UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RANGEL LEAL SILVA

**Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e
anti-hipernociceptivo da Isobruceína B**

Ribeirão Preto

2013

RANGEL LEAL SILVA

Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e
anti-hipernociceptivo da Isobruceina B

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como pré-requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Ciências Biológicas –
Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Rangel Leal

Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo da Isobruceina B. Ribeirão Preto, 2013. 98 f.

Dissertação de Mestrado, apresentado à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

1. Isobruceina B. 2. Inflamação. 3. Hipernocicepção 4. Citocinas

Nome: SILVA, Rangel Leal

Título: Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo da Isobruceina B

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, Ciências Biológicas – Farmacologia.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Profº. Dr. João Batista Calixto - UFSC

Profº. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto – FMRP/USP

Profº. Dr. Thiago Mattar Cunha – FMRP/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo apoio e incentivo dado durante não só durante a pós-graduação, mas em toda minha vida.

Ao meu irmão, Weidson, por direta e indiretamente ter sido um grande incentivador da minha carreira acadêmica.

À Larissa Perruci pelo incentivo, amor e companheirismo, que contribuíram de forma indispensável para minha estabilidade em vários âmbitos para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo e orientador, Dr. Thiago Mattar Cunha, por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório, acreditando em meu potencial, e por durante todo este período ter discutido, ensinado, orientado e acompanhado todos os problemas e soluções para a execução deste projeto.

Aos meus amigos da Republica Ksona, Francisco, Alexandre Biá, Jean, Tiago, Valdeci e ao ex-morador Alisson, que ao longo destes anos, me concederam suas amizades e contribuíram com meu processo de formação e amadurecimento.

Aos meus grandes amigos André e Alexandre pela amizade e companheirismo, apoio, incentivo e auxílio nos momentos bons e ruins.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Andreza Urba, Andressa Duarte, David, Denis, Geovani, Miriam, Flavia, Cristina, Flávio, Paulo, Daniele, Paula Giselle, Rafael Ferreira, Rafael Sanches, Jhimmy, Adriana, Alexandre Kanashiro, Fabricio, Fabiane, Gabriela, Vanessa, Fernanda, Maria Cláudia, Paula Barbim, Rafael Poloni, Larissa, Morena, Mauricio, Guilherme, Silvia, Walter, Jozi, Gabriel e Marcelo por terem contribuído direta ou indiretamente para minha formação acadêmica e social.

Ao Dr. Rafael França pelo ensinamento e assistência na execução de muitos experimentos.

À Dr. Adriana Manfiolli pelos esclarecimentos necessários para execução do experimento de separação de extratos nuclear e citoplasmático.

Aos técnicos Serginho, Bruno, Ieda, Giuliana, Katia, Diva por todo apoio tanto na execução de experimentos, quanto na preparação para executá-los.

Aos professores José Carlos, Fernando Cunha e Sérgio Ferreira por seus ensinamentos e contribuições para minha formação acadêmica.

Aos funcionários Fátima, Soninha e Ramon pelos auxílios e informações concedidas durante este período.

A agência de fomento sem as quais nada disso seria possível: CNPq, FAEPA e FAPESP.

*“A tarefa não é tanto ver o que
ninguém viu ainda, mas pensar o que
ninguém pensou sobre algo que todos
veem.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

SILVA, R. L. **Mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo da Isobruceina B**. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Objetivo: Avaliar o efeito da Isobruceina B como anti-hipernociceptivo e anti-inflamatório, e identificar o mecanismo molecular envolvido. **Métodos:** Inicialmente, o efeito da IsoB sobre a hipernocicepção inflamatória do tecido plantar foi avaliada por von Frey eletrônico. Os tecidos plantares foram removidos para quantificação indireta da infiltração de neutrófilos por mieloperoxidase (MPO). Seu efeito nocicepção térmica foi avaliado em camundongos pelo teste da placa quente a 55° C. Camundongos pré-tratados com IsoB (s.c.) e tratados com carragenina (i.pl), tiveram seus tecidos plantares removidos para quantificação da liberação de citocinas TNF, IL-1 β e KC/CXCL1. Para os estudos *in vitro*, foram utilizados macrófagos extraídos da cavidade peritoneal de camundongos naïve, pré-tratados com 3% de tioglicolato (i.p.) ou de linhagem RAW 264.7. Macrófagos peritoneais foram incubadas com lipopolissacarídeo (LPS) na presença ou ausência de diferentes concentrações de IsoB, para a quantificação da liberação das citocinas TNF, IL-1 β , KC/CXCL1 e IL-10 no sobrenadante pelo método de ELISA. A produção *in vitro* de óxido nítrico (NO) foi indiretamente determinada pelo método de Griess. Para verificar o efeito da IsoB sobre a via do NF-kB, foram utilizados macrófagos RAW 264.7 estavelmente transfectados com um gene para expressão de luciferase dependente de NF-kB (RAW-Luc), incubados com diferentes estímulos (LPS, peptideoglicano, TNF e acetato de forbol miristato [PMA]) na presença ou ausência de IsoB. A atividade da luciferase foi detectada por meio do Luminômetro. A citotoxicidade da IsoB foi avaliada por MTT, lactato desidrogenase e ensaios de citotoxicidade pelo azul de tripan em macrófagos, *in vitro*. O efeito da IsoB em macrófagos, sobre a degradação do I κ B- α e translocação do NF-kB (pela marcação da subunidade p65) para o núcleo e foram examinados por *Western Blot* de extratos nucleares e citoplasmáticos, e por Microscopia Confocal. O efeito da IsoB sobre a transcrição do RNAm do gene TNF induzido por LPS, foi avaliada por RT-PCR. Células HEK 293 transfectadas foram utilizadas para verificar o efeito da IsoB sobre a síntese de proteínas. **Resultados:** A IsoB inibe a hipernocicepção inflamatória, mas não tem efeito sobre a nocicepção térmica. IsoB inibiu a produção/libertação das citocinas IL-1 β e KC/CXCL1 *in vivo*, e de TNF, IL-1 β , KC/CXCL1, IL-10 e NO *in vitro* de forma concentração-dependente. O composto analisado também inibiu a atividade da luciferase, NF-kB dependente, por todos os estímulos testado, de forma concentração-dependente. Não foi detectada atividade citotóxica em nenhuma das concentrações testadas. A IsoB não inibe a degradação do I κ B- α ou a translocação de NF-kB para o núcleo. Inesperadamente, o composto natural testado também não reduziu a transcrição de RNAm do gene TNF, porém inibiu a síntese de luciferase inespecificamente induzida. **Conclusão:** A redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 β e KC/CXCL1 e da migração de neutrófilos são mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo da IsoB. Os presentes resultados sugerem um mecanismo molecular baseado na direta inibição da síntese de proteica.

Palavras-Chave: Isobruceina B, anti-inflamatório, anti-hipernociceptivo, Macrófagos, NF-kB, Quassinóide

ABSTRACT

SILVA, R. L. **Mechanisms involved in the anti-inflammatory and anti-hypernociceptive effects of Isobrucein B.** 2013. Dissertation (Master's Degree in Pharmacology) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Objective: To evaluate the effect of the Isobruceina B (IsoB) as anti-hypernociceptive and anti-inflammatory, and identify the molecular mechanism involved. **Methods:** Initially the effect of IsoB upon inflammatory hypernociception on plantar tissue was evaluated by electronic von Frey. Plantar tissues were removed for indirect quantification of neutrophil infiltration by myeloperoxidase (MPO). Its effect on thermal nociception in mice was evaluated by the hot plate test at 55 ° C. Mice pretreated with IsoB (s.c.) and treated with carrageenan (i.p.), their tissues were removed for quantification of plantar release of cytokines TNF, IL-1 β and KC/CXCL1. For in vitro studies, macrophages derived from peritoneal cavity of naive mice, pretreated with 3% thioglycolate (i.p.) or line RAW 264.7 were used. Peritoneal macrophages were incubated with lipopolysaccharide (LPS) in the presence or absence of different concentrations of IsoB for the quantification of the release of cytokines TNF, IL-1 β , and IL-10 KC/CXCL1 in the supernatant by ELISA. In vitro production of nitric oxide (NO) was indirectly determined by the Griess method. To verify the effect of IsoB on the pathway of NF-kB, RAW 264.7 macrophages stably transfected with a gene to expression NF-kB-dependent luciferase (RAW-Luc) were incubated with different stimuli (LPS, peptidoglycan, TNF and phorbol myristate acetate [PMA]) in the presence or absence of IsoB. The luciferase activity was detected by the Luminometer. The cytotoxicity of IsoB was assessed by the MTT, lactate dehydrogenase and cytotoxicity assays trypan blue on macrophages in vitro. The effect of IsoB on macrophages upon the I κ B- α degradation and NF-kB translocation (p65 subunit for marking) to the nucleus were examined by Western blot of nuclear and cytoplasmic extracts, and Confocal Microscopy. The effect of IsoB on the TNF mRNA gene transcription induced by LPS was assessed by RT-PCR. Transfected HEK 293 cells were used to verify the effect of IsoB on the protein synthesis. **Results:** IsoB inhibits inflammatory hypernociception, but has no effect on thermal nociception. IsoB inhibited the production/release of cytokines IL-1 β and KC/CXCL1 in vivo, and TNF, IL-1 β , KC/CXCL1, IL-10 and NO in vitro in a concentration-dependent manner. The analyzed compound also inhibited luciferase activity NF-kB-dependent for all stimuli tested in a concentration-dependent manner. Cytotoxic activity was not detected in any of the concentrations tested. The IsoB not inhibit the degradation of I κ B- α or translocation of NF-kB to the nucleus. Unexpectedly, the natural compound tested neither reduced transcription of TNF mRNA, but inhibited the synthesis of luciferase induced nonspecifically. **Conclusion:** The reduction on release of pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-1 β and KC/CXCL1 and neutrophil migration are mechanisms involved in anti-inflammatory and anti-hypernociceptive effects of IsoB. The present results suggest a molecular mechanism based on the direct inhibition of protein synthesis.

Keywords: Isobrucein B, Antiinflammatory, Antihynociceptive, Macrophages, NF-kB, Quassinoid

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 – Exemplos de PAMPS, DAMPS e receptores envolvidos no reconhecimento	24
Tabela 2 - Sequência dos primers <i>sense</i> e <i>anti-sense</i> utilizados	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Estrutura dos receptores tipo Toll (TLR).....	26
Figura 2 - Cascata de sinalização dos TLRs.	27
Figura 3 - Substâncias nociceptivas liberadas após a lesão tecidual.....	34
Figura 4 - Estrutura química da Isobruceína B	38
Figura 5 - Estrutura do plamídeo <i>pmirGLO Dual-Luciferase</i>	54
Figura 6 - Isobruceína B reduz de maneira dose-dependente a hipernocicepção inflamatória	60
Figura 7 - Isobruceína B não apresenta efeito sobre a nocicepção térmica.....	61
Figura 8 - A Isobruceína B inibe, de forma dose-dependente, a migração de neutrófilos induzida por carragenina.	63
Figura 9 – Isobruceína B inibe a liberação das citocinas pró- inflamatórias IL-1 β e KC/CXCL1, mas não TNF, induzida por carragenina <i>in vivo</i>	64
Figura 10 - A Isobruceína B inibe a liberação de citocinas TNF, IL- 1 β e KC/CXCL1 por macrófagos, <i>in vitro</i> , estimulados com lipopolissacarídeo.....	66
Figura 11 – A Isobruceína B reduz de forma concentração- dependente a liberação de NO e IL-10 por macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	67

Figura 12 - Isobruceina B inibe a expressão do gene da luciferase dependente de NF-κB, induzida por estímulos e vias de sinalização diferentes.	69
Figura 13 - Isobruceina B não exibe citotoxicidade em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>.....	72
Figura 14 - Isobruceina B não exibe efeito sobre a degradação de IκBα ou translocação do NF-κB (p65) para o núcleo	73
Figura 15 - Isobruceina B não tem efeito sobre a translocação de NF-κB para o núcleo	74
Figura 16 - Isobruceina B não reduz a transcrição do TNF RNAm induzido por LPS.....	76
Figura 17 - Isobruceina B inibe a atividade de luciferase induzida constitutivamente	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT₃ – receptor de 5-hidroxitriptamina tipo-3

a.C – antes de Cristo

AP-1 – proteína ativadora tipo-1

ASIC₃ - canal sensível a íons ácidos tipo-3

ATP – trifosfato de adenosina

BK₂ ou B2 - receptor de bradicinina tipo-2

CB1 - receptor de canabinóide tipo-1

CD4⁺ - grupamento de diferenciação-4 positivo

CD8⁺ - grupamento de diferenciação-8 positivo

CGRP- peptídeo relacionado ao gene de calcitonina

CINC-1 - quimioatraente de neutrófilos induzida por citocina tipo-1

CLR - receptores de lectina tipo C

d.C – depois de Cristo

DAMP - padrão molecular associado a dano

DEG/ENaC - canal iônico de degenerina

Dex - Dexametasona

DMSO - dimetilsulfoxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

E.P.M. – erro padrão médio

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GRO - citocina de crescimento regulado por oncogene

HMGB-1 - grupo de proteínas com alta mobilidade tipo-B1

i.pl. - intraplantar

ICAM-1 - molécula tipo-1 de adesão intercelular

IFN- γ – interferon- γ

IFN- β – interferon- β

I κ B – inibidor do NF- κ B

IKK – complexo I κ B quinase

IKK*i* – I κ B quinase-*i*

IKK α – I κ B quinase- α

IKK β – I κ B quinase- β

IKK ϵ – I κ B quinase- ϵ

IL-1R1 – receptor tipo-1 de IL-1
IL-1 β – interleucina-1 β
IL-6 – interleucina-6
IL-8 – interleucina-8
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
IP-10/CXCL10 - proteína imune-10
IRAK – quinase associada ao receptor de IL-1
IRF-3 – fator de transcrição tipo-3 regulador de IFN
IsoB – Isobruceína B
KC/CXCL1 – quimiocina derivada de queratinócitos
LDH - lactato desidrogenase
LPS – lipopolissacarídeo
LRR – repetições ricas em leucina
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1/CCL2 - proteína quimiotática de monócitos-1
MTT - 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difenil tetrazólio
MyD88 – fator 88 de diferenciação mielóide
NEMO/IKK γ – modulador essencial do NF-kB/IkB quinase- γ
NF-kB - fator nuclear-kappaB
NGF - fator de crescimento neural
NLR - receptores do tipo NOD
NLS - sequência de localização nuclear
NO - óxido nítrico
NOD - domínio de oligomerização e de ligação a nucleotídeos
PAMP – padrão molecular associado a patógeno
PGE₂ - prostaglandina E₂
PGN - peptideoglicano
PDTC - pirrolidina ditiocarbamato
PKA - proteína quinase A
PKC – proteína quinase C
PPR – receptor de reconhecimento de padrão
RNA – ácido ribonucleico
RNA_m – RNA mensageiro
S.A. – Sociedade Anônima

s.c. – subcutânea

SARM – *sterile α and armadillo-motifs-containing protein*

TAK-1 - quinase tipo-1 ativada por TGF- β

TBK-1 – *Tank-binding Kinase 1*

TGF- β – fator de transformação do crescimento- β

TIR – receptor de interleucina-1/Toll

TIRAP - proteína adaptadora contendo domínio TIR

TLR – receptores do tipo Toll

TNF – fator de necrose tumoral

TNFR1 - receptor tipo 1 de TNF

TNFR2 - receptor tipo 2 de TNF

TRAF-6 – fator-6 associado ao receptor de TNF

TRAM – molécula adaptadora relacionada à TRIF

TRIF – adaptador contendo domínio TIR induzido por IFN- β

VCAM-1- molécula tipo-1 de adesão vascular

VR1/VRL1 - receptor vanilóide tipo-1

LISTA DE SÍMBOLOS

° C – graus Celsius

i.p. - intraperitoneal

cm – centímetros

μM - micromolar (10^{-6} molar)

mM – milimolar (10^{-3} molar)

M – molar

μL – microlitro(s) (10^{-6} litro)

μm – micrometro(s) (10^{-6} metro)

μg – micrograma(s) (10^{-6} grama)

mM – milimolar (10^{-3} molar)

mL – mililitro(s) (10^{-3} litro)

mm – milímetro(s) (10^{-3} metro)

mm² – milímetros quadrados

mg – miligrama(s) (10^{-3} grama)

ng – nanograma(s) (10^{-9} grama)

pg – picograma(s) (10^{-12} grama)

kg – quilograma(s) (10^3 gramas)

US\$ - dólares

® - registrado

mg – miligrama(s) (10^{-3} gramas)

v - volts

nm – nanômetro(s) (10^{-9} metro)

CO₂ – gás carbônico

NO – óxido nítrico

rpm – rotações por minuto

L – litro(s)

x – vezes

h – hora(s)

min – minuto(s)

s – segundo(s)

kDa – kilodalton(s) (10^3 daltons)

G – unidades de gravidade

g – grama(s)

Δ – variação

± - mais ou menos

n – número de amostras

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO	19
1.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO	20
1.2.1 Reconhecimento de PAMPs E DAMPs	22
1.2.2 Sinalização intracelular por ativação de TLRs.....	25
1.2.3 Papel das citocinas TNF, IL-1B E KC/CXCL1 na inflamação	29
1.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO	32
1.4 PESQUISA DE FARMACOS DE ORIGEM NATURAL NO BRASIL	36
1.4.1 Isobruceína B	37
2. OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAIS E METODOS.....	37
3.1 ANIMAIS	37
3.2 OBTENÇÃO DA ISOBRUCEINA B	37
3.3 TESTES IN VIVO	38
3.3.1 Avaliação da hipernocicepção mecânica.....	38
3.3.3 Teste da placa quente	38
3.3.3 Quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	39
3.3.4 Quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1B e KC/CXCL1 <i>in vivo</i>	40
3.4 TESTES <i>IN VITRO</i>	40
3.4.1 Coleta e cultura de macrófagos peritoneais	40
3.4.2 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1B e KC/CXCL1, e IL-10 <i>in vitro</i>	41
3.4.3 Quantificação indireta de no pelo método de griess.....	42
3.4.4 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	42
3.4.5 Ensaio de luciferase em macrófagos RAW 264.7-LUC	44
3.4.6 Localização de p65 (NF-KB) nuclear por imunofluorescência.....	45
3.4.7 Separação de extratos nuclear e citoplasmático	46
3.4.8 Quantificação nuclear e citoplasmática de p65 e IκB-α, respectivamente, por <i>western blot</i>	46

3.4.9 Quantificação da expressão do RNAm do gene TNF por PCR-RT	48
3.4.10 Propagação e isolamento do plasmídeo <i>PmirGLO Dual-luciferase</i>	49
3.4.11 Transfecção em células HEK 293	51
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
3.6 PREPARO DE SOLUÇÕES	52
4. RESULTADOS	54
4.1 ISOBRUCEINA B REDUZ A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA MECÂNICA, MAS NÃO TEM EFEITO SOBRE A NOCICEPÇÃO TÉRMICA	54
4.2 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA LOCAL	57
4.3 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A LIBERAÇÃO DE TNF, IL- 1B, KC/CXCL1, IL-10 E NO POR MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	60
4.4 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A EXPRESSÃO DO GENE LUCIFERASE DEPENDENTE DE NF-KB, EM MACRÓFAGOS RAW 264.7	63
4.5 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE MEDIADA PELA ISOBRUCEINA B SOBRE MACRÓFAGOS <i>IN VITRO</i>	65
4.6 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A DEGRADAÇÃO DE IKBA E TRANSLOCAÇÃO DE NF-KB PARA O NÚCLEO	67
4.7 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO RNAm DO GENE TNF INDUZIDO POR LPS.....	70
4.8 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A SÍNTESE DE LUCIFERASE EM CÉLULAS HEK 293 TRANSFECTADAS COM PLASMÍDEO <i>PMIRGLO DUAL-LUCIFERASE</i>	72
5. DISCUSSÃO.....	74
6. CONCLUSÃO	86
REFERENCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

Não foi na idade contemporânea (século XVI ao atual) que o homem começou a utilizar recursos naturais como ferramenta terapêutica para o tratamento de doenças ou sintomas desconfortáveis. Seria impossível inferir a época exata à qual os animais, incluindo o *Homo sapiens sapiens*, descobriram o potencial terapêutico da natureza. Contudo, os primeiros relatos escritos, conhecidos, da utilização de plantas como fonte terapêutica são datados de 2900 a.C.. Constam de tabuletas cuneiformes de argila encontradas na Mesopotâmia, descrevendo mais de 1000 diferentes preparações derivadas de plantas (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Embora a utilização vegetal na terapêutica seja uma prática tão antiga, apenas no século XIX o homem começou a isolar seus princípios ativos. Um marco especial deste feito foi a descoberta e isolamento do quinino, presente na casca de *Cinchona*, pelos cientistas franceses Caventou e Pelletier (PHILLIPSON, 2001). Com esta prática, passamos a manipular as fontes naturais, de forma a potencializar seus efeitos desejados (eficácia) e minimizar os indesejados (segurança).

Estima-se que, atualmente, cerca de 40% dos medicamentos disponíveis para venda são originados de fontes naturais, sendo 25% oriundo de plantas (FERREIRA; NEVES; BINSFELD, 2011). Todavia, permanece predominante a utilização tradicional de plantas nas formas de chá, extrato ou óleo, produzidos artesanalmente para cuidados primários à saúde. De acordo com Organização Mundial da Saúde, em 2002, 60-90% da população de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento faziam uso tradicional de plantas para fins terapêuticos.

Embora não ofereça segurança adequada, a utilização tradicional dos recursos naturais como medicamento é fundamental para grande parte da

população, que por questões culturais, éticas, socioeconômicas ou simplesmente geográficas, não, ou pouco, utilizam medicamentos industrializados. Este tipo de utilização, ao longo dos anos, permitiu o acúmulo de conhecimento sobre efeitos terapêuticos de muitas plantas. Baseado neste tipo conhecimento, o presente trabalho investigou os efeitos anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo da Isobruceína B (IsoB), um composto extraído da planta *Picrolemma sprucei* Hook f., a qual é utilizada pela população indígena e nativa do estado do Amazonas, principalmente, para tratamento patologias gastrointestinais.

1.1 ASPECTOS GERAIS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é a consequência da resposta do organismo a danos físicos, infecções ou estimulação antigênica, no qual ocorre, geralmente, acúmulo local de fluido, proteínas plasmáticas e células do sistema imune. Seus sinais e sintomas clínicos característicos foram listados por Celsius, escritor romano do primeiro século d.C., como “os quatro sinais cardinais da inflamação”: *rubor* (vermelhidão), *tumor* (inchaço), *calor* (aquecimento) e *dolor* (dor). Um quinto sinal clínico foi adicionado, a *functio laesa* (perda de função), descoberto por Gelfand no segundo século d.C., mas também atribuído a Rudolf Virchow no século XIX (RATHER, 1971; ROCHA E SILVA, 1978).

A resposta inflamatória é uma tentativa de controle do organismo à infecção, injúria ou estimulação antigênica, que pode ser benéfico como, por exemplo, na proteção contra a infecção por micro-organismos, mas também pode tornar-se desregulada e prejudicial, como no choque séptico ou inflamação crônica, com danos teciduais (MEDZHITOV, 2008). Esta resposta é responsável por coordenar as

reações dos vasos, leucócitos e proteínas plasmáticas, com o objetivo de livrar o organismo tanto da causa inicial da lesão celular (por exemplo, micro-organismos e toxinas), quanto das consequências de tal injúria (por exemplo, células e tecidos necróticos). Contudo, mecanismos designados para destruir os agentes invasores e tecidos necróticos, quando inapropriadamente direcionado, ou não adequadamente controlados, tem habilidade intrínseca para danificar os tecidos saudáveis, tornando-se causa de injúria e doença. Nestes casos, a utilização de medicamentos anti-inflamatórios adequados é fundamental para a redução de danos à saúde (BARTON, 2008; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

1.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

A inflamação poder ser induzida por estímulos distintos: (i) danos físicos, (ii) infecções ou (iii) estimulação antigênica, os quais envolvem, fundamentalmente, a participação do sistema imune inato, representado principalmente por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Após algum (i) dano físico ou lesão tecidual, há a exposição de moléculas intracelulares conhecidas como padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como o grupo de proteínas com alta mobilidade-B1 (HMGB-1), S100 e o trifosfato de adenosina (ATP) (BOURS et al, 2006; COLLINS et al, 2004; ZHANG et al, 2010; YU et al, 2006). O reconhecimento destas moléculas, por receptores específicos expressos em células do sistema imune inato, desencadeia uma resposta conhecida como “inflamação estéril”, devido à ausência de infecção microbiana (SRIKRISHNA; FREEZE, 2009).

No processo de (ii) inflamação induzida por infecção, existe o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estes padrões são específicos de micro-organismos (vírus, bactérias, fungos e parasitas), como por exemplo, os componentes da parede celular bacteriana, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico e algumas lipoproteínas (BARTON, 2008; MEDZHITOV, 2007). O reconhecimento destas moléculas, por receptores em células do sistema imune inato, resulta na liberação de mediadores, principalmente citocinas, que coordenam a resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2007).

O desencadeamento da (iii) inflamação por estimulação antigênica é mais complexa e, relativamente, tardia em relação às demais, por necessitar de múltiplas interações entre o sistema imune inato e adaptativo. De forma geral, esta interação é iniciada após o reconhecimento de um antígeno que é processado e apresentado por células do sistema imune inato (principalmente células dendríticas e macrófagos), a células que constituem a imunidade adaptativa, linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Deste modo, os linfócitos são ativados e liberam um conjunto de citocinas que acabam potencializando a resposta imune inata, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e migração de neutrófilos, desencadeando a inflamação (IWAKURA; ISHIGAME, 2006; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os leucócitos, além de serem estimulados por DAMPs e PAMPs, também podem ser ativados por citocinas como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-17, interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (JOVANIC et al, 1998; BACHWICH et al, 1986; NATHAN et al, 1984).

As respostas funcionais induzidas pela ativação dos leucócitos incluem (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004):

- Produção de metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos;
- Degranulação e secreção de enzimas lisossomais;
- Ativação do estresse oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- Produção e liberação de óxido nítrico (NO);
- Produção e liberação de citocinas, que atuam amplificando e/ou regulando as reações inflamatórias.

Juntos, esses mediadores desencadeiam e coordenam uma resposta evolutivamente selecionada por atuarem em conjunto por mecanismos distintos, objetivando livrar o organismo do insulto inflamatório, na maioria das vezes, patogênico e/ou prejudicial.

1.2.1 Reconhecimento de PAMPs e DAMPs

Um dos mais fascinantes problemas da imunologia está no entendimento de como o organismo hospedeiro detecta a presença de agentes infecciosos, depois de invadido, destruindo-o com certa seletividade. Com os avanços nas pesquisas relacionadas à imunidade inata, sabe-se que a identificação inicial do patógeno é mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes receptores reconhecem moléculas que são evolutivamente conservadas entre micro-organismos, os PAMPs, mas também reconhecem algumas moléculas endógenas, os DAMPs (MEDZHITOV, 2007, 2001).

O processo de reconhecimento de um PAMP é, geralmente, iniciado no momento em que um patógeno atravessa a barreira epitelial e invade o tecido. Após

a invasão tecidual e reconhecimento do PAMP por receptores em células do sistema imune, ocorre à ativação celular, indução da produção e secreção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos de cascatas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008 SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Além disso, alguns leucócitos também podem liberar DAMPs, após serem ativados por citocinas ou PAMPs, promovendo uma “retroalimentação positiva” (SCAFFIDI; MISTELI; BIANCHI, 2002; GARDELLA et al, 2002).

Os principais PRRs conhecidos são os receptores do tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C (CLR) e receptores do tipo - domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos - [NOD] (NLR) (MEDZHITOV, 2007). Além de PAMPs, os DAMPs também são reconhecidos por PRRs resultando em repostas similares (BIANCHI, 2007) (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Exemplos de PAMPS, DAMPS e receptores envolvidos no reconhecimento.

	LIGANTE	RECEPTOR	REFERÊNCIA
PAMPS	LPS	TLR4	Poltorak et al, 1998
	PGN	TLR2, NOD1	Fritz et al, 2007; Schwadner et al 1999
	Ácido Lipotecóico	TLR2	Schwadner et al 1999
	Zimosana	TLR2/CLR (Dectina-1)	Dillon et al, 2006
	Flagelina	TLR4	Hayashi et al, 2001
	β-glicanos	CLR (Dectina-1)	Brown, Gordon, 2001
	DNA contendo CpG	TLR9	Hemmi et al, 2000
DAMPs	Proteína de choque térmico 70	TLR4, TLR2	Vabulas et al, 2002
	S100A9	TLR4	Vogl et al, 2007
	S100A8	TLR4	Vogl et al, 2007
	ATP	Receptores Purinérgicos	Burnstock , 1978
	Fibrinogênio	TLR4	Smiley; King; Hancock, 2001
	HMGB1	TLR4, TLR2	Yu et al, 2006
	DNA mitocôndrial	TLR9	Zhang et al, 2010

Os TLR são os PRRs mais bem caracterizados (MEDZHITOV, 2007). Foram identificados inicialmente em moscas do gênero *Drosophila*, e posteriormente descobertos em mamíferos, mostrando sua conservação evolutiva (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY JR, 1997). Estes receptores também desempenham um papel essencial na resposta celular ao LPS (principal

componente da membrana externa de bactérias gram-negativas), PGN, alguns nucleotídeos não-metilados ou até componentes internos como o ácido ribonucleico (RNA) de dupla hélice, que é produzido por alguns vírus (AKIRA; TAKEDA, 2004).

1.2.2 Sinalização intracelular por ativação de TLRs

A sinalização intracelular, após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, proporciona a resposta efetora contra o estímulo. São requeridos muitos acoplamentos entre moléculas e ativações enzimáticas para o desencadeamento da sinalização. Devido o uso preferencial do LPS como ativador de macrófagos, durante as pesquisas realizadas neste trabalho, é dado foco à sinalização pelos TLRs.

Todos os TLRs contêm um domínio extracelular com uma série de repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio intracelular com um conservado módulo de sinalização chamado receptor de interleucina-1/Toll (TIR) (**Figura 1**). Porém, diferentes TLRs podem acionar cascatas de sinalização distintas (**Figura 2**) (AKIRA; TAKEDA, 2004).

Em geral, a cascata de sinalização dos TLRs resulta no recrutamento de moléculas adaptadoras citoplasmáticas, das quais 5 são conhecidas: (i) fator 88 de diferenciação mielóide (MyD88); (ii) proteína adaptadora contendo domínio TIR (TIRAP); (iii) adaptador contendo domínio TIR indutor de – interferon- β – [IFN- β] (TRIF); (iv) molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM); e (v) *sterile α and armadillo-motifs-containing protein* (AKIRA; TAKEDA, 2004). Algumas destas moléculas podem combinar-se e seguir, pelo menos, duas vias distintas na transdução do sinal, após a ativação do TLR: via independente de MyD88

(conduzindo a produção, principalmente, de interferon) ou dependente de MyD88 (a qual leva a formação, prioritariamente, de citocinas pró-inflamatórias) (**Figura 2**) (TAKEDA; AKIRA, 2004; LUA, YEHA, OHASHI, 2008).

Figura 1 - Estrutura dos receptores tipo Toll (TLR). Domínio extracelular com uma série de repetições ricas em leucina (LRRs), e o domínio intracelular conservado com o receptor de interleucina-1/Toll (TIR). (Adaptado de: AKIRA; TAKEDA, 2004)

Por meio da via independente de MyD88, a molécula adaptadora TRIF exerce papel importante. Esta pode ativar, de forma relativamente rápida, o fator de transcrição tipo-3 regulador de IFN (IRF3), responsável pela transcrição do interferon, e tardiamente, o fator nuclear- κ B (NF- κ B), como descrito na **Figura 2** (LUA; YEHA; OHASHI, 2008; TAKEDA, AKIRA, 2004).

Figura 2 - Cascata de sinalização dos TLRs. Todos os receptores Toll sinalizam por uma ou duas vias distintas, através das moléculas adaptadoras MyD88 e/ou TRIF. A via dependente de MyD88 desencadeia a ativação em cascata das IRAKs, TRAF-6, que em associação com outras quinases ativam o complexo IKK, formado por NEMO/IKK γ , IKK β e IKK α . Ativado este complexo fosforila a I κ B, direcionando para degradação via proteassoma, libertando o fator de transcrição NF- κ B, permitindo sua translocação para o núcleo. A via TRIF também desencadeia a ativação de fatores de transcrição através de TBK-1/IKK ϵ /IKK ι , como IRF3 e, tardiamente, NF- κ B. (Adaptado de: TAKEDA; AKIRA, 2004).

Por meio da via dependente de MyD88, esta molécula adaptadora se associa à quinases que contenham uma região chamada domínio de morte, como as quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAKs), que prosseguem a sinalização intracelular (SUZUKI et al, 2002; WANG et al, 2009). O fator-6 associado ao receptor de TNF (TRAF-6) também é crítico na resposta pela via dependente de MyD88. Após sua ativação por IRAKs, o TRAF-6 forma um complexo com outras proteínas, desencadeando a ativação da quinase tipo-1 ativada por - fator de transformação do

crescimento- β - [TGF- β] (TAK1) (LUA; YEHA; OHASHI, 2008). Então, a TAK-1, em complexo com outras proteínas, ativa o complexo da I κ B quinase (IKK), formado pelas subunidades IKK β e IKK α , e a subunidade reguladora NEMO/IKK γ . Embora seja crítico o papel do complexo envolvendo TAK-1 na ativação do IKK após a estimulação do TLR, os mecanismos que medeiam esta ação permanecem obscuros. Depois de ativada, a IKK desencadeia a fosforilação, levando a ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal, do inibidor do NF- κ B (I κ B), um inibidor da translocação deste fator de transcrição para o núcleo (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999; LUA; YEHA; OHASHI, 2008; AKIRA, TAKEDA, 2004; HAYDEN; GHOSH, 2008).

Embora existam vários subtipos de I κ B (I κ B- α , I κ B- β e I κ B- ϵ), porém o membro protótipo e mais estudado da família é o I κ B- α . Este é rapidamente degradado durante a ativação canônica do NF- κ B, por várias vias de sinalização. O modelo estabelecido de como o I κ B- α retém o NF- κ B no citoplasma, é explicado como uma interação na qual ocorre a ocultação da sequência de localização nuclear (NLS) presente no neste fator de transcrição, impedindo que esta região seja reconhecida por importinas, que se ligam ao NLS e conduzem a molécula para o interior do núcleo (HAYDEN; GHOSH, 2008).

O NF- κ B é um fator de transcrição que pode ser formado por homo ou heterodímeros, de uma família de 5 membros: c-Rel (REL), RelA/p65 (RELA), RelB (RELB), p50/p105 (NFKB1) e p52/p100 (NFKB2). O mais prevalente na maioria das células, assim como em macrófagos, é o heterodímero p65-p50, que, homeostaticamente, é inibido, sobretudo, pela interação de I κ B- α com a subunidade p65. Com a degradação da molécula inibitória, o NF- κ B entra no núcleo e promove a expressão de vários genes, como para as citocinas pró-inflamatórias, selectinas e

óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enzima que produz NO a partir de L-arginina (HAYDEN; GHOSH, 2008; SIGGERS et al, 2012).

1.2.3 Papel das citocinas TNF, IL-1 β e KC/CXCL1 na inflamação

A liberação de citocinas, principalmente as pró-inflamatórias, tem papel crucial na indução e manutenção do processo inflamatório (BARTON, 2008). Estes mediadores desencadeiam uma série de eventos locais, que podem ser descritos, de maneira resumida, da seguinte forma: (i) aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares, permitindo a exsudação de líquidos que contêm componentes de cascatas de enzimas (sistema complemento e coagulação), que resultam na produção de mais mediadores da inflamação; (ii) expressão e/ou ativação de selectinas e integrinas (moléculas de adesão) na superfície das células endoteliais e leucócitos, às quais permitem o rolamento, adesão e travessia dos leucócitos pelo endotélio; (iii) quimiotaxia, com migração de leucócitos da microcirculação, causando seu acúmulo no foco da injúria para eliminar o agente agressor (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

As citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta aos patógenos (citocinas pró-inflamatórias) são um grupo de moléculas estruturalmente diverso e inclui a IL-1 β , IL-6, interleucina-12, TNF- α além da interleucina-8 (IL-8) em humanos, as quais desempenham papel crucial na gênese do processo inflamatório (NATHAN, 1987; VERRI JR et al, 2006; MEDZHITOV, 2007). Por outro lado, algumas citocinas como interleucina-10 (IL-10) têm papel regulador, e inibem a produção de citocinas

pró-inflamatórias, por isso são consideradas citocinas anti-inflamatórias (PERRETTI, SZABÓ, THIEMERMANN, 1995; PLATZER et al, 1995).

O TNF- α (também chamado simplesmente de TNF) é produzido, predominantemente, por macrófagos e linfócitos T ativados. Inicialmente é sintetizado como pró-TNF, uma proteína de 26 kDa. Uma metaloprotease chamada enzima conversora de TNF- α , cliva o pró-TNF expresso na membrana celular, liberando sua forma solúvel de 17 kDa, o TNF propriamente dito. Ambas as formas são ativas, porém podem ter atividades biológicas diferentes (BRADLEY, 2008). Esta citocina tem atuação mediada pelos receptores tipo 1 de TNF (TNFR1) e tipo 2 (TNFR2) (BAZZONI; BEUTLER, 1996). Distintas atividades biológicas têm sido descritas para cada um destes receptores. TNFR1 está relacionado com a migração de neutrófilos, choque induzido por endotoxina e dor neuropática e inflamatória, enquanto que o TNFR2 medeia apoptose celular e necrose (VERRI JR et al, 2006; CUNHA et al, 2005).

De forma geral, o TNF pode atuar no processo inflamatório de maneiras distintas: aumentando a permeabilidade do endotélio vascular; aumentando a expressão de moléculas de adesão como a molécula tipo-1 de adesão intercelular (ICAM-1), E-selectina e a molécula tipo-1 de adesão vascular (VCAM-1); pode induzir a síntese de uma série de citocinas quimiotáticas, incluindo proteína imune-10 (IP-10/CXCL10), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1/CCL2) em alguns tecidos específicos, deste modo, favorecendo a migração de neutrófilos; outro forma é estimulando do crescimento de células endoteliais, promovendo a angiogênese e, desta forma, auxiliando na recuperação dos vasos danificados pelo processo inflamatório (LAUTERBACH et al, 2008; MACKAY et al, 1993; BRADLEY, 2008; IBELGAUFTS, 2011)

O TNF é importante citocina para a resposta efetiva do sistema imune a infecções por bactérias, vírus e parasitas. Contudo, sua inapropriada ou excessiva produção pode ser prejudicial em determinadas situações patológicas como na artrite reumatóide, espondilite anquilosante, doenças inflamatórias intestinais, psoríase, doenças respiratórias, cardiovasculares, renais e no sistema nervoso central (BRADLEY, 2008).

Outro importante mediador solúvel envolvido na resposta inata durante a inflamação é a IL-1 β . Esta citocina é sintetizada como uma proteína com 35 kDa, principalmente por macrófagos, monócitos e células dendríticas ativadas. Entretanto, a IL-1 β só se torna ativa quando clivada pela cisteína protease caspase-1 (também denominada enzima conversora de IL-1 β), liberando a citocina ativa com 17 kDa (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). Como diversas outras citocinas pró-inflamatórias, a produção de IL-1 β é regulada por 2 sinais distintos: (I) indução de sua síntese, principalmente via NF- κ B, e (II) pela ativação do inflamassoma, um complexo celular de proteínas associadas estimulado por alguns DAMPs ou PAMPs. Este complexo ativa proteases da família das caspases, que quebram os precursores recém sintetizados de IL-1 β , tornando-os biologicamente ativos (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; DINARELLO, 2005). Após sua liberação, a IL-1 β medeia seus efeitos biológicos através de um receptor de membrana chamado receptor tipo-1 de IL-1 (IL-1R1), o qual possui estrutura e vias de transdução de sinal similar aos receptores Toll. Desse modo, a estimulação do receptor de IL-1 também pode levar a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora tipo-1 (AP-1) (DUNNE; O'NEILL, 2003).

A citocina derivada de queranócitos (KC), ou CXCL1 pela nova classificação, é o maior quimioatraente de neutrófilos em camundongos (ZLOTNIK; YOSHIE,

2000; FRINK et al, 2007; FILIPPO et al, 2008). No intuito de contemplar ambas as classificações, neste trabalho é adotada a sigla KC/CXCL1. Esta citocina quimiotática pertence à família das quimiocinas, e tem ação através dos receptores CXCR1/CXCR2, presente em leucócitos. Em ratos esta quimiocina é equivalente ao quimioatraente de neutrófilos induzida por citocina tipo-1 (CINC-1), e em humanos à citocina de crescimento regulado por oncogene (GRO), que atua similarmente a IL-8 (WATANABE et al, 1989; FILIPPO et al, 2008).

O KC/CXCL1 foi inicialmente identificado por sua superexpressão em queratinócitos murinos, monócitos e macrófagos, em resposta a fator de crescimento derivado de plaquetas e fator estimulante de macrófagos. Sua síntese também é induzida por TNF- α (IBELGAUFTS, 2011) e ativação de TLR2 e TLR4, por via dependente de MyD88 (FILIPPO et al, 2008).

Camundongos transgênicos expressando KC/CXCL1 no timo, pele e língua, tiveram grande infiltração de neutrófilos em sítios de expressão do transgene, sem induzir destruição tecidual local, demonstrando a capacidade quimiotática desta citocina independente de outra ativação neutrofílica (LIRA et al, 1994). Além disso, KC/CXCL1 pode ainda estimular a produção de outros mediadores como IL-1 β , aminas simpáticas e prostanóides (CUNHA et al, 2005), desta forma, apresentando importante participação em processos inflamatórios.

1.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO

A dor pode ser definida como uma percepção desagradável de uma sensação nociceptiva. Este conceito envolve dois componentes: nocicepção e percepção. A percepção da dor é uma função integradora, modulada por elementos emocionais,

motivacionais e experiências de vida. Já a nocicepção é resultado de sensações nociceptivas geradas pela ativação de subpopulações de fibras neurais primárias sensoriais, que transmitem a informação nociceptiva para a medula espinhal, de onde é retransmitido para níveis supraespinais e podendo, então, ser percebida como dor (VERRI JR et al, 2006).

A hipernocicepção, ou hiperalgesia, ocorre após a sensibilização de nociceptores, ou seja, a redução do limiar de excitação das fibras neurais (principalmente os tipos A δ e C) que conduzem o estímulo doloroso (CUNHA et al, 2005; JULIUS; BASBAUM, 2001). A sensibilização de fibras nociceptivas ocorre, geralmente, após o acionamento de receptores presentes em neurônios, desencadeando a ativação de quinases intracelulares, como proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC), que fosforilam canais iônicos específicos, de forma a facilitar a despolarização após um estímulo despolarizante, como mecânico, térmico ou químico (ALEY; LEVINE; 1999; VELÁZQUEZ; MOHAMMAD; SWEITZER, 2007).

A lesão tecidual e a inflamação são fontes de muitas substâncias hipernociceptivas e nociceptivas, que diretamente sensibilizam e/ou ativam, respectivamente, as fibras condutoras da nocicepção (**Figura 3**). Dentre as substâncias que atuam sensibilizando estas fibras, podemos destacar as prostaglandinas, bradicinina e aminas simpaticomiméticas (CUNHA et al, 2005; VERRI JR et al, 2006; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Figura 3 - Substâncias nociceptivas liberadas após a lesão tecidual. O dano tecidual ocasiona a liberação de diversos mediadores como bradicinina, 5-HT, prostaglandinas, NFG, ATP e íons H⁺ que atuam reduzindo o limiar de excitação ou despolarizando a fibra neural. O nervo despolarizado também pode liberar substâncias como CGRP e substância P que atuam em vasos, mastócitos e neutrófilos produzindo uma retroalimentação positiva. A despolarização da fibra periférica é conduzida até a medula espinhal, de onde é retransmitido para os níveis superiores do sistema nervoso central. A caixa acima ilustra alguns mediadores liberados e seus respectivos receptores em fibras neurais condutoras de estímulos nociceptivos. Siglas: peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP); fator de crescimento neural (NGF); receptor tipo-2 de bradicinina (BK₂, atualmente B₂); receptor tipo-3 de 5-hidroxitriptamina (5-HT₃); receptor tipo-1 vanilóide (VR1/VRL1, atualmente TRPV1); canal iônico de degenerina (DEG/ENaC); receptor de prostaglandina E₂ (PGE₂); receptor de canabinóide tipo-1 (CB1); canal sensível a íons ácidos tipo-3 (ASIC₃). (Adaptado de: JULIUS; BASBAUM, 2001).

O papel das citocinas pró-inflamatórias, como indutoras da inflamação, está atrelado indiretamente a hipernocicepção, de forma que a redução da liberação destas citocinas inibe a hipernocicepção induzida por um estímulo inflamatório (CUNHA et al, 2005, 2008a, 2008b, 2008c). As citocinas pró-inflamatórias, como descrito anteriormente, são as principais responsáveis por induzir a migração leucocitária, e estas células tem papel fundamental na hipernocicepção. A liberação de mediadores hipernociceptivos no modelo de inflamação local aguda parece ser dependente da presença de neutrófilos, sendo que o bloqueio da migração destes leucócitos inibe a hipernocicepção inflamatória, mas a administração de mediadores, como por exemplo, prostaglandina E₂, leucotrieno B₄ ou dopamina, mantém o efeito hipernociceptivo na ausência de neutrófilos (CUNHA et al, 2008a; LEVINE et al, 1984).

A dor é uma sensação desagradável que pode ocorrer em distúrbios como lesão mecânica do tecido, ou como sintoma de várias patologias, incluindo artrite, neuropatia e câncer. Estudos tem demonstrado a função critica da inflamação na indução e manutenção da dor nestas patologias, de modo que o uso de medicamentos anti-inflamatórios tem sido uma das opções no tratamento deste sintoma (JULIUS; BASBAUM, 2001; CALVO; DAWES; BENNETT, 2012; MERCADANTE, 2001; MANTYH et al, 2002; COURVOISIER et al, 2012). Todavia, em muitos casos, os anti-inflamatórios atuais não geram um efeito na intensidade desejada, ou possuem efeitos colaterais que inviabilizam seu uso em alguns pacientes. Neste sentido, exista busca pelo desenvolvimento de anti-inflamatórios e analgésicos mais potentes e com menor efeito inespecífico. Dentre as fontes de moléculas com este potencial, destaca-se a fonte natural (animais e plantas), que

fornecem uma infinidade de compostos estruturalmente diversos e, muitas vezes, de difícil síntese (NEWMAN; CRAGG, 2007; GUTAM; JACHAK, 2009).

1.4 PESQUISA DE FARMACOS DE ORIGEM NATURAL NO BRASIL

O Brasil é possuidor de uma das maiores floras do mundo em quantidade de espécies, que inclui mais de 43.400 entre plantas e fungos (CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL, 2012). Porém, apesar da grande diversidade, não há utilização adequada destes recursos para seu próprio desenvolvimento (CALIXTO, 2005). No Brasil os fitomedicamentos movimentam anualmente cerca de US\$ 400 milhões, com uma taxa de crescimento de 15% ao ano, mas deixa de gerar, aproximadamente, US\$ 5 bilhões ao ano, por não conseguir transformar sua flora em remédios (FERREIRA; NEVES; BINSFELD, 2011).

Apesar do interesse de pesquisadores brasileiros no desenvolvimento de medicamentos a partir de fontes naturais, os estudos são ineficientes e dificilmente resultam em patentes ou chegam à comercialização por grandes indústrias farmacêuticas. Dos mais de 420 fitoterápicos, provenientes de 60 diferentes plantas, registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, somente 11 são de plantas nacionais, e destes 10 não foram desenvolvidos no Brasil. Até o momento apenas o Acheflan® foi inteiramente desenvolvido em território nacional, por iniciativa de uma parceria público-privada, do grupo da Universidade Federal de Santa Catarina, liderado por João Batista Calixto, com a Aché Laboratórios S.A. (FERREIRA; NEVES; BINSFELD, 2011).

Muitas pesquisas têm sido realizadas na busca de identificar substâncias com atividade anti-inflamatória, presente em plantas nativas do Brasil (PAULINO et al, 2008; LEAL et al, 2000; PORTO et al, 2013; PARENTE et al, 2012; BORGES et al, 2013; ELFRIDES et al, 1998; SILVA et al, 2005; CALIXTO et al, 2004). A maioria dos estudos são realizados em universidades, e se baseiam em conhecimentos prévios da população que faz a utilização tradicional destas plantas para o tratamento de um determinado sintoma ou patologia. Este tipo de conhecimento é cientificamente chamado de etnofarmacológico (INTERNATIONAL SOCIETY OF ETHNOPHARMACOLOGY, 2012). Não obstante, o atual estudo é apoiado por evidências etnofarmacológicas que apontam extratos de raízes e folhas da planta *Picrolemma sprucei* possuem efeito terapêutico em gastropatias, como a gastrite (MORETTI et al, 1982; SILVA et al, 2009a; SARAIVA et al, 2002).

1.4.1 Isobruceina B

A população indígena e nativa da Amazônia tem utilizado a planta *P. sprucei* Hook f., também conhecida como *Picrolemma pseudocoffea* Ducke ou, popularmente, como “caferana”, para tratamento de gastropatias, malária e infestações por helmintos (MORETTI et al, 1982; SILVA et al, 2009, NUNOMURA et al, 2006). A Isobruceina B (**Figura 4**) é uma substância da classe dos quassinóides, que pode ser extraída de plantas do gênero *Picrolemma*, como a *P. sprucei* Hook f., através de infusões de raízes, caules e folhas (MORETTI et al, 1982; POHLIT et al, 2009). Os quassinóides constituem uma classe de triterpenos com alto padrão de oxigenação, encontrados quase que exclusivamente em plantas da família *Simaroubaceae* (ALMEIDA, 2007). Esta classe apresenta ampla variedade de

atividades biológicas *in vitro* e/ou *in vivo*, incluindo antitumoral, antimalárica, antiviral, anti-inflamatória, inseticidas, amebicida, antielmíntica, antiulceroso e atividades herbicidas (SILVA et al, 2009a; POHLIT et al 2009; NUNOMURA et al, 2006; VIGNERON et al, 2005; HALL et al, 1983).

Figura 4 - Estrutura química da Isobruceina B.

Muitos quassinóides foram estudados, principalmente, na década de 70 e 80, por demonstrarem atividade terapêutica no tratamento de leucemia, e que resultou na aprovação do uso clínico da bruceatina para quimioterapia deste câncer (EIGEBALY et al, 1979; POLONSKY; MERIENNE; SEVENET, 1981; LIOU et al, 1982; ALMEIDA, 2007). Outros estudos também demonstram atividade de quassinóides como anti-inflamatórios ou inibidores da ativação de fatores de transcrição relacionados a inflamação, como AP-1 e NF-kB (TOMA et al, 2003; DIYABALANAGE et al, 2011; HALL et al, 1983; LAU; LIN; LEUNG, 2010).

Considerando a importância do estudo de compostos naturais no desenvolvimento de novos medicamentos, nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Dor e Inflamação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP em parceria

com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) vem desenvolvendo estudos com um composto isolado da planta *Picrolemma sprucei* Hook f. denominado Isobruceína B (IsoB).

Em estudos prévios de nosso grupo, identificamos atividade gastroprotetora da IsoB no modelo experimental de gastrite induzida por indometacina em camundongos, no qual o pré-tratamento com IsoB reduziu danos gástricos, migração leucocitária e liberação de citocinas pró-inflamatórias (dados não publicados). Baseado nestes resultados preliminares, e no papel crucial das citocinas pró-inflamatórias e da migração leucocitária na gênese da inflamação e dor, o presente estudo objetiva avaliar o potencial efeito da IsoB como anti-hipernociceptivo e anti-inflamatório, e identificar o mecanismo molecular envolvido neste efeito.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da Isobruceína B como anti-hipernociceptivo e anti-inflamatório, e identificar o mecanismo molecular envolvido.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da Isobruceína B sobre a hipernocicepção inflamatória e nocicepção térmica;
2. Identificar o efeito da Isobruceína B sobre a migração de neutrófilos e liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 na resposta inflamatória aguda local;
3. Determinar curva concentração resposta da IsoB sobre a inibição das citocinas TNF- α , IL-1 β e KC/CXCL1 por macrófagos *in vitro*;
4. Avaliar a citotoxicidade, *in vitro*, da IsoB em diferentes concentrações, por diferentes métodos;
5. Elucidar o mecanismo molecular da IsoB na redução/inibição da liberação das citocinas pró-inflamatórias em macrófagos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6 com 20 a 30 g, provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo (USP) - Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina, em caixas de acrílico com dimensões de 29 x 18 x 13 cm (máximo 8 animais por caixa), em fluxo laminar e condições ambientais controladas (temperatura 23-25° C; ciclo claro escuro de 12h), com livre acesso a água e ração (*ad libidum*) até o momento da experimentação. Os experimentos foram realizados em concordância com o Comitê de Ética para Animais de Experimentação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, protocolo número 077/2012.

3.2 OBTENÇÃO DA ISOBRUCEINA B

A Isobruceina B foi extraída e isolada de folhas e raízes da planta *Picrolemma sprucei* Hook f. coletada por A.M.P. em abril de 2003 na selva amazônica, no estado do Amazonas, Brasil. O material coletado foi identificado pelo Dr. W. Thomas (*New York Botanical Garden, New York, NY, USA*). Amostras de garantia (Silva 5729 & 5730) foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. Os procedimentos de extração e isolamento do composto foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, tendo

como responsáveis Rodrigo Amorim e Adrian Pohlit, seguindo os métodos descritos por Silva e colaboradores (2009b).

3.3 TESTES *IN VIVO*

3.3.1 Avaliação da hipernocicepção mecânica

Para a avaliação da hipernocicepção mecânica, os animais foram acondicionados em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm), com piso de grade de arame, 30 minutos antes do início dos testes, e avaliados através do von Frey eletrônico. O teste consiste em evocar um reflexo de retirada súbita na pata traseira, com um transdutor de força de mão (Electronic Anesthesiometer, IITC Life Science, Woodland Hills, CA), adaptado com uma ponta de polipropileno 0,5 mm² que quantifica a pressão gerada pelo contato (CUNHA et al, 2008a). As medidas foram realizadas em dois tempos: (i) logo antes da administração das drogas, obtendo-se a medida basal, e (ii) 3 horas após a administração da carragenina (FMC, Filadélfia) (100 µg/25µL) via i.pl. traseira, em animais previamente tratados, 1 hora antes, com IsoB (0,5, 1 e 5 mg/Kg) ou veículo via s.c.. Os resultados expressam a variação, entre as medidas, da força aplicada para gerar um estímulo nociceptivo, nos diferentes tempos analisados (Δ limiar nociceptivo).

3.3.2 Teste da placa quente

O teste da placa quente consiste na submissão dos camundongos ao uma placa de metal com 10 cm de largura, aquecida a $55 \pm 2^\circ \text{C}$, dentro de um cilindro de

vidro, como descrito por Vale et al. (2004). O limiar térmico é obtido quando o animal tem o comportamento de retirada súbita das patas ou lambida, baseado no tempo, em segundos, de exposição ao teste. Para este teste os camundongos foram tratados com salina, IsoB (5 mg/Kg) ou morfina (8 mg/Kg), e tiveram seu limiar nociceptivo avaliado nos tempos 0, 30, 60 e 180 minutos após a administração das drogas. Para evitar possíveis ferimentos, adotamos o tempo máximo, de submissão do camundongo ao teste, de 40 segundos. Os resultados são expressos como limiar térmico em segundos.

3.3.3 Quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase tecidual foi utilizada como forma de quantificar indiretamente o acúmulo de neutrófilos local, como demonstrado por Bradley et al. (1982). Para este ensaio, os camundongos tratados para avaliação da hipernocicepção mecânica (descrito anteriormente) foram decapitados, e tiveram seu tecido plantar removido e transferido, individualmente, para tubos contendo tampão K_2HPO_4 50 mM e 0,5% trimetilbrometo de hexadecil amônio, pH 6,0. As amostras foram trituradas e homogeneizadas usando o triturador e homogeneizador *Polytron* (PT3100), e logo centrifugadas a 16000 G por 4 minutos. Então, 10 μ L do sobrenadante resultante foi adicionado a 200 μ L de tampão K_2HPO_4 50 mM, pH 6,0, contendo *O-dianisidina dihidrocloro* 0,167 mg/mL e peróxido de hidrogênio 0,0005%. A atividade de MPO foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda 450 nm. A atividade obtida foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos purificados da cavidade peritoneal camundongos, 6 horas após a administração de

tioglicolato, via i.p.. A atividade de MPO foi expressa como equivalente ao número de neutrófilos por mg de tecido.

3.3.4 Quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e KC/CXCL1 *in vivo*

Camundongos foram previamente tratados com IsoB (5 mg/Kg) ou veículo via s.c., 1 hora antes da administração intraplantar de carragenina (100 μ g/25 μ L). Após 3 h da administração da carragenina, os animais foram sedados na câmara de anestesia por inalação de isoflurano, e mortos por decapitação. O tecido plantar foi removido e transferido, individualmente, para tubos contendo tampão PBS (composição descrita no item 3.6), de acordo com Cunha et al. (2005). As amostras foram trituradas e homogeneizadas usando o triturador e homogeneizador *Polytron* (PT3100), e logo centrifugadas a 6000 G por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e KC/CXCL1 pelo ensaio imunoenzimático *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), seguindo as instruções do fabricante *Kit Duo Set* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

3.4 TESTES *IN VITRO*

3.4.1 Coleta e cultura de macrófagos peritoneais

Macrófagos foram obtidos 4 dias após a administração de 3 mL de solução tioglicolato de sódio 3%, via i.p., ou de camundongos *naïve* (sem administração prévia

de tioglicolato), como descrito em Figueiredo et al. (2013). Para a coleta, camundongos foram sedados na câmara de anestesia por inalação de isoflurano, e mortos por deslocamento da cervical. Em sequência, foi realizada a assepsia do abdômen e um corte levando a exposição do peritônio, no qual foi injetado 3 mL de meio RPMI-1640. O lavado peritoneal foi extraído e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e as células decantadas foram resuspensas em meio RPMI-1640 suplementado (descrito no item 3.6). A concentração de células foi obtida por contagem através de um contador automático (Coulter Counter).

A concentração de macrófagos peritoneais foi ajustada para 10^6 células/mL. A cada poço foi adicionado 2×10^5 células, em placa de 96 poços, encubada em estufa a 37°C , tensão constante de 5% de CO_2 *overnight*. Antes da realização dos experimentos, os sobrenadantes foram substituídos, com remoção das células não aderentes.

3.4.2 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL- 1β e KC/CXCL1, e IL-10 *in vitro*

Macrófagos peritoneais em cultura, como anteriormente descrito, foram pré-tratados com veículo, Isobruceína B (0,001 - 10 μM) ou dexametasona (1 mM) 30 minutos antes da adição do estímulo LPS (oriundo de *E. coli*; Sigma, St Louis, MO, EUA) à concentração final de 1 $\mu\text{g/mL}$. Após 4 horas de estimulação, os sobrenadantes foram removidos e estocados em freezer -70°C , até o momento da dosagem. A quantificação das citocinas TNF, IL- 1β , KC/CXCL1 e IL-10 foram realizadas através do ensaio ELISA, seguindo as instruções do fabricante *Kit Duo Set* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Macrófagos extraídos após a administração da solução tioglicolato 3% foram utilizados nos ensaios para quantificação de TNF, IL-1 β e KC/CXCL1, enquanto macrófagos *naive* foram utilizados para ensaios com a IL-10. Os resultados são expressos em picogramas (pg) por mL.

3.4.3 Quantificação indireta de NO pelo método de Griess

A quantificação de óxido nítrico foi realizada indiretamente pela dosagem de nitrito [NO $_2^-$] pelo método de Griess, adaptado de Vazquez-Torres et al. (2000). Brevemente, macrófagos peritoneais, extraídos após previa administração de tioglicolato 3% (como relatado anteriormente), foram pré-tratados com veículo, IsoB (0,001 - 10 μ M) ou dexametasona (1 mM) 30 minutos antes da adição do estímulo LPS (1 μ g/mL). Cerca de 24 h após a adição do estímulo, os sobrenadantes foram retirados e logo tiveram a concentração de nitrito [NO $_2^-$] mensurada. Para a quantificação, foram utilizados 100 μ L de cada amostra junto a 100 μ L do reagente de Griess, composto de uma solução com 0,1% de NED, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico (H $_3$ PO $_4$), adquirindo coloração instantaneamente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) comprimento de onda 540 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão, com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

3.4.4 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Para avaliação do potencial citotóxico da IsoB, macrófagos peritoneais em cultura foram tratados sob o mesmo protocolo para ensaio e quantificação de

citocinas liberadas *in vitro*. Foram utilizados 3 métodos para detecção de citotoxicidade: Exclusão por corante azul de tripan, quantificação da redução do 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 brometo de difenil tetrazólio (MTT) e atividade da lactato desidrogenase (LDH) extracelular.

A triagem inicial foi realizada por contagem de células viáveis com Azul de Tripan, no qual, após o pré-tratamento e incubação com estímulo, os sobrenadantes foram removidos, e sob as células foram adicionados 20µL de azul de tripan diluído em RPMI-1640 na proporção de 1:1. Então, uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi adicionada a câmara de Neil-Bauer, para quantificação da porcentagem de células viáveis. Células que possuíam o citoplasma corado em azul foram consideradas inviáveis.

Posteriormente, foi utilizado o método de MTT, previamente descrito por Mosmann (1983). Após o período de incubação, os sobrenadantes foram removidos e as células foram novamente incubadas com 200 µL solução de MTT (Sigma, St Louis, MO, EUA, sal tetrazólio) (1 mg/mL) em meio RPMI-1640 por 2 horas. Então a solução foi removida, e o MTT reduzido intracelularmente para o sal de formazan não hidrossolúvel, foi solubilizado com 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos sob agitação. Para análise, 100 µL das amostras foram transferidas para placa de 96 poços e quantificadas em espectrofotômetro sob comprimento de onda de 550 nm. Os resultados são expressos em porcentagem de redução, comparado ao grupo controle (veículo).

Para a detecção da atividade da LDH foi utilizado o Kit *Citotoxicity Detection^{plus}* LDH (Roche, Mannheim, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm. Para grupo o controle positivo, células igualmente cultivadas foram incubadas com tampão de lise

(contido no Kit) por 5 minutos. Os resultados são expressos em porcentagem da atividade de LDH, considerando o grupo controle positivo como 100%.

3.4.5 Ensaio de luciferase em macrófagos RAW 264.7-Luc

Macrófagos RAW 264.7 estavelmente transfectadas com o gene NF- κ B-pLUC, para expressarem luciferase especificamente através do fator de transcrição NF- κ B, como descrito por Cooper et al. (2010), foram estimulados com diferentes ativadores diretos e/ou indiretos, na ausência ou presença de diferentes concentrações de IsoB ou Dexametasona. Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços (3.10^5 células/poço), encubada em estufa a 37° C, a tensão constante de 5% de CO₂, *overnight*. Antes da realização dos experimentos, os sobrenadantes foram substituídos, com remoção das células não aderentes. Para o ensaio, as células cultivadas foram pré-tratadas com Isobruceína B em diferentes concentrações (0,001 a 10 μ M) ou Dexametasona (1 mM) 30 min antes da adição do estímulo (LPS 1 μ g/mL, PGN 10 μ g/mL, TNF 10 ng/mL ou acetato de forbol miristato [PMA] 1 μ g/mL), e novamente incubadas em estufa por 4 h. Para a análise, as células foram lisadas com 50 μ L de tampão de lise TNT (descrito no item 3.6), e mantidas a 4°C por 20 minutos. Em seguida, uma alíquota (10 μ L) foi retirada de cada poço, e transferida para placa branca opaca de 96 poços junto a 25 μ L do reagente para ensaio de luciferase (Promega, Madison, WI, EUA) contendo luciferina.

A ativação, especificamente, do fator de transcrição NF- κ B nestas células, conduz a transcrição do gene luciferase, e a atividade desta enzima pode ser quantificada pela emissão de fótons detectada através do Luminômetro (FlexStation

3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), ao catalisar a reação de oxidação da luciferina, produzindo oxiluciferina e fótons.

3.4.6 Localização de p65 (NF- κ B) nuclear por imunofluorescência

Células RAW 264.7 foram cultivadas em lamínulas circulares em placa com 12 poços, sob mesmas condições previamente descritas. Então, foram pré-tratadas com veículo, IsoB (1 e 10 μ M) ou pirrolidina ditiocarbamato (PDTC; 500 μ M) 30 minutos antes da adição do estímulo LPS (100 ng/mL), logo sendo incubadas em estufa 37°C, 5% de CO₂, por 30 min (pré-determinado em padronização). Em seguida, os sobrenadantes foram removidos, e as células aderidas às lamínulas foram fixadas com solução paraformaldeído 4%, pH 7,2, por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas com tampão PBS e glicina 10 mM, 3 vezes, e entre os demais passos a lavagem foi realizada apenas com tampão PBS. As células foram permeabilizadas por incubação com triton X-100 0,2 % em tampão PBS, por 30 minutos. A solução bloqueio constituída por soro de cabra 1% e mBSA 2%, foi encubada com as lamínulas por 1 hora. As células foram incubadas com solução contendo anticorpo primário de coelho anti-p65 (sc-372; Santa Cruz) na concentração de 1:100. Em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho, conjugado com fluoróforo alexa-fluor 488 (A11034, Molecular Probes) na concentração de 1:400. Como marcador de núcleo, foi utilizado o Hoesch 33342 (Sigma, St Louis, MO, EUA) na concentração de 1 μ g/mL. As lamínulas foram retiradas e fixadas em lâmina com *Fluormount* (SouthernBiotech, Birmingham, AL) e estocadas a 2-8° C até a análise microscópica. A aquisição das imagens foi realizada

através do microscópio confocal *Leica TCS-SP5 AOBS* (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) do Laboratório Multiusuário Microscopia Confocal da FMRP-USP.

3.4.7 Separação de extratos nuclear e citoplasmático

Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados como descrito anteriormente, na concentração $5 \cdot 10^6$ células/poço em placa de 6 poços. As células foram pré-tratadas com veículo, IsoB (10 μ M) ou PDTC (500 μ M) 30 minutos antes da adição do estímulo LPS (1 μ g/mL) por 30 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e descartados, e as células aderentes foram removidas por lavagem com 200 μ L do tampão de lise A (composição descrita no item 3.6), logo sendo transferidas para tubos e homogeneizadas, em *vortex*, por 1 minuto para total lise do citoplasma. O extrato resultante foi centrifugado a 20800 G por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado como extrato citoplasmático. O *pellet* aderido foi lavado por 2 vezes novamente com tampão A, e após a centrifugação, o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi lisado pela adição de 50 μ L do tampão de lise B (composição descrita no item 3.6), e homogeneizados em *vortex* por 30 min. O extrato obtido foi centrifugado a 20800 G por 5 minutos, e o sobrenadante resultante foi considerado como extrato nuclear.

3.4.8 Quantificação nuclear e citoplasmática de p65 e I κ B, respectivamente, por *Western Blot*

Amostras de extrato nuclear e citoplasmática, descritas previamente, tiveram seu teor de proteína quantificadas pelo método de Bradford, previamente descrito por Bradford (1976).

As proteínas de cada extrato foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) sob diferença de potencial de 100 v, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. A membrana contendo extrato citoplasmático foi encubada com anticorpo de coelho anti-IkB- α (Santa Cruz, sc-371) na concentração de 1:1000, em tampão TBS-T (composição descrita no item 3.6) contendo leite em pó 5%, *overnight*, 2-8°C, sob agitação. A membrana contendo o extrato citoplasmático foi encubada com o anticorpo de coelho anti-p65 (sc-372; Santa Cruz) na concentração 1:300, em tampão TBS-T contendo leite em pó 5%. Após incubação, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e novamente incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-IgG de coelho, Sigma). Para revelação, foi utilizado o sistema de quimiluminescência (*ECL Western Blotting Systems, GE Healthcare*) e visualizadas em detector *Fujifilm LAS-3000*. Para avaliação da qualidade da separação dos extratos, as mesmas membranas foram marcadas com anticorpo de camundongo anti-nucleofosmina (Sigma, St Louis, MO, EUA) na concentração de 1:1000, para quantificação do extrato nuclear, ou anticorpo de camundongo actina (Sigma, St Louis, MO, EUA) 1:2500 para quantificação do extrato citoplasmático. Em seguida, as membranas foram e incubadas com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, e revelados sob o mesmo protocolo descrito acima.

3.4.9 Quantificação da expressão do RNAm do gene TNF por PCR-RT

Macrófagos RAW 264.7 ($1,5 \cdot 10^6$ células/poços) cultivados em meio RPMI-1640 suplementado, em placa de 12 poços, foram estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 30 minutos depois do tratamento com veículo, IsoB ($10 \mu\text{M}$) ou dexametasona (1 mM). Após 2 horas de incubação com estímulo, as células foram lavadas com RPMI-1640, lisadas e homogeneizadas com $500 \mu\text{L}$ de TRIzol® (Life Technology, Carlsbad, CA, EUA) para extração de RNAm. O volume de amostra equivalente a $2 \mu\text{g}$ de RNA foi adicionado a $1 \mu\text{L}$ do primer de iniciação (oligonucleotídeo), e quantidade suficiente para $7 \mu\text{L}$ com água livre de RNAase (Sigma, St Louis, MO, EUA). Esta solução foi inserida no termociclador por 5 minutos a 70°C . Então foi adicionado o *mix* contendo transcriptase reversa *Pre-Impom II* (Promega, Madison, WI, EUA) e os tampões necessários para a síntese do DNA complementar.

Estas amostras contendo cDNA e os primers (**Tabela 2**) foram analisadas em tempo real no aparelho de RT-PCR ABI Prism 7500 *Sequence Detection System*, usando o sistema de fluorescência SYBR-*green* (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “*cycle threshold*” comparando a expressão do RNAm do gene TNF com a expressão constitutiva controle do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Tabela 2 - Sequência dos primers *sense* e *anti-sense* utilizados.

Primer	Sequência
TNF <i>sense</i>	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'
TNF <i>anti-sense</i>	5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
GAPDH <i>sense</i>	5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'
GAPDH <i>anti-sense</i>	5'-CGGCCAAATCCGTTTAC-3'

3.4.10 Propagação e isolamento do plasmídeo *pmirGLO*

Dual-Luciferase

Clones estáveis de *E. coli* DH5 α foram proliferadas garrafas estéreis contendo meio LB (composição descrita no item 3.6), em estufa incubadora a 37°C por 24 horas sob agitação constante de 200 rpm. O meio de cultura, contendo as bactérias, foi transferido para tubos estéreis de 50 mL, e resfriados no gelo (0-4°C) por 10 minutos. Então foram centrifugados a 2700 G por 10 minutos, 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os tubos foram invertidos por 1 min para escoamento e remoção do meio, permanecendo apenas o *pellet* contendo bactérias. Em seguida, cada *pellet* foi ressuspensionado e homogeneizado, gentilmente, em 30 mL de solução contendo 80 mM MgCl₂ e 20 mM CaCl₂ em água ultrapura, a 4°C. Então a suspensão foi novamente centrifugada a 2700 G por 10 minutos, a 4°C, tendo os sobrenadantes escoados e descartados, com ressuspensão do *pellet* formado em 2 mL de solução 0,1 M de CaCl₂ para cada 50 mL de meio de cultura inicial. Nesta solução as bactérias estão competentes, ou seja, estão aptas a receber um plasmídeo exógeno.

Para transformação das bactérias competentes, 100 μ L de cada suspensão descrita acima, foi transferida para tubos aos quais foram adicionados 1 μ L da solução contendo 50 ng do plasmídeo *pmirGLO Dual-Luciferase* (Promega, Madison,

WI, EUA) (**Figura 5**), com gene de resistência a ampicilina. Os tubos foram gentilmente homogeneizados e estocados em gelo (0-4°C) por 30 minutos. Na sequência, os tubos foram transferidos para banho-maria pré-aquecido a 42°C, onde permaneceram por exatos 90 s, e em seguida, rapidamente realocados para o gelo por 2 min. Então, foram adicionados 800 µL de meio LB líquido a cada tubo, e encubado em estufa 37°C por 1 hora para recuperação bacteriana, e permitir a expressão de proteínas que conferem a resistência ao antibiótico.

Figura 5 - Estrutura do plasmídeo *pmirGLO Dual-Luciferase*. Fosfoglicerato Quinase (PKG); Sítio de Múltipla Clonagem (MCS); Luciferase de vaga lume (Luc2); SV40; Gene de resistência a ampicilina (Amp^r); Sítio de Parada (SV40 *poly(A)* e *Synthetic poly(A)*).

Os clones de bactéria contendo o plasmídeo foram cultivados em meio LB líquido, contendo 100 µg/mL de ampicilina, em estufa sob agitação por 16 horas, a 37° C. Após incubação as bactérias foram recuperadas por centrifugação. Para o isolamento do plasmídeo, foi utilizado o kit QIAGEN - *EndoFree Plasmid Maxi* (Qiagen, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os plasmídeos purificados foram solubilizados em tampão TE (composição descrita no item 3.6). A quantificação foi

realizada em espectrofotômetro (Nanodrop) no comprimento de onda de 260 nm. A solução final foi estocada a -20° C, até o momento da transfecção em células HEK 293, como descrito posteriormente.

3.4.11 Transfecção em células HEK 293

Células HEK 293, mantidas em meio DMEM suplementado (composição descrita no item 3.6) foram quantificadas e semeadas em placa de 24 poços, na concentração de 5×10^5 células/poço, até a confluência de aproximadamente 60%. Então, os sobrenadantes foram substituídos por meio DMEM suplementado com 2% de soro fetal bovino, ao qual foi adicionado o plasmídeo *pmirGLO Dual-Luciferase* (1 µg/poço) (**Figura 5**) junto ao reagente de transfecção FuGene 6 (Roche, Indianapolis, IN, USA), seguindo as instruções do fabricante.

As culturas foram incubadas por 4 h em estufa, a 5% de CO₂ e 37° C, para completa transfecção e início da síntese da luciferase (padronizada previamente). Após esse período, foi adicionada, ao meio de transfecção, a Isobruceína B em diferentes concentrações (10 µM - 0,1 µM), sendo novamente encubado por mais 4 h em estufa (37° C / 5% CO₂). As células foram lisadas com 50 µL de tampão TNT, e os demais procedimentos, para quantificação da luminescência, seguem como descrito para as células RAW 264.7-Luc.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método de comparação por Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste *post-hoc* por comparação

múltipla de Tukey, com nível de significância estabelecido em 5% ($P < 0,05$). O teste de Levene foi utilizado para avaliar a homogeneidade de variâncias.

3.6 PREPARO DE SOLUÇÕES

Água Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%: Dietilpirocarbonato (Sigma, St Louis, MO, EUA) 1 mL, em água ultrapura 1 L. A solução foi posteriormente autoclavada.

Meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – Meio DEMEM em pó (Sigma, St Louis, MO, EUA) 10,4 g, HEPES 3,38 g, Bicarbonato de sódio 2,2 g.

Meio DMEM suplementado 10% - 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina e 1mg/mL estreptomicina 0,3 µg/mL fungizona.

DMEM suplementado 2% para transfecção – 2% de soro fetal bovino em 100 mL de Meio DMEM.

Meio Luria-Bertani (LB) líquido: 10 g tripton, 10 g cloreto de sódio (NaCl) e 5 g Extrato de Levedura por litro de água ultrapura, pH 7,0.

Meio RPMI-1640 suplementado: Soro fetal bovino inativo 10 %, penicilina (Sigma, St Louis, MO, EUA) 100 U/mL, estreptomicina (Sigma, St Louis, MO, EUA) 1 mg/mL, glutamina (Sigma, St Louis, MO, EUA) 2 mM, fungizona (Sigma, St Louis, MO, EUA) 0,3 g/mL em meio RPMI-1640 estéril.

Meio RPMI-1640: RPMI-1640 pó (Sigma, St Louis, MO, EUA) 10,4 g, bicarbonato de sódio 2,2 g, HEPES 2,38 g e água ultrapura em quantidade suficiente para (q.s.p.) 1 litro (L), e pH ajustado para 7,2. A solução foi esterilizada pela filtração em membrana de poro 0,22 µm, em capela de fluxo laminar, e estocada a 4°C em recipiente estéril.

Tampão A: HEPES 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 1 mM; EGTA 0,1 mM; PMSF 1 mM; DDT 1 mM; NP40 0,2% e coquetel inibidor de proteases e lipases (Sigma, St Louis, MO, EUA) 50 µL/mL, solubilizados em água ultrapura.

Tampão B: HEPES 20 mM; NaCl 420 mM; EDTA 0,1 mM; EGTA 0,1 mM; PMSF 1; DDT 1 mM e coquetel inibidor de proteases e lipases (Sigma, St Louis, MO, EUA) 50 µL/mL solubilizados em tampão RIPA (Sigma, St Louis, MO, EUA).

Tampão PBS: Cloreto de sódio (NaCl) 8 g, cloreto de potássio (KCl) 0,2 g, fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) 0,24 g, fosfato de sódio 1,44 g e água ultrapura em q.s.p. 1 litro, e pH ajustado para 7,2.

Tampão TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e água ultrapura, pH 8,0.

Tampão TBS-T: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M e Tween 20 0,05% em água ultrapura.

Tampão TNT: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, 0,05% Tween 20.

Veículo: DMSO 0,05% em RPMI-1640 estéril.

4. Resultados

4.1 ISOBRUCEINA B REDUZ A HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA MECÂNICA, MAS NÃO TEM EFEITO SOBRE A NOCICEPÇÃO TÉRMICA

Baseado em resultados prévios que indicam a propriedade anti-inflamatória da IsoB, foi investigado o seu possível efeito na redução da hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina. Neste sentido, foi observado que o pré-tratamento dos camundongos com IsoB reduz, de maneira dependente da dose, a hipernocicepção inflamatória mecânica induzida pela administração intraplantar de carragenina (**Figura 6**). Por outro lado, o tratamento de camundongos com IsoB, não altera o limiar nociceptivo térmico basal, o que pode ser observado quando se administra morfina aos animais, como controle experimental (**Figura 7**).

Figura 6 - Isobruceina B reduz de maneira dose-dependente a hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina. Camundongos foram pré-tratados com veículo ou IsoB (0,5, 1 ou 5 mg/kg; via s.c.) 1 hora antes da administração d carragenina (100 µg/pata, via i.pl.). A avaliação da intensidade da hipernocicepção foi realizada 3 horas após a administração da carragenina. Barras expressam a média ± E.P.M. ($n \geq 4$). # $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com veículo; * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com veículo/carragenina.

Figura 7 - Isobruceina B não apresenta efeito sobre a nocicepção térmica. Camundongos foram tratados com veículo, IsoB (5 mg/Kg; via s.c.) ou morfina (8 mg/kg; via s.c.) foram submetidos ao teste da placa quente 0, 30, 60 e 180 min após a administração das drogas. Resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. ($n \geq 4$). [#] $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.2 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA LOCAL

Apoiado nos resultados anteriores (**Figuras 6 e 7**), foi avaliado o efeito da IsoB sobre a migração de neutrófilos, visto seu papel crucial na hipernocicepção inflamatória. Logo, foi utilizado o modelo experimental de inflamação aguda local pela administração i.pl. de carragenina, e quantificação indireta da migração de neutrófilos pela atividade da mieloperoxidase do tecido plantar.

Corroborando com os efeitos anteriormente vistos, a IsoB reduz a migração de neutrófilos para o tecido local de maneira dose-dependente, como exibido na **Figura 8**, chegando a inibir completamente a migração na maior dose testada (5 mg/kg).

Complementarmente, baseado no papel crucial das citocinas pró-inflamatórias na a indução da resposta inflamatória, migração de neutrófilos e consequentemente para a hipernocicepção inflamatória. próximo passo deste estudo foi avaliar o efeito da IsoB sobre a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e KC/CXCL1, neste mesmo modelo de inflamação aguda local. Para a mesma dose de total inibição da migração de neutrófilos (5 mg/kg, **Figura 8**), houve inibição da liberação das citocinas de IL-1 β (**Figura 9B**) e KC/CXCL1 (**Figura 9C**), interessante, sem reduzir a liberação de TNF (**Figura 9A**).

Figura 8 - A Isobruceina B inibe, de forma dose-dependente, a migração de neutrófilos induzida por carragenina. Camundongos foram pré-tratados com veículo ou IsoB (0,5, 1 ou 5 mg/kg; via s.c.) 1h antes da administração da carragenina (100 µg/pata, via i.pl.). O tecido plantar foi coletado 3 horas após a administração da carragenina, para quantificação da atividade de MPO. Resultados são expressos como equivalente a neutrófilos por mg de tecido, como descrito em materiais e métodos. Barras expressam a média ± E.P.M. (n ≥ 4). #P<0,05 comparado ao grupo veículo; *P<0,05 comparado ao grupo tratado com veículo/carragenina.

Figura 9 – Isobruceina B reduz a liberação das citocinas pró-inflamatórias induzida por carragenina, (B) IL-1 β e (C) KC/CXCL1, mas não inibe (A) TNF. Camundongos foram pré-tratados com veículo ou IsoB (5 mg/kg, via s.c.), 1 h antes da administração i.pl. de carragenina (100 μ g/pata). O tecido plantar foi coletado 3 horas após a administração da carragenina. Barras expressam a média $\pm$ E.P.M. (n = 5). [#]P<0,05 comparado ao grupo veículo; ^{*}P<0,05 comparado ao grupo tratado com veículo/carragenina.

4.3 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A LIBERAÇÃO DE TNF, IL-1B, KC/CXCL1, IL-10 E NO POR MACRÓFAGOS *IN VITRO*

Com o intuito de identificar os mecanismos moleculares envolvidos na inibição da liberação destas citocinas pela IsoB *in vivo*, o foco deste trabalho passa para a experimentação *in vitro*, pelas condições mais controladas. Fundamentado nos mecanismos envolvidos na indução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, e a participação fundamental de macrófagos teciduais, os próximos experimentos se processam, em maioria, sobre estas células, extraídas da cavidade peritoneal de camundongos ou de linhagem imortalizada RAW 246.7.

Para estudar o efeito da IsoB sobre a liberação de citocinas e NO, *in vitro*, foi utilizado o lipopolissacarídeo oriundo de *E. coli*, pela sua alta eficácia, elevando em níveis consideráveis a liberação destes mediadores neste sistema. Os resultados mostram que a IsoB também é capaz de reduzir de maneira concentração-dependente (0,1 - 10 μ M) a produção/liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e KC/CXCL1 *in vitro* (**Figuras 10A-C**). Dexametasona (Dex) foi usada como controle positivo, pela estabelecida ação na redução da liberação destas citocinas.

A liberação de mediadores com atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos também foi avaliada. Macrófagos peritoneais, *in vitro*, foram pré-tratados com IsoB e estimulados com LPS para a produção/liberação de NO e IL-10 (**Figura 11A e B**, respectivamente). Os resultados demonstram que a IsoB também inibe a produção/liberação destes mediadores de forma concentração-dependente (0,1 – 10 μ M). Dexametasona foi utilizada como controle para redução da liberação destes mediadores.

Figura 10 - A Isobruceina B inibe a liberação de citocinas (A) TNF, (B) IL-1β e (C) KC/CXCL1 por macrófagos, *in vitro*, estimulados com lipopolissacarídeo. Macrófagos peritoneais, *in vitro*, foram pré-encubados com veículo, IsoB (0,001 - 10 μM) ou Dexametasona (Dex; 1 mM), 30 minutos antes da adição do LPS. Após 4 h de incubação com o estímulo, os sobrenadantes foram removidos para dosagem das citocinas pelo método de ELISA. Barras expressam a média ± E.P.M. (n = 4). [#]P<0,05 comparado ao grupo veículo; ^{*}P<0,05 comparado ao grupo tratado apenas com LPS.

Figura 11 – A Isobruceina B reduz de forma concentração-dependente a liberação de NO e IL-10 por macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram pré-encubados com veículo, Isobruceina B (0,001 - 10 μM) ou dexametasona (Dex; 1 mM), 30 minutos antes da adição do LPS. Após 24 h (**A**) ou 4 h (**B**) de incubação com o estímulo, os sobrenadantes foram removidos para quantificação indireta de (A) NO por meio do Método de Griess e de (B) IL-10 por ELISA. Barras expressam a média $\pm$ E.P.M. ($n \geq 3$). # $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo; * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado apenas com LPS.

4.4 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A SÍNTESE DA LUCIFERASE DEPENDENTE DE NF-kB, EM MACRÓFAGOS RAW 264.7

Na tentativa de identificar o mecanismo envolvido no efeito inibitório da IsoB sobre a produção/liberação de citocinas por macrófagos, foi utilizado macrófagos RAW 264.7, estavelmente transfectados, para expressão do gene luciferase dependente da ativação NF-kB. Desta forma, 4 diferentes estímulos foram utilizados para ativar NF-kB por diferentes vias, como forma de *screening* para identificar um possível mediador envolvido no mecanismo de ação da IsoB. Contudo, os resultados obtidos não apontaram seletividade de vias para a atuação da IsoB, na inibição da ativação de NF-kB. A expressão/atividade da luciferase induzida por peptideoglicano, lipopolissacarideo, fator de necrose tumoral ou acetato de forbol miristato, foi inibida pela IsoB (**Figura 11**). Dexametasona foi utilizada como controle para redução da expressão da luciferase. Como controle da ação da Isobruceina B sobre a atividade catalítica da luciferase, esta droga foi adicionada após a indução da expressão enzimática, e não houve alteração da luminescência (dados não mostrados).

Figura 12 - Isobruceina B inibe a síntese da luciferase dependente de NF-kB, induzida por estímulos e vias de sinalização distintas. Macrófagos RAW 264.7, estavelmente transfectados com o gene indutor da expressão de luciferase dependente de NF-kB, foram pré-incubadas com veículo, Isobruceina B (0,001 - 10 µM) ou Dexametasona (Dex; 0,1 - 1 mM), 30 minutos antes da adição do estímulo LPS, PGN, TNF ou PMA, e incubação por 4 horas. A atividade relativa de luciferase do grupo controle positivo foi utilizada como referência (100%). Barras expressam a média $\pm$ E.P.M. ($n \geq 3$). # $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo; * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle positivo correspondente.

4.5 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE MEDIADA PELA ISOBRUCEINA B SOBRE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

Com o intuito de verificar se os efeitos inibitórios da IsoB não estariam associados ao aumento da mortalidade das células tratadas, verificou-se, por meio de três diferentes métodos, a citotoxicidade deste composto sobre macrófagos peritoneais *in vitro*. Desta forma, pelos métodos utilizados, Azul de Tripán (**Figura 12A**), LDH (**Figura 12B**) e MTT (**Figura 12C**), não foi detectado citotoxicidade significativa causada pela IsoB nas concentrações e tempos testados.

Figura 13 - Isobruceina B não exibe citotoxicidade em macrófagos peritoneais *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram pré-encubados com veículo, Isobruceina B (0,001 - 10 μ M), ou Dexametasona (Dex; 1 mM), 30 minutos antes da adição do LPS. Após 4 h de incubação com o estímulo, os sobrenadantes foram removidos e utilizados para quantificação da atividade de LDH (**B**). As células fixadas tiveram sua viabilidade acessada pelo teste de MTT (**C**) ou Tripán Blue (**A**). Barras expressam a média $\pm$ E.P.M. ($n \geq 3$). * $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo, levando em consideração um efeito pró-citotóxico.

4.6 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A DEGRADAÇÃO DE IKB- α E TRANSLOCAÇÃO DE NF-kB PARA O NÚCLEO

De acordo com resultados anteriores, a hipótese com relação ao mecanismo de molecular principal, envolvido nos efeitos da IsoB, baseava-se na inibição da atividade da via do NF-kB, que proporcionaria a redução da liberação da citocinas pró-inflamatórias, como observado. Com o intuito de testar esta hipótese, foram realizados experimentos por *western blot* e microscopia confocal, visando quantificação a degradação da molécula inibitória do NF-kB, Ikb- α , e sua translocação para o núcleo, pela marcação da subunidade (p65), induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. Contudo, os resultados demonstram que a IsoB não apresenta efeito sobre a degradação do Ikb- α (**Figura 13A**) ou translocação do NF-kB (p65) para o núcleo (**Figura 13B e Figura 14**).

Figura 14 - Isobruceína B não exibe efeito sobre a degradação de IκBα ou translocação do NF-κB (p65) para o núcleo. Macrófagos RAW 264.7, em cultura, foram pré-encubados com veículo, Isobruceína B (10 μM) ou PDTC (500 μM), 30 minutos antes da adição do LPS (1 μg/mL). Após 30 min de incubação com o estímulo, as células foram lisadas de forma a separar os conteúdos citoplasmáticos e nucleares. No extrato citoplasmático foram quantificadas a proteína IκBα e Actina (A). No extrato nuclear foram quantificadas as proteínas p65 e nucleofosmina (B). Barras expressam a média ± E.P.M. (n ≥ 2). #P<0,05 comparado ao grupo veículo; *P<0,05 comparado ao grupo estimulado apenas com LPS.

Figura 15 - Isobruceína B não tem efeito sobre a translocação de NF-κB para o núcleo. Macrófagos RAW 264.7, em cultura sobre lamínulas, foram pré-encubados com veículo, Isobruceína B (10 μM), ou PDTC (500 μM), 30 minutos antes da adição do LPS (100 nM). Após 30 min de incubação com o estímulo, as células foram fixadas, permeabilizadas, e marcadas com anticorpo anti-p65 (coluna **A**; verde) e com marcador nuclear Hoesch 33342 (coluna **B**; azul). A sobreposição está representada na coluna **C**.

4.7 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A TRANSCRIÇÃO DO RNAm DO GENE TNF INDUZIDO POR LPS

Baseado nos resultados que indicam a inibição da produção/liberação de citocinas e NO em macrófagos, pela Isobruceina B, sem afetar a translocação de NF- κ B (p65) para o núcleo, foi, então, avaliado a transcrição do RNAm do gene TNF induzido por LPS em macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com o composto natural em questão. De fato, não foi observado efeito inibitório da IsoB sobre a transcrição do gene TNF induzido por LPS (**Figura 15**), indicando que a IsoB deve atuar por mecanismos pós-transcricionais, para reduzir a produção da citocinas pró-inflamatórias. Dexametasona foi utilizada como controle para redução da transcrição de RNAm do gene TNF.

Figura 16 - Isobruceína B não reduz a transcrição de RNAm do gene TNF induzido por LPS. Macrófagos RAW 264.7, foram pré-incubados com veículo, Isobruceína B (10 μ M) ou Dexametasona (Dex; 1 mM), 30 minutos antes da adição do LPS (1 μ g/mL). Após 2h de incubação com o estímulo, as células foram lisadas para extração do RNAm e quantificação da expressão do gene do TNF por RT-PCR. Resultados são relativos à expressão do gene GAPDH. Para possibilitar a homogeneidade de variâncias, os valores foram logaritmizados. Barras expressam a média $\pm$ E.P.M. ($n \geq 4$). # $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo; * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com LPS.

4.8 EFEITO DA ISOBRUCEINA B SOBRE A SÍNTESE DE LUCIFERASE EM CÉLULAS HEK 293 TRANSFECTADAS COM PLASMÍDEO *PmirGLO Dual-LUCIFERASE*

Seguindo as etapas envolvidas, desde a estimulação exógena até a liberação das citocinas, o próximo passo foi avaliar a participação da IsoB na síntese proteica. Uma vez que esta droga não inibe a síntese de RNAm para o gene TNF, mas inibe a liberação da proteína formada, seria provável seu efeito ser mediado pela inibição da síntese proteica. Para testar essa hipótese, em suma, células HEK 293 foram transfectadas com um plasmídeo contendo uma região promotora universal, fosfoglicerato quinase, que promove o recrutamento de fatores de transcrição inespecificamente, culminando na transcrição do gene para expressão da enzima luciferase. Logo, o resultado mostra que a IsoB inibe a síntese da luciferase independente do fator de transcrição envolvido na sua expressão (**Figura 14**).

Figura 17 - Isobruceina B inibe a atividade de luciferase induzida constitutivamente. Células HEK 293 foram transfectadas com o plasmídeo para a expressão de luciferase constitutivamente. As células foram incubadas com o plasmídeo para transfecção até o início da síntese de luciferase (5 horas). Em seguida foi adicionado a IsoB (0,1 - 10 μM) ou veículo, por mais 4 horas. Barras expressam a média ± E.P.M. (n = 5). #P<0,05 comparado ao grupo veículo não transfectado; *P<0,05 comparado ao grupo veículo transfectado.

4. DISCUSSÃO

Apesar da utilização de extratos e chás da planta *Picrolemma sprucei* Hook f., pela população, local e indígena, do estado Amazonas (SILVA et al, 2009a; SARAIVA et al, 2002), não existem estudos científicos publicados até a data, relacionando algum dos seus compostos à atividade anti-inflamatória. Contudo, em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a Isobruceina B, presente, relativamente, em grandes quantidades nesta planta, exibiu efeito anti-inflamatório em alguns modelos experimentais de inflamação. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar o potencial anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo desta substância, e os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos.

Inicialmente, investigamos o efeito da IsoB sobre a hiperalgesia inflamatória utilizando o clássico modelo de inflamação induzida por administração intraplantar de carragenina. A carragenina é um β -glicano polissulfatado, extraído de alga marinha, amplamente utilizada como indutor de inflamação para estudo do efeito de compostos anti-inflamatórios (NANTEL et al, 1999; ALMEIDA et al, 1980; CUNHA et al, 2005). Embora a carragenina não seja classificada como PAMP, interessante, seus efeitos são igualmente imunogênicos (THOMSON; FOWLER, 1981). Neste modelo experimental, a IsoB reverteu a hipernocicepção inflamatória, mas não teve efeito sobre o limiar térmico nociceptivo. Estes resultados sugerem a ação da IsoB sobre a redução de mediadores inflamatórios hipernociceptivos, prevenindo a sensibilização de fibras neurais ao estímulo mecânico nociceptivo.

Como previamente descrito, muitos mediadores inflamatórios ocasionam a redução do limiar nociceptivo, contudo, a liberação destes mediadores, na inflamação

aguda local, parece ser dependente da presença de neutrófilos (CUNHA et al, 2008a; LEVINE et al, 1984). Logo, o efeito da IsoB sobre migração de neutrófilos foi avaliado. Nossos resultados mostram que a IsoB reduz de forma dose-dependente a migração de neutrófilos para o foco da inflamação, corroborando com o seu efeito anti-hipernociceptivo no modelo de inflamação aguda local.

A migração de neutrófilos é um processo que envolve vários tipos de moléculas, incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (PANÉS; PERRY; GRANGER, 1999; GRABOVSKY et al, 2000). Previamente a migração de neutrófilos, há a ativação de células locais, principalmente macrófagos. Estas células são estimuladas por PAMPs ou DAMPs, à liberarem citocinas e quimiocinas, que desencadeiam eventos, culminando na migração de leucócitos ao foco da injúria e consequente inflamação (VIEIRA et al, 2009; LAUTERBACH et al, 2008; CYBULSKY; COLDITZ; MOVAT, 1986; WANKOWICZ; MEGYERI; ISSEKUTZ, 1988). As citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β , KC/CXCL1 são iniciadores primordiais do processo inflamatório e hipernociceptivo em camundongos (CUNHA et al, 2005), sendo liberadas, principalmente, por macrófagos após o reconhecimento de PAMPs (ELIZUR et al, 2008; ADAMS; CZUPRYNSKI, 1994). De forma a avaliar os mecanismos envolvidos na redução da migração de neutrófilos induzida IsoB, avaliou-se o efeito deste composto na redução da liberação destas citocinas pró-inflamatórias *in vivo*. Prontamente, os resultados mostram que a IsoB reduz a liberação das citocinas IL-1 β e KC/CXCL1 induzida por carragenina, porém não reduz a liberação de TNF.

Baseado na fundamental participação de macrófagos na liberação de citocinas pró-inflamatórias, e na migração leucocitária, os próximos experimentos basearam-se em avaliar o seu envolvimento no efeito da IsoB sobre a redução da liberação de

citocinas pró-inflamatórias. Para estes experimentos foram utilizados macrófagos peritoneais, pela maior facilidade de obtenção. O LPS foi utilizado nos experimentos *in vitro*, pelo fato de ter o mecanismo de indução da liberação de citocinas mais conhecido, comparado a carragenina, contribuindo para elucidação dos mecanismos moleculares de desencadeados pelo composto estudado. Deste modo, o pré-tratamento de macrófagos, *in vitro*, com IsoB, reduz a liberação de citocinas (TNF, IL-1 β e KC/CXCL1) induzidas pelo estímulo LPS. Estes resultados mostram o envolvimento da IsoB na redução da liberação de citocinas por atuação direta em macrófagos, e provavelmente, da mesma forma em outras células locais. Contraditoriamente aos resultados obtidos *in vivo*, a droga em questão reduziu a liberação de TNF *in vitro*. Sabe-se que a liberação do TNF antecede a das outras citocinas avaliadas (CUNHA et al, 2005), e não há informações sobre as cinéticas de absorção e distribuição da IsoB, logo, é possível que este composto não alcance concentrações efetivas, no tempo necessário, para reduzir a liberação deste mediador *in vivo*. Coincidentemente, o maior efeito inibitório *in vivo* foi sobre a IL-1 β , a mais tardia das citocinas avaliadas. Outra possível explicação é que mastócitos teciduais possuem vesículas que armazenam o TNF pré-formado, o qual pode ser liberado após um estímulo inflamatório (ZHANG; RAMOS; JAKSCHIK, 1992).

Outros mediadores liberados, principalmente por macrófagos, no processo inflamatório podem modular de forma negativa a migração leucocitária, como IL-10 e NO (DAL SECCO et al, 2006; PERRETTI; SZABÓ; THIEMERMANN, 1995). Portanto, foi realizada a quantificação destes mediadores liberados por macrófagos, *in vitro*, estimulados, na presença de IsoB, no entanto, não houve aumento na produção/liberação, mas, inesperadamente, houve redução. Vale a pena salientar que nos experimentos para dosagem de IL-10 foram utilizados macrófagos peritoneais

naïve, visto que macrófagos obtidos por indução da migração por tioglicolato não liberaram IL-10. Portanto, juntos estes dados sugerem que a IsoB reduz a migração de leucócitos por um mecanismo prioritariamente mediado por inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, sem potencializar liberação os mediadores anti-inflamatórios.

Para investigar os mecanismos intracelulares pelo qual a IsoB reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, foram utilizados macrófagos RAW 264.7, arquitetados para a expressão da proteína luciferase dependentemente de NF- κ B. Macrófagos RAW 264.7 exibem resposta a PAMPs, como LPS, equivalente a macrófagos peritoneais (LICHTMAN; WANG; LEMASTERS, 1998). Inicialmente, para a indução da ativação deste fator de transcrição e expressão da luciferase foi utilizado o LPS. O pré-tratamento com IsoB, reduziu de maneira dependente da concentração, a expressão da luciferase induzida por LPS, sugerindo sua ação inibitória sobre alguma molécula da cascata de sinalização do TLR4, na ativação do NF- κ B. Prosseguindo os estudos neste modelo, foram utilizadas diferentes substâncias que ativam o NF- κ B por vias distintas.

Para avaliar o possível efeito da IsoB mediado seletivamente pelo TLR4, foi utilizado o PGN, agonista dos receptores TLR2 e NOD2 para a ativação de NF- κ B (FRIZ et al, 2007; MÜLLER-ANSTETT et al, 2010; DZIARSKI; GUPTA, 2005). Contudo, a IsoB igualmente inibiu a expressão da luciferase, indicando que sua ação não é seletiva sobre a sinalização mediada por TLR4. Em seguida, foi utilizado o TNF (agonista de TNFRs) como ativador indireto de NF- κ B, por atuar distintamente da via de sinalização dos receptores *Toll*. Entretanto, a IsoB foi capaz de inibir a expressão da luciferase também por este estímulo. A sinalização intracelular desencadeada por estes agonistas, culminam no acionamento do complexo TAK1-IKK para a ativação do

NF- κ B. Então, para examinar o envolvimento da TAK1 no efeito inibitório da IsoB, foi utilizado o PMA, que pode ativar NF- κ B de maneiras distintas, via PKC fosforilando I κ B- α conduzindo-o para degradação ou por ativação direta de IKK (ÁCS et al, 1997). Contudo, a IsoB também foi capaz de reduzir a expressão de luciferase por este estímulo, indicando que seu efeito não é mediado por inibição de vias acima da ativação do complexo IKK.

Outra possibilidade analisada foi a atuação da IsoB por efeito citotóxico, levando a morte celular e impedimento toda sinalização intracelular. Outros estudos demonstram leve citotoxicidade deste composto natural *in vivo* a 1 mg/kg em camundongos com leucemia p388, e alta citotoxicidade em várias linhagens de células tumorais *in vitro* (IC₅₀ = 0,05 μ M), após 72 horas de incubação (MORETTI et al, 1982; SILVA et al, 2009a). Então, foram utilizados três métodos clássicos para avaliação da citotoxicidade da IsoB. O ensaio de MTT consiste na quantificação da atividade metabólica celular, pela medida da redução do sal tetrazólio, por oxiredutases citosólicas dependentes de NADPH, ao sal insolúvel formazan, indicando indiretamente a viabilidade celular. Complementarmente, foram utilizados os métodos de LDH e azul de tripan, avaliam a integridade da membrana plasmática, que podem ser danificada diretamente pela IsoB ou indiretamente via apoptose, podendo detectar citotoxicidade em ensaios que o método de MTT não detecta (DIMOVA; HOET; NEMERY, 2000; WANG; HENNING; HEBER, 2010). Contudo, pelos métodos utilizados, azul de tripan, MTT e LDH, não foi evidenciado algum efeito citotóxico. Outros experimentos realizados com o dobro de tempo de incubação (8 horas; dados não mostrados) também não demonstraram citotoxicidade, revelando que a IsoB não está exibindo efeito na redução da liberação de citocinas por efeitos citotóxicos inespecíficos ou morte celular.

Visto o efeito inibitório da IsoB sobre várias vias na ativação de NF- κ B, o próximo passo foi a investigação do efeito deste composto sobre a degradação da molécula inibitória do NF- κ B (I κ B- α), e sobre a translocação deste fator de transcrição para o núcleo. As hipóteses se voltaram para um mecanismo mediado pela inibição direta da ativação de NF- κ B. Lau, Lin e Leng (2010) mostraram que um quassinóide estruturalmente semelhante a IsoB, a Bruceina D, inibe a ativação de NF- κ B por impedir degradação do I κ B- α , em células de carcinoma pancreático que possuem ativação constitutiva deste fator de transcrição, reforçando esta hipótese. Porém, inesperadamente, a IsoB não inibiu a degradação de I κ B- α , e também não interferiu na translocação do NF- κ B (pela marcação da subunidade p65) para o núcleo por nenhuma das técnicas utilizadas.

Outros estudos mostram a capacidade de alguns compostos naturais de impedirem diretamente a ligação de NF- κ B ativado ao DNA (XU et al, 1997; HIDALGO et al, 2005). Para examinar se a IsoB poderia atuar por este mecanismo, foi quantificado a expressão do TNF RNAm formado pela transcrição promovida pelo NF- κ B. Porém, também não foi observado redução da transcrição deste gene, e surpreendentemente um grande aumento em valores absolutos (não logaritmizados). Concluímos, desta forma, que a IsoB, atua por mecanismos pós-transcricionais.

Baseado nos nossos resultados, em que a IsoB reduz a produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas não inibe a transcrição do mesmo gene (TNF RNAm), e em outros estudos que mostram potencial efeito dos quassinóides na inibição da síntese proteica eucariótica (FUKAMIYA et al, 2005; LIOU et al, 1982), foi testada a hipótese de que a IsoB atua por este mecanismo. Células HEK transfectadas com uma plasmídeo para expressão constitutiva de luciferase, por conter uma região promotora PKG que recruta inespecificamente fatores de transcrição, incubadas com

IsoB, tiveram redução da atividade da luciferase. Desta forma, nossos resultados mostram que a IsoB atua por inibição da síntese proteica, impedindo, assim, a produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias. Este mecanismo também elucida o fato de que este composto pode inibir a produção/liberação de IL-10 e NO (supostamente por inibição da iNOS), que podem também ser sintetizados por vias independentes de NF- κ B (KLEINERT et al, 2004; PLATZER et al 1995).

Apesar da inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* ser parcial, houve total inibição da migração de neutrófilos após a administração da mesma dose (5 mg/kg). O efeito da IsoB mediado pela inibição da síntese proteica, elucida esta diferença, já que outros mediadores que recrutam neutrófilos também provavelmente estão sendo reduzidos, como as quimiocinas MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10, e a síntese de moléculas de adesão, induzidas prioritariamente pelo TNF que não foi inibido.

O aumento da expressão do RNAm TNF em células estimuladas com LPS, assim como para a IsoB, também é um efeito descrito de outro inibidor da síntese proteica, o ciclohexamide (COCKFIELD; RAMASSAR; HALLORAN, 1993; ZUCKERMAN; EVANS; GUTHRIE, 1991).

Baseado no mecanismo de ação elucidado, a utilização da Isobruceina B como anti-inflamatório ou anti-hipernociceptivo torna-se inviável. Um fato que chama a atenção é utilização de extratos da planta *Picrolemma sprucei* Hook f. pela população amazônica, para o tratamento de gastropatias. Provavelmente, a IsoB possui propriedades vermífugas por inibir a síntese proteica helmíntica. Contudo, não sabemos o nível de absorção deste composto e a sua disponibilidade sistêmica, que em altos níveis poderia ser fatal. Então, esperamos que estes resultados possam

alertar a população que faz uso desta planta, contribuindo para a redução de efeitos colaterais e até risco de morte.

Outro quassinóide estruturalmente semelhante a IsoB, que tem efeito bem estabelecido na inibição da síntese proteica, é bruceatina (descrita anteriormente). Seu alvo molecular na inibição da síntese proteica foi descrito como o sítio ribossomal da peptidiltransferase (RODRIGUEZ-FONSECA; AMILS; GARRETT, 1995), local onde provavelmente a IsoB pode estar atuando.

Fundamentado no mecanismo mediado pela inibição da síntese proteica eucariótica, sugere-se o estudo da IsoB como agente antitumoral ou como adjuvante, em doses baixas, no tratamento de tumores, podendo reduzir a resistência quimioterápicos que, geralmente, é ocasionada pela indução da síntese de proteínas como os transportadores de multidroga. Outro possível alvo de estudo de aplicação da IsoB é como antifúngico de uso tópico, já que existem substâncias promissoras com estes mecanismos, as sordarinas, sendo pesquisadas por grandes indústrias farmacêuticas (HERREROS et al, 1998).

5. CONCLUSÃO

A redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1 β e KC/CXCL1 e da migração de neutrófilos são mecanismos envolvidos nos efeitos anti-inflamatório e anti-hipernociceptivo da IsoB.

Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios da IsoB baseiam-se na redução da síntese de mediadores inflamatórios por inibição da síntese proteica inespecificamente.

REREFÊNCIAS

ÁCS, P. et al. The Catalytic Domain of Protein Kinase C Chimeras Modulates the Affinity and Targeting of Phorbol Ester-induced Translocation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 35, p. 22148-53, 1997.

ADAMS, J.L.; CZUPRYNSKI, C.J. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF- α , IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. **Microb Pathog**, v. 16, p. 401–11, 1994.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, 2004.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. **J Neurosci**, v. 19, n. 6, p. 2181–6, 1999.

ALMEIDA, A.P., BAYER, B.M., HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M.A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 214, p. 74-79, 1980.

ALMEIDA, M.M.B. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Quim Nova**. v. 30, n. 4, p. 935-51, 2007.

BACHWICH, P.R. et al. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E₂ production in resting macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 136, n. 1, 1986.

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest**, v. 118, p. 413-20, 2008.

BAZZONI, F.; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **N Engl J Med**, v. 334, p. 1717–25, 1996.

BIANCHI, M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**, v. 81, p. 1–5, 2007.

BORGES, R. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 2013, 2013.

BOURS, M.J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 2, p. 358–404, 2006.

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**, v. 72, p. 248–54, 1976.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, p. 149–60, 2008.

BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol**, v. 78, p. 206-9, 1982.

BROWN, G.D.; GORDON, S. Immune recognition: a new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-7, 2001.

BURNSTOCK, G. **A basis for distinguishing two types of purinergic receptor**. In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach. Straub RW and Bolis L. 1978.

CALIXTO, J.B. et al Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131–4, 2005.

CALVO, M.; DAWES, J.M.; BENNETT, D.L.H. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **Lancet Neurol**, v. 11, p. 629-42, 2012.

COCKFIELD, S.M.; RAMASSAR, V.; HALLORAN, P.F. Regulation of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha expression in vivo: Effects of cycloheximide and cyclosporine in normal and lipopolysaccharide-treated mice. **J Immunol**, v. 150, n. 2, p. 342-52, 1993.

COLLINS, L.V. et al. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. **J Leukoc Biol**, v. 75, p. 995–1000, 2004.

COURVOISIER, D.S. et al. Pain as an Important Predictor of Psychosocial health in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Care Res**, v. 64, n. 2, p. 190-6, 2012.

CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL. **Lista de Espécies da Flora do Brasil 2012**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>>. Acesso em: 09 de fev. 2013.

COOPER, Z.A. et al. Febrile-range temperature modifies cytokine gene expression in LPS-stimulated macrophages by differentially modifying NF-κB recruitment to cytokine gene promoters. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, 2010.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n.5, 2005,

CUNHA, T.M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, 2008a.

CUNHA, T.M. et al. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. **Eur J Pain**, v. 12, p. 1059–68, 2008b.

CUNHA, T.M. et al. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **Br J Pharmacol**, v. 154, p. 460-70, 2008c.

CYBULSKY, M.I.; COLDITZ, I.G.; MOVAT, H.Z. The role of interleukin-1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. **Am J Pathol**, v. 124, n. 3, p. 367–72, 1986.

DAL-SECCO, D. et al. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 1, p.77-86, 2006.

DILLON, S. et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen presenting cells and immunological tolerance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 4, 2006.

DIMOVA, S.; HOET, P.H.M., NEMERY, B. Paracetamol (acetaminophen) cytotoxicity in rat type II pneumocytes and alveolar macrophages In Vitro. **J Biochem Pharmacol**. v.59, p.1467-75, 2000.

DINARELLO, C.A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **J Exp Med**, v. 201, p.1355–9, 2005.

DIYABALANAGE, T. et al, Nothospondin, a new AP-1 inhibitory quassinoid from the Cameroonian plant *Nothospondias staudtii*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, p. 4397–9, 2011.

DUNNE, A.; O'NEILL, L.A. The Interleukin-1 Receptor/Toll-Like Receptor Super family: Signal Transduction During Inflammation and Host Defense. **Sci STKE**, v.171, 2003.

DZIARSKI, R; GUPTA, D. *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan is a Toll-Like Receptor 2 Activator: a Reevaluation. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 5212-6, 2005.

EIGEBALY, S.A. et al. Antitumor Agents XXXV: Effects of Brusatol, Bruceoside A, and Bruceantin on P-388 Lymphocytic Leukemia Cell Respiration. **J Pharm Sci**, v. 68, n. 7, 1979.

ELFRIDES, E.S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 60, p. 53-59, Feb. 1998.

ELIZUR, A. et al. Tumor necrosis factor-alpha from macrophages enhances LPS-induced clara cell expression of keratinocyte-derived chemokine. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 38, n. 1, p. 8-15, 2008.

FERREIRA, H.L.; NEVES, L.L.M.; BINSFELD, P.C. **A INSERÇÃO DOS FITOTERÁPICOS NO COMPLEXO PRODUTIVO E INOVAÇÃO EM SAÚDE.** In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Inovação em temas estratégicos de saúde pública. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Organização Pan-Americana da Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, v. 1. cap. 8, 2011.

FIGUEIREDO, J. et al. NDP-MSH inhibits neutrophil migration through nicotinic and adrenergic receptors in experimental peritonitis. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 386, p. 311-8, 2013.

FILIPPO, K. et al. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. **J Immunol**, v. 180, p. 4308-15, 2008.

FRINK, M. et al. Keratinocyte-derived Chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. **SHOCK**, v. 28, p. 576-81, 2007.

FRITZ, J.H. et al. Nod1-Mediated Innate Immune Recognition of Peptidoglycan Contributes to the Onset of Adaptive Immunity. **Immunity**, v. 26, p. 445–59, 2007.

FUKAMIYA, N. et al. Structure–activity relationships of quassinoids for eukaryotic protein synthesis. **Cancer Lett**, v. 220, p. 37-48, 2005.

GARDELLA, S. et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. **EMBO J**, rep. 3, p.995–1001, 2002.

GAUTAM, R.; JACHAK, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Med Res Rev**, v. 29, p. 767–820, Sept. 2009.

GRABOVSKY, V. et al. Subsecond Induction of α -4 Integrin Clustering by Immobilized Chemokines Stimulates Leukocyte Tethering and Rolling on Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule 1 under Flow Conditions. **J Exp Med**, v.192, n. 4, p. 495–505, 2000.

HALL, H.I. et al. Anti-inflammatory agents III: Structure–activity relationships of brusatol and related quassinoids. **J Pharm Sci**, v. 72, p. 1282–4, 1983.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n.6832, p. 1099-103, Apr. 2001.

HAYDEN, MS; GHOSH, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. **Cell**, v. 132, 8 Feb. 2008.

HEMMI, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, p. 740–45, 2000.

HERREROS, E. *et al.* Sordarins: In Vitro Activities of New Antifungal Derivatives against Pathogenic Yeasts, *Pneumocystis carinii*, and Filamentous Fungi. **Antimicrob Agents and Chemother**, v. 42, n. 11, p. 2863–9, Nov. 1998.

HIDALGO, M.A. *et al.* Andrographolide interferes with binding of nuclear factor- κ B to DNA in HL-60-derived neutrophilic cells. **Br J Pharmacol**, v. 144, p. 680–6, 2005.

IBELGAUFTS, H. **Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia**. 2001. Revisado em: 4 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.copewithcytokines.org/cope.cgi>>. Acesso em: 23 Mar. 2013.

INTERNATIONAL SOCIETY OF ETHNOPHARMACOLOGY, 2012. Disponível em: <http://www.ethnopharmacology.org/ISE_constitution.htm>. Acesso em: 28 mar. 2013.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **J Clin Invest**, 2006, v.116, n. 5.

JOVANIC, D.V. *et al.* IL-17 Stimulates the production and Expression of proinflammatory Cytokines, IL- β and TNF- α , by Human Macrophages. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3513-21, 1998.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.13, 2001.

KLEINERT, H.; PAUTZ, A.; LINKER, K., SCHWARZ, P.M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol**, v. 500, p. 255–66, 2004.

LEAL, L.K.A.M. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J Ethnopharmacol**, v. 70, p. 151-9, May 2000.

LAU, S.T.; LIN, X.Z.; LEUNG, P.S. Role of reactive oxygen species in brucein D-mediated p38-mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signalling pathways in human pancreatic adenocarcinoma cells. **Br J Cancer**, v. 102, p. 583–93, 2010.

LAUTERBACH, M. *et al.* Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. **J Leukoc Biol**, v. 83, p. 1423-30, 2008.

LEVINE, J.D. *et al.* Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 225, p. 743-5, 1984.

LICHTMAN, S.N.; WANG, J.; LEMASTERS, J.J. RAW 264.7 and peritoneal cells but not in Kupffer cells participates in release of TNF- α in LPS receptor CD14. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 275, p. 39-46, 1998.

LIOU, Y.F. et al. Antitumor agents XLVIII: Structure—activity relationships of quassinoids as in vitro protein synthesis inhibitors of P-388 lymphocytic leukemia tumor cell metabolism. **J Pharm Sci**, v. 71, p. 430–5, 1982.

LIRA, S.A. et al. Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermis of transgenic mice results in marked infiltration of a single class of inflammatory cells. **J Exp Med**, v. 180, 1994,

LUA, Y.C.; YEHA, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, p.145–51, 2008.

MACKAY et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. **J Exp Med**, v. 177, p. 1277-86, 1993.

MANTYH, P.W. et al. Molecular mechanisms of cancer pain. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 201-9, Mar. 2002.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . **Mol Cell**, v. 10, p. 417-26, 2002.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, 2008.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**. v. 449, n. 18, 2007.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, Nov. 2001.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT P.; JANEWAY JR, C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394-7, 1997.

MERCADANTE, S. The use of anti-inflammatory drugs in cancer pain. **Cancer Treat Rev**, v. 27, p. 51-61, Feb. 2001.

MORETTI, C. et al. Isolation and structure of sergeolide, a potent cytotoxic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. **Tetrahedron Lett**, v. 23, 1982.

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

MÜLLER-ANSTETT, M.A. et al. Staphylococcal Peptidoglycan Co-Localizes with Nod2 and TLR2 and Activates Innate Immune Response via Both Receptors in Primary Murine Keratinocytes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, 2010.

NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 128, p. 853-9, 1999.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages, **J Clin Invest**, v. 79, p. 319-26, 1987.

NATHAN, C.F. et al. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma. **J Exp Med**, v. 160, n. 2, p. 600-5, 1984.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **J Nat Prod**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, v. 17, p. 215–234, 2000.

NUNOMURA, R. C. S. et al. *In vitro* studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). **Acta Amaz**, v. 36, n. 3, 2006.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br J Pharmacol**, v. 126, p. 537-550, 1999.

PARENTE, L.M.L. et al. Wound Healing and Anti-Inflammatory Effect in Animal Models of *Calendula officinalis* L. Growing in Brazil. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 2012, n. 375671, 2012.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis, **Eur J Pharmacol**, v. 587, p. 296-301, 10 June 2008.

PERRETTI, M.; SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Effect of interleukin-4 and interleukin-10 on leucocyte migration and nitric oxide production in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 116, n. 4, p. 2251–7, Oct. 1995.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-43, 2001.

PLATZER, C. et al. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. **Int Immunol**, v. 7, n. 4, p. 517-23, 1995.

POHLIT, A. M. et al. LC-ESI-MS determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma sprucei* sytem infusions. **J Braz Chem Soc**, v. 20, p. 1065-70, 2009.

POLONSKY, J.M.V.T.; MERIENNE, C.; SEVENET, T. Soularubinone, a New Antileukemic Quassinoid From *Soulamea tomentosa*. **J Nat Prod**, v. 44, n. 3, p. 279–84, 1981.

POLTORAK, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. **Science**. v.282, p. 2085–8, 1998.

PORTO, C.R.C. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Phyllanthus niruri* spray-dried standardized extract. **Rev Bras Farmacogn**, v. 23, n. 1, p. 138-44, Jan./Feb. 2013.

RATHER, L. J. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by galen to the four cardinal signs of celsus. **Bull N Y Acad Med**, v. 47, p. 303-22, 1971.

ROCHA e SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents and Actions**, v. 8, 1978.

RODRIGUEZ-FONSECA, C.; AMILS, R.; GARRETT, R.A. Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23S-like rRNAs deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes. **J Mol Biol**, v. 247, p. 224–35, 1995.

SARAIVA, R.C.G. *et al.* Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). **Acta Amaz**, v. 33, p. 213-20, 2002.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, p. 191–5, 2002.

SCHWADNER, R. *et al.* Peptidoglycan and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2. **J Biol Chem**, v. 274, p.17406–9, 1999.

SHERWOOD, E R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**. v. 18, p. 385–405, 2004.

SIGGERS, T. *et al.* Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF-κB family DNA binding. **Nat Immunol**, v. 13, p. 95-103, 2012.

SILVA, E. C. C. *et al.* Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 1, 2009a.

SILVA, E.C.C. *et al.* Gram-scale isolation of isobrucein B and neosergeolide from *Picrolemma sprucei* Hook. f. **Acta Amaz**, v. 39, n. 1, p. 229-32, 2009b.

SILVA, G.N. *et al.* Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lantana trifolia*. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 254-9, 14 Sept. 2005.

SMILEY, S.T.; KING, J.A.; HANCOCK, W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. **J. Immunol**, v. 167, p. 2887–94, 2001.

SRIKRISHNA, G.; FREEZE, H.H. Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation and Cancer. **Neoplasia**, v. 11, n. 7, p. 615–28, 2009.

SUZUKI, N. et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. **Nature**, v. 416, p. 750–56, 2002.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Semin Immunol**, v. 16, p. 3–9, 2004.

THOMSON, A.W.; FOWLER, E.F. Carrageenan: a review of its effects on the immune system. **Agents and Actions**, v. 11, p. 265-73, 1981.

TOMA, W. et al. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. **J Ethnopharmacol**, v. 85, p. 19–23, 2003.

VABULAS, R. M. et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. **J Biol Chem**, v. 277, p.15107-12, 2002.

VALE, M.L. et al. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br J Pharmacol**, v. 143, p. 833–44, 2004.

VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Antimicrobial Actions of the NADPH Phagocyte Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Salmonellosis. I. Effects on Microbial Killing by Activated Peritoneal Macrophages In Vitro. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 227–36, 17 July 2000.

VELÁZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 6, p. 578–89, June 2007.

VERRI JR, W.A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacol Ther**, v. 112, p. 116–38, 2006.

VIEIRA, S. M. et al. A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL and LIX/CXCL5. **Br J Pharmacol**, v. 158, 2009.

VIGNERON, M. et al. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **J Ethnopharmacol**, v. 98, p. 351-60, 2005.

VOGL, T. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nat Med**, v.13, p. 1042-9, 2007.

WANG, Z. et al. IRAK-4 Inhibitors for Inflammation. **Curr Top Med Chem**, v. 9, p. 724-37, 2009.

WANKOWICZ, Z., MEGYERI, P., ISSEKUTZ, A. Synergy between tumor necrosis factor α and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. **J Leukoc Biol**, v. 43, p. 349-56, 1988.

WATANABE, K. et al. The Neutrophil Chemoattractant Produced by the Rat Kidney Epithelioid Cell Line NRK-52E is a Protein Related to the KC/gro Protein. **J Biol Chem**, v. 264, n. 33, 1989.

XU, Y.X. et al. Curcumin inhibits IL1- α and TNF- α induction of AP-1 and NF- κ B DNA-binding activity in bone marrow stromal cells. **Hematopathol Mol Hematol**, v. 11, p. 49-62, 1997.

YU, M. et al. HMGB1 signals through Toll-like Receptor (TLR) 4 and TLR2. **SHOCK**, v. 26, n. 2, p.174-9, 2006.

ZHANG, Q et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, v. 464, p. 104-7, 2010.

ZHANG, Y.; RAMOS, B.F.; JAKSCHIK, B.A. Neutrophil Recruitment by Tumor Necrosis Factor from Mast Cells in Immune Complex Peritonitis. **Science**, v. 258, 18 Dec. 1992.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121-7, 2000.

ZUCKERMAN, S.H.; EVANS, G.F.; GUTHRIE, L. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in the differential expression of LPS-induced IL-1 and TNF mRNA. **Immunology**. v. 73, p. 460-5, 1991.

WANG, P.; HENNING, S.M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. **PLoS ONE**. v.5, 2010.