamento com os compostos ($49 \pm 5 \%$, $44 \pm 6 \%$, $54 \pm 20\%$, $41 \pm 9\%$, $44 \pm 3 \%$ e $52 \pm 5 \%$ para os derivados metil ($25 \mu\text{M}$), etil ($25 \mu\text{M}$), butil ($8,5 \mu\text{M}$), octil ($2,5 \mu\text{M}$), benzil ($10 \mu\text{M}$) e fenetil ($5 \mu\text{M}$), respectivamente), continua presente ($37 \pm 0,7 \%$, $45 \pm 2 \%$, $36 \pm 3\%$, $40 \pm 5\%$, $53 \pm 8 \%$ e $49 \pm 2 \%$ para os derivados metil ($25 \mu\text{M}$), etil ($25 \mu\text{M}$), butil ($8,5 \mu\text{M}$), octil ($2,5 \mu\text{M}$), benzil ($10 \mu\text{M}$) e fenetil ($5 \mu\text{M}$), respectivamente), mostrando que os derivados não estão interferindo na via de oxidação do NO.

Tabela 6. Estrutura química dos derivados do ácido caféico e CI50 obtidas para inibição do acúmulo de nitrito no sobrenadante de células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

Composto	Inibição de nitrito (CI50 (LC95%) μM)	Estrutura química
Ácido caféico metil éster	21 (13 – 35)	
Ácido caféico etil éster	12 (11 – 13)	
Ácido caféico butil éster	8,4 (8 – 9)	
Ácido caféico octil éster	2,4 (2 – 3)	
Ácido caféico benzil éster	10,7 (8 – 13)	
Ácido caféico fenetil éster	4,8 (2,8-8,4)	

As CI50 se encontram apresentadas como média geométrica de três experimentos acompanhada por seus respectivos limites de confiança 95%.

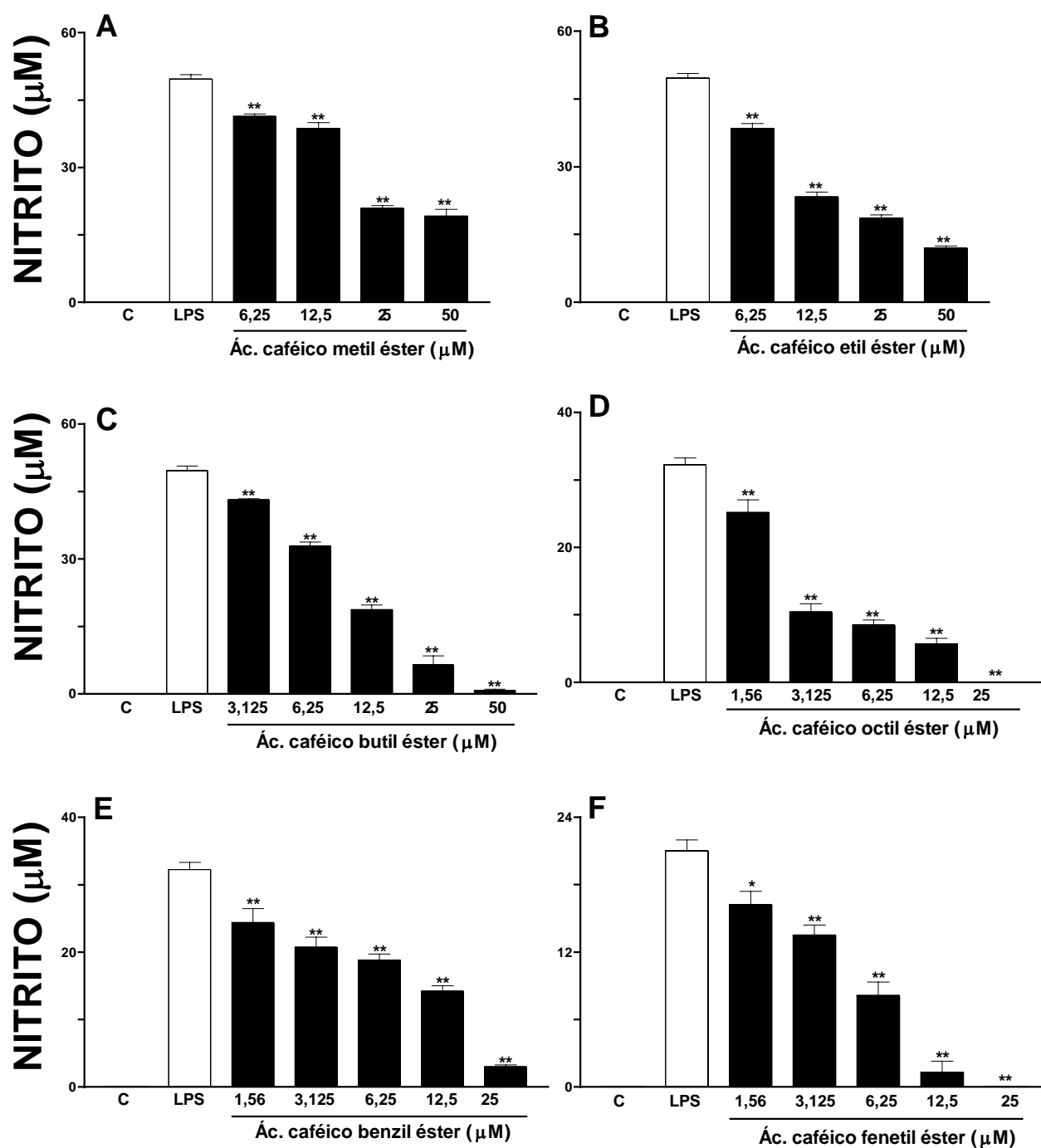


Figura 2. Efeito da pré-incubação (-30 min) com os derivados metil (A), etil (B), butil (C), octil (D), benzil (E) e fenil (F) sobre o acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (0,5 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos - E.P.M. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. C = controle (células sem tratamento nem estímulo).

Tabela 7. Viabilidade celular das células RAW 264.7 após 24 h de incubação com os derivados.

Composto	Viabilidade celular (% do controle)			
	50 μ M	25 μ M	12,5 μ M	6,25 μ M
Ácido caféico metil éster	86,6 \pm 12,3	95,5 \pm 4,5	100 \pm 1	-
Ácido caféico etil éster	86,3 \pm 11,7	98 \pm 2	99,5 \pm 0,5	-
Ácido caféico butil éster	64,6 \pm 17,7	91,5 \pm 8,5	98,5 \pm 1,5	-
Ácido caféico octil éster	-	22,6 \pm 2,6**	84,6 \pm 7,4	93,3 \pm 6,6
Ácido caféico benzil éster	-	86,3 \pm 7,8	97,3 \pm 2,6	100 \pm 1
Ácido caféico fenetil éster	-	62,3 \pm 4,9**	97 \pm 2	99 \pm 1

Os resultados de três experimentos encontram-se descritos como média \pm E.P.M. Significativamente diferentes do controle ** $p < 0.01$.

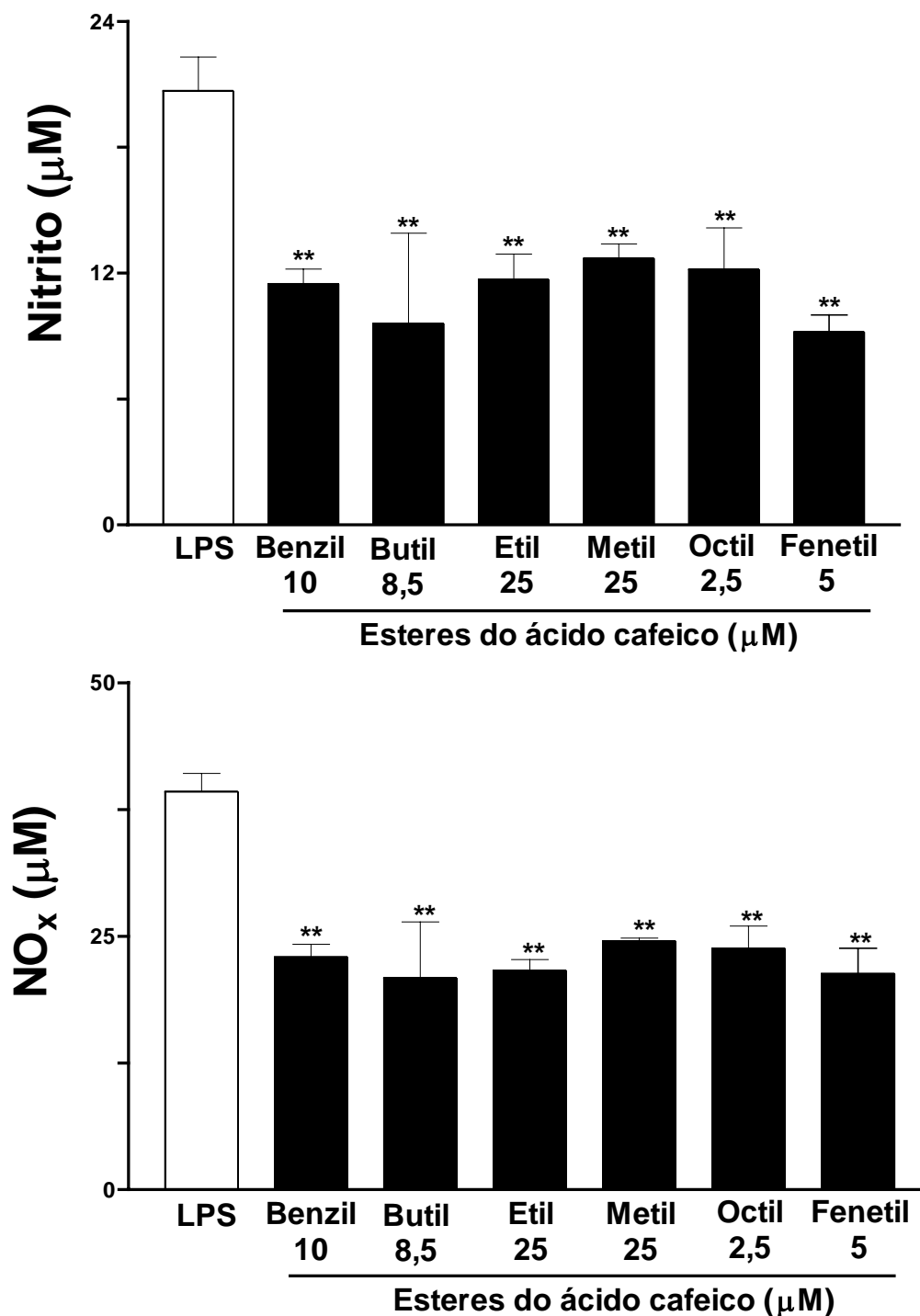


Figura 3. Efeito da pré-incubação (-30 min) dos derivados do ácido caféico sobre o acúmulo de nitrito e de nitrito+nitrato (NO_x) no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (0,5 µg/ml) por 24 h. Para conversão do nitrato em nitrito, foi utilizada a *E. coli* como fonte de nitrato redutase. Os resultados correspondem à média de três experimentos - E.P.M. Significativamente diferentes do grupo LPS, ** $p < 0,01$.

A diminuição do nitrito pelos compostos estudados também poderia estar sendo mediada pela interação do próprio nitrito formado com os compostos. Para avaliar esta possibilidade, os compostos foram incubados por 24 h a 37 °C com uma solução de nitrito de sódio, sendo o nitrito quantificado pela reação de Griess. Como mostra a figura 4, nenhum dos derivados alterou de forma significativa os níveis de nitrito pré-existentes no meio de cultura, indicando que os derivados do ácido caféico não reagem com o nitrito.

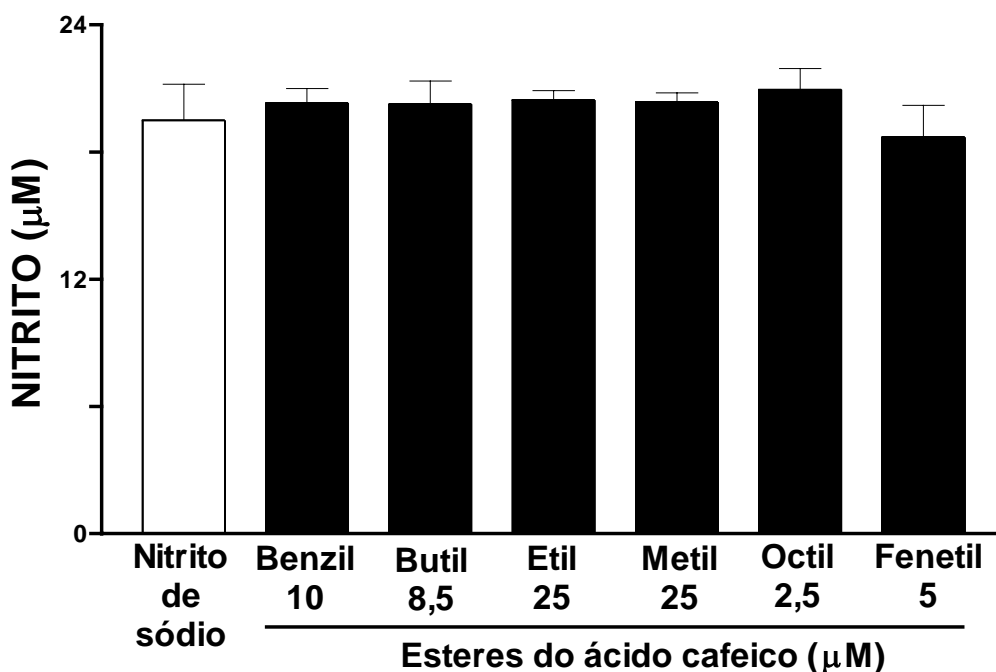


Figura 4. Efeito da incubação dos derivados do ácido caféico por 24 h sobre os níveis de nitrito pré-existentes. Os resultados correspondem à média de três experimentos - E.P.M.

Para avaliar a possível ocorrência de uma interação direta entre os derivados do ácido caféico e o NO, foi realizado um ensaio utilizando SNAP como fonte de NO. A incubação do doador de NO, o SNAP (300 µM) em DMEM sem soro por 24 h resultou em um acúmulo marcante de nitrito ($51 \pm 3,7$ µM; Fig. 5). Na presença dos derivados, esta quantidade de nitrito foi reduzida de forma

significativa e dependente da concentração. As inibições máximas obtidas foram de $49\pm 0,5\%$, $44\pm 1\%$, $44\pm 1\%$, $29\pm 2\%$, $34\pm 3\%$ e $49\pm 4\%$ para os derivados metil ($50\ \mu\text{M}$), etil ($25\ \mu\text{M}$), butil ($25\ \mu\text{M}$), octil ($6,25\ \mu\text{M}$), benzil ($25\ \mu\text{M}$) e fenetil ($12,5\ \mu\text{M}$), respectivamente (Fig. 5).

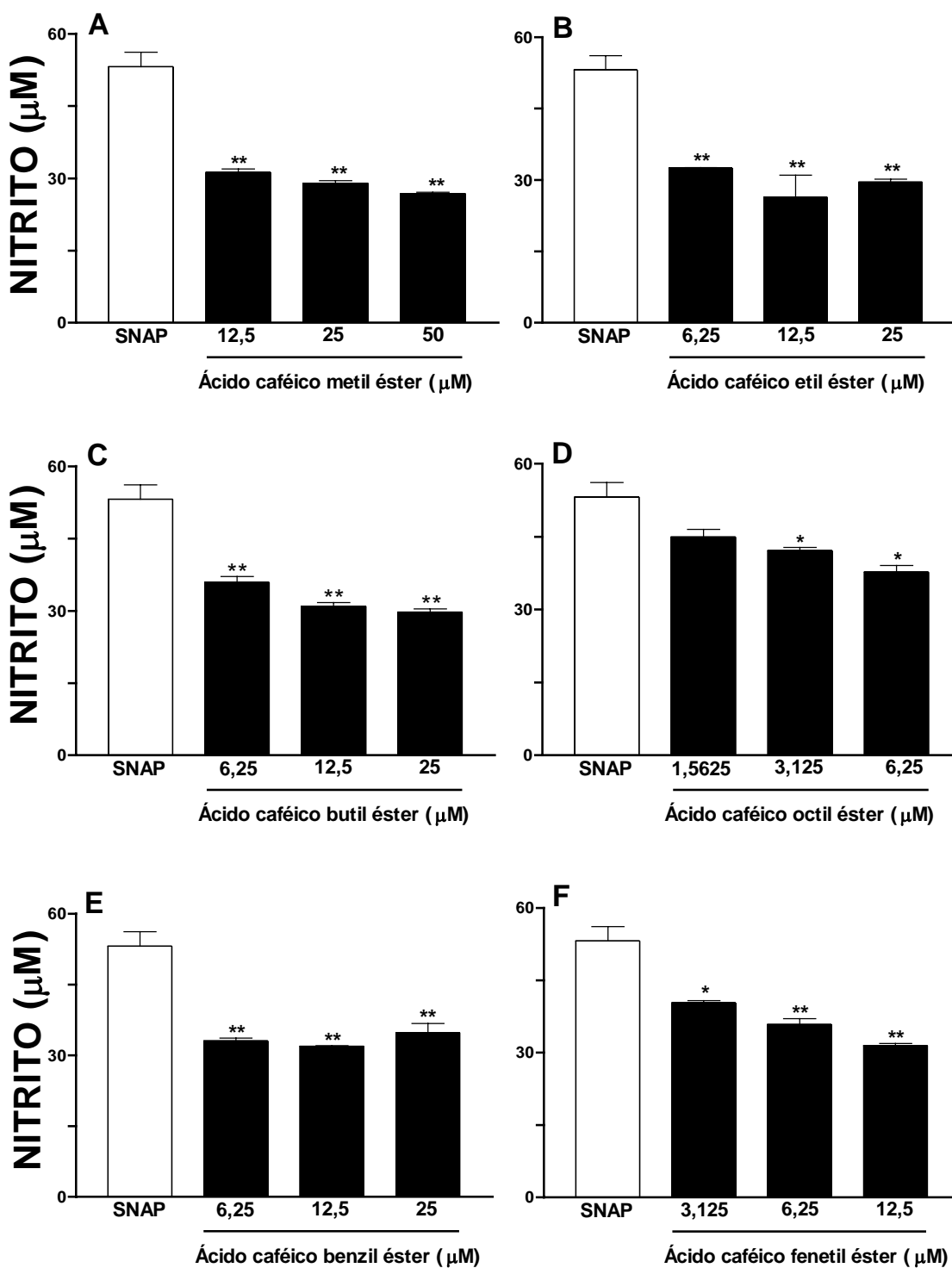


Figura 5. Efeito dos derivados metil (A), etil (B), butil (C), octil (D), benzil (E) e fenetil (F) sobre o acúmulo de nitrito decorrente da degradação do SNAP 300 µM por 24 h a 37 °C. Os resultados correspondem à média de três experimentos - E.P.M. Significativamente diferentes do grupo SNAP, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Para verificar se a diminuição do nitrito produzido por macrófagos RAW 264.7 estaria relacionada com a inibição da atividade da enzima iNOS pelos compostos estudados, foi realizado o ensaio de quantificação da atividade da iNOS. Os resultados da figura 6 mostram que, não só nenhum dos derivados estudados foi capaz de inibir a conversão de L-arginina em L-citrulina, como alguns deles aumentaram de forma significativa a atividade da enzima. Por outro lado, o inibidor não seletivo das NOS, o L-NAME, inibiu 100 % quando ensaiado na concentração de 100 μ M.

Para os experimentos a seguir, optou-se por estudar somente os três derivados mais potentes na inibição de nitrito por células RAW 264.7 estimuladas com LPS. Foram eles: ácido caféico butil, octil e fenetil éster.

O pré-tratamento (- 30 min) dos macrófagos RAW 264.7 com os derivados butil, octil e fenetil (Fig. 7 A, B e C) (1,5625 – 25 μ M) assim como com o inibidor de síntese protéica, a cicloheximida (1 μ M) (Fig. 7 A, B e C), foi capaz de inibir de forma significativa e dependente da concentração a expressão da iNOS induzida pela ativação das células com LPS (0,5 μ g/ml) quando analisados 16 h após a estimulação. Os percentuais de inibição máxima obtidos foram de 85,8 \pm 5,0; 52,7 \pm 10,7; 30,0 \pm 5,5 e 71,1 \pm 6,1 para os derivados butil (25 μ M), octil (6,25 μ M) e fenetil (12,5 μ M) e para a cicloheximida (1 μ M), respectivamente.

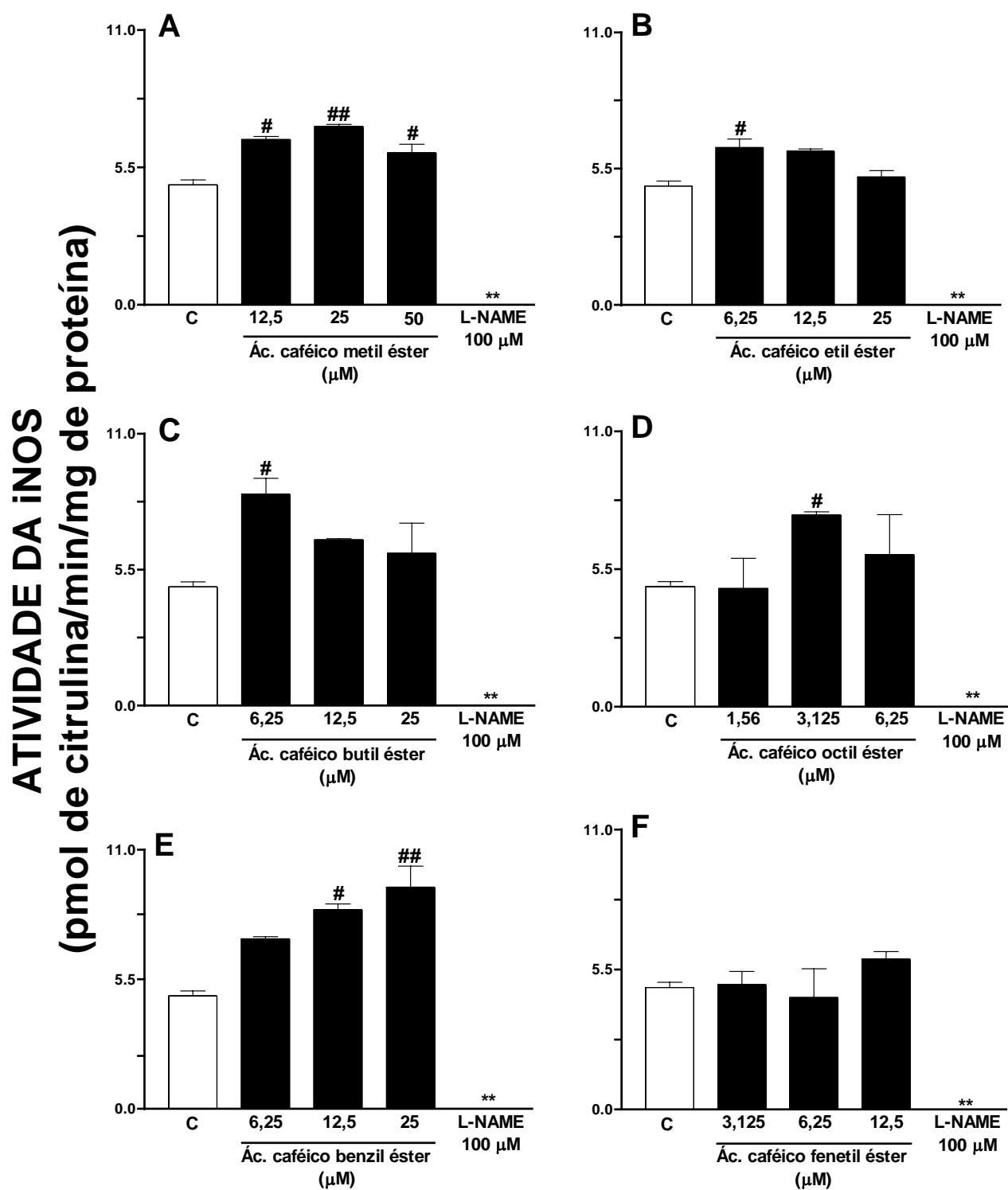


Figura 6. Efeito dos derivados metil (A), etil (B), butil (C), octil (D), benzil (E) e fenetil (F) sobre a atividade da iNOS. Os resultados correspondem à média de dois experimentos - E.P.M. Significativamente diferentes do grupo controle, # $p < 0,05$ e ## e ** $p < 0,01$.

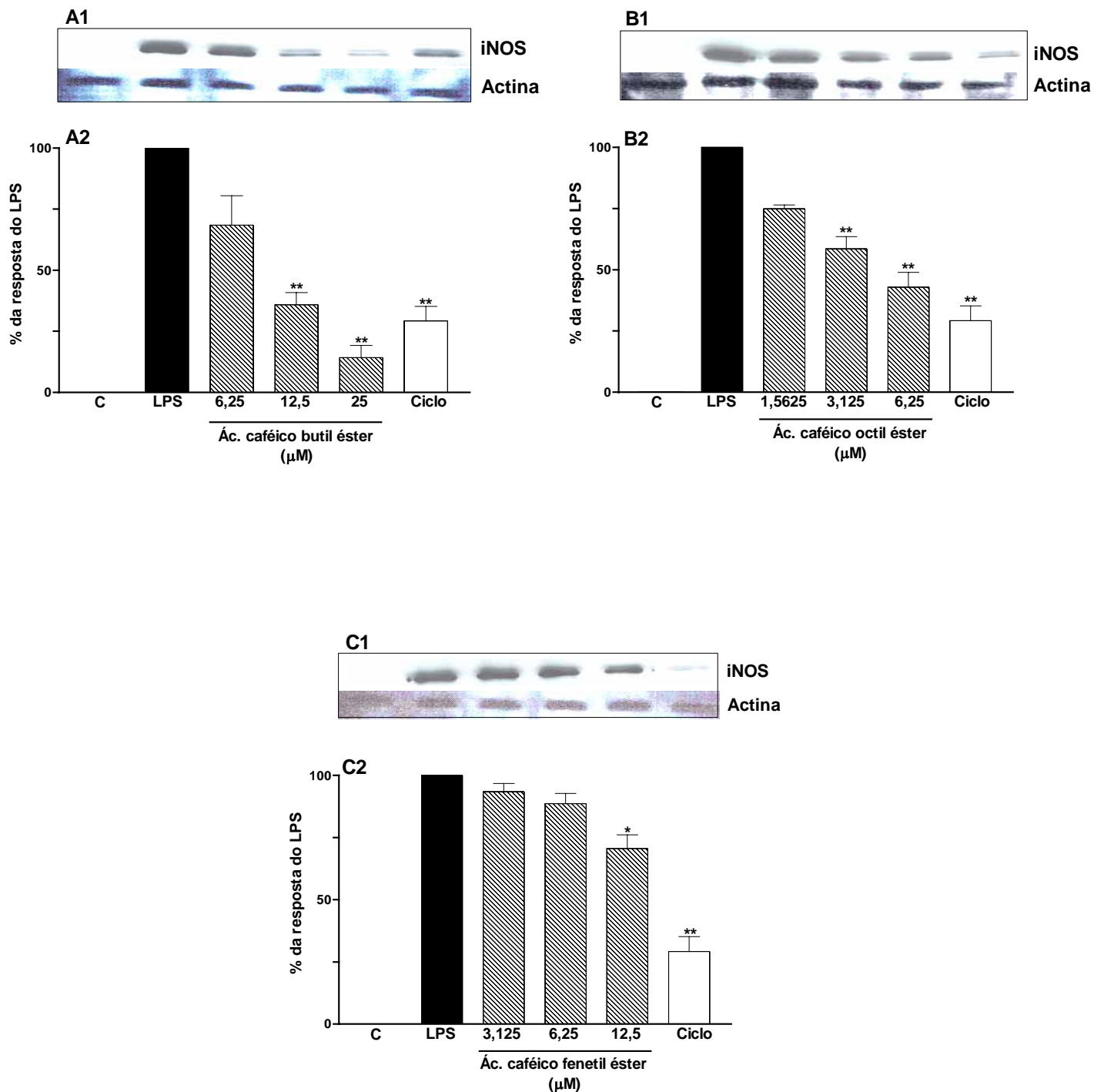


Figura 7. Efeito dos derivados butil (6,25 – 25 μ M, painel A1 e 2), octil (1,5625 – 6,25 μ M, painel B1 e 2), fenetil (3,125 – 12,5 μ M, painel C1 e 2) e da cicloheximida (ciclo: 1 μ M, painéis A, B e C) sobre a expressão da iNOS induzida pelo LPS (0,5 μ g/ml) em macrófagos RAW 264.7. Painéis 1: fotografias das bandas imunorreativas para iNOS e actina. Painéis 2: análise densitométrica das bandas imunoreativas. C= controle (células sem tratamento nem estímulo). As barras correspondem à média de três experimentos \pm E.P.M. Significativamente diferentes do grupo LPS, * p <0,05 e ** p <0,01.

Com o intuito de verificar se os efeitos biológicos observados *in vitro* em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS eram se estediam a condições *in vivo*, os três derivados mais ativos nas células RAW 264.7 (derivados butil, octil e fenetil) foram testados em um modelo de inflamação aguda: o edema de pata de camundongo induzido pela injeção de carragenina. Neste modelo, a carragenina causa aumento duradouro do volume da pata do animal, que pode ser observado por aproximadamente 5 dias (Fig. 7 B). Para melhor compreensão dos resultados, as medidas realizadas até 6 h após a injeção de carragenina foram chamadas de edema agudo e separadas das medidas subseqüentes que foram chamadas de edema tardio. O pré-tratamento dos animais com os derivados butil, octil e fenetil na dose de 30 mg/kg, 1 h antes da injeção de carragenina, foi capaz de inibir de forma siginificativa o aumento do volume da pata induzido pelo agente flogístico em questão de forma semelhante à dexametasona (Figs. 8A, 9A e 10A). As percentagens de inibição obtidas para os derivados assim como para a dexametasona encontram-se listadas na tabela 8. Cabe ressaltar que os derivados avaliados neste modelo apresentaram ação antiedematogênica duradoura, podendo ser observada uma inibição marcante do edema de pata causado pela carragenina até 72 h após a indução do edema de pata no caso dos animais tratados com o derivado fenetil (Fig. 8 B), e até 24 h no caso dos animais tratados com os derivados octil e butil (Figs. 9 B e 10 B).

Tabela 8. Percentuais de inibição obtidos para os derivados butil, octil, fenetil (30 mg/kg, i.p., -1h) e para a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4h) no modelo do edema de pata de camundongo induzido pela carragenina.

PERCENTUAIS DE INIBIÇÃO								
Tempo após a injeção de carragenina								
Composto	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	24 h	48 h	72 h
Butil	-	41±8	73±3	46±6	41±5	47±7	-	-
Octil	-	56±4	65±6	55±5	54±5	52±6	-	-
Fenetil	-	44±8	41±6	50±5	46±4	40±8	42±11	39±7
Dexametasona	49±6	65±6	75±3	51±4	54±4	52±4	-	-

Os valores representam a média de 5-6 animais ± E.P.M.

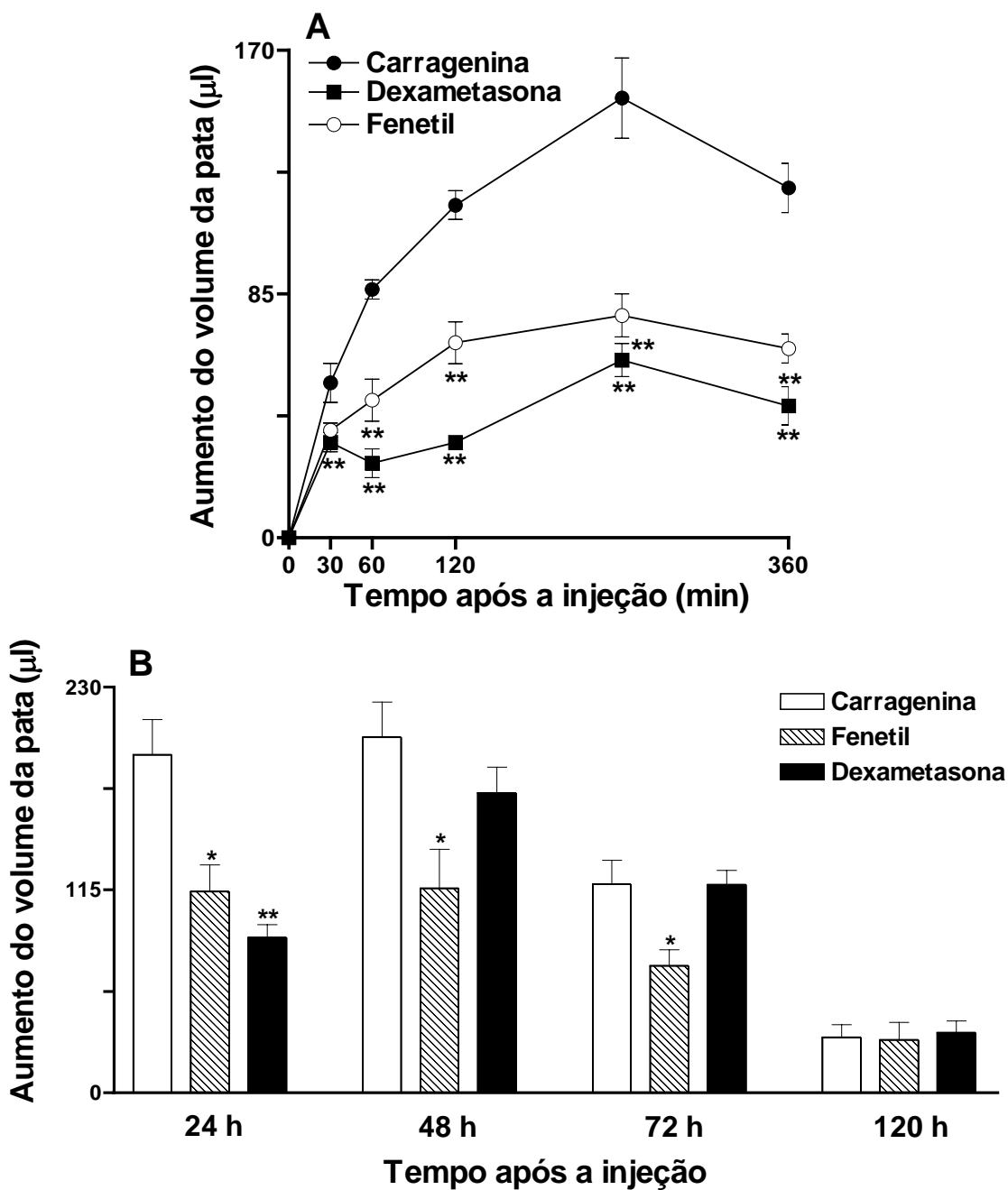


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com ácido caféico fenetil éster (30 mg/kg, i.p., -1h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4 h) sobre o edema de pata agudo (A) e tardio (B) induzido pela injeção de carragenina (300 µg/pata). Os resultados estão expressos como o aumento de volume das patas em µl e correspondem à média de 5-6 animais ± E.P.M. Significativamente diferentes do grupo carragenina, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

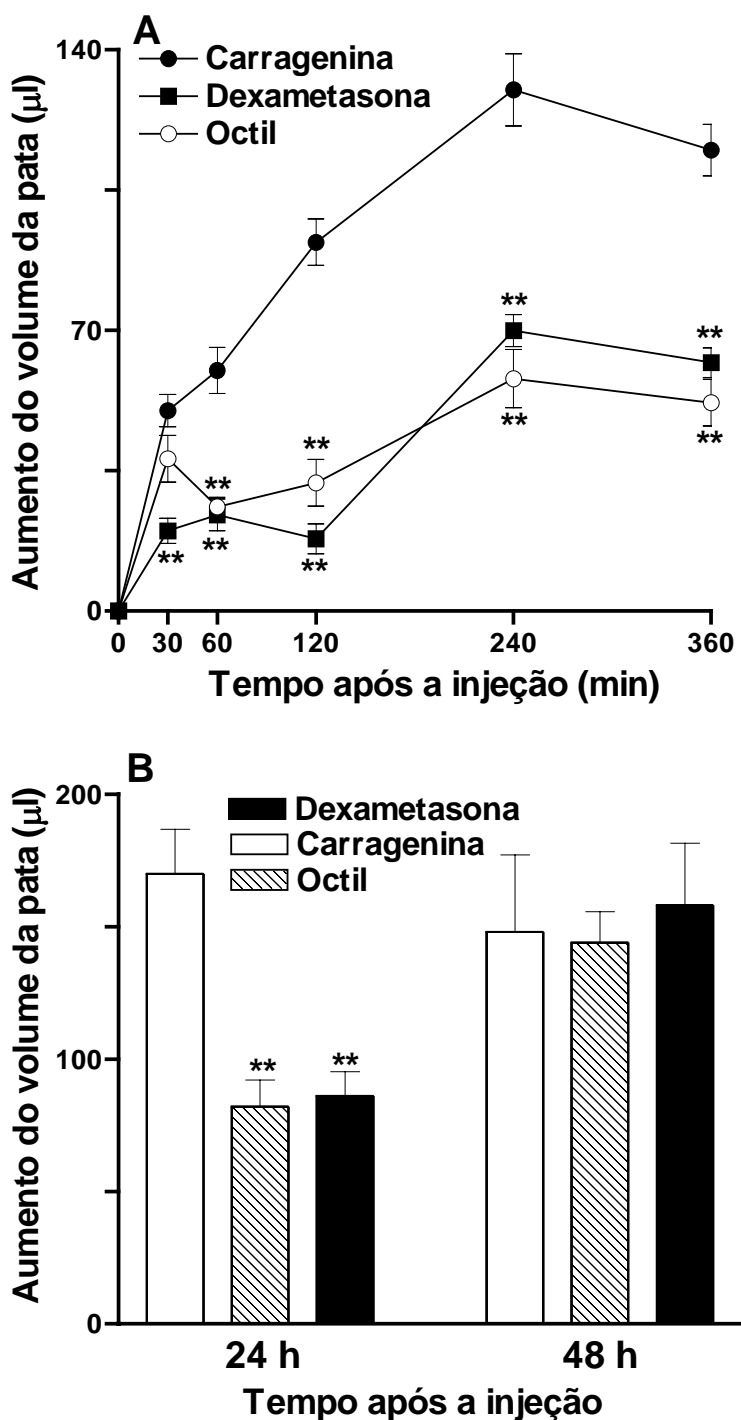


Figura 9. Efeito do pré-tratamento com ácido caféico octil éster (30 mg/kg, i.p., -1h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4 h) sobre o edema de pata agudo (A) e tardio (B) induzido pela injeção de carragenina (300 μg /pata). Os resultados estão expressos como o aumento de volume das patas em μl e correspondem à média de 5-6 animais \pm E.P.M. Significativamente diferentes do grupo carragenina, ** $p < 0,01$.

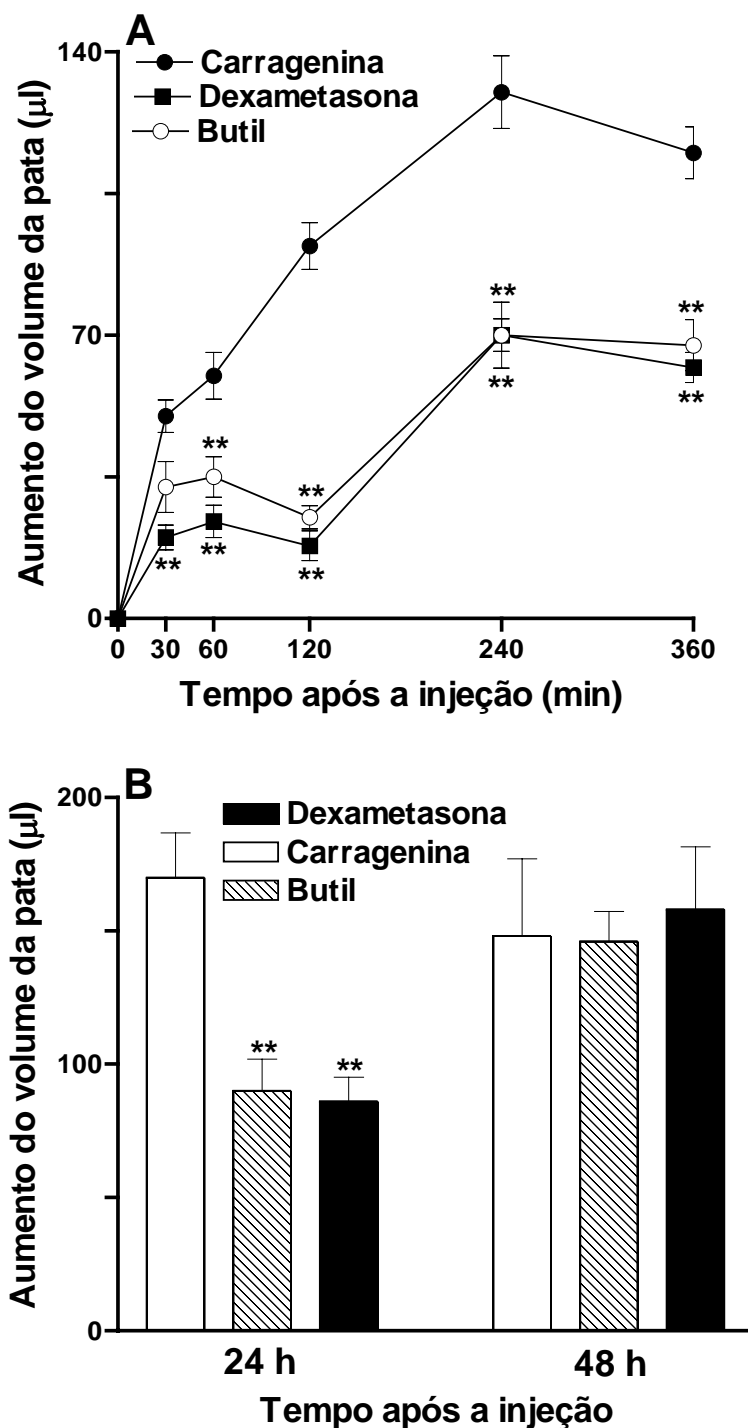


Figura 10. Efeito do pré-tratamento com ácido caféico butil éster (30 mg/kg, i.p., -1h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4 h) sobre o edema de pata agudo (A) e tardio (B) induzido pela injeção de carragenina (300 μg/pata). Os resultados estão expressos como o aumento de volume das patas em μl e correspondem à média de 5-6 animais ± E.P.M. Significativamente diferentes do grupo carragenina, ** $p < 0,01$.

A injeção intraplantar de 300 µg de carragenina, induz, ao final de 6 h, o aumento dos níveis de IL-1β nas patas injetadas. Os níveis de IL-1β em patas injetadas com solução salina é de aproximadamente 0,3 pg/mg de tecido aumentando para 34 pg/mg de tecido 6 h após a injeção i.d. do agente flogístico ($p<0,01$) (Fig. 11). O pré-tratamento dos animais com os derivados butil, octil e fenetil (30 mg/kg, i.p., -1 h), assim como com dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4 h), foi capaz de inibir de forma significativa o aumento dos níveis de IL-1β induzido pela carragenina. Os percentuais de inibição calculados foram: 30 ± 17 , 24 ± 2 , 36 ± 3 e 54 ± 2 para os derivados butil, octil, fenetil e para a dexametasona, respectivamente (Fig. 11)

Além dos níveis de IL-1β, a injeção i.d. de carragenina também induz, ao final de 6 h, a migração de neutrófilos para a pata injetada, como demonstra o aumento acentuado (6 vezes quando comparado ao grupo salina, $p<0,01$) da atividade da mieloperoxidase (Fig. 12 A, B e C). Novamente, o pré-tratamento dos animais com os derivados butil, octil e fenetil na dose de 30 mg/kg (i.p., - 1 h) assim como com a dexametasona (0,5 mg/kg; s.c., 4 h antes) foi capaz de inibir o aumento da atividade da mieloperoxidase induzido pela carragenina com percentuais de inibição de 28 ± 2 , 49 ± 1 , 31 ± 2 e 38 ± 5 , respectivamente (Fig. 12 A, B e C).

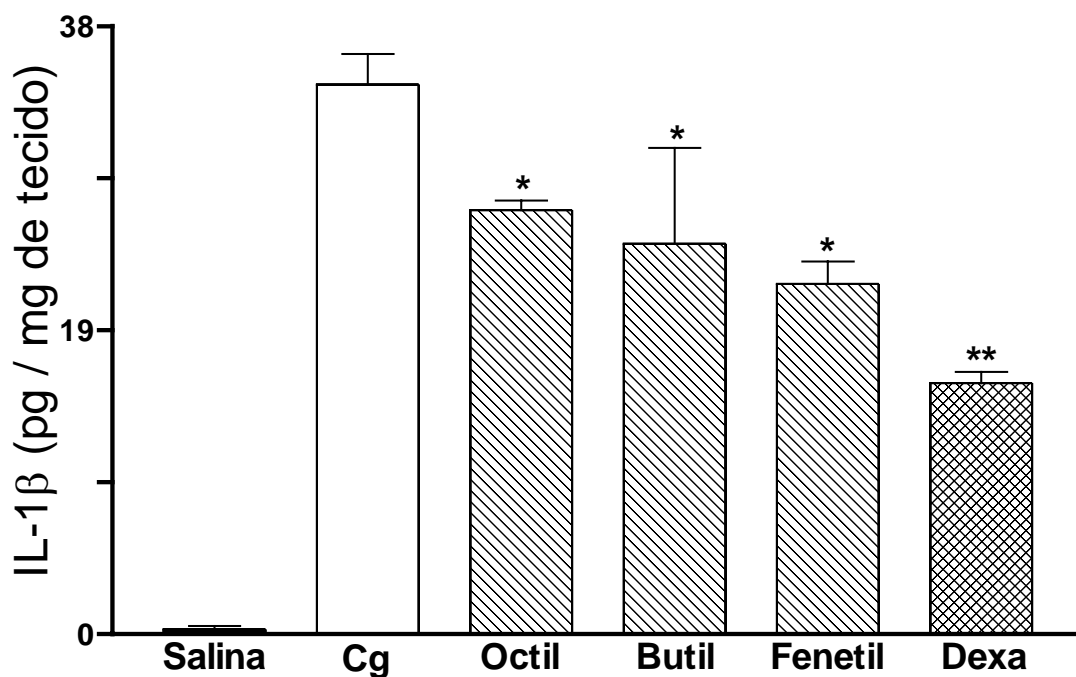


Figura 11. Efeito do pré-tratamento com os derivados octil, butil, fenetil (30 mg/kg, i.p., -1h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4 h) sobre o aumento dos níveis de IL-1 β no tecido subcutâneo das patas induzido pela injeção i.d. de carragenina (300 μ g). Os resultados estão expressos em pg de IL-1 β / mg de tecido e correspondem à média de 3-6 amostras - E.P.M. Significativamente diferentes do grupo carragenina, * p <0,05 e ** p <0,01.

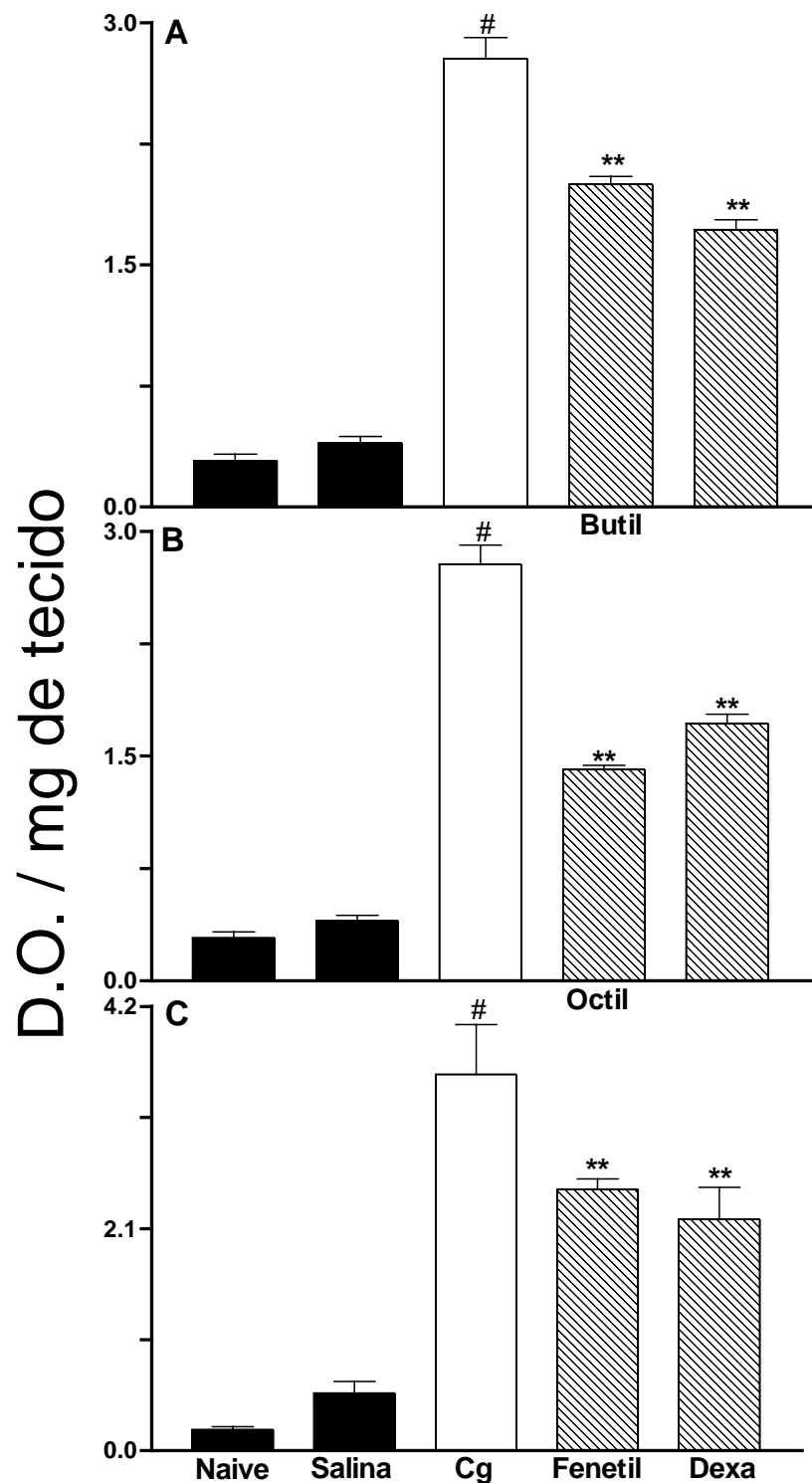


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com ácido caféico butil éster (A), octil éster (B), fenetil éster (C) (30 mg/kg, i.p., -1h) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., -4 h) sobre o aumento da atividade da mieloperoxidase no tecido subcutâneo das patas induzido pela injeção i.d. de carragenina (300 μ g). Os resultados estão expressos como D.O. / mg de tecido e correspondem à média de 4-6 animais \pm E.P.M. Significativamente diferentes do grupo carragenina, # e ** $p < 0,01$.

DISCUSSÃO

Os macrófagos são células fundamentais para o início e desenvolvimento das respostas imune e inflamatória, não somente por sua capacidade de apresentar antígenos e produzir citocinas, como também por produzir grandes quantidades de NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) em adição a outros mediadores inflamatórios (Moncada et al., 1991). Em situações de depleção de arginina, como observado durante um processo inflamatório, a iNOS passa a produzir o radical ânion superóxido ($O^{\bullet-}_2$) além de NO (Xia e Zweier, 1997). Este último reage rapidamente com o ânion superóxido gerando o peroxinitrito, espécie altamente oxidante, que se decompõe em outras espécies reativas como por exemplo, o radical hidroxil que por sua vez, é capaz de iniciar um processo de peroxidação lipídica acarretando danos a membranas e ao DNA (Herencia et al., 2001). De fato, muitos dos danos celulares pelos quais o NO era responsabilizado, é na verdade resultado da ação do peroxinitrito (Szabó, 1996; Coleman, 2001). Em várias condições patofisiológicas associadas à inflamação ou estresse oxidativo, o peroxinitrito foi proposto como mediador do dano celular. Este último pode ser citotóxico por intermédio de diferentes mecanismos, incluindo a iniciação da peroxidação lipídica, a inativação de várias enzimas (principalmente aquelas envolvidas na respiração mitocondrial) e depleção de glutatona, além de causar dano ao DNA (Cuzzocrea et al., 2000). As ROS estão implicadas em várias condições patofisiológicas, como na aterosclerose, ulceração gástrica, degeneração neuronal, câncer, além de exercer papel fundamental em condições inflamatórias (Kourounakis et al., 1999). A superprodução de ROS durante o

processo inflamatório leva a um estresse oxidativo considerável como indicado pela peroxidação lipídica e consumo dos antioxidantes endógenos, vitaminas C e E geralmente observado durante o processo inflamatório (Cuzzocrea et al., 2000). O fato de vários antioxidantes possuírem atividade antiinflamatória torna bastante clara a importância das ROS para o processo inflamatório (Kourounakis et al., 1999).

Vários trabalhos recentes mostram que o ácido caféico e seus derivados são potentes antioxidantes sendo capazes de fazer o seqüestro de vários radicais livres (Sud´ina et al., 1993; Castelluccio et al., 1995; Silva et al., 2000; Kikuzaki et al., 2002; Russo et al., 2002) além serem capazes de inibir a oxidação do LDL *in vitro* (Castelluccio et al., 1995; Andreasen et al., 2001; Cartron et al., 2001) e a atividade da xantina oxidase, fonte importante de ROS (Russo et al., 2002). Foi visto que a capacidade de fazer o seqüestro de diferentes radicais livres é um dos principais mecanismos de ação antioxidante do ácido caféico e de seus derivados, e decorre, pelo menos em parte, da existência de dois hidrogênios fenólicos, assim como da possibilidade de estabilização do radical fenoxil formado (Rice-Evans et al., 1996; Silva et al., 2000). Além das ações antioxidantes, propriedades antiinflamatórias também foram descritas para o ácido caféico e alguns de seus derivados (Natarajan et al., 1996; Orban et al., 1999; Nardini et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2001; Maffia et al., 2002; Hsiao et al., 2003).

O presente trabalho confirma e estende os dados existentes na literatura, mostrando que os derivados metil, etil, butil, octil, benzil e fenetil possuem ação antiinflamatória *in vitro*, inibindo de forma significativa e dependente da concentração, o aumento dos níveis de nitrito induzido pela ativação de células

RAW 264.7 com LPS. Os resultados mostram ainda que quanto maior a cadeia alquílica lateral dos compostos, maior sua potência em inibir a produção de nitrito pelos macrófagos. O aumento do tamanho da cadeia lateral, confere um aumento da lipofilicidade do derivado, e por conseguinte, facilita sua passagem através da membrana da célula. Esta talvez seja a razão pela qual os derivados mais lipofílicos são também os mais tóxicos. Por outro lado, é bastante provável que a potência de inibição do nitrito também esteja relacionada com a lipofilicidade dos derivados. Dados bastante semelhantes foram reportados por Nagaoka et al. (2003), que testaram vários derivados do ácido caféico (dentre eles os derivados estudados neste trabalho) quanto à sua potência em inibir a produção de NO por macrófagos J774.1 estimulados com LPS, assim como sua toxicidade contra esta linhagem celular. Os valores de CI50 obtidos por Nagaoka et al. são bastante próximos daqueles descritos no presente trabalho. Os mesmos autores também afirmam, que o tamanho da cadeia lateral é um determinante importante da potência de inibição da produção de nitrito.

Macrófagos ativados sintetizam NO e $O_2^{\bullet-}$ resultando na formação de NO_2^- (nitrito) e NO_3^- (nitrato) numa proporção $[NO_3^-] / [NO_2^-]$ de 0,67 a 1,0. Entretanto, na presença de oxihemoglobina ou substâncias com grande potencial oxidante, o NO e o NO_2^- são completamente oxidados em NO_3^- (Lewis et al., 1995). A reação de Griess, empregada no presente trabalho para avaliação indireta dos níveis de NO, é uma reação colorimétrica simples e confiável, sendo que sua única desvantagem reside no fato de que detecta somente nitrito. Levando-se em conta a possibilidade de que a inibição dos níveis de nitrito observada nas células RAW

264.7 poderia ser devida ao fato dos derivados impedirem a degradação do NO em nitrito, desviando-a para a produção exclusiva de nitrato, procedeu-se à incubação de uma alíquota do sobrenadante das células RAW com a bactéria *E. coli*, fonte abundante de nitrato redutase. Desta forma, todo o nitrato presente nas amostras foi convertido em nitrito podendo este ser dosado pela reação de Griess. O mesmo perfil de inibição obtido quando da dosagem de nitrito antes da conversão com a nitrato redutase foi observado após a incubação das amostras com esta enzima, excluindo a possibilidade de que os derivados estivessem diminuindo os níveis de nitrito por alterarem a via de oxidação do NO.

Alternativamente, os derivados poderiam diminuir o nitrito por interferirem de alguma forma com o nitrito já formado ou mesmo com o reagente de Griess. Para descartar esta possibilidade, os derivados foram adicionados a uma solução de nitrito de sódio e incubados por 24 h, tempo após o qual procedeu-se à dosagem do nitrito. A ausência de diferença entre os grupos estudados indica que os derivados parecem não reagir com o nitrito já formado nem tampouco com o reagente de Griess.

Pelo fato do ácido caféico e alguns de seus derivados serem reconhecidamente bons seqüestradores de radicais livres, decidiu-se verificar se os derivados estudados eram capazes de interagir diretamente com o NO, fazendo seu seqüestro. Para isto, lançou-se mão de um ensaio de liberação de NO sem células, onde a fonte de NO é o SNAP. De fato, a literatura afirma que a capacidade de diminuir nitrito em ensaios livres de células, onde a fonte de NO é um doador desta molécula, está associada à capacidade do composto testado de seqüestrar o NO liberado pelo doador (Virgili et al., 1998; Xiong et al., 2000;

Creczynski-Pasa et al., 2001). Neste trabalho, todos os derivados inibiram de forma significativa o nitrito proveniente da decomposição do SNAP, sugerindo ação de seqüestro de NO. Vale ressaltar que a inibição do nitrito derivado da decomposição do SNAP, apesar de significativa, não foi tão acentuada quanto aquela observada no sistema com células. Desta forma, estes resultados permitem sugerir que o seqüestro do NO é um dos mecanismos pelos quais os derivados do ácido caféico diminuem o nitrito produzido por células RAW 264.7.

Como o seqüestro do NO não parece ser o único mecanismo de ação reponsável pela inibição de nitrito produzido por células RAW 264.7, procurou-se investigar se os derivados do ácido caféico eram capazes de inibir a atividade da enzima que sintetiza óxido nítrico nos macrófagos ativados: a iNOS. Os resultados obtidos mostram que os derivados são desprovidos de ação inibitória sobre a atividade da iNOS, chegando mesmo a aumentar de forma significativa esta atividade. Este resultado aparentemente contraditório, confirma a suposição de que os derivados seriam seqüestradores de NO. De fato, vários trabalhos demonstram que o NO produzido promove um *feedback* negativo, ligando-se ao grupamento heme da iNOS, diminuindo sua atividade (Assreuy et al., 1993; Santolini et al., 2001). Além disso, seqüestradores de NO como a hemoglobina aumentam a atividade da iNOS por diminuírem a quantidade de NO livre, protegendo a enzima do *feedback* negativo (Santolini et al., 2001). Como os derivados fazem o seqüestro do NO, é de se esperar que melhorem a atividade da enzima.

Apesar de uma inibição direta da atividade da iNOS não ser detectada, não se pode excluir a possibilidade de uma inibição indireta da enzima pelos derivados

do ácido caféico, uma vez que o ensaio originalmente descrito por Bredt e Snyder (1990) e utilizado no presente trabalho para quantificação da atividade da iNOS, emprega a enzima isolada e excesso de cofatores e substrato para assegurar sua atividade. Substâncias que inibem a iNOS de forma indireta, pelo deslocamento de co-fatores ou pela inibição da homodimerização, passariam despercebidas neste ensaio. De fato, a inibição indireta da iNOS é uma possibilidade plausível e freqüentemente ignorada pelos trabalhos de forma geral. Balligand e cols. (1993) mostraram que os glicocorticóides eram capazes de suprimir a produção de NO por células endoteliais da microvasculatura cardíaca estimuladas com LPS. Entretanto, esta inibição não era acompanhada de atividade diminuída da iNOS no homogenato celular, nem de níveis diminuídos de RNA mensageiro para a enzima, sugerindo assim, que outros fatores deveriam ser responsáveis pela diminuição da produção de NO. Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que a inibição da produção de NO era devida à capacidade dos glicocorticóides de inibir a expressão da enzima que sintetiza o cofator BH_4 , assim como de inibir o transportador e a síntese *de novo* do substrato L-arginina (Simmons et al., 1996). Da mesma forma, os derivados estudados poderiam alterar de forma indireta a atividade da iNOS modificando a disponibilidade de BH_4 e/ou a disponibilidade de L-arginina.

A BH_4 é um cofator indispensável para atividade das três isoformas de NOS (Wang et al., 1995). Seu papel nas reações catalizadas pelas NOS ainda não está completamente esclarecido, mas existem evidências indicando que ele funciona tanto como um fator alostérico, promovendo a associação e estabilização da isoforma indutível da NOS em sua forma dimérica ativa, quanto como um cofator

envolvido nas reações de redox (Simmons et al., 1996; Bryk e Wolff, 1999). A disponibilidade de BH₄ tem papel fundamental, uma vez que é capaz de modular a produção de NO por células endoteliais da microvasculatura cardíaca estimuladas com LPS (Simmons et al., 1996), assim como por ratos injetados com LPS (Bune et al., 1996). A BH₄ é sintetizada a partir do trifosfato de guanosina (GTP) pelas enzimas GTP ciclohidrolase I, 6-piruvil tetraidrobiopterina sintase e sepiapterina redutase (Werner-Felmayer et al., 1993). A expressão da GTP ciclohidrolase I, assim como a da iNOS, é induzida por diferentes estímulos inflamatórios como LPS e citocinas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Simmons et al., 1996) e portanto passível de inibição. Foi visto que a região promotora do gene para a GTP ciclohidrolase I de rato compartilha vários elementos regulatórios com o gene que codifica a iNOS em murinos, incluindo os sítios para a ligação do NF-κB, elementos responsivos ao IFN-γ, NF-IL6 e AP-1 dentre outros (Simmons et al., 1996). É possível que os derivados do ácido caféico estejam diminuindo a atividade de um ou mais destes fatores de transcrição, diminuindo a expressão de GTP ciclohidrolase I, em última instância diminuindo a quantidade de BH₄.

Além disso, os derivados do ácido caféico também poderiam alterar a disponibilidade de L-arginina, interferindo nos mecanismos que controlam a concentração intracelular de L-arginina (i- síntese *de novo* de L-arginina a partir da citrulina, ii- transporte de L-arginina para dentro da célula e iii- degradação da arginina pela arginase), todos os três passíveis de indução e por conseguinte, de inibição.

A síntese *de novo* da arginina a partir da citrulina se dá intracelularmente pela ação da argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liase. Foi visto que esta via metabólica está presente em macrófagos murinos e que a expressão da argininosuccinato sintetase aumenta numa variedade de células após estímulo com mediadores inflamatórios (Simmons et al., 1996). Os compostos estudados no presente trabalho poderiam diminuir a disponibilidade de L-arginina por inibir um ou mais fatores de transcrição assim como por componentes das vias de transdução (como MAPK), necessários para o aumento da expressão das enzimas argininosuccinato sintetase e/ou argininosuccinato liase. Estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

No que diz respeito ao transporte de L-arginina, diferentes sistemas de transporte celular para aminonácidos catiônicos foram caracterizados. Dentre eles, o sistema y^+ , que tem papel-chave no transporte de L-arginina em macrófagos (Hammermann et al., 2000). A atividade do sistema y^+ é caracterizada por uma alta afinidade por aminoácidos catiônicos, não-dependência de Na^+ e estimulação do transporte por substrato do lado oposto da membrana (trans-estimulação) (Hallemeesch et al., 2002). A família de transportadores de aminoácidos catiônicos (CAT) apresenta as características do sistema y^+ de transporte. Quatro proteínas relacionadas foram identificadas e nomeadas de CAT-1, CAT-2A, CAT-2B e CAT-3 (Closs, 2000). Os transportadores CAT diferem em seu local e intensidade de expressão. Assim, foi visto que o transportador CAT-2B era induzido pelo LPS, concomitantemente à iNOS em macrófagos alveolares de ratos. Além disso, tanto a expressão da iNOS quanto a do transportador CAT-2B são inibidas pelos bloqueadores do NF- κ B, o TLCK, PDTC,

e por um oligonucleotídeo que se liga a este fator de transcrição, mostrando que este fator nuclear medeia a indução das duas proteínas nestas células (Hammermann et al., 2000). Adicionalmente, as MAPK, em especial a família da ERK e da p38 MAPK parecem estar envolvidas no transporte de L-arginina, uma vez que seus inibidores específicos o PD 98059 e o SB 203580, respectivamente, diminuíram de forma acentuada o aumento do influxo de L-arginina em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS/IFN- γ (Caivano, 1998). Tendo em vista que a produção de NO pela iNOS em macrófagos ativados é dependente de L-arginina exógena (Assreuy e Moncada, 1992; Closs et al., 2000), substâncias que interferem na expressão do transportador CAT-2B alteram indiretamente a atividade da iNOS e por conseguinte, a produção de NO.

Uma última via passível de modulação pelos compostos analisados neste trabalho, seria a via de degradação da arginina. A arginase cataliza a formação de uréia e ornitina a partir da arginina. Esta enzima existe em duas isoformas. A arginase I que é uma enzima citossólica altamente expressa no fígado e participa do ciclo da uréia, e a arginase II, uma enzima mitocondrial que pode ser co-induzida com a iNOS em macrófagos RAW 264.7 (Hallemeesch et al., 2002). Neste caso, os derivados do ácido caféico estudados no presente trabalho poderiam aumentar sua expressão e/ou atividade, diminuindo em última instância, a disponibilidade de L-arginina para a iNOS.

Como discutido nos parágrafos acima, as enzimas e os transportadores que asseguram a disponibilidade de substrato e co-fatores para a síntese de NO são, em sua maioria, induzidas juntamente com a iNOS. Além disso, muitas delas

parecem responder a fatores de transcrição que controlam a expressão da iNOS. Assim, a inibição de um ou mais fatores de transcrição compartilhados por estas enzimas e transportadores, como por exemplo, o NF- κ B, resultaria na inibição indireta da iNOS com conseqüente diminuição da produção de NO. Como o ácido cafécico e seus derivados são conhecidamente potentes antioxidantes (Sud´ina et al., 1993; Castelluccio et al., 1995; Silva et al., 2000; Kikuzaki et al., 2002; Russo et al., 2002), capazes de alterar o estado redox das células (Orban et al., 1999), há uma grande possibilidade que modulem vários aspectos da transcrição gênica que leva à expressão das proteínas citadas acima. De fato, já foi demonstrado que o ácido cafécico fenetil éster (CAPE) inibe a ativação do NF- κ B induzida por vários agentes inflamatórios (Natarajan et al., 1996). Além de sua capacidade de alterar o estado redox intracelular (Orban et al., 1999), foi sugerido o CAPE exerce seus efeitos inibitórios sobre o NF- κ B através da inibição da produção de ROS (Maffia et al., 2002), que sabidamente liberam o fator de transcrição de sua proteína inibitória I κ B- α (Schmidt et al., 1995). Adicionalmente, Song et al., (2002) mostraram que o CAPE é capaz de inibir a expressão da iNOS induzida por LPS/IFN γ em macrófagos RAW 264.7. Além do CAPE, foi visto que o ácido cafécico octil éster, também interfere na transcrição gênica que leva à expressão da iNOS em células musculares lisas de aorta de rato, sendo que o efeito inibitório parece resultar da habilidade do derivado de bloquear a ativação de MAPK (Hsiao et al., 2003). Assim, é possível que os derivados estudados no presente trabalho estejam alterando indiretamente a atividade da iNOS em macrófagos RAW 264.7

por interferirem na transcrição gênica que leva ao aumento de transportadores e enzimas envolvidos na via de produção do NO a partir da L-arginina.

O grande número de evidências mostrando a capacidade dos derivados do ácido caféico de alterar a transcrição gênica, levou-nos a verificar se a diminuição dos níveis de nitrito no sobrenadante de células RAW 264.7 estimuladas, poderia ser devida à inibição da expressão da iNOS. De fato, a produção de NO por macrófagos murinos estimulados pode ser modulada através da alteração da expressão da iNOS, que é induzida e regulada por uma série de vias de sinalização. Em murinos, a região promotora do gene da iNOS contém consensos para ligação de vários fatores transcrição. Estes consensos encontram-se distribuídos em dois locais específicos: um chamado de região I e o outro de região II. A região I parece ser responsável pela expressão da iNOS induzida pelo LPS, uma vez que contém três sítios de ligação para o fator nuclear responsivo à interleucina-6 (NF-IL6), um elemento responsivo ao TNF, um sítio de ligação para o NF- κ B e um sítio de ligação para octâmeros. Por outro lado, a região II parece ser importante para a expressão da iNOS induzida pelo IFN- γ pois contém sítios de ligação para o fator regulatório de IFN-1 (IFR-1), STAT-1 α e NF- κ B (Dlaska e Weiss, 1999). Sequências de ligação para outros fatores de transcrição, como a proteína ativadora-1 (AP-1), os membros da família de proteínas ligadoras de CAAT/enhancer (C/EBP), assim como para o fator ativador de transcrição responsivo a AMPc (ATF/CREB), também compõem a região promotora do gene da iNOS (Chen e Wang, 1999).

As vias de sinalização pelas quais o LPS promove a expressão da iNOS ainda não estão totalmente esclarecidas, mas envolvem eventos que resultam na transmissão do sinal da membrana plasmática, através do citoplasma, ao núcleo onde a expressão da iNOS é aumentada. Estudos mostram que o LPS se liga à proteína ligadora de LPS que por sua vez se liga ao CD14 de membrana e ativa, através de tirosina quinase, a fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC) e a fosfatidilcolina fosfolipase C (PC-PLC). Estas, por sua vez, ativam a proteína quinase C (PKC) levando à ativação do NF- κ B (Chen e Wang, 1999). Entretanto, embora a via do NF- κ B seja essencial para a indução da iNOS mediada pelo LPS, ela não é suficiente, tendo que se combinar a outros fatores de transcrição para induzir a expressão gênica da iNOS (Dlaska e Weiss, 1999).

A família de proteínas Rel/NF- κ B inclui a p50 (NF- κ B1), a p52 (NF- κ B2), a p65 (Rel A), a RelB e a c-Rel. Estas proteínas funcionam como fatores transcripcionais indutíveis, interagindo com consensos κ B na região regulatória de vários genes. As proteínas NF- κ B/Rel encontram-se como homo ou heterodímeros “presos” no citoplasma de células não ativadas através da interação covalente com proteínas inibitórias chamadas de I κ B. Esta família de proteínas caracteriza-se por repetições de uma seqüência específica de 30 a 33 aminoácidos, chamada de anquirina. Estes inibidores do NF- κ B previnem a compartimentalização nuclear dos dímeros de NF- κ B em células não estimuladas. Na presença de estímulos como LPS, IL-1, TNF- α , ROS, dentre outros, os resíduos de serina 32 e 36 do I κ B são fosforilados pelo complexo I κ B quinase (IKK). Esta modificação faz com que resíduos de lisina do I κ B sejam poliubiquitinados, fato que marca a proteína para

degradação pelo proteassoma 26S. A degradação do inibidor resulta na exposição da seqüência de localização nuclear (NLS) das proteínas Rel, onde se ligarão carioferinas, levando, em última instância, à translocação nuclear do NF- κ B e à conseqüente transcrição de genes-alvo (Karin e Ben-Neriah, 2000; Laroux et al., 2001). A ativação do complexo IKK é o ponto de convergência de sinais que ativam o NF- κ B por diferentes vias. Apesar de não ser totalmente esclarecida, esta ativação é feita por proteínas capazes de fosforilar o complexo IKK, sendo por isso chamadas de IKK quinases (Kracht e Saklatvala, 2002). Neste sentido, estudos demonstraram que várias proteínas são capazes de fazer esta fosforilação, dentre elas, diferentes isoformas de PKC e membros da família das MAPKKK como as MEKK1, 2 e 3 (Karin e Ben-Neriah, 2000).

As MAPK são proteínas que fosforilam resíduos de serina/treonina e que participam das vias de sinalização iniciadas por vários estímulos extracelulares (Chen e Wang, 1999). As MAPK encontram-se divididas em três grandes famílias: i) as quinases ativadas por receptor de sinal extracelular (ERK), também conhecida como p44/p42, ii) as proteínas quinases ativadas por estresse, também conhecida como quinase c-Jun-NH₂-terminal (JNK) e iii) as p38 MAPK (Chen e Wang, 1999). A ativação das MAPK segue uma cascata de fosforilação que se inicia com a ativação das MAPKKK, que fosforilam MAPKK, que por sua vez, adicionarão grupamentos fosfato nas MAPK, ativando-as. Também através de fosforilação, as MAPK modulam a atividade de seus substratos: fatores de transcrição como Elk-1, SAP-1 e 2, dentre muitos outros (Kracht e Saklatvala, 2002).

Ainda existe muita controvérsia a respeito de quais famílias de MAPK estariam envolvidas na expressão da iNOS induzida pelo LPS. O que se sabe é que as vias de sinalização utilizadas pelo LPS para promover a expressão da iNOS variam de acordo com o tecido e o tipo celular estudados (Paul et al., 1999), e que ainda assim, resultados conflitantes são observados envolvendo uma mesma célula e um mesmo estímulo. Foi observado que em macrófagos murinos, todas as três famílias de MAPK são fosforiladas após estímulo com LPS (Chakravortty et al., 2001). Entretanto, ainda não há um consenso a respeito do papel de cada uma das MAPK no processo de expressão da iNOS pelo LPS em macrófagos RAW 264.7.

O presente trabalho confirma dados da literatura (Song et al., 2002) mostrando que o pré-tratamento de macrófagos RAW 264.7 com o derivado do ácido caféico fenetil éster, inibe de forma dependente da concentração a expressão da iNOS induzida pelo LPS. Além disso, também foi observada atividade inibitória sobre a expressão da iNOS para os derivados butil e octil. Infelizmente, não foi possível investigar quais as vias de sinalização envolvidas nesta inibição. Entretanto, devido à importância do NF- κ B para expressão da iNOS, e levando-se em conta dados existentes na literatura (Natarajan et al., 1996; Orban et al., 1999; Nardini et al., 2001; Fitzpatrick et al., 2001; Maffia et al., 2002; Hsiao et al., 2003) que mostram que o ácido caféico assim como seus derivados fenetil e octil são capazes de diminuir a ativação do NF- κ B, é provável que os compostos estudados no presente trabalho modulem a ativação deste fator de transcrição, sendo esta modulação decorrente, pelo menos em parte, da

capacidade dos derivados de alterarem o estado redox das células e interferir na ativação das proteínas MAPK.

Vários trabalhos existentes na literatura descrevem propriedades antiinflamatórias para determinada molécula em modelos *in vitro* como, por exemplo, culturas celulares, sem no entanto analisar se estas atividades biológicas se estendem a situações *in vivo*, colocando em dúvida a importância dos achados *in vitro*. Para verificar se as ações antiinflamatórias dos derivados do ácido caféico observadas em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS se estendem a um modelo *in vivo*, os três derivados mais potentes no modelo *in vitro* foram testados quanto à sua capacidade de inibir a resposta inflamatória induzida pela injeção intraplantar de carragenina em camundongos.

O modelo do edema de pata induzido pela carragenina é um modelo clássico de inflamação aguda, universalmente usado na pesquisa de novas substâncias antiinflamatórias (Di Rosa et al., 1971). Foi demonstrado que a injeção intraplantar de carragenina promove uma resposta inflamatória caracterizada por aumento dependente do tempo do volume da pata (edema) decorrente da infiltração de neutrófilos (Vinegar et al., 1987) e da liberação de vários mediadores inflamatórios como citocinas, ROS, RNS e prostanóides no foco inflamatório (Salvemini et al., 1996; Omote et al., 2001). A resposta edematogênica induzida pela carragenina em ratos é um evento bifásico constituído por uma fase precoce (até 2 h), desencadeada pela liberação de histamina, bradicinina e serotonina no sítio inflamatório, seguida de uma fase tardia (2 a 6 h) em que predomina a ação pró-inflamatória dos prostanóides (Di Rosa et al., 1971). Vários estudos mostram que o NO possui papel fundamental

na formação da resposta edematogênica induzida pela carragenina. A injeção deste agente flogístico na pata de ratos, induz aumento prolongado dos níveis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no sítio inflamatório, aumento este diminuído pelo tratamento dos animais com L-NMMA, aminoguanidina ou neurectomia, sugerindo a participação das isoformas constitutivas e induzida neste aumento (Omote et al., 2001). Além disso, os mediadores da fase precoce (histamina, serotonina e bradicinina) promovem a liberação de NO, que provavelmente medeia a dilatação da microvasculatura, aumento da permeabilidade vascular e a formação do edema. Mais ainda, o inibidor não seletivo das NOS, o L-NAME, é capaz de inibir tanto a fase precoce, como a tardia do edema induzido pela carragenina em ratos (Handy e Moore, 1998). Além disso, a fase precoce do edema induzido pela carragenina parece depender das isoformas constitutivas da NOS enquanto que a fase tardia possui como principal fonte de NO, a iNOS, uma vez que seu inibidor seletivo, o L-NIL, não foi capaz de inibir a fase precoce da inflamação induzida pela carragenina, mas reduziu acentuadamente a fase tardia da resposta (Handy e Moore, 1998).

Embora a maioria dos estudos sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção intraplantar de carragenina seja realizada em ratos, a resposta obtida em camundongos, apesar de um pouco menor, é bastante semelhante (Henriques et al., 1987). A única diferença significativa reside no fato de que ao contrário do que é observado em ratos, em que a resposta edematogênica máxima ocorre nas primeiras 24 h, em camundongos esta resposta é observada 48 a 72 h após a injeção de carragenina, período durante o qual os neutrófilos predominantes até

então no sítio inflamatório são substituídos por macrófagos, eosinófilos e linfócitos (Henriques et al., 1987).

Borrelli et al. (2002), demonstraram que o pré-tratamento de ratos com o derivado fenetil éster era capaz de inibir o edema de pata, assim como a pleurisia induzidos pela carragenina. O presente trabalho confirma e estende os dados da literatura, demonstrando que os derivados butil, octil e fenetil possuem atividade antiinflamatória *in vivo*, uma vez que o pré-tratamento de camundongos com estes derivados inibiu de forma significativa e duradoura o edema, a migração de neutrófilos, e o aumento dos níveis de IL-1 β induzidos pela injeção de carragenina, sendo que o efeito inibitório dos derivados sobre o edema pôde ser observado já na primeira hora após a injeção de carragenina. Em vista dos resultados obtidos no ensaio do NO derivado do SNAP, é possível sugerir que um dos mecanismos envolvidos na inibição do edema de pata pelos derivados, é o seqüestro do NO liberado na fase precoce do processo inflamatório induzido pela carragenina, decorrente da ação da histamina, bradicinina e serotonina em seus respectivos receptores, diminuindo o aumento da permeabilidade vascular. Além disso, foi reportado que em fases iniciais do processo inflamatório, quando ainda se encontra em baixas concentrações, o NO ativa o NF- κ B (Connelly et al., 2001), levando à expressão de uma variedade de moléculas inflamatórias, amplificando o processo. Assim, o seqüestro deste NO impede que ele exerça suas funções pró-inflamatórias inibindo a ativação de células residentes, o que leva à diminuição da produção e liberação de diferentes proteínas inflamatórias, dentre elas fatores

quimiotáticos, o que em última instância reduz a migração de células inflamatórias para o sítio inflamado.

Como citado acima, o pré-tratamento dos animais com os derivados do ácido caféico butil, octil e fenetil éster assim como com o corticóide dexametasona inibiu de forma significativa o aumento dos níveis de IL-1 β nas patas injetadas com carragenina.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória secretada por uma variedade de células em resposta à infecção, produtos de linfócitos ativados, toxinas microbianas e estímulos inflamatórios (Dinarello, 1996). Estudos demonstraram que os macrófagos são a principal fonte de IL-1 β após estimulação pela carragenina (Dinarello, 1988). A IL-1 β é capaz de induzir a biossíntese de vários mediadores inflamatórios, dentre eles a PGE₂, amplificando o processo. Além disso, a IL-1 β possui importante papel no edema induzido pela carragenina uma vez que sua inibição através do uso de IL-1 β recombinante humana reduz acentuadamente o edema de pata induzido pela carragenina em ratos (Nakamura et al., 1988). Mais ainda, a IL-1 β é um fator quimiotático para neutrófilos e monócitos assim como promove a degranulação de neutrófilos e eosinófilos no foco inflamatório (Zang et al., 2002). A inibição do aumento dos níveis de IL-1 β pelos derivados do ácido caféico, constitui um dos mecanismos responsáveis pela inibição do edema induzido pela carragenina e pode ser resultado da ação inibitória dos compostos sobre a ativação de células residentes, em especial, macrófagos.

A inibição da migração de neutrófilos para as patas inflamadas parece ser mais um mecanismo pelos quais os derivados inibem o edema de pata. De fato, a

migração de células, em especial neutrófilos, tem papel chave no desenvolvimento e amplificação do processo inflamatório local, uma vez que mediante estimulação pela IL-1 β , por exemplo, liberam o conteúdo de seus grânulos e produzem de ROS (Zang et al., 2002). Desta forma, a inibição da migração de neutrófilos, mesmo que não tão acentuada, é capaz de inibir de forma significativa o processo inflamatório como um todo. O efeito inibitório dos derivados sobre a migração de neutrófilos pode ser resultado dos níveis diminuídos de IL-1 β e de outras proteínas envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos não avaliadas no presente trabalho.

Embora este trabalho tenha se limitado em analisar a migração de neutrófilos e os níveis de IL-1 β na pata dos animais, dados da literatura fornecem evidências indicando que o efeito antiedematogênico dos derivados do ácido caféico observado no modelo do edema de pata induzido pela carragenina é resultado da inibição de vários outros componentes do processo. Assim, Kono et al. (1997), demonstraram que o ácido cafeico é capaz de fazer o seqüestro dos radicais superóxido, peroxinitrito e hidroxil de forma bastante eficiente. Calikoglu et al., (2003) mostraram que o derivado fenetil éster foi capaz de prevenir o dano tecidual induzido por estresse oxidativo em um modelo de isquemia/reperfusão. Uma vez que o peroxinitrito e os ROS de forma geral possuem importante papel no edema de carragenina (Salvemini et al. 1996; Zang et al., 2002), é tentador sugerir que a neutralização dos radicais livres através de seu seqüestro pode contribuir para o efeito antiedematogênico destes derivados. Além disso, uma vez que os derivados butil, octil e fenetil inibiram a expressão da iNOS em macrófagos RAW 264.7 é grande a probabilidade de que sejam capazes de inibir a expressão

desta enzima também no modelo *in vivo* assim como a expressão de várias outras proteínas envolvidas no desenvolvimento da resposta inflamatória como por exemplo citocinas outras que a IL-1 β e moléculas de adesão.

Finalmente, vários trabalhos mostram que o ácido caféico e alguns de seus derivados como o fenetil éster são potentes inibidores da atividade das enzimas lipooxigenase e ciclooxigenase, que dão origem aos eicosanóides (Koshihara et al., 1983; Sudína et al., 1993; Michaluart et al., 1999; Etzenhouser et al., 2001; Rossi et al., 2002), assim como inibem a expressão da COX-2 em diferentes modelos inflamatórios (Michaluart et al., 1999; Maffia et al., 2002). Os prostanóides constituem o elemento base da resposta tardia à carragenina no modelo do edema de pata (Di Rosa et al., 1971) e sua biossíntese é aumentada pelo NO produzido durante esta resposta (Sautebin et al., 1995). Mais uma vez, é tentador sugerir que a inibição da biossíntese de prostanóides pelos derivados também seja responsável pela inibição do edema de pata descrita no presente trabalho, sendo que os níveis diminuídos de prostanóides poderiam decorrer tanto da inibição da expressão da COX-2 quanto dos níveis diminuídos de NO endógeno.

Em conclusão, o presente trabalho confirma e estende dados da literatura mostrando que os derivados do ácido caféico, especialmente os derivados butil, octil e fenetil éster, são providos de importantes ações antiinflamatórias tanto quando estudados em modelos *in vitro* como *in vivo*. Diante destes fatos, é possível afirmar que o ácido caféico e seus derivados firmam-se cada vez mais como novas e importantes moléculas com potencial ação antiinflamatória.

RESUMO

1 – O presente trabalho avaliou os efeitos de derivados do ácido cafeico em modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*.

2 – No modelo da produção de óxido nítrico (NO) pela linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), o pré-tratamento (-30 min) com os derivados metil, etil, butil, octil, benzil ou fenetil éster (1,5625 – 50 μM) inibiu de forma significativa e dependente da concentração o acúmulo de nitrito (produto estável de oxidação do NO) no sobrenadante celular. As CI_{50} ($\text{IC}_{95\%}$) obtidas foram: 21 (13-35) μM , 12 (11-13) μM , 8,4 (8-9) μM , 2,4 (2-3) μM , 10,7 (8-13) μM , 4,8 (2,8-8,4) μM para os derivados metil, etil, butil, octil, benzil e fenetil, respectivamente.

3- Os derivados metil, etil, butil, octil, benzil e fenetil inibiram a produção de nitrito decorrente da degradação do SNAP, um doador de NO, com inibições de $49\pm 0,5\%$, $44\pm 1\%$, $44\pm 1\%$, $29\pm 2\%$, $34\pm 3\%$ e $49\pm 4\%$ para os derivados metil (50 μM), etil (25 μM), butil (25 μM), octil (6,25 μM), benzil (25 μM) e fenetil (12,5 μM), respectivamente. Estes resultados mostram que os derivados interagem diretamente com o NO fazendo seu seqüestro, sugerindo que este é dos mecanismos pelos quais os compostos inibem o acúmulo de nitrito do sobrenadante das células RAW 264.7.

4 – Nenhum dos derivados estudados foi capaz de inibir a atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima responsável pela produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, indicando que a diminuição dos níveis de nitrito no sobrenadante das células RAW 264.7 não parece ser decorrente da atividade diminuída da iNOS.

5 – O pré-tratamento (-30 min) das células RAW 264.7 com os derivados butil, octil, fenetil (1,5625 – 25 μM) ou com o inibidor de síntese protéica a cicloheximida (1 μM) foi capaz de inibir a expressão da iNOS induzida pelo LPS, sugerindo que a diminuição do acúmulo de nitrito no sobrenadante celular é devida, pelo menos em parte, a uma menor produção de NO decorrente da expressão diminuída da iNOS.

6 – No modelo *in vivo* do edema de pata de camundongos induzido pela injeção de carragenina, o pré-tratamento dos animais com os derivados butil, octil e fenetil (30 mg/kg, i.p., - 1h) assim como com a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., - 4 h) inibiu significativamente e de forma bastante duradoura o aumento do volume das patas injetadas, com inibições de $73\pm 3\%$, $65\pm 6\%$, $50\pm 5\%$ e $75\pm 3\%$ para os derivados butil, octil e fenetil e para o corticóide dexametasona, respectivamente.

7 – O possível envolvimento do seqüestro de neutrófilos no tecido da pata em reposta à injeção de carragenina foi medido indiretamente através da

quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Tanto os derivados butil, octil e fenetil (30 mg/kg, i.p., - 1h) quanto a dexametasona (0,5 mg/kg, s.c., - 4 h) inibiram significativamente o aumento da atividade da MPO nas patas injetadas com carragenina, sendo que os percentuais de inibição obtidos foram: $28\pm 2\%$, $49\pm 1\%$, $31\pm 2\%$ e $38\pm 5\%$, para os derivados butil, octil e fenetil e para a dexametasona, respectivamente.

8 – O aumento dos níveis da citocina IL-1 β nas patas injetadas com carragenina também foi significativamente atenuado pelo pré-tratamento dos animais com os derivados butil, octil, fenetil ou com a dexametasona nas doses e tempos mencionados acima, com percentuais de inibição de: $30\pm 17\%$, $24\pm 2\%$, $36\pm 3\%$ e $54\pm 2\%$, respectivamente.

9 – De acordo com os resultados obtidos nos modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo*, pode-se afirmar que os derivados do ácido caféico possuem atividade antiinflamatória que parece ser mediada, pelo menos em parte, pela capacidade dos mesmos em fazer o seqüestro do NO e alterar a transcrição gênica de proteínas envolvidas no desenvolvimento e na manutenção do processo inflamatório.

SUMMARY

1 – The present work evaluated the effects of six caffeic acid derivatives in *in vitro* and *in vivo* inflammation models.

2 – Pre-incubation (-30 min) of cells with caffeic acid derivatives, namely methyl, ethyl, butyl, octyl, benzyl and phenethyl ester (1,5625 – 50 μM) inhibited, in a significant and concentration-dependent manner, nitrite (stable product of NO oxidation) accumulation in LPS-treated RAW 264.7 macrophages. IC 50(CI 95%) obtained values were: 21 (13-35) μM , 12 (11-13) μM , 8,4 (8-9) μM , 2,4 (2-3) μM , 10,7 (8-13) μM , 4,8 (2,8-8,4) μM for the methyl, ethyl, butyl, octyl, benzyl and phenethyl derivatives, respectively.

3- All studied caffeic acid derivatives inhibited nitrite accumulation originated from SNAP, a known NO donor, with inhibitions of $49\pm 0,5\%$, $44\pm 1\%$, $44\pm 1\%$, $29\pm 2\%$, $34\pm 3\%$ and $49\pm 4\%$ for methyl (50 μM), ethyl (25 μM), butyl (25 μM), octyl (6,25 μM), benzyl (25 μM) and phenethyl (12,5 μM), respectively. These results indicate that caffeic acid derivatives are able to interact directly with NO, scavenging it, suggesting that this may be a mechanism responsible, at least in part, for inhibition of nitrite accumulation in RAW 264.7 supernatant.

4 – None of the studied caffeic acid derivatives was able to inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity, the enzyme responsible for NO production in LPS-activated RAW 264.7 macrophages, indicating that the decrease of nitrite levels in cell supernatant do not seem to be the result of iNOS activity inhibition.

5 – Pre-incubation (-30 min) of RAW 264.7 cells with butyl, octyl or phenethyl derivatives (1,5625 – 25 μM) as well as with protein synthesis inhibitor cycloheximide (1 μM) inhibited LPS-induced iNOS expression, suggesting that the decrease in nitrite accumulation in RAW 264.7 supernatant is due, at least in part, to an inhibitory effect on iNOS expression.

6 – In the *in vivo* model of carragenan-induced mouse paw oedema, pre-treatment of animals with butyl, octyl or phenethyl derivatives (30 mg/kg, i.p., - 1h) as well as with dexamethasone (0,5 mg/kg, s.c., - 4 h) significantly inhibited, in a long-lasting manner, the paw oedema, with inhibitions of $73\pm 3\%$, $65\pm 6\%$, $50\pm 5\%$ and $75\pm 3\%$ for butyl, octyl and phenethyl derivatives and for the corticoid dexamethasone, respectively.

7 – The leukocyte sequestration in paw tissues in response to carragenan injection was measured indirectly as quantification of myeloperoxidase (MPO) activity. Butyl, octyl and phenethyl derivatives (30 mg/kg, i.p., - 1h) as well as dexamethasone (0,5 mg/kg, s.c., - 4 h) inhibited in a significant manner MPO activity increase in

carrageenan-injected paws, with inhibitions of: $28\pm 2\%$, $49\pm 1\%$, $31\pm 2\%$ and $38\pm 5\%$, respectively.

8 – The increase in interleukin-1 β (IL-1 β) levels in carrageenan-injected paws was also significantly attenuated by the pre-treatment of mice with butyl, octyl, phenethyl or with dexamethasone, assessed in the doses and times mentioned before, displaying percentages of inhibition of: 30 ± 17 , 24 ± 2 , 36 ± 3 and 54 ± 2 , respectively.

9 – Accordingly to the results obtained in *in vitro* and *in vivo* inflammation models, it can be suggested that caffeic acid derivatives possess indeed anti-inflammatory activity that seems to be mediated, at least in part, by compounds ability to scavenge NO and alter gene expression of proteins involved in the development and maintenance of the inflammatory process.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREASEN, M.F.; KROON, P. A.; WILLIAMSON, G.; GARCIA-CONESA, M.T. Esterase activity able to hydrolyse dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. **J. Agric. Food. Chem.**, 49: 5679-84, 2001.
- ASSREUY, J.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y.; MONCADA, S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br. J. Pharmacol.**, 108: 833-7, 1993.
- ASSREUY, J.; MONCADA, S. A perfusion system for the long term study of macrophage activation. **Br. J. Pharmacol.**, 107: 317-21, 1992.
- BALLIGAND, J.L.; UNGUREANU, D.; KELLY, R.A.; KOBZIK, L.; PIMENTAL, D.; MICHEL, T.; SMITH, T.W. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. **J. Clin. Invest.**, 91 (5): 2314-9, 1993.
- BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, 73 (Suppl. 1): S53-S63, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-54, 1976.
- BREDDT, D.S. e SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87:682-685, 1990.
- BREMER, V.; TOJO, A.; KIMURA, K.; HIRATA, Y.; GOTO, A.; NAGAMATSU, T.; SUZUKI, Y.; OMATA, M. Role of nitric oxide in rat nephrotoxic nephritis: comparison between inducible and constitutive nitric oxide synthase. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 8 (11):1712-21, 1997.
- BUNE, A.J.; BRAND, M.P.; HEALES, S.J.R.; SHERGILL, J.K.; CAMMACK, R.; COOK, H.T. Inhibition of tetrahydrobiopterin synthesis reduces *in vivo* nitric oxide production in experimental endotoxic shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 220: 13-19, 1996.
- BRYK, R.; WOLFF, D.J. Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. **Pharmacol. Ther.**, 84: 157-78, 1999.

- CAIVANO, M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW 264.7 macrophages. **FEBS Letters**, 429: 249-53, 1998.
- CALIKOGLU, M.; TAMER, L.; SUCU, N.; COSKUN, B.; ERCAN, B.; GUL, A.; CALIKOGLU, I.; KANIK, A. The effects of caffeic acid phenethyl ester on tissue damage in lung after hindlimb ischemia-reperfusion. **Pharm. Res.**, 48: 397-403, 2003.
- CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Med.**, 69: 973-83, 2003a.
- CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.**, *in press*, 2003b.
- CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert. Opin. Emerging Drugs**, 6 (2): 261-79, 2001.
- CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. **Br J.Pharmacol.**, 114: 1005 – 1013, 1995.
- CARTRON, E.; CARBONNEAU, M-A.; FOURET, G.; DESCOMPS, B.; LÉGER, C.L. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. **J. Nat. Prod.**, 64: 480-86, 2001.
- CASTELLUCCIO, C.; PAGANGA, G.; MELIKIAN, N.; BOLWELL, G.P.; PRIDHAM, J.; SAMPSON, J.; RICE-EVANS, C. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. **FEBS Letters**, 368: 188-92, 1995.
- CHAKRAVORTTY, D.; KATO, Y.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; MU, M.M.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. Inhibition of caspase 3 abrogates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by preventing activation of NF- κ B and c-Jun NH₂-terminal kinase/stress-activated protein kinase in RAW 264.7 murine macrophage cells. **Infec. Immun.**, 69 (3): 1315-21, 2001.
- CHEN, C-C.; WANG, J-K. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. **Mol. Pharmacol.**, 55: 481-8, 1999.

- CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDT, D.S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and diseases. **J. Clin. Invest.**, 100: 2424-29, 1997.
- CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **TIPS**, 24(2): 91-95, 2003.
- CLOSS, E.I.; SCHELD, J-S.; SHARAFI, M.; FÖRSTERMANN, U. Substrate supply for nitric oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. **Mol. Pharmacol.**, 57: 68-74, 2000.
- COBB, J.P.; DANNER, R.L. Nitric oxide and septic shock. **JAMA**, 175: 1192-96, 1996.
- COLEMAN, J.W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, 129: 4-10, 2002.
- COLEMAN J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, 1: 1397-1406, 2001.
- CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S.; HOBBS, A.J. Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J. Immunol.**, 166: 3873-81, 2001.
- CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; BEIRITH, A.; CKLESS, K.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, C.V.; WILHEM FILHO, D.; CALIXTO, J.B. Complexes *trans*-[RuCl₂(nic)₄] and *trans*-[RuCl₂(i-nic)₄] as free radical scavengers. **Inorg. Biochem.**, 86: 587-94, 2001.
- CROW, J.P.; BECKMAN, J.S. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite *in vivo*. In: Nitric oxide, biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications. Ignarro, L and Murad, F (ed), Academic Press, San Diego, p 17-43, 1995.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; SARRO, A.; Van de LOO, F.A.J.; CAPUTI, A. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 162: 1859-66, 2000.
- DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 41: 203-36, 2001.
- DAWSON, V.L.; KIZUSHI, V.; HUANG, M.P.L.; SNYDER, S.H., DAWSON, T.M. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. **J. Neurosci.**, 16: 2479-87, 1996.

- DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate toxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 88: 6368-71, 1991.
- De YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, 26: 335-341, 1989.
- Di ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, 104: 15-29, 1971.
- DINARELLO, C.A. Biologic bases for interleukin-1 in disease. **Blood**, 87: 2095-147, 1996.
- DINARELLO, C.A. Interleukin -1. **Ann. NY Acad. Sci.**, 546: 122-32, 1988.
- DLASKA, M.; WEISS, G. Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. **J. Immunol.**, 162: 6171-77, 1999.
- DUSTING, G.J. Nitric oxide in cardiovascular disorders. **J. Vasc. Res.**, 32: 143-61, 1995.
- DUSTING, G.J.; MACDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med.**, 27: 395-405, 1995.
- DWEIK R.A.; LASKOWSKI, D.; ABU-SOUD, H.M.; KANEKO, F.T.; HUTTE R.; STUEHR, D.J.; ERZURUM, S.C. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. **J. Clin. Invest.**, 101: 660-66, 1998.
- ETZENHOUSER, B.; HANSCH, C.; KAPUR, S.; SELASSIE, C.D. Mechanism of toxicity of esters of caffeic and dihydrocaffeic acids. **Bioorg. Med. Chem.**, 9: 199-209, 2001.
- EVANS, C.H.; STEFANOVIC-RACIC, M.; LANCASTER, J. Nitric oxide and its role in orthopaedic disease. **Clin. Orthop.**, 312: 175-94, 1995.
- FANG, Y-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, 18: 872-79, 2002.
- FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol. Ther.**, 91: 179-213, 2001.

- FERNANDES, D.; SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflam. Res.**, 51: 377-84, 2002.
- FITZPATRICK, L.R.; WANG, J.; LE, T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor- κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 299 (3): 915-20, 2001.
- FLEMING, I.; BAUERSACHS, J.; FISSALTHALER, B.; BUSSE, R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ. Res.**, 82: 686-95, 1998.
- FRANCISCHI, J.N.; YOKORO, C.M.; POOLE, S.; TARUFI, W.L.; CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, 399: 243-49, 2000.
- FURCHGOTT, R.F. **TIPS**, 2:173, 1981.
- FURCHGOTT, R.F. e ZAWADZKI, J.F. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373, 1980.
- GIRALDELO, C.M.M.; ZAPPELLINI, A.; MUSCARA, M.N.; De LUCA, I.M.S.; HYSLOP, S.; CIRINO, G.; ZATZ, R.; De NUCCI, G., ANTUNES, E. Effect of arginine analogues on rat hindpaw edema and mast cell activation in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, 257: 87-93, 1994.
- GREEN L.C.; TANNENBAUM S.R.; GOLDMAN R. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, 212: 56-68, 1981.
- GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D.A. Physiological chemistry of superoxide and nitric oxide interactions. **Adv. DNA Damage Repair**, 125-34, 1999.
- GROSS, P.M.; WEAVER, D.F.; BOWERS, R.J.; NAG, S.; HO, L.T., PANG, J.J.; ESPINOSA, F.J. Neurotoxicity in conscious rats following intraventricular SNAP, a nitric oxide donor. **Neuropharmacol.**, 33 (7): 915-27, 1994.
- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. In: Mediators of inflammation. Haanen, C; Vermes. I (eds), Oxford, London: Rapid communications of Oxford Ltd., p:5-15, 1995.
- HALLEMEESCH, M.M.; LAMERS, W.H.; DEUTZ, N.E.P. Reduced arginine availability and nitric oxide production. **Clin. Nutri.**, 21 (4): 273-79, 2002.

- HALLIWELL, B. Antioxidants: the basic – what they are and how to evaluate them. In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy. Sies, H (ed), Academic Press, San Diego, p: 3-20, 1997.
- HAMMERMMAN, R.; DREIßIG, M.D.M.; MÖSSNER, J.; FUHRMANN, M.; BERRINO, L.; GÖTHERT, M.; RACKÉ, K. Nuclear factor- κ B mediates simultaneous induction of inducible nitric oxide synthase and up-regulation of the cationic amino acid transporter CAT-2B in rat alveolar macrophages. **Mol. Pharmacol.**, 58: 1294-1302, 2000.
- HANDY, R.L.C.; MOORE, P.K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **British J. Pharmacol.**, 123: 1119-26, 1998.
- HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20: 243-9, 1987.
- HERENCIA, F.; FERRÁNDIZ, M.A.; UBEDA, A.; GUILLÉN, I.; DOMINGUEZ, J.N.; CHARRIS, J.E.; LOBO, G.M.; ALCARAZ, M.J. 4-dimethylamino-3',4'-dimethoxychalcone downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. **Free Rad. Biol. Med.**, 30 (1): 43-50, 2001.
- HIBBS, J.B. Jr.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, 235: 473-76, 1987.
- HIERHOLZER, C.; HARBRECHT, B.; MENEZES, J.; KANE, J.; MACMICKING, J.; NATHAN, C.F.; PEITZMAN, A.; BILLIAR, T.R.; TWEARDY, D.J. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the antiinflammatory response after hemorrhagic shock. **J. Exp. Med.**, 187: 1-12, 1998.
- HONDA, S.; MIGITA, K.; HIRAI, Y.; UEKI, Y.; YAMASAKI, S.; URAYAMA, S.; KAWABE, Y.; FUKUDA, T.; KAWAKAMI, A.; KAMACHI, M.; KITA, M.; IDA, H.; AOYAGI, T.; EGUCHI, K. Induction of COX-2 expression by nitric oxide in rheumatoid synovial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 268 (3): 928-31, 2000.
- HSIAO G.; SHEN, M-Y.; CHANG, W-C.; CHENG, Y-W.; PAN, S-L.; KUO, Y-H.; CHEN, T-F.; SHEU, J-R. A novel antioxidant, octyl caffeate, supresses LPS/IFN- γ -induced inducible nitric oxide synthase gene expression in rat aortic smooth muscle cells. **Biochem. Pharmacol.**, 7598: 1-10, 2003.
- HUERRE, M.R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res. Immunol.**, 147: 417 - 434, 1996.

- INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gut. In: Hardman, JC; Limbird, LE. (eds.) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9th ed. New York: Mc Graw-Hill. pp 617-657, 1995.
- IYENGAR, R.; STUEHR, D.J.; MARLETTA, M.A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 84: 6369, 1987.
- JOHNSON, M.J.; BILLIAR, T.R. Roles of nitric oxide in surgical infection and sepsis. **World J. Surg.**, 22: 187-96, 1998.
- KANWAR, S.; WALLACE, J.L.; BEFUS, D.; KUBES, P. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. **Am. J. Physiol.**, 266 (2 Pt 1): G 222-9, 1994.
- KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Ann. Rev. Immunol.**, 18: 621-63, 2000.
- KERN, S.M.; BENNETT, R.N.; MELLON, F.A.; KROON, P.A.; GARCIA-CONESA, M.T. Absorption of hydroxycinnamates in humans after high-bran cereal consumption. **J. Agric. Food. Chem.**, 51: 6050-55, 2003.
- KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 2161-68, 2002.
- KIMURA, M.; MITANI, H.; BANDO, T.; TOTSUKA, T.; HAYASHI, S. Mast cell degranulation in rat mesenteric venule: effects of L-NAME, methylene blue and ketotifen. **Pharmacol. Res.**, 39 (5): 397-402, 1999.
- KLAHR, S.; MORRISSEY, J. Renal disease: two faces of nitric oxide. **Lab. Invest.**, 72: 1-3, 1995.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, 298: 249-58, 1994.
- KOBZIK, L.; BREDT, D.S.; LOWENSTEIN, C.J.; DRAZEN, J.; GASTON, B.; SUGARBAKER, D.; STAMLER, J.S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 9: 371-77, 1993.
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochim. Biophys. Acta**, 1335: 335-42, 1997.

- KOSHIHARA, Y.; NEICHI, T.; MUROTA, S-I.; LAO, A-N.; FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. **Biochim. Biophys. Acta**, 792: 92-7, 1984.
- KOUROUNAKIS, A.P.; GALANAKIS, D.; TZIAKITZIS, K.; REKKA, E.A.; KOUROUNAKIS, P.N. Synthesis and pharmacological evaluation of novel derivatives of anti-inflammatory drugs with increased antioxidant and anti-inflammatory activities. **Drug Develop. Res.**, 47: 9-16, 1999.
- KRACHT, M.; SAKLATVALA, J. Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. **Cytokine**, 20 (3): 91-106, 2002
- KRONCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 376: 327-43, 1995.
- LAROUX, F.S.; PAVLICK, K.P.; HINES, L.N.; KAWACHI, S.; HARADA, H.; BHARWANI, S.; HOFFMAN, J.M.; GRISHAM, M.B. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta Physiol. Scand.**, 173: 113-8, 2001.
- LEWIS, R.S.; TAMIR, S.; TANNENBAUM, S.R.; DEEN, W.M. Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, 270 (40): 29350-5, 1995.
- MACMICKING J.; XIE Q.W.; NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, 15: 323-350, 1997.
- MAFFIA, P.; IANARO, A.; PISANO, B.; BORRELLI, F.; CAPASSO, F.; PINTO, A.; IALENTI, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury. **Br. J. Pharmacol.**, 136: 353-60, 2002.
- MCINTYRE, T.M.; MODUR, V.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Molecular mechanisms of early inflammation. **Thromb. Haem.**, 78: 302 - 305, 1997.
- MCKAY, D.M.; LU, J.; JEDRZKIEWICZ, S.; HO, W.; SHARKEY, K.A. Nitric oxide participates in the recovery of normal jejunal epithelial ion transport following exposure to the superantigen, Staphylococcus aureus enterotoxin B. **J. Immunol.**, 163 (8): 4519-26, 1999.
- MENDES, A.F.; CARVALHO, A.P.; CARAMONA, M.M.; LOPES, M.C. Role of nitric oxide in the activation of NF- κ B, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes. **Inflamm. Res.**, 51: 369-75, 2002.
- MICHALUART, P.; MASFERRER, J.L.; CAROTHERS, A. M.; SUBBARAMAIAH, K.; ZWEIFEL, B.S.; KOBOLT, C.; MESTRE, J.R.; GRUNBERGER, D.; SACKS, P.G.; TANABE, T.; DANNENBERG, A.J. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in

human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **Cancer Res.**, 59: 2347-52, 1999.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: wich, where, how and why? **J. Clin. Invest.**, 100 (9): 2146-2152, 1997.

MIOTLA, J.M.; TEIXEIRA, M.M., HELLEWELL, P.G. Supression of acute lung injury in mice by an inhibitor of phosphodiesterase type 4. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.**, 18: 411-420, 1998.

MOILANEN, E.; VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Ann. Med.**, 27: 359-67, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.

MURAD, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. **Angew. Chem. Int. Ed.**, 38: 1856-68, 1999.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. **J.Clin. Invest.**, 78: 1-5, 1986.

NAGAOKA, T.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherland propolis. **Biol. Pharm. Bull.**, 26 (4): 487-91, 2003.

NAKAMURA, H.; MOTOYOSHI, S.; KADOKAWA, T. Anti-inflammatory action os interleukin 1 through the pituitary-adrenal axis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 151 (1): 67-73, 1988.

NARDINI, M.; LEONARDI, F.; SCACCINI, C.; VIRGILI F. Modulation of ceramide-induced NF- κ B binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. **Free Rad. Biol. Med.**, 30 (7): 722-33, 2001.

NARDINI, M.; SCACCINI C.; PACKER, L.; VIRGILI, F. In vitro inhibition on the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin rich pine bark (*Pinus marittima*) extract. **Biochim. Biophys. Acta**, 1474: 219-25, 2000.

NARDINI, M.; PISU, P.; GENTILI, V.; NATELLA, F.; Di FELICE, M.; PICCOLELLA, E.; SCACCINI, C. Effect of caffeic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. **Free Rad. Biol. Med.**, 25: 1098-105, 1998.

NATARAJAN, K.; SINGH, S.; BURKE Jr., T.R.; GRUNBERGER, D.; AGGARWAL, B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation

of nuclear transcription factor NF- κ B. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 93: 9090-95, 1996.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, 420: 846-52, 2002.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J. Clin. Invest.**, 100: 2417-23, 1997.

NATHAN, C.; XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, 78: 915-18, 1994.

NODAN, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos in: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, organizado por Simões C.M.O et al., Ed. UFRGS / UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Res.**, 912: 171-75, 2001.

ORBAN, Z.; MITSIADES, N.; BURKE Jr., T.R.; TSOKOS, M.; CHROUSOS, G.P. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. **Neuroimmunomodul.**, 7: 99-105, 2000.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-6, 1987.

PAUL, A.; CUENDA, A.; BRYANT, C.E.; MURRAY, J.; CHILVERS, E.R.; COHEN, P.; GOULD, G.W.; PLEVIN, R. Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. **Cell. Signal.**, 11 (7): 491-7, 1999.

PAUL-CLARK, M.J.; GILROY, D.W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D.A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **J. Immunol.**, 166 (2): 1169-77, 2001.

PERKINS, D.J.; KNISS, D.A. Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE₂ biosynthesis in macrophages. **J. Leuk. Biol.**, 65: 792-9, 1999.

- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. **J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.**, 9: 281-90, 1983.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, 20 (7): 933-56, 1996.
- ROSSI, A.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; De SARRO, A.; DUGO, L.; FELICE, M.R.; VAN DE LOO, F.A.J.; Di ROSA, M.; MUSCI, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. Regulation of prostaglandin generation in carrageenan-induced pleurisy by inducible nitric oxide synthase in knockout mice. **Life Sci.**, 72: 1199-1208, 2003.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, 73 (suppl. 1): S21-S29, 2002.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z-Q.; BOURDON, D.M.; STERN, M.K.; CURRIE, M.G.; MANNING, P.T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **Eur. J. Pharmacol.**, 203: 217-20, 1996.
- SANTOLINI, J.; MEADE, A.L.; STUEHR, D.J. Differences in three kinetic parameters underpin the unique catalytic profiles of nitric-oxide synthases I, II and III. **J. Biol. Chem.**, 276 (52): 48887-98, 2001.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários in: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, organizado por Simões C.M.O et al., Ed. UFRGS / UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.
- SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia**, 71, S48-S57, 2000.
- SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; Di ROSA M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. **Biochem. Pharmacol.**, 55: 1113-17, 1998.
- SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; Di ROSA, M. Endogenous nitric oxide increases prostaglandin biosynthesis in carrageenan rat paw oedema. **Eur. J. Pharmacol.**, 286: 219-22, 1995.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos in: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, organizado por Simões C.M.O et al., Ed. UFRGS / UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.

- SCHMIDT, K.N.; AMSTAD, P.; CERUTTI, P.; BAEUERLE, P.A. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. **Chem. Biol.**, 2: 13-22, 1995.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, F.; GUIMARÃES, C.; LIMA, J.L.F.C.; MATOS, C.; REIS, S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. **J. Agric. Food Chem.**, 48: 2122-26, 2000.
- SIMMONS, W.W.; UNGUREANU-LONGROIS, D.; SMITH, G.K.; SMITH, T.W.; KELLY, R.A. Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. **J. Biol. Chem.**, 271 (39): 23928-37, 1996.
- SONG, Y.S.; PARK, E-H.; HUR, G.M.; RYU, Y.S.; LEE, Y.S.; LEE, J.Y.; KIM, Y.M.; JIN, C. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer Letters**, 175: 53-61, 2002.
- STUEHR, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochem. Biophys. Acta**, 1411: 217-30, 1999.
- STUEHR, D.J.; GROSS, S.S.; SAKUMA, I.; LEVI, R.; NATHAN, C.F. Activated murine macrophage secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. **J. Exp. Med.**, 169: 1011, 1989.
- STUEHR, D.J. e MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophage produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 82: 7738-42, 1985.
- SUD'INA, G.F.; MIRZOEVA, O.K.; PUSHKAREVA, M.A.; KORSHUNOVA, G.A.; SUMBATYAN, N.V.; VARFOLOMEEV, S.D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. **FEBS Letters**, 329 (1,2): 21-4, 1993.
- SZABÓ, C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, 6 (2): 79-88, 1996.
- TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN BA, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed. Pharmacother.**, 56: 200-7, 2002.
- TETSUKA, T.; DAPHNA-IKEN, D.; MILLER, B. W.; GUAN, Z.; BAIER, L. D.; MORRISON, A. R. **J. Clin. Invest.**, 97: 2051-56, 1996.
- TIMOTHY, R.; BILLIAR, M.D. Nitric oxide, novel biology with clinical relevance. **Annals of Surgery**, 221 (4): 339- 49, 1995.

- TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. **Nature**, 420: 853-59, 2002.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **FASEB J.**, 46: 118-26, 1987.
- VIRGILI, F.; KOBUCHI, H.; PACKER, L. Procyanidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol™): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages. **Free Rad. Biol. Med.**, 24 (7-8): 1120-29, 1998.
- YOU DIN, K.A.; MCDONALD, J.; KALT, W.; JOSEPH, J.A. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **J. Nutr. Biochem.**, 13: 282-88, 2002.
- VAN DE LOOSDRECHT, A.A.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G.J.; BEELEN, R.H.J.; LANGENHUIJSE, M.M.A.C. Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J. Immunol. Meth.**, 141:15-22, 1991.
- WADSWORTH, T.L.; KOOP, D.R. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochem. Pharmacol.**, 57: 941-949, 1999.
- WALLEY, K.R.; MCDONALD, T.E.; HIGASHIMOTO, Y.; HAYASHI, S. Modulation of proinflammatory cytokines by nitric oxide in murine acute lung injury. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 160: 698-704, 1999.
- WANG, J.; STUEHR, D.J.; ROUSSEAU, D.L. Tetrahydrobiopterin-deficient nitric oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analogue. **Biochemistry**, 34: 7080-87, 1995.
- WANG, J.; YI, G.H.; KNECHT, M.; CAI, B.L.; POPOSKIS, S.; PACKER, M.; BURKHOFF, D. Physical training alters the pathogenesis of pacing-induced heart failure through endothelium-mediated mechanisms in awake dogs. **Circulation**, 96: 2683-92, 1997.
- WEISS, U. Editorial nature insight: Inflammation. **Nature**, 420: 845, 2002.
- WERNER-FELMAYER, G.; PRAST, H.; WERNER, E.R.; PHILIPPU, A.; WACHTER, H. Induction of GTP cyclohydrolase I by bacterial lipopolysaccharide in the rat. **FEBS Letters**, 322 (3): 223-226, 1993.
- WILSON, R.I.; YANOVSKY, J.; GODECKE, A.; STEVENS, D.R.; SCHRADER, J.; HAAS, H.L. Endothelial nitric oxide and LTP. **Nature**, 386: 338, 1997.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 94 (13): 6954-8, 1997.

XIONG, Q.; TEZUKA, Y.; KANEKO, T.; LI, H.; TRAN, L.Q.; HASE, K.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Inhibition of nitric oxide by phenylethanoids in activated macrophages. **Eur. J. Pharmacol.**, 400: 137-144, 2000.

ZANG, Y.; WANG, J-Z.; WU, Y-J.; LI, W-G. Anti-inflammatory effect of recombinant human superoxide dismutase in rats and mice and its mechanism. **Acta Pharmacol. Sin.**, 23: 439-44, 2002.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 109-110, 1983.