



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TALITA MAGALHÃES ROCHA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE ALCALOIDES
IMIDAZÓLICOS DE *Pilocarpus microphyllus*: ESTUDO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN
SILICO***

FORTALEZA

2017

TALITA MAGALHÃES ROCHA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE ALCALOIDES
IMIDAZÓLICOS DE *Pilocarpus microphyllus*: ESTUDO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN
SILICO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida
Moreira Leal

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R577e Rocha, Talita Magalhães.
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE ALCALOIDES IMIDAZÓLICOS DE
Pilocarpus microphyllus: ESTUDO IN VITRO, IN VIVO E IN SILICO / Talita Magalhães Rocha. – 2017.
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. *Pilocarpus microphyllus*. 2. *epiisopiloturina*. 3. *epiisopilosina*. 4. atividade antinociceptiva. 5.
atividade anti-inflamatória. I. Título.

CDD 615.1

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE ALCALOIDES
IMIDAZÓLICOS DE *Pilocarpus microphyllus*: ESTUDO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais José Freires e Hilça Terceiro, pelo amor e apoio incondicional, sem eles eu nunca teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu namorado Caio, obrigada pelo carinho, companhia, força, e paciência de sempre.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que repassaram seus conhecimentos com o intuito de formar profissionais com excelência, e principalmente a minha orientadora, Profa. Kalyne Leal, pelo acolhimento desde o início da minha graduação, incentivo e ensinamentos tão importantes para o meu crescimento.

À banca examinadora pelo seu tempo dedicado a avaliação deste trabalho e consideráveis sugestões.

A todos colegas do CEFAC, pela ajuda, aprendizado e momentos de descontração nesses últimos anos.

Ao CNPQ, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DE ALCALOIDES IMIDAZÓLICOS DE *Pilocarpus microphyllus*: ESTUDO *IN VITRO*, *IN VIVO* E *IN SILICO* Aluna: Talita Magalhães Rocha. Orientador: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2017.

As plantas medicinais têm se mostrado promissoras como fonte de novos fármacos para modular a resposta inflamatória, incluindo a dor inflamatória. *Pilocarpus microphyllus*, conhecida popularmente como jaborandi, é uma espécie nativa do Nordeste e amplamente explorada pela indústria farmoquímica para a extração da pilocarpina, um alcaloide imidazólico colinérgico. Suas folhas também possuem outros alcaloides, como epiisopilosina (EPIL) e epiisopiloturina (EPIT), obtidos de resíduo industrial. Estudos preliminares determinaram a ação anti-inflamatória e antinociceptiva da epiisopiloturina em camundongos. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo dos alcaloides EPIT e EPIL com determinação do possível mecanismo de ação. Para tanto, foram empregados modelos experimentais de inflamação em neutrófilos humanos, hiperalgesia mecânica induzida por carragenina em camundongos (Von Frey eletrônico) e estudo *in silico*. Na avaliação do potencial anti-inflamatório, foi observado que tanto EPIT quanto EPIL (1–100 µg/mL) inibiram a degranulação de neutrófilos (5x10⁶ células/mL) determinada pela liberação de mieloperoxidase (MPO) induzida por PMA 0,1µM (CI₄₀ = 14,3 e 29,5 µg/mL, respectivamente) ou fMLP 1µM (CI₄₀ = 45,2 e 62,3 µg/mL, respectivamente). Esse efeito mostrou-se relacionado com a modulação do metabolismo oxidativo, no qual EPIT e EPIL inibiram em até 44 e 74%, respectivamente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) determinada por quimioluminescência – sonda luminol. Ademais foi observado que EPIT e EPIL também reduziram o influxo de Ca²⁺ na célula em 46 e 55%, respectivamente e inibiram a fosforilação do NF-κB citosólico, impedindo assim sua translocação para o núcleo. Destaca-se que as ações anti-inflamatória e antioxidante de EPIT e EPIL ocorreram sem afetar a viabilidade celular (teste do MTT e atividade da enzima lactato desidrogenase). No estudo da atividade antinociceptiva, EPIT e EPIL (0,3 e 1 mg/kg, i.p.) inibiram a hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina (300 µg/pata) em camundongos e reduziram significativamente os níveis de MPO em até 87 e 74%, respectivamente, uma medida indireta da migração neutrofílica. O pré-tratamento dos camundongos com EPIT (1 mg/kg, i.p.) e EPIL (0,3 mg/kg, i.p.) reduziu a expressão de COX-2 em tecido subplantar induzida por carragenina em camundongos. EPIT e EPIL estabeleceram fortes interações com resíduos de aminoácidos considerados essenciais para a ligação com as isoformas COX-1 e COX-2. Os resultados obtidos sugerem que a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos alcaloides imidazólicos, EPIT e EPIL, está relacionada, pelo menos em parte, a uma modulação na ativação e no acúmulo de células do sistema imune inato (neutrófilos) no foco inflamatório, possivelmente por redução do influxo de cálcio intracelular, ativação do NF-κB e expressão de COX-2.

Palavras-chave: *Pilocarpus microphyllus*, epiisopiloturina, epiisopilosina, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória

ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF IMIDAZOLE ALKALOIDS OF *Pilocarpus microphyllus*: IN VITRO, IN VIVO AND IN SILICO STUDY. Author: Talita Magalhães Rocha. Advisor: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Master Degree. Program of Pos-Graduate in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2017.

Medicinal plants have been shown to be promising as a source of alternative therapies to modulate the inflammatory response, including inflammatory pain. *Pilocarpus microphyllus*, popularly known as jaborandi, is a species native to the Northeast and widely exploited by the pharminochemical industry for the extraction of pilocarpine, a cholinergic imidazole alkaloid. Its leaves also have other alkaloids, such as epiisopilosine (EPIL) and epiisopiloturine (EPIT), obtained from industrial waste. Preliminary studies determined the anti-inflammatory and antinociceptive action of epiisopiloturine in mice. On the above, the aim of the present study was to investigate the anti-inflammatory and antinociceptive potential of the alkaloids EPIT and EPIL. For this, experimental models of inflammation in human neutrophils, mechanical hyperalgesia induced by carrageenan in mice (Von Frey electronic) and in silico study were used. In assessing the anti-inflammatory potential, both EPIT as EPIL (1 - 100 µg/mL) inhibited neutrophils degranulation (5×10^6 cells/mL) measured by myeloperoxidase activity in activated neutrophils by 1 µM fMLP (CI40 = 45.2 and 62.3 µg / mL, respectively) or 0.1 µM PMA (CI40 = 14.3 and 29.5 µg / mL, respectively). This effect was related to the modulation of the oxidative metabolism, in which EPIT and EPIL inhibited up to 44 and 74%, respectively, the production of reactive oxygen species (ROS) determined by chemiluminescence - luminol probe. In addition, it was observed that EPIT and EPIL also reduced the Ca^{2+} influx in the cell by 46 and 55%, respectively, and inhibited the phosphorylation of the cytosolic NF-κB, thus preventing its translocation to the nucleus. It is noteworthy that the anti-inflammatory and antioxidant actions of EPIT and EPIL occurred without affecting cell viability (MTT test and lactate dehydrogenase enzyme activity). In the study of antinociceptive activity, EPIT and EPIL (0.3 and 1 mg / kg, i.p.) inhibited carrageenan-induced inflammatory hypernociception (300 µg / paw) in mice and significantly reduced MPO levels by up to 87 and 74%, respectively, an indirect measure of neutrophil migration. Pretreatment of mice with EPIT (1 mg / kg, i.p.) and EPIL (0.3 mg / kg, i.p.) reduced the expression of COX-2 in subplantar carrageenan-induced tissue in mice. EPIT and EPIL were able to establish strong interactions with amino acid residues considered essential for binding to the COX-1 and COX-2 isoforms. The results obtained suggest that the anti-inflammatory and antinociceptive activity of imidazole alkaloids, EPIT and EPIL, are related, at least in part, to a modulation in the activation and accumulation of the innate immune system cells (neutrophils) in inflammatory focus, possibly by reducing intracellular calcium influx, activation of NF-κB and COX-2 expression.

Key words: *Pilocarpus microphyllus*, epiisopiloturine, epiisopilosine, antinociceptive activity, anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Doenças que apresentam o processo inflamatório em sua etiologia. | 18 |
| Figura 2. Migração de leucócito para o sítio inflamatório | 20 |
| Figura 3. Envolvimento da MPO na função de neutrófilos | 24 |
| Figura 4. Processo de maturação do neutrófilo e formação dos grânulos | 26 |
| Figura 5. Modelo esquemático da via de transdução de sinal em neutrófilos. | 28 |
| Figura 6. Via de ativação do NF- κ B na resposta inflamatória..... | 30 |
| Figura 7. Mecanismo específico da dor inflamatória | 34 |
| Figura 8. Estrutura química da pilocarpina..... | 38 |
| Figura 9. Estrutura química da Epiisopilosina (A) e Epiisopiloturina (B). | 39 |
| Figura 10. Efeito da EPIT (A) e da EPIL (B) sobre a degranulação neutrofílica induzida por PMA determinada pela liberação da mieloperoxidase. | 53 |
| Figura 11. Efeito da EPIT (A) e da EPIL (B) sobre a degranulação neutrofílica induzida por fMLP determinada pela liberação da mieloperoxidase. | 53 |
| Figura 12. Efeito da EPIT (A) e da EPIL (B) sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos ativados com PMA em percentual. . | 54 |
| Figura 13. Efeito da EPIT no influxo de cálcio induzido por fMLP em neutrófilos humanos mensurado por fluorescência. (A) Registro original do influxo de cálcio em neutrófilos. (B) Proporção de intensidade de fluorescência/basal (F/F ₀) da liberação de cálcio em 60 minutos..... | 56 |
| Figura 14. Efeito da EPIL no influxo de cálcio induzido por fMLP em neutrófilos humanos mensurado por fluorescência. (A) Registro original do influxo de cálcio em neutrófilos. (B) Proporção de intensidade de fluorescência/basal (F/F ₀) da liberação de cálcio em 60 minutos..... | 57 |
| Figura 15. Efeito da EPIT e da EPIL na expressão de NF- κ B em extrato citosólico de neutrófilos ativos por fMLP..... | 58 |
| Figura 16. Efeito da EPIT (A) e da EPIL (B) sobre a viabilidade de neutrófilos humanos / metabolismo mitocondrial determinado pelo teste do MTT..... | 59 |
| Figura 17. Avaliação da toxicidade da EPIT (A) e da EPIL (B) em neutrófilos humano através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH). | 60 |
| Figura 18. Efeito da EPIT e EPIL na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg)..... | 62 |
| Figura 19. Efeito da EPIT e da EPIL na migração de neutrófilos induzida por carragenina (Cg) na pata de camundongos. | 63 |
| Figura 20. Fotomicrografias da imunohistoquímica no tecido subplantar para COX-2 em camundongos..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 21. Contagem de células imunomarcadas para COX-2 em tecidos subplantares. | 66 |
| Figura 23. (a) Conformação de ligação prevista para EPIT no sítio de ligação da COX-1 no resíduo Glu140 (b) Interações entre EPIT e COX-1 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1HT5) | 69 |
| Figura 24. (a) Conformação de ligação prevista para EPIL no sítio de ligação da COX-2 no resíduo Ser353 (b) Interações entre EPIL e COX-2 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1CX2) | 70 |
| Figura 25. (a) Conformação de ligação prevista para EPIT no sítio de ligação da COX-2 no resíduo Tyr355 (b) Interações entre EPIT e COX-2 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1CX2) | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Concentração de EPIT e EPIL capaz de inibir em 40% a degranulação de neutrófilos induzida por PMA ou fMLP e determinada pela liberação de MPO..... | 42 |
| Tabela 2 | Valores de RMSD de validação de PDB-entradas..... | 65 |
| Tabela 3 | Escores de <i>docking</i> dos resíduos específicos de ligantes da COX-1..... | 66 |
| Tabela 4 | Valores de RMSF de resíduos específicos dos ligantes de COX-2..... | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|--|
| % | Porcentagem |
| Δ | Delta |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau(s) centígrado(s) |
| μL | Microlitro(s) |
| g | Gramma(s) |
| mg | Miligrama(s) |
| mL | Mililitro |
| 5-HT | Serotonina |
| AA | Ácido araquidônico |
| AINE | Anti-inflamatório não esteroidal |
| AP-1 | Proteína ativadora 1 |
| BPI | Proteína de aumento da permeabilidade /bactericida |
| C5a | Produto do sistema complemento |
| CFA | Adjuvante completo de Freud |
| Cg | Carragenina |
| COX | Ciclooxigenase |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DAG | Diacilglicerol |
| DMSO | Dimetil sulfoxido |
| EPM | Erro padrão da media |
| ERK | Quinase reguladora de sinal extracelular |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| Fc γ R | Receptor de imunoglobulina G |
| fMLP | Peptídeo N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina |
| GM-CSF | Fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| hCAP-18 | Proteína antimicrobiana catelicidina humana |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanesulfônico |
| HTAB | Brometo de hexadeciltrimetilamônio |
| i.p. | Intraperitoneal |

| | |
|----------------|---|
| i.pl. | Intraplantar |
| IASP | Associação internacional para o estudo da dor |
| ICAM | Moléculas de adesão intercelular |
| IFN- γ | Interferon γ |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| IP3 | Fosfatidilinositol 3-fosfato |
| I κ B | Inibidor κ B |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LTB4 | Leucotrieno B4 |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MOE | <i>Molecular Operating Environment</i> |
| MPO | Mieloperoxidase |
| MTT | Brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| NADH | Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| NE | Elastase de neutrófilo |
| NET | <i>Neutrophil extracellular trap</i> |
| NF- κ B | Fator nuclear κ B |
| iNOS | Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase |
| NGAL | Lipocalina associada a gelatinase de neutrófilo |
| MHC | Complexo principal de histocompatibilidade |
| NO | Óxido nítrico |
| PAF | Fator ativador de plaquetas |
| PAMPs | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PDB | Protein data bank |
| PG | Prostaglandina |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinases |
| PKC | Proteína quinase C |

| | |
|---------------|--|
| PLA | Fosfolipase A |
| PLC | Fosfolipase C |
| PMA | Forbol miristato acetato |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetanosulfonil |
| PR3 | Proteinase 3 |
| PSGL-1 | Glicoproteína ligadora de P- selectina |
| QL | Quimioluminescência |
| RMSD | <i>Root mean square deviation</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SOC | Canal operado por estoque |
| TBST | Solução salina tris tamponada com tween |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento |
| TLR | Receptor <i>toll like</i> |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| TRPV1 | Receptor vaniloide 1 |
| VCAM | Molécula de adesão celular-vascular |
| MAC | Antígeno macrofágico |
| MCP1 | Proteína quimiotática para monócitos |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VLA-4 | Antígenos de ativação tardia |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Doenças inflamatórias | 17 |
| 1.2 Processo inflamatório | 18 |
| 1.2.1 Neutrófilos..... | 22 |
| 1.2.2 Mediadores inflamatórios..... | 28 |
| 1.3 Dor inflamatória..... | 31 |
| 1.4 Farmacoterapia..... | 34 |
| 1.5 Alcaloides de <i>Pilocarpus microphyllus</i> : epiisopiloturina e epiisopilosina | 37 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 41 |
| 3 OBJETIVOS | 42 |
| 3.1 Geral..... | 42 |
| 3.2 Específicos..... | 42 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 43 |
| 4.1 Aspectos éticos..... | 43 |
| 4.2 Material de estudo | 43 |
| 4.3 Animais..... | 43 |
| 4.4 Avaliação farmacológica | 43 |
| 4.4.1 Isolamento de polimorfonucleares (PMNs) humanos | 43 |
| a) Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante em neutrófilos humanos..... | 44 |
| • Degranulação de neutrófilos..... | 44 |
| • Ensaio de Quimioluminescência | 44 |
| • Mensuração dos níveis de cálcio intracelular | 45 |
| • Preparo do extrato citosólico | 45 |
| • Western Blotting (NF-kB p65)..... | 45 |
| b) Testes de citotoxicidade | 46 |
| • Teste do MTT..... | 46 |
| • Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)..... | 47 |
| c) Avaliação do potencial antinociceptivo dos alcaloides in vivo | 47 |
| • Modelo de Avaliação da Hipernocicepção - Von Frey eletrônico | 47 |
| • Avaliação do efeito da EPIT e EPIL na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg) | 48 |

| | |
|--|----|
| • Efeito da EPIT e EPIL sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por carragenina (Cg) | 48 |
| • Quantificação da Atividade de MPO | 48 |
| • Imunohistoquímica para COX-2 | 49 |
| d) Avaliação da interação molecular da EPIT e EPIL com as isoformas da enzima cicloxigenase in silico | 50 |
| • Preparação da estrutura das proteínas e ligantes | 50 |
| • Protocolo de triagem virtual | 50 |
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 51 |
| 5 RESULTADOS | 52 |
| 5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante em neutrófilos humanos ... | 52 |
| • Efeito da EPIL e da EPIT na degranulação em neutrófilos humano induzida por PMA ou fMLP: liberação de enzima mieloperoxidase (MPO) | 52 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência | 54 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre os níveis de cálcio intracelular | 55 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre a expressão gênica de NF- κ B..... | 58 |
| 5.2 Avaliação da citotoxicidade dos alcaloides em neutrófilos humanos | 59 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre a avaliação da citotoxicidade mensurada através do teste do MTT | 59 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)..... | 60 |
| 5.3 Avaliação do potencial antinociceptivo dos alcaloides EPIT e EPIL | 61 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre a hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg) | 61 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido subplantar induzido por carragenina (Cg) em camundongos | 63 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL na imunoexpressão de Ciclooxygenase-2 (COX-2) no tecido subplantar de camundongos | 64 |
| 5.4 Avaliação da interação molecular dos alcaloides com as isoformas da COX in silico..... | 67 |
| • Efeito da EPIT e da EPIL na interação molecular com as isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2)..... | 67 |
| 6 DISCUSSÃO | 71 |
| 7 CONSIDERAÇÕES GERAIS | 79 |
| 8 CONCLUSÕES | 80 |
| REFERÊNCIAS | 81 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças inflamatórias

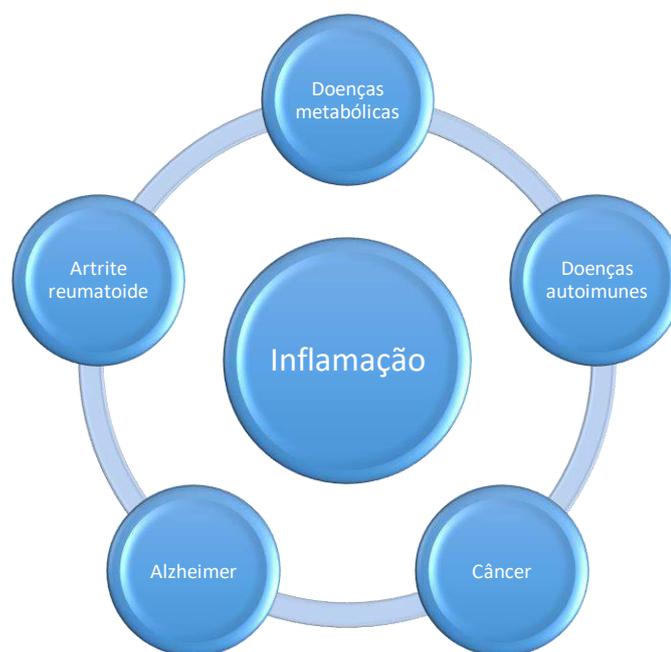
A inflamação é uma resposta natural e essencial proporcionada pelo sistema imune para assegurar a sobrevivência do tecido mediante a um dano tecidual causado por patógenos, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas, promovendo a remoção do estímulo nocivo e a recuperação do tecido danificado (CHANDRASEKHARAN & SHARMA-WALIA, 2015; AHMED, 2011).

O primeiro passo da cascata inflamatória é principalmente uma resposta vascular com hiperemia e aumento da permeabilidade da parede do vaso. Inicialmente, vasoconstrição arteriolar transitória é observada e promovida pela contração da musculatura lisa dos vasos. Posteriormente, a vasodilatação arteriolar leva ao aumento do fluxo sanguíneo para a área danificada, resultando em hiperemia local. Nesta fase inicial, alterações no endotélio vascular são prontamente detectáveis com consequente exsudação de proteínas plasmáticas e do líquido do sangue para o tecido, sendo seguido pela migração de leucócitos da circulação em tecido (KUMAR et al., 2015). A reação inflamatória é reconhecida pelos sinais cardinais de calor, rubor, tumor, dor e perda da função, dos quais os quatro primeiros foram descritos por Cornelius Celsus no primeiro século (LAWRENCE et al., 2002).

A resposta inflamatória normal geralmente é benéfica ao hospedeiro, reestabelecendo em pouco tempo a estrutura e função do tecido e/ou órgão. Para a maioria dos pacientes, a recuperação do tecido lesionado ocorre naturalmente, sem a necessidade de medicamentos, terapia ou outras intervenções (WATSON, 2006). No entanto, em condições anormais pode promover perda da função do órgão ou tecido, e a cronicidade nesta resposta, levando ao desenvolvimento de doenças (LAWRENCE et al, 2002). Muitas doenças envolvem inflamação crônica e representam a maior carga de morbimortalidade no Brasil (DUNCAN et al., 2012). Logo, a resposta inflamatória é um componente fisiopatológico que contribui para instalação de doenças como arteriosclerose, obesidade, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide (DUNCAN et al, 2012; HEADLAND & NORLING, 2015).

Estudos demonstraram que diferentes doenças inflamatórias são dependentes do aumento do metabolismo oxidativo (**Figura 1**). Na doença de Parkinson, ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente pela enzima NADPH oxidase por células da micróglia (PETERSON & FLOOD, 2012). No caso da doença inflamatória intestinal, estudos evidenciaram aumento na produção de EROs, como o H_2O_2 (BELTRAN et al, 2010). Citocinas pró-inflamatórias também estão envolvidas em doenças metabólicas, como o diabetes tipo 2, a síndrome metabólica e a obesidade (MAEDLER et al., 2009; FLYVBJERG, 2010), doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (DAVIS et al, 2011; FARID et al, 2011), doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (SHAFTEL et al, 2008) e doenças inflamatórias, como a osteoartrite e a artrite reumatoide (DINARELLO, 2011).

Figura 1. Doenças que apresentam o processo inflamatório em sua etiologia. Próprio autor.



1.2 Processo inflamatório

Inflamação é um evento benéfico que leva à remoção de estímulos agressivos e à restauração da função fisiológica e estrutura do tecido. Entre as células associadas a resolução da inflamação aguda, estão os neutrófilos e macrófagos e uma crescente evidência sugere que os eosinófilos desempenham funções importantes durante a resolução de processos inflamatórios crônicos (HEADLAND et al, 2015). Os neutrófilos são tipicamente os primeiros leucócitos a serem recrutados para o foco inflamatório e são

capazes de eliminar patógenos por múltiplos mecanismos (KOLACZKOWSKA et al, 2013). Os macrófagos também desempenham o papel de fagocitose junto com neutrófilos, mas têm uma vida útil muito mais longa e papel essencial em orquestrar a resposta imune adaptativa (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011).

A resposta inflamatória aguda é complexa, mas altamente coordenada em uma sequência de eventos envolvendo alterações moleculares, celulares e fisiológicas. O processo começa com a produção de mediadores solúveis (quimiocinas, citocinas, radicais livres, aminas vasoativas e eicosanoides) pelas células residentes (macrófagos teciduais, células dendríticas (DCs), linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos) no tecido lesado ou infectado. Concomitantemente, moléculas de adesão celular são expressas em leucócitos e células endoteliais, promovendo a exsudação de proteínas e influxo de granulócitos do sangue para os tecidos (FULLERTON & GILROY, 2016).

Esses mediadores aumentam a permeabilidade vascular, levando ao influxo de plasma contendo anticorpos e outros componentes solúveis, como complemento necessário para a opsonização de bactérias (resposta imune humoral) e a diluição dos estímulos inflamatórios. Quimiocinas produzidas por células residentes formam um gradiente na superfície do endotélio microvascular para capturar e recrutar neutrófilos circulantes via seus receptores de quimiocinas. Os neutrófilos ativados transmigram através do endotélio para o tecido inflamado e exercem potentes mecanismos antibacterianos como a degranulação e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) através do *burst* oxidativo (MEDZHITOV, 2008).

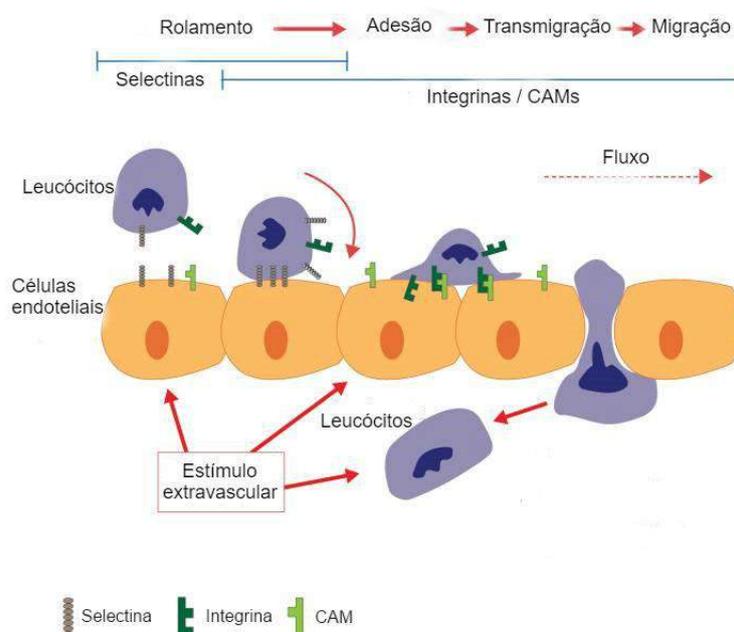
Na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento de leucócitos envolve basicamente as seguintes etapas: marginalização, rolamento, adesão, seguido pela transmigração e migração para os tecidos. O recrutamento de neutrófilos é iniciado por alterações na superfície do endotélio que resultam da estimulação por mediadores inflamatórios (incluindo histamina, leucotrienos e citocinas) que são liberados de leucócitos residentes quando entram em contato com patógenos (PHILLIPSON & KUBES, 2011). As células endoteliais ativadas por citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral – TNF- α e IL-1 β), pela exposição a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e outros mediadores expressam moléculas de adesão e sintetizam quimiocinas e lipídios que são apresentados na luz do endotélio (SUMMERS et al, 2010).

O *upregulation* das moléculas de adesão facilita o primeiro passo na cascata da adesão, envolvendo a interação física dos neutrófilos com o vaso, conhecida como captura ou marginalização. Uma família de glicoproteínas superficiais transmembrana, denominadas E - L - e P-selectinas, desempenham um importante papel na mediação nesta etapa inicial da cascata de adesão (DIMASI et al, 2013).

Após a captura, o próximo passo na cascata da adesão de leucócitos é denominado rolamento. Neste estágio, os neutrófilos rolam ao longo do endotélio na direção do local inflamado. Como com a captura de neutrófilos, o rolamento é predominantemente mediado por interações entre selectinas endoteliais e seus ligantes associados (MCDONALD et al, 2010).

Após o rolamento no endotélio ativado nas áreas de inflamação, a resposta dos leucócitos ao gradiente quimioatraente é a adesão. O processo de adesão tanto nas células endoteliais quanto na matriz extracelular é realizado principalmente pela família das β 2-integrinas (**Figura 2**). Integrinas são glicoproteínas transmembrana heterodiméricas presentes em praticamente todas as células dos mamíferos. Os leucócitos também expressam a integrina VLA-4 que se liga a VCAM-1 endotelial (SCHYMEINSKY et al, 2007).

Figura 2. Migração de leucócito para o sítio inflamatório (Fonte: GHOSH & PANACCIONE, 2010 Adaptado)



O estágio final da cascata de adesão é a migração dos leucócitos do vaso sanguíneo para o tecido inflamado. Na sequência do processo de recrutamento e adesão, os neutrófilos emigram a partir do lúmen vascular entre ou através das células endoteliais. A transmigração pode ocorrer com o mínimo de ruptura da complexa estrutura das paredes dos vasos. Antes de atravessar o endotélio, neutrófilos e monócitos rastejam dentro dos vasos sanguíneos de uma forma dependente de MAC1 e ICAM1, buscando locais preferenciais de transmigração (SCHENKEL et al, 2004, PHILLIPSON et al, 2006).

Os leucócitos que emigraram seguem um gradiente de quimiocinas que estão potencialmente depositadas no endotélio (PHILLIPSON & KUBES, 2011). Essas células intensificam a reação inflamatória liberando citocinas pró-inflamatórias — IL-1 e TNF- α (WU & CHEN, 2014). Após dois ou três dias na área inflamada, os neutrófilos são esgotados pelo processo de apoptose e são substituídos por monócitos. Os monócitos infiltram-se no foco inflamatório em resposta a estímulos quimiotáticos gerados pela quimiocina MCP1. E ainda, sob o estímulo de substâncias como o IFN- γ (interferon- γ), os monócitos se diferenciam em macrófagos, de modo a aumentar sua estrutura e capacidade metabólica. Dessa forma os macrófagos realizam sua função fagocítica (OLCZYK et al., 2014). Sua principal função é remover os corpos apoptóticos e tecidos mortos do local injuriado. Além disso, os macrófagos são as principais células a liberarem citocinas pró-inflamatórias (TNF- α) e citocinas que ativam vias como a angiogênese e vias de deposição de matriz (VEGF e TGF- β) (KOH et al., 2013).

Os macrófagos variam funcional e fenotipicamente ao longo do processo inflamatório desempenhando duplo papel no processo inflamatório: papel pró-inflamatório, observado no início da resposta inflamatória, caracterizado pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , remoção de detritos (matriz e corpos apoptóticos) por meio da secreção de metaloproteinases (por exemplo, collagenase e elastase), além de liberarem altos níveis de EROs que facilitam a imunidade inata na eliminação de microrganismos (fenótipo de macrófago M1); por outro lado, um papel anti-inflamatório por ser a principal fonte de mediadores químicos anti-inflamatórios como o TGF- β e fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos e biossíntese de matriz (fenótipo de macrófago M2) (OLCZYK et al., 2014, KOH et al., 2013; GENSEL, 2015). Essas células desempenham um papel crítico para o início da

reparação tecidual: o debridamento do tecido por meio da fagocitose dos neutrófilos apoptóticos e tecido morto, limpando a área de tecido injuriado (DELAVARY et al, 2011). Já a ação antimicrobiana dos macrófagos difere da dos neutrófilos pela síntese aumentada de NO (ISAAC et al., 2010). O óxido nítrico (NO) é um radical pequeno, formado a partir do aminoácido L-arginina por três isoformas distintas de óxido nítrico. A isoforma indutível (iNOS – NO sintase induzida) é sintetizada por células inflamatórias, especialmente macrófagos (LUO & CHEN, 2005).

Os mastócitos constituem outro tipo celular conhecido por estar envolvido numa variedade de processos de defesa do organismo, seja esse processo normal ou patogênico, incluindo a inflamação crônica (HART, 2015). São células residentes, amplamente distribuídos por todo tecidos conjuntivos. Estas células são particularmente numerosas abaixo da camada subcutânea ao lado de vasos sanguíneos e nervos. Eles têm o potencial de secretar um amplo espectro de mediadores biologicamente ativos, citocinas e quimiocinas que podem exercer diversos efeitos sobre as células circundantes e tecidos (AGIER et al., 2015). Embora seu papel principal seja em reações agudas, é claro que essas células também desempenham papéis importantes em diversas condições crônicas (HART, 2015). Portanto, os mastócitos são importantes células na manutenção da homeostase através de seu envolvimento na angiogênese, remodelação/reparo tecidual e regulação da permeabilidade vascular, atuando na modulação da inflamação (pela ação de seus mediadores químicos) com efeitos pró e anti-inflamatórios (AGIER et al., 2015).

1.2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no corpo humano, porém possuem uma vida curta que é equilibrada por sua liberação contínua da medula óssea (ROSE & MACKAY, 2014). As respostas inflamatórias mediadas por neutrófilos são um processo complexo, com a adesão inicial de células de endotélio vascular ativado seguido de extravasamento de circulação, migração para focos inflamatórios e, finalmente, destruição *in situ* de patógenos (KAPLAN, 2011). Os microrganismos são eliminados através de processos de fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) via *burst* respiratório e liberação das substâncias microbicidas dos grânulos citoplasmáticos (KOBAYASHI & DELEO, 2009).

Na fagocitose, os mecanismos de interiorização dependem do tipo de interação entre os neutrófilos e os microrganismos. A interação pode ser direta, através do reconhecimento de PAMPs pelos receptores de reconhecimento de padrões ou mediado por opsoninas. O último mecanismo é melhor caracterizado e inclui dois exemplos: fagocitose mediada por FcγR, que se baseia na formação de extensões de pseudópodes para englobar as partículas opsonizada por IgG e fagocitose mediada pelo receptor de complemento, que não requer extensões de membrana ou pseudópodes (UNDERHILL & OZINSKY, 2002).

Outro mecanismo de neutrófilos ativados é *burst* respiratório através montagem do complexo NADPH oxidase na membrana plasmática e do fagossomo, onde começa a cascata das espécies reativas de oxigênio, reduzindo o oxigênio molecular a superóxido (O_2^-). O superóxido, embora não seja um oxidante forte, rapidamente sofre dismutação, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Superóxido também pode reagir com o óxido nítrico (NO), que é produzido em níveis elevados em focos inflamatórios, para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante forte. Após a degranulação no fagossomo, a MPO pode reagir com o H_2O_2 para produzir várias espécies reativas, incluindo haletos ácidos. O ácido hipocloroso (HOCl) é principal produto da mieloperoxidase (MPO) no fagossomo, sendo mais reativo que o superóxido e é antimicrobiano *in vitro* (WINTERBOURN et al, 2006).

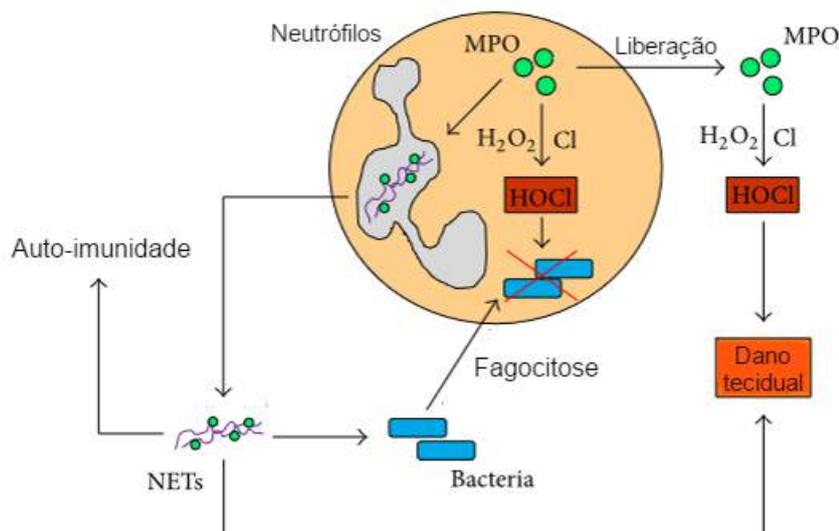
Os grânulos azurofílicos, também conhecidos como grânulos de peroxidase positiva ou primários, são os primeiros formados durante a maturação dos neutrófilos. São assim chamados por sua capacidade de assumir a cor azul em corante básico e conter mieloperoxidase (MPO), uma enzima fundamental para a explosão oxidativa (LACY, 2005). Os outros componentes desse grânulo incluem as defensinas, lisozimas, proteína de aumento da permeabilidade /bactericida (BPI) e proteases de serina: elastase de neutrófilos (NE), proteinase 3 (PR3) e catepsina G (CG). Esses grânulos são cheios de compostos antimicrobianos e funcionam como um repositório primário para o armamento molecular dos neutrófilos (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

A mieloperoxidase (MPO) é uma heme-proteína encontrada em grandes quantidades em grânulos azurofílicos de neutrófilos, monócitos e alguns macrófagos de tecido, incluindo micróglia. É sintetizada em grandes quantidades por promielócitos e promielomonócitos durante a diferenciação dos granulócitos na medula óssea (KLEBANOFF, 2005, MALLE et al, 2007). Após a ativação por mediadores

inflamatórios como ligantes de receptores *toll like* (TLR) e citocinas como GM-CSF e TNF- α , bem como sinais mediados por Ig/Fc, os neutrófilos podem liberar MPO por degranulação e pelo processo de morte celular, incluindo apoptose e necrose (HOLLE et al, 2013, VAN DER VEEN et al, 2009, ODOBASIC et al, 2014).

Na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e um intermediário de baixo peso molecular (haletos: cloreto, brometo ou tiocianato; tirosina ou nitrito), a MPO catalisa a formação de poderosos intermediários reativos incluindo os ácidos hipocloroso (HOCl), hipobromoso (HOBr) e hipotiocianoso (HOSCN), radicais tirosil e intermediários reativos de nitrogênios. Esses intermediários podem causar efeitos na função celular, modificando proteínas, lipídeos e/ou DNA (**Figura 3**) (VAN DER VEEN et al, 2009).

Figura 3. Envolvimento da MPO na função de neutrófilos (Fonte: ODOBASIC et al, 2016 Adaptado).



Além de mediadores inflamatórios derivados de neutrófilos que contribuem para o dano tecidual em condições inflamatórias como moléculas efetoras, a MPO e outras proteínas de neutrófilos como a proteinase-3 podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento de doenças autoimunes, atuando como alvos (auto antígenos, por exemplo) contra a qual a resposta imune patogênica foi gerada (FLINT et al, 2015).

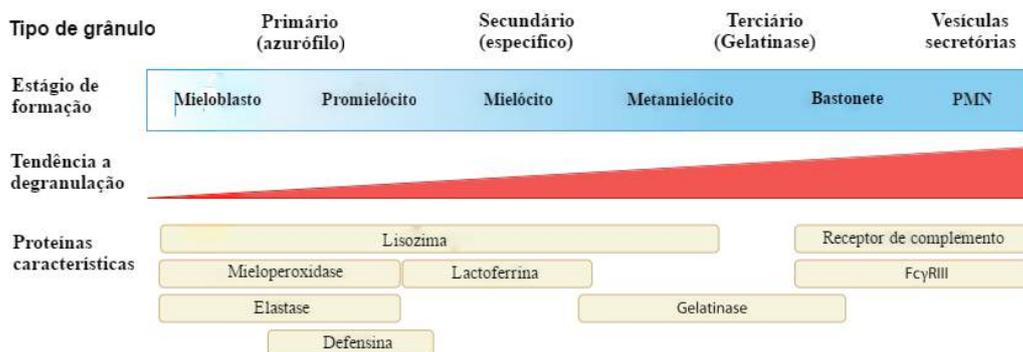
Ações de MPO são mediadas predominantemente através de sua atividade enzimática e a geração de reativos intermediários. No entanto, existem evidências demonstrando que também pode regular a função das células imunes através de seus efeitos não-enzimáticos. Por exemplo, através de sua ligação com a CD11b/CD18 (Mac-1), a MPO pode induzir a ativação de neutrófilos de forma autócrina incluindo a ativação

de MAPK e NF- κ B, produção de EROs, *upregulation* de integrinas de superfície e degranulação, bem como diminuição da apoptose, levando a maior inflamação nos pulmões (LAU et al, 2005, EL KEBIR et al, 2008). Além disso, os leucócitos podem aderir a MPO através da ligação de CD11b/CD18, que também pode contribuir para os efeitos pró-inflamatórios da MPO por potencializar o acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação. Também já foi demonstrado que a MPO inativa pode aumentar a ativação de macrófagos, tais como a produção de citocinas e indução do *burst* respiratório *in vitro*. Sendo assim, a MPO caracteriza-se por apresentar atividades bactericida e enzimática e como um mediador pró-inflamatório (GRATTENDICK et al, 2002).

Os grânulos específicos (ou secundários) não possuem MPO e caracterizam-se pela presença da glicoproteína lactoferrina. Estes grânulos são formados após grânulos azurofílicos e também contêm uma grande variedade de compostos antimicrobianos, incluindo lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL), a catelicidina hCAP-18 e lisozimas (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). A terceira classe, os grânulos de gelatinase (terciários), são também MPO negativo e contêm alguns antimicrobianos, mas eles servem como um local de armazenamento para um número de metaloproteases, como gelatinases e leucolisina. Estes grânulos são também a última população de grânulos formados durante a maturação dos neutrófilos (BORREGAARD, 2010).

Por fim, um quarto conjunto de estruturas, as vesículas secretoras, também comumente consideradas parte da família de grânulos neutrófilos. Em contraste com os grânulos clássicos, essas não derivam do complexo de Golgi, mas em vez disso, são formados por endocitose na fase final da maturação dos neutrófilos (BORREGAARD et al, 2007). Os neutrófilos carregam as vesículas secretoras para a superfície da célula, nos quais as proteínas contidas nas vesículas são incorporadas à superfície da membrana. Assim, após sua ativação, as vesículas secretoras primeiro transportam moléculas que são necessárias para a aderência (por exemplo, integrinas β 2) à superfície das células. Em seguida, grânulos de gelatinase entregam proteases que podem digerir a membrana basal e/ou da matriz extracelular, permitindo a transmigração (HÄGER et al, 2010).

Figura 4. Processo de maturação do neutrófilo e formação dos grânulos (FONTE: AMULIC et al, 2012 Adaptado)



As diferentes classes de grânulos demonstram diferenças de mobilização em resposta aos sinais inflamatórios: os grânulos azurofílicos são mais difíceis de mobilizar, seguido pelos grânulos específicos, grânulos de gelatinase e finalmente, as vesículas secretórias (**Figura 4**). Os mecanismos relacionados a essa mobilização diferencial não são totalmente entendidos, mas já se sabe que os níveis de cálcio intracelular parecem desempenhar um papel importante (BORREGAARD et al, 1992, SENGELOV et al, 1993).

Há alguns anos foi descoberta uma nova estratégia dos neutrófilos no combate aos microrganismos, as NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), que são constituídas de cromatina descondensada liberada por neutrófilos ativados em resposta à infecção e inflamação. Fatores conhecidos por induzir essas redes são citocinas como IL-8, TNF- α ou vários patógenos (VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE & NIZET, 2009). Histonas, peptídeos antimicrobianos e proteínas dos grânulos formam junto com a cromatina descondensada estruturas semelhantes a uma armadilha para aprisionar os microrganismos (BRINKMANN et al, 2004). A marca da formação de redes é a liberação extracelular de DNA associado com compostos antimicrobianos. Esses componentes antimicrobianos são mieloperoxidase (MPO), elastase de neutrófilos (NE), catelicidinas como a LL-37, histonas, proteinase 3, catepsina, lactoferrina ou gelatinase (PAPAYANNOPOULOS & ZYCHLINSKY, 2009; URBAN et al, 2009).

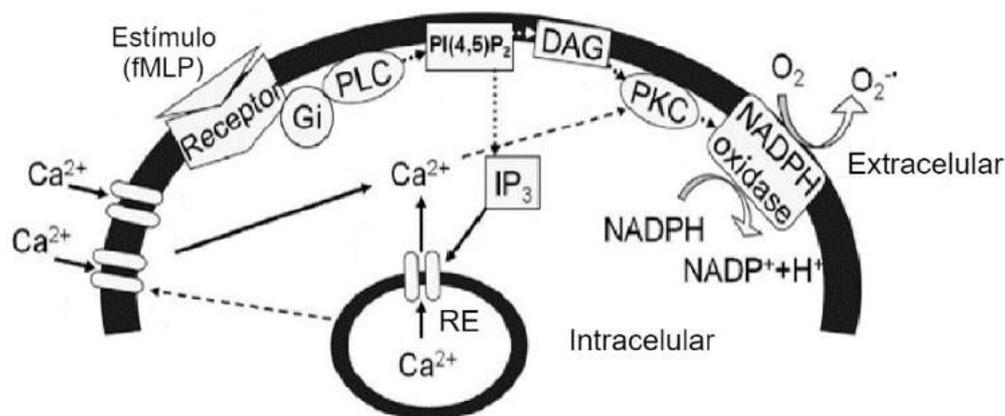
Além dos seus efeitos principais, estudos mostram que a formação de NETs pode ter consequências prejudiciais para o organismo quando as redes são eliminadas ineficientemente e acumulam-se, por exemplo, em várias doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, vasculite sistêmica, nefrite autoimune ou artrite reumatoide (KNIGHT et al, 2012, PIETERSE & VAN DER VLAG, 2014).

O papel desempenhado pelos neutrófilos na imunidade passou muitos anos visto como restrito a fase aguda da inflamação e na resistência contra patógenos extracelulares (BORREGAARD, 2010). Essa visão é derivada da teoria fagocitária de Metchnikoff quem propôs há mais de 100 anos que leucócitos polimorfonucleares patrulham a corrente sanguínea e migram para o local da infecção para fagocitar os patógenos. No entanto, recentemente vários estudos têm desafiado esse dogma e colocado o neutrófilo como uma célula chave na orquestração da imunidade adaptativa e na resolução da resposta inflamatória (MANTOVANI et al, 2011, AMULIC et al, 2012).

Esse papel na imunidade adaptativa já foi mencionado com as funções não enzimáticas da MPO ao regular a função de células imunes, mas os neutrófilos também possuem outros mecanismos de regulação desse processo. Essas células têm capacidade de secretar uma grande variedade de citocinas e quimiocinas, que podem regular a função de quase todas as outras células do sistema imunológico e promover a *upregulation* da expressão de receptores da membrana plasmática, tais como MHC de classe II, o que permite a apresentação de antígenos aos linfócitos T. Também é capaz de regular interações de células através da ativação de células *natural killer*, por exemplo, e a liberação de proteases que podem ativar ou desativar citocinas e quimiocinas (WRIGHT et al, 2014).

Todas as funções desempenhadas pelos neutrófilos durante a resposta inflamatória iniciam-se com sua ativação, que pode ser regulada por fatores endógenos (IL-8, LTB₄, C5a e PAF) ou exógenos (PMA e fMLP) ao organismo (SADIK et al., 2011). A ligação desses fatores a receptores de membrana acoplados a uma proteína G ou a ativação direta de enzimas intracelulares desencadeiam diversos mecanismos de sinalização intracelular, marcados pelo aumento intracelular dos níveis de cálcio. Desta forma, o influxo de cálcio é visto como um segundo mensageiro envolvido no controle de funções celulares imediatas (por exemplo, produção de EROs, mudanças intracelulares de pH e degranulação) e de longa duração (expressão de citocinas e formação de NETs), ou seja, um mecanismo comum de ativação de vários tipos celulares do sistema imune, incluindo os neutrófilos estimulados por diferentes mediadores inflamatórios (SALMON & AHLUWALIA, 2010; BURGOS et al, 2011).

Figura 5. Modelo esquemático da via de transdução de sinal em neutrófilos. (FONTE: KAZUMURA et al, 2013 Adaptado)



A entrada de cálcio nos neutrófilos inicia-se com a ligação de um fator quimiotático (fMLP, IL-8 ou LTB₄) ao seu receptor de membrana específico acoplado a proteína G, ativando a fosfolipase C (PLC) a hidrolisar o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a fosfatidilinositol trifosfato e diacilglicerol (DAG). A ligação do IP₃ ao seu receptor, um canal de Ca²⁺ localizado no retículo endoplasmático provoca uma rápida e transitória liberação das reservas de cálcio no citoplasma e consequente aumento da concentração de cálcio intracelular. A depleção dos estoques intracelulares leva ao influxo de Ca²⁺ através de canais operados por estoque (SOC) ou pela entrada regulada por receptores. Tanto o Ca²⁺ quanto o DAG ligam-se a domínios específicos da proteína quinase C (PKC) que leva ao recrutamento da PKC para a membrana plasmática. A PKC ativada fosforila componentes citosólicos da NADPH oxidase promovendo a translocação para a membrana e assim formar o complexo enzimático NADPH oxidase responsável por gerar o ânion superóxido (O₂⁻) (**Figura 5**) (KAZUMURA et al, 2013; BURGOS et al, 2011).

1.2.2 Mediadores inflamatórios

A resposta inflamatória é coordenada por uma grande variedade de mediadores que formam redes complexas de regulação. Esses por sua vez, podem alterar a funcionalidade de muitos tecidos e órgãos. Muitos destes mediadores inflamatórios têm efeitos em comum sobre o sistema vascular e o recrutamento de leucócitos e podem ser derivados de proteínas plasmáticas ou secretados por células (KUMAR et al, 2015).

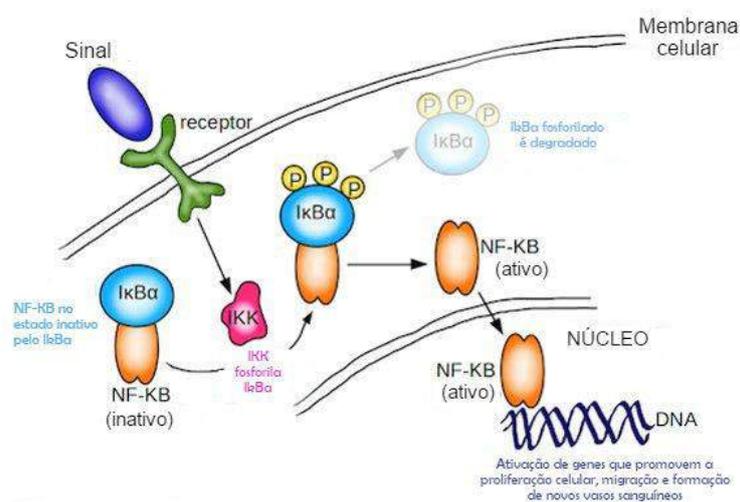
Diversos mediadores estão envolvidos no processo inflamatório, entre eles estão: aminas e peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, quimiocinas, enzimas proteolíticas, mediadores lipídicos e citocinas.

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) são produzidas de forma “tudo ou nada” quando mastócitos e plaquetas degranulam. Elas têm efeitos complexos na vasculatura, causando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo do contexto. Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados em sua forma ativa em vesículas secretoras (por exemplo, substância P) ou gerados por um processo proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular (por exemplo, as cininas, fibrinopeptídeo A, fibrinopeptídeo B e produtos de degradação da fibrina.). Os fragmentos do complemento C3a, C4a e C5a (também conhecidos como anafilatoxinas) são produzidos por várias vias de ativação do complemento. O C5a (e em menor medida, C3a e C4a) promove o recrutamento de granulócitos e monócitos e induz a degranulação de mastócitos, afetando assim a vasculatura. As quimiocinas são produzidas por vários tipos de células em resposta aos indutores de inflamação. Elas controlam o extravasamento de leucócitos e a quimiotaxia para os tecidos afetados. Várias enzimas proteolíticas (incluindo elastina, catepsinas e metaloproteinases) têm diversos papéis na inflamação, em parte através da degradação da matriz extracelular e proteínas de membrana basal. Essas proteases têm papéis importantes em muitos processos, incluindo a defesa do hospedeiro, remodelação de tecido e migração de leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

O fator nuclear kappa B (NF- κ B) merece destaque na cascata inflamatória já que regula e codifica genes pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e proteínas de fase aguda (FRODE SALEH & CALIXTO, 2000). Em células não estimuladas, o NF- κ B permanece inativo no citoplasma, como um complexo I κ B-NF- κ B. Somente após estímulo inflamatório (LPS, citocinas, fMLP), o I κ B citosólico é fosforilado resultando na dissociação do complexo I κ B-NF- κ B e a translocação do NF- κ B para o núcleo permitindo à interação com regiões promotoras de diversos genes (**Figura 6**) (CHANG et al, 2012). A codificação desses genes promove a produção de diversos mediadores inflamatórios como citocinas (IL-1 β e TNF- α), além de enzimas pró-inflamatórias como cicloxigenase induzida (COX-2) e NO sintase (iNOS) (NIEDERBERGER & GEISLINGER, 2008).

As citocinas são polipeptídeos produzidos e liberados pelas células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios, tais como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas. Em geral, são liberados em uma sequência controlada de vários tipos de células e são responsáveis pela produção dos mediadores finais envolvidos na indução dos sinais inflamatórios e sintomas. Atuam em receptores específicos do tipo tirosina-quinase presentes nas próprias células que as produziram (efeito autócrino) ou em receptores de outras células que não as produziram (efeito parácrino) e ainda podem atingir a circulação sanguínea e agir em tecidos distantes (efeito hormonal) (VERRI et al, 2006).

Figura 6. Via de ativação do NF- κ B na resposta inflamatória. (FONTE: SAMARASINGHE, 2014 Adaptado).



Dentre as citocinas destaca-se o fator de necrose tumoral α (TNF- α), identificado pela primeira vez como endotoxina causa necrose de tumores *in vivo* (CARSWELL et al., 1975; TRACEY et al., 1988). É uma potente citocina pró-inflamatória, que rapidamente é produzida em grandes quantidades por macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios, tais como infecção bacteriana, sendo, em alguns casos, um dos principais responsáveis por quadros de sepse (DE SOUZA et al, 2005).

Outra citocina atuante no processo inflamatório é a IL-1 β , presente em macrófagos, monócitos e células endoteliais, quando ativados durante uma infecção. A IL-1 β , em baixas concentrações promove inflamação local por atuar em células endoteliais, aumentando as moléculas de adesão que ativam leucócitos recrutando-os ao sítio inflamatório. Já em altas concentrações, a IL-1 β promove ativação do NF- κ B e induz ao quadro de febre por promover aumento na síntese de COX-2, com consequente

aumento dos níveis de PGE₂ no centro termorregulador do hipotálamo (DINARELLO, 2005). A IL-1 β também é responsável pelo aumento da produção de IL-6 que atua na medula óssea aumentando a mobilização e maturação de neutrófilos induzindo ao quadro de neutrofilia (SADIK et al, 2011).

Quanto às isoformas da enzima cicloxigenase, duas são mais citadas na literatura. A COX-1 é uma enzima constitutiva que se expressa praticamente em todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins), atuando em diversos processos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Já a enzima COX-2 é expressa por células que estão envolvidas em processos inflamatórios, em resposta às injúrias físicas, químicas e estímulos biológicos, incluindo a exposição à luz ultravioleta. Além disso, tem sido descrita como a isoforma responsável pela síntese de prostanoídes envolvidos em processos patológicos como estados inflamatórios agudos e crônicos e também na dor (HINZ & BRUNE, 2002; FLOWER, 2003).

Os mediadores lipídicos (eicosanóides e fatores de ativação de plaquetas) são derivados de fosfolipídios, tais como fosfatidilcolina, que estão presentes nas membranas celulares. Após a ativação por íons Ca²⁺ intracelulares, a fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica gera ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico, os precursores das duas classes de mediadores lipídios citados acima. O ácido araquidônico (AA) é metabolizado para a forma de eicosanóides pelas cicloxigenases (COX-1 e COX-2), que geram prostaglandinas e tromboxanos, ou por lipoxigenases, que geram leucotrienos e lipoxinas (BARTON, 2008). O AA é convertido em PGH₂ na presença de COX-1 e COX-2 e então através de diferentes prostaglandinas sintases geram diferentes classes de PGs (PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , PGI₂) (BROCK et al, 2003). A PGE₂ é um dos principais mediadores lipídicos e contribui para a hipersensibilidade da dor, modulando múltiplas vias nociceptivas, incluindo a sensibilização periférica e central (CHEN et al, 2013).

1.3 Dor inflamatória

Dor é definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) como uma “*experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial*” (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Já a nociceção consiste na real injúria tecidual ou em um evento potencialmente danoso traduzido e codificado por nociceptores (LOESER & TREED, 2008; SCHNAKERS et al., 2012). A experiência

dolorosa é muito variável entre os indivíduos, não havendo uma correlação direta entre a ativação de nociceptores e a expressão sensorial, isto é, o estímulo nocivo pode provocar um dano sem necessariamente causar dor (OSSIPOV et al, 2010).

Os nociceptores podem ser ativados por estímulos químicos, térmicos e mecânicos, porém essa estimulação pode ser reforçada ou sensibilizada por mediadores inflamatórios, tais como bradicinina, serotonina e prostaglandinas, os quais são produzidos em uma injúria tecidual (BONNINGTON & MCNAUGHTON, 2003; HUANG et al, 2006).

A detecção de estímulos nocivos requer ativação de nociceptores, os quais são amplamente distribuídos por todo o corpo e transmitem tanto a informação nociceptiva quanto a informação não nociceptiva para a medula espinal, dependendo do estímulo deflagrador. Os neurônios aferentes primários que respondem a estímulos de caráter nocivo são denominados nociceptores e são classificados em duas categorias gerais. São eles os nociceptores cutâneos A δ e A β , que possuem fibras pouco e altamente mielinizadas, respectivamente, e são responsáveis pela sensação de dor rápida e aguda, enquanto que os nociceptores C possuem fibras não-mielinizadas e produzem uma sensação de dor tardia (WILLIS, 2007). Estudos recentes demonstram o papel fundamental dos canais de sódio dependentes de voltagem do tipo Nav1.8 no controle da excitabilidade de fibras A β , assim como sua potencial contribuição no desenvolvimento da alodinia mecânica após inflamação crônica persistente causada por CFA (BELKOUCH et al., 2014).

Os corpos celulares dos nociceptores que inervam o tronco, os membros e as vísceras estão localizados no gânglio da raiz dorsal, enquanto aqueles que inervam a cabeça, a cavidade oral e o pescoço estão localizados no gânglio trigeminal e conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinal e até o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente (SCHUG et al., 2016). A parte superficial do corno dorsal da medula espinal (lâminas I e II) é a principal zona de terminação dessas fibras, as quais podem ser divididas em duas grandes classes neuroquímicas de acordo com seu conteúdo de peptídeos e a localização de seus terminais sinápticos no corno dorsal da medula espinal. São elas as fibras C peptidérgicas e as fibras C não-peptidérgicas, sendo que ambas respondem a estímulos nocivos semelhantes (HUNT & MANTYH, 2001). A sinapse entre nociceptores e neurônios de segunda ordem no corno dorsal ocorre predominantemente dentro da lâmina II da medula espinal. Os neurônios de

segunda ordem então cruzam a medula espinal para ascender no trato espinotalâmico com fibras terminais predominantemente localizadas no tálamo. Uma vez que o sinal alcança o tálamo, neurônios de terceira ordem conduzem esses sinais por meio de axônios da cápsula interna para o córtex somatossensorial, onde aspectos discriminativo-sensoriais da dor são identificados. Além da localização somatossensorial, as fibras do núcleo interlaminar e medial do tálamo irradiam para o giro cingulado anterior e tornam-se envolvidas nos componentes emocionais e afetivos da dor (BASBAUM et al, 2009).

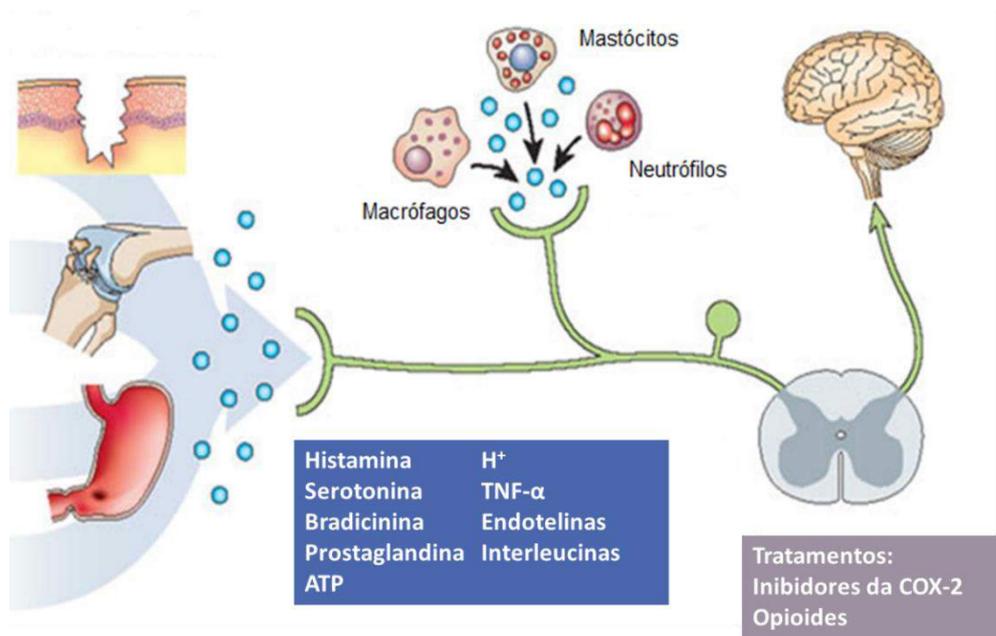
Frequentemente, a dor está acompanhada de inflamação, quando ocorre dano tecidual. A reação inflamatória constitui uma tentativa do organismo em restabelecer a homeostasia (CHAPMAN & GRAVRIN, 1999), todavia uma resposta exacerbada pode descompensar fisiologicamente o indivíduo, provocando disfunção em órgãos e, até mesmo, a morte (LIEW, 2003).

Durante a lesão de tecidos e inflamação, agentes como 5HT, histamina, adenosina, bradicinina, PGE₂, NO, IL-1, TNF- α , IL-6, fator inibitório de leucemia (LIF) e fator de crescimento nervoso (NGF) contribuem para a sensibilização do nociceptor para que estímulos inócuos sejam detectados como uma sensação dolorosa (alodinia) ou com uma resposta exagerada a estímulos nocivos (hiperalgesia) (**Figura 7**) (SESSLE, 2011, WOOLF & MA, 2007, SMITH et al, 2013). Esses mediadores levam à ativação de quinases como PKA, PKC, ERK e p38 MAPK que também contribuem para o aumento da sensibilidade e excitabilidade dos nociceptores (sensibilização periférica) através de diferentes mecanismos. A regulação pós-traducional pode ocorrer dentro de minutos por fosforilação de canais iônicos críticos e receptores, enquanto a regulação transcricional leva várias horas para se manifestar. Além disso, a regulação através da tradução independente de transcrição ou transporte axonal também pode alterar a sensibilidade dos nociceptores (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Evidências a partir de modelos inflamatórios experimentais mostram que a indução de COX-2 é responsável em grande parte pela elevada taxa de produção prostanoídes no local da inflamação. Estudos mostraram que a COX-2 é altamente regulada positivamente no tecido da pata no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, enquanto que a expressão de COX-1 fica inalterada. Esses dados coincidem com a síntese de prostanoídes e o desenvolvimento de dor (MALEKINEJAD et al, 2013). Do mesmo modo, a expressão de COX-2 foi

significativamente aumentada em articulações inflamadas no modelo de artrite induzida por colágeno, o que foi associada com a hipernocicepção mecânica (MYERS et al, 2000).

Figura 7. Mecanismo específico da dor inflamatória (Fonte: SCHOLZ & WOOLF, 2002 Adaptado).



A deleção de COX-2 e a administração local de inibidores de COX-2 reduziu a gravidade da hipersensibilidade à dor (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). De maneira notável, a COX-2 foi regulada positivamente não apenas nas células lesadas nesses modelos inflamatórios, mas também nas células do sistema imunológico que se infiltram, incluindo macrófagos, neutrófilos e mastócitos (CHEN et al, 2013).

1.4 Farmacoterapia

Desde a antiguidade o homem procura encontrar meios para aliviar a dor, a febre entre outros distúrbios similares relacionados à inflamação. No ano 30 a.C, Celsus descreveu os 4 sinais clássicos da inflamação (dor, rubor, calor e tumor) e utilizava extrato de *Salix alba* (Salgueiro) para aliviar esses sintomas. Séculos mais tarde, Leroux (1829) purificou uma substância chamada de salicina que foi identificada como sendo o princípio ativo responsável pelos efeitos do salgueiro (VONKEMAN & VAN DE LAAR, 2010).

Os glicocorticoides (GC) são os anti-inflamatórios mais eficazes disponíveis para o tratamento de muitas doenças inflamatórias e imunológicas crônicas, incluindo asma, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e doenças autoimunes. Essa classe de

fármacos age ativando genes anti-inflamatórios e suprimindo genes pró-inflamatórios, assim como possui efeitos pós-traducionais (BARNES & ADCOCK, 2009; DE BOSSCHER et al., 2010).

O glicocorticoide entra na célula e liga-se ao receptor de esteroides citoplasmático, esse complexo é translocado para o núcleo, onde reconhece sequências de DNA específicas. O complexo glicocorticoide-receptor liga-se a regiões promotoras de certos genes induzindo a síntese de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina-1 e I κ B e de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico. Os GC também atuam por meio do mecanismo genômico chamado de transrepressão em que monômeros de moléculas de GC e receptores de GC interagem com fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o NF- κ B, por interação proteína-proteína e promovem efeito inibitório de suas funções. Por essa via, há redução da expressão de genes que codificam a COX-2, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), interleucinas IL-6 e IL-2 e TNF- α (DINARELLO, 2010; RHEN & CIDLOWSKI, 2005).

Apesar de todos os efeitos benéficos contra a inflamação existem várias complicações associadas à terapia prolongada com glicocorticoides. São descritos inúmeros efeitos adversos sistêmicos, entre eles os principais são osteoporose, fraturas ósseas, fraqueza do músculo esquelético, atrofia muscular principal, miopatia, alterações no equilíbrio hidroeletrolítico, no metabolismo de carboidratos, suscetibilidade aumentada a infecção, alterações oculares, dentre outras. Além disso, alguns pacientes tratados cronicamente podem desenvolver redução da sensibilidade ou até mesmo resistência a glicocorticoides, aumentando a vulnerabilidade a respostas inflamatórias exacerbadas (QUAX et al, 2013; RODRIGUEZ et al, 2016; VAN DER GOES et al, 2016).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) estão entre os fármacos mais utilizados no mundo inteiro para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas, em particular a dor associada a inflamação (BADRI et al, 2016). Os AINEs agem inibindo as enzimas cicloxigenases 1 e 2, que estão envolvidas na síntese de prostaglandinas, resultando em seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos. Existem dois grandes grupos de AINEs — os mais tradicionais, não-seletivos, que inibem tanto a COX-1 e COX-2 e os mais recentes, os inibidores seletivos de COX-2, que inibem predominantemente a COX-2. A aspirina, um AINE não seletivo, é usada principalmente

por seu efeito antiplaquetário, reduzindo assim o risco de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (DAY & GRAHAM, 2013).

No entanto, a utilização deve ser limitada pelos efeitos secundários graves, entre os mais comuns é a toxicidade gastroduodenal. As queixas variam muito em severidade, e incluem náuseas, dispepsia e ulceração. Esses efeitos parecem estar relacionados ao papel de cada ciclooxigenase. Se inibida a ação da COX-1, responsável por formar algumas prostaglandinas homeostáticas (PGE2 e PGI2), consideradas protetoras da mucosa gástrica e também presentes nos rins, pode se levar a uma toxicidade gastrointestinal e renal (AURIEL et al, 2014). Para evitar esses efeitos adversos e manter a integridade da parede do estômago e revestimento mucoso, uma estratégia é o uso de AINEs COX-2 seletivos e a administração concomitante de análogos da prostaglandina, ou alternativamente inibidores da secreção de ácido gástrico, como antagonistas dos receptores H2 de histamina ou inibidores da bomba de prótons (IBP) (SOSTRES et al, 2010).

Com o aparecimento dos inibidores seletivos de COX-2, houve uma redução significativamente dos efeitos secundários gastrintestinais em comparação com os inibidores de COX-1. No entanto, o uso crônico de alguns inibidores seletivos de COX-2 tem sido associado a um aumento de eventos cardiovasculares, bem como cerebrovasculares, particularmente em pacientes com risco elevado de trombose. Este risco aumentado pode ser devido à redução na síntese de prostaciclina (PGI2) mediada pela COX-2, que é um inibidor natural de ativação plaquetária e um dos níveis séricos de tromboxano A₂ produzidos pela COX-1 não inibida (DINARELLO, 2010, VONKEMAN et al, 2006).

Nos últimos anos, novos produtos biológicos têm sido utilizados visando diferentes moléculas chaves dos mecanismos imunes, proporcionando assim grandes avanços no tratamento de algumas doenças autoimunes e inflamatórias como a artrite reumatoide e doença de Crohn. Entre os alvos utilizados estão: a inibição de várias enzimas (quinases, metaloproteinases), citocinas/quimiocinas, fatores de transcrição e a modulação de vários receptores acoplados a proteína G (canabinoides, purinoceptores, neuroeptídeos). No entanto, eles têm custos de produção elevados e geralmente são disponíveis somente por via parenteral e seus efeitos colaterais a longo prazo, muitas vezes, limitam sua administração (BOTZ et al, 2016).

Nos últimos anos a pesquisa de novos compostos com potencial farmacológico ganhou mais uma ferramenta de predição de alvos moleculares, o *docking* molecular. Essa ferramenta computacional busca por um ligante capaz de ligar tanto geometricamente quanto energeticamente em um sítio de ligação de uma proteína (TEODORO et al, 2001). Assim, a abordagem com múltiplas frentes de pesquisa (*in vitro*, *in vivo* e *in silico*) consiste em uma ótima estratégia para aumentar a produtividade e a possibilidade de descoberta de novos fármacos.

Diante do exposto, certamente é necessário a pesquisa de novos compostos que se mostrem seguros e eficazes e possuam vantagens em relação aos tratamentos terapêuticos prescritos na farmacoterapia atual da inflamação. Nesse contexto, surgem os produtos de origem vegetal como uma fonte em potencial de novos anti-inflamatórios.

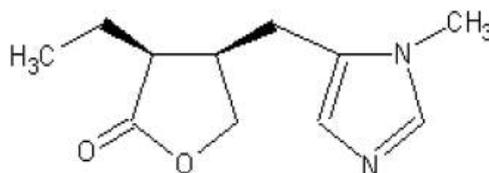
1.5 Alcaloides de *Pilocarpus microphyllus*: epiisopiloturina e epiisopilosina

Jaborandi é a designação de um grupo de espécies pertencentes à família Rutaceae, do gênero *Pilocarpus* sendo que as principais espécies são *microphyllus*, *jaborandi* e *pennatifolius* (OLIVEIRA et al., 1991; PINHEIRO, 2002). A espécie *Pilocarpus microphyllus* é uma espécie nativa da flora brasileira muito explorada nas últimas décadas devido ao grande interesse mundial em utilizá-la como matéria prima para isolamento de pilocarpina pela indústria farmoquímica (SANTOS e MORENO, 2004).

A extração do jaborandi é responsável por uma grande massa de recursos nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Em 2014, movimentou cerca de 252 toneladas no Norte e Nordeste brasileiro perfazendo aproximadamente R\$ 1 milhão de um total de R\$ 20,8 bilhões referentes ao extrativismo vegetal realizado no Brasil naquele ano (IBGE, 2014). A companhia farmacêutica alemã, Merck, tem detido um monopólio de décadas na compra de folhas de jaborandi e produção de pilocarpina no Brasil, mais particularmente no Maranhão. As ações de exploração insustentável levaram à necessidade de um processo de domesticação das plantas silvestres que começou com os passos básicos de prospecção, coleta e avaliação de material silvestre de jaborandi. Em 2002, o Grupo Centroflora (Vegeflora Extrações do Nordeste Ltda) começou a cultivar a espécie *P. microphyllus* e tornou-se a responsável pela extração da pilocarpina a partir das folhas de jaborandi, no entanto a Merck ainda é responsável pelo processo de purificação e comercialização do alcaloide (PINHEIRO 2002; SAWAYA et al. 2010).

A pilocarpina, encontrada somente nas folhas de jaborandi, é um alcaloide colinérgico com estrutura de uma amina terciária, que apresenta ações nicotínicas e muscarínicas (**Figura 8**). Utilizada para o tratamento do glaucoma e xerostomia e possui efeitos discretos sobre o coração e o trato gastrointestinal (VITAL e ACOO, 2006).

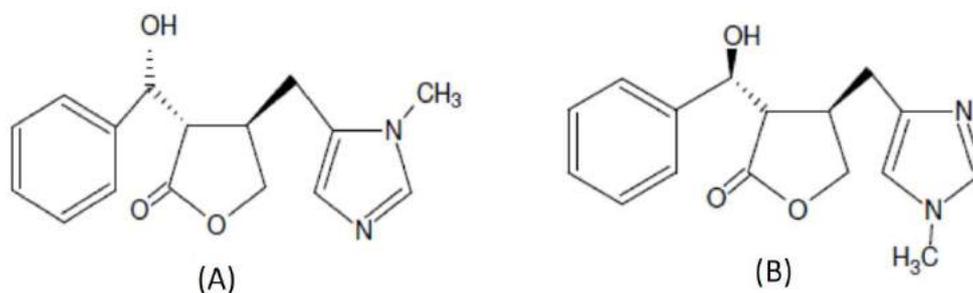
Figura 8. Estrutura química da pilocarpina



Além da pilocarpina, outros alcaloides já foram isolados a partir do jaborandi, como isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7(11)-dehidro-pilocarpina, N,N-dimetil-5-metoxi-triptamina, N,N-dimetil- triptamina, plastidesmina, (1H)-4-metoxi-2-quinolone e dictamina e macaubina (VOIGTLÄNDER et al., 1978; LUCIO et al., 2002; SANTOS e MORENO, 2004; BENTO et al., 2010; VERAS et al., 2012).

Os alcaloides epiisopilosina (EPIL) e epiisopiloturina (EPIT) têm fórmula molecular C₁₆H₁₈O₃N₂ e peso molecular 286,33 g/mol (**Figura 9**). Apresentam o mesmo arranjo espacial e diferem somente na ligação do grupo metila no anel imidazólico, uma vez que em EPIL a metila está ligada ao nitrogênio N-1 e em EPIT a ligação se dá no nitrogênio N-3 (RODRIGUES, 2005). Suas estruturas químicas assemelham-se a pilocarpina pela presença de um anel imidazólico ligado a um ciclopentano heterocíclico (lactona) através de uma ligação C-C, mas diferem dela pela presença de um grupamento hidrobenzílico ao invés de um etílico ligado ao carbono C no anel lactona (VERAS et al., 2012).

Figura 9. Estrutura química da Epiisopilosina (A) e Epiisopiloturina (B).



Em relação ao possível efeito colinérgico dos alcaloides EPIT e EPIL relacionado a suas semelhanças estruturais com a pilocarpina, estudo anterior mostrou que a EPIL pode causar redução do estado consciente e disposição e da atividade motora e tônus muscular, provocar convulsões e ereção da cauda e estimular a salivação em doses acima de 120 mg/kg, diferente da pilocarpina que apresentou alguns desses efeitos na dose de 4 mg/kg (LUCIO, 2002; MIURA, 2009). Isso mostra que a EPIL atua ativando receptores colinérgicos com intensidade bem inferior a pilocarpina. Essa redução do efeito sobre os sistemas nervosos central e autônomo parassimpático da EPIL e, provavelmente, da EPIT em relação a pilocarpina, apesar da semelhança estrutural das moléculas (anel imidazólico ligado a uma lactona), pode ser explicado pelo impedimento estérico causado pelo grupamento hidrobenzílico ligado a lactona na EPIL e na EPIT, ao invés do grupamento etila, que afeta a ligação droga-receptor (BEN-BASSAT et al, 1971; BEN-BASSAT & LA VIE, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR, 1982).

Esses estudos também mostraram que o anel de 5 membros da lactona é essencial para o potencial biológico da pilocarpina e outros pontos de ataque também são necessários para a ligação da molécula ao sítio receptor semelhante a molécula de acetilcolina como: a) sítio catiônico quaternário; b) oxigênio do éter; c) oxigênio da carbonila, e d) o grupo etil na posição C-3 do anel lactona. A mínima modificação estrutural na molécula de pilocarpina causa uma redução drástica ou perda de sua atividade biológica (BEN-BASSAT et al, 1971; BEN-BASSAT & LA VIE, 1976; ABOUL-ENEIN & AL-BADR, 1982). De acordo com esses estudos de relação estrutura/atividade os alcaloides EPIT e EPIL podem não apresentar as mesmas ações parassimpaticomiméticas e parassimpatolíticas da pilocarpina.

Estudos anteriores mostraram a ausência de toxicidade em tratamento agudo com esses alcaloides em camundongos. A EPIT apresentou DL_{50} superior a 8.000 mg/kg e até a dose de 530 mg/kg (i.p) não houve alterações clínicas visíveis e histopatológicas no

baço, rins, pulmão e cérebro e a EPIL apresentou DL₅₀ via intraperitoneal de 540,9 mg/kg (LUCIO, 2002; GUIMARÃES et al, 2015).

Existem na literatura poucos estudos farmacológicos com esses alcaloides. A epiisopiloturina demonstrou efeito antiparasitário *in vitro* contra cepas de *Leishmania amazonenses* e atividade inibitória *in vitro* e *in vivo* contra *Schistosoma mansoni*. Estudos preliminares com a epiisopiloturina (0,3 e 1 mg/kg) também demonstraram seu potencial anti-inflamatório em modelo animal de edema de pata induzida por diferentes mediadores inflamatórios (carragenina, sulfato de dextrana, serotonina e bradicinina) e antinociceptivo em modelos de contorção induzida por ácido acético, teste da placa quente e teste da formalina (MIURA, 2009; VERAS et al., 2012; SILVA et al, 2013; GUIMARÃES et al, 2015). Diante disso, esses alcaloides derivados de *P. microphyllus* tornam-se promissores quanto a suas propriedades biologicamente ativas.

2 JUSTIFICATIVA

A inflamação tem um papel importante na fisiopatologia de inúmeras doenças inflamatórias de alto impacto social devido às suas elevadas morbimortalidades, como câncer, doença cardiovascular, diabetes, artrite reumatoide e asma (VINOLA et al., 2003; VILLACORTA et al., 2007; MOTA et al., 2010). Nesse contexto, o uso de anti-inflamatórios como terapia principal ou coadjuvante no tratamento de várias patologias, como a artrite reumatoide que afeta cerca de 70 milhões de pessoas, em torno de 1 % da população mundial, é extensivo, embora estes em algumas circunstâncias promovam efeitos colaterais importantes, e alguns mais seletivos estão na classe de medicamentos de alto custo (KIELY et al, 2009; SMOLEN et al, 2010; SCOTT et al, 2010; MOTA et al, 2013). Diante do exposto, investir na pesquisa de novos fármacos anti-inflamatórios é oportuno, e as plantas medicinais têm se mostrado como uma fonte promissora, com perspectivas reais de ampliação na farmacoterapia de doenças inflamatórias.

Nos últimos anos, as pesquisas relacionadas às propriedades químicas e farmacológicas de plantas medicinais tem sido direcionadas à procura de substâncias com atividade biológica, no sentido de prover uma base científica à utilização popular (GIORGETTI et al, 2007; KAROU et al., 2011), ou para a obtenção de novas estruturas químicas de interesse para a indústria farmacêutica, com propriedades farmacológicas específicas, podendo resultar em novos fármacos e/ou medicamentos fitoterápicos.

Diante do exposto percebe-se a importância de se investir em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos, com aproveitamento da biodiversidade química da flora nativa do Nordeste, como exemplo podemos relacionar os alcaloides imidazólicos – epiisopiloturina (EPIT) e epiisopilosina (EPIL) obtidos das folhas do jaborandi cultivado, espécie extensivamente explorada pela indústria farmoquímica da região. Estudos preliminares (SILVA et al, 2013) têm mostrado o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da EPIT, e não há registros de estudos comprobatórios desse potencial para a EPIL.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo dos alcaloides imidazólicos, epiisopiloturina (EPIT) e epiisopilosina (EPIL) obtidos de *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), com determinação do possível mecanismo celular e molecular.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito dos alcaloides (EPIT e EPIL) sobre a degranulação de neutrófilos humanos induzidos por PMA ou fMLP, através da mensuração da enzima mieloperoxidase;
- Investigar o efeito dos alcaloides sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos;
- Determinar o efeito dos alcaloides sobre o influxo de cálcio em neutrófilos humanos;
- Investigar o efeito da EPIT e EPIL sobre a expressão de NF- κ B em neutrófilos humanos;
- Avaliar a citotoxicidade dos alcaloides em neutrófilos humanos (LDH e MTT);
- Avaliar o efeito da EPIT e EPIL na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina, avaliando o papel da COX-2 neste efeito;
- Realizar estudo de *docking* molecular com as isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Ceará, sob o número de protocolo 62/2014, seguindo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana, sob o número CAAE 45344315.9.0000.5054, da Universidade Federal do Ceará (**Anexo**).

4.2 Material de estudo

Os alcaloides epiisopiloturina (EPIT) (99,7% de pureza) e epiisopilosina (EPIL) ($\geq 90\%$ de pureza) foram isolados segundo método descrito por VERAS et al (2012) a partir do sub-produto (resíduo) obtido durante o processo de isolamento da pilocarpina de *P. mycrophyllus*, um produto comercial e fornecidos pela empresa Phytobios (Grupo Centroflora) / Parnaíba, Piauí.

4.3 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss (25 a 30g), do sexo masculino, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos e mantidos no Biotério do Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos (CEFAC) em períodos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatação. Aos animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*.

4.4 Avaliação farmacológica

4.4.1 Isolamento de polimorfonucleares (PMNs) humanos

Polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos (80-90%), foram obtidos de sangue humano cedido pelo Centro de Hemoterapia e Hematologia do Ceará – HEMOCE (*buffy coat*) e isolados de acordo com o método descrito por Henson (1971) e modificado por Lucisano & Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, lavado seguidas vezes com soluções salina, utilizando solução de gelatina 2,5% (p/v) para formação de um gradiente de separação dos componentes sanguíneos. Depois de isolados, os neutrófilos foram mantidos no meio HBSS (*Hanks balanced salt solution*) em gelo.

a) Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante em neutrófilos humanos

- **Degranulação de neutrófilos**

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada durante 15 min a 37°C com EPIT ou EPIL (1, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$), DMSO 1% (controle - veículo), Indometacina (INDO – 36 $\mu\text{g/mL}$) ou HBSS (células não tratadas). A seguir, foi adicionado a citocalasina B (10 μM) e fMLP (1 μM) ou PMA (0,1 μM) e manteve-se por mais 15 min a 37°C . As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela degranulação leucocitária, foi utilizado na determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO) segundo metodologia descrita por Úbeda et al. (2002). Os resultados foram expressos como percentual de liberação de mieloperoxidase.

- **Ensaio de Quimioluminescência**

A quimioluminescência (QL) é amplamente utilizada como um método para quantificar a capacidade dos neutrófilos de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) (KUDOH et al., 1999). Com o auxílio de marcadores luminescentes (sondas) é possível quantificá-las e diferenciá-las. As sondas são utilizadas para aumentar a quantidade de luz emitida durante a produção de EROs. Estas sondas são substâncias orgânicas que servem de substrato para reações redox, que geram intermediários eletronicamente excitados que, retornando a um estágio basal emitem fótons, os quais podem ser quantificados como quimioluminescência. A sonda utilizada foi o luminol (QLlum) que detecta a somatória de diversos metabólitos extra e intracelulares produzidos pela ação da MPO.

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada com EPIT (0,01; 0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{g/mL}$) ou EPIL (1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) ou quercetina (50 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos e em seguida com a sonda quimioluminescente luminol (280 μM) a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras dispostas em placa de 24 poços foram transportadas para uma leitora de microplacas e a ela foi adicionado o estímulo (PMA 0,1 μM) e, imediatamente, acompanhou-se a produção de QL, em cpm (contagem de fótons por minuto), durante 20 minutos a 37°C . Em todos os ensaios realizados foi mensurada a produção espontânea de QLlum das células na ausência de estímulo. Os resultados foram

expressos através do percentual de emissão de quimioluminescência correspondente a produção de espécie reativas de oxigênio (EROs) (PAULA et al, 2009).

- **Mensuração dos níveis de cálcio intracelular**

Para a quantificação dos níveis de cálcio (Ca^{2+}) intracelular foi utilizado o kit *Fluo-4 Direct™ Calcium Assay* (Molecular Probes), de acordo com as instruções do fabricante. Neutrófilos foram plaqueados em placa de 96 poços de fundo plano preta na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço em HBSS livre de Ca^{2+} . Após 30 minutos de incubação a 37°C , os neutrófilos foram incubados com o reagente Fluo-4 Direct™ contendo 2,5 Mm de probenecida (inibidor da proteína de permuta aniônica). Em seguida, as células foram incubadas com EPIT ou EPIL (1, 10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos a 37°C . A seguir, as células foram estimuladas com citocalasina B (10 μM) por 10 minutos e fMLP (1 μM) para induzir a mobilização do cálcio intracelular. A concentração de Ca^{2+} intracelular foi monitorada por 60 minutos. A emissão de fluorescência foi medida em um leitor de microplacas com 494 nm de excitação e 516 nm de emissão. Os resultados foram expressos como razão da intensidade de fluorescência final pela inicial (F/F0).

- **Preparo do extrato citosólico**

A suspensão de neutrófilos (5×10^6 células/mL) foi pré-incubada com EPIT (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou EPIL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), concentrações com melhor efeito, DMSO 1% (controle - veículo) ou HBSS (células não tratadas) por 15 min a 37°C . Posteriormente foi adicionado citocalasina B (10 μM) por 5 minutos, logo após foi adicionado fMLP (1 μM) por 1h a 37°C . As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspenso com uma solução tampão A (10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl) acrescida de inibidor de protease e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Depois foram feitas 15 passagens por uma agulha 25G e foram centrifugadas novamente. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C (ABRAHAM et al, 2006).

- **Western Blotting (NF-kB p65)**

Após preparação do extrato citosólico, a concentração de proteínas contidas no extrato citosólico foi determinada pelo método de Bradford. Os lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra Laemmli (50 mM de Tris-HCL, pH 6,8, sódio

dodecil sulfato (SDS) a 1%; 2-mercaptoetanol a 5%; glicerol a 10% e azul de bromofenol a 0,001%) a 60° C durante 20 min. As amostras de proteínas (30 µg de proteínas) foram submetidas a corrida no gel de eletroforese SDS-poliacrilamida 7.5% (PAGE) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. As membranas foram bloqueadas com TBS-Tween (TBST - Solução salina tris tamponada com tween) contendo 5% de leite desnatado e receberam o anticorpo monoclonal primário específico para NF-κB subunidade p65 (1:1000) (Bio Rad *Laboratories*) overnight a 4° C. Na manhã seguinte (em torno de 12 horas após incubação), as membranas foram lavadas em TBS-T e, em seguida, incubadas à temperatura ambiente, por 2h, com anticorpo secundário anti-mouse (Bio Rad *Laboratories*). Para detectar as bandas imuno-reativas, os “blots” foram expostos à solução de quimioluminescência por 5 minutos, seguido de exposição em aparelho fotodocumentador para detecção de quimioluminescência. As densidades das bandas de cada amostra sobre as membranas foram capturadas para posterior quantificação da densitometria ótica, usando o Software Image Lab. Para confirmar a inserção das mesmas quantidades de proteína os valores foram corrigidos a partir da leitura das bandas referentes a β- actina.

b) Testes de citotoxicidade

Os ensaios *in vitro* podem ser empregados na avaliação preliminar da segurança de várias substâncias. Os parâmetros utilizados para a avaliação de citotoxicidade avaliam a atividade metabólica da célula (teste do MTT) e a medida da integridade da membrana celular (lactato desidrogenase - LDH).

- **Teste do MTT**

Neutrófilos humanos (5×10^6 células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença de EPIT ou EPIL (1, 10, 25, 50, 100 µg/mL), Controle (DMSO 1% - veículo), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% v/v – padrão citotóxico) em placa de 96 poços. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a 25°C e o sobrenadante descartado e incubada uma nova solução contendo 10% de MTT, na concentração de 10 mg/mL, e essas células foram incubadas novamente por mais 3 horas. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e adicionado DMSO puro para a lise das células e solubilização do sal de formazan (MOSMANN, 1983). Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi

medida em leitor de microplacas a 550 nm. A viabilidade celular foi expressa através do valor percentual em relação ao grupo controle.

- **Atividade da enzima Lactato desidrogenase (LDH)**

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença de EPIT ou EPIL (1, 10, 25, 50, 100 µg/mL), Controle (DMSO 1% - veículo), HBSS (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% v/v – padrão citotóxico). A seguir, os tubos de reação foram centrifugados a 755g, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, que fica localizada no citoplasma da célula e é liberada quando as células são lesadas ou necrosadas. Essa enzima é responsável pela conversão de piruvato a lactato na presença de NADH (BERGMEYER e BERNT, 1963).

O ensaio é realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da absorbância devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250 µL de substrato foram pré-incubadas com o sobrenadante, por 3 minutos, a 37°C. Foi realizada a leitura da absorbância em 340 nm nos tempos 1 e 3 minutos, a 37°C, em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A_1 - A_2) / 2] \times 1746,03$$

Onde:

A= atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A₁= absorbância inicial (1 minuto) em 340 nm;

A₂= absorbância final (3 minutos) em 340 nm;

1746,03= fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25 µL.

A citotoxicidade de EPIT e EPIL foi avaliada em três experimentos independentes, com medidas em triplicata.

c) Avaliação do potencial antinociceptivo dos alcaloides *in vivo*

- **Modelo de Avaliação da Hipernocicepção - Von Frey eletrônico**

O modelo de avaliação da hipernocicepção mecânica foi realizado pelo método de pressão crescente na pata dos animais através do Von Frey eletrônico, uma versão

modificação por Cunha e colaboradores (2005) da versão descrita por Frey em 1896. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada através da variação da pressão aplicada na pata (Δ limiar de estímulo em gramas). O delta é obtido a partir da subtração do valor medido antes dos tratamentos (medida basal – T0) e após administração dos estímulos algogênicos e dos alcaloides. As doses e a via de administração dos alcaloides utilizadas em nosso estudo (0,3 e 1 mg/kg) foram utilizadas de acordo com estudo anterior (SILVA et al, 2013).

- **Avaliação do efeito da EPIT e EPIL na hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg)**

A hipernocicepção mecânica foi avaliada nos tempos 1, 3 e 5 horas após a administração intraplantar (i.pl.) de Cg (300 μ g/50 μ L de salina). Camundongos foram pré-tratados com EPIT ou EPIL (0,3 e 1 mg/kg, i.p.); indometacina (20 mg/Kg i.p.), inibidor não-seletivo da COX ou veículo – DMSO 1% (i.p.) 30 minutos antes da administração da Cg na pata traseira direita de cada camundongo. O grupo controle negativo foi formado por animais tratados com salina por via i.pl. A intensidade de hipernocicepção mecânica é medida conforme descrito anteriormente e calculada pela subtração das medidas (pressão/g) coletadas ($\Delta 1 = T0 - T1$; $\Delta 2 = T0 - T3$ e $\Delta 3 = T0 - T5$).

- **Efeito da EPIT e EPIL sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por carragenina (Cg)**

Os animais foram tratados i.p. com EPIT ou EPIL na dose que apresentou efeito antinociceptivo (0,3 ou 1 mg/Kg) ou salina (100 μ L), 30 min antes da Cg i.pl. (300 μ g/50 μ L de salina). O grupo controle negativo foi formado por animais tratados com salina i.pl.. Três horas após a administração da Cg, os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical e o tecido subcutâneo plantar das patas foi coletado e armazenado à -70°C para posterior quantificação da atividade de MPO conforme metodologia descrita por Cunha e colaboradores (2008), descrita a seguir.

- **Quantificação da Atividade de MPO**

No momento da dosagem as amostras de tecido foram descongeladas e incubadas em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio) na proporção de 50 mg de tecido por 1mL de HTAB, homogeneizados e centrifugados (1500g/15 min a 4°C).

O sobrenadante obtido foi transferido para um eppendorf e submetido ao choque térmico no pellet de células em três etapas de congelamento e descongelamento (-20°C; 10 minutos cada). O sobrenadante foi novamente homogeneizado e centrifugado (1500xg; 15 min a 4°C) para melhor remoção de contaminantes. Em seguida, as amostras foram plaqueadas em placas de 96 poços e adicionada a solução de leitura (tampão fosfato, H₂O₂ 0,017% e tetrametilbenzidina - TMB 18,4 mM), após 3 minutos, a reação foi parada com H₂SO₄ 4M. A leitura da absorbância foi obtida a 450nm em leitora de microplacas e o resultado foi expresso em absorbância.

- **Imunohistoquímica para COX-2**

A imunohistoquímica foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU & RAINE, 1981). Os grupos foram pré-tratados com EPIT (1 mg/kg, i.p) ou EPIL (0,3 mg/kg, i.p) e indometacina (20 mg/kg, i.p) e veículo – DMSO 1% (i.p.). Após 30 minutos, foi administrado Cg (300µg/50µL de salina, i.pl.) na pata traseira direita do animal. Após três horas, os animais foram eutanaziados e uma amostra de 5 mm da pata traseira direita foi retirada e fixada em formol tamponado por 24h para confecção de lâminas apropriadas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 9), sob aquecimento em banho-maria a 85°C por 30 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados por 4h com anticorpo primário de coelho anti-COX-2 diluídos em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA), de acordo com o manual de cada fabricante.

Após a lavagem, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti-IgG de coelho, diluído 1:400 em PBS/BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz Biotechnology, Inc, Texas, USA) por 30 minutos.

Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3' diaminobenzidine-peróxido (DAB), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas para análise das mesmas.

d) Avaliação da interação molecular da EPIT e EPIL com as isoformas da enzima ciclooxigenase *in silico*

Os ensaios *in silico* foram realizados com auxílio da Profa. Dra. Maria Goretti de Vasconcelos Silva do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará.

- **Preparação da estrutura das proteínas e ligantes**

As estruturas cristalográficas das moléculas de ciclooxigenases foram obtidas a partir do *RCSB Protein Data Bank* (PDB), os códigos de acesso foram 1HT5 para COX-1 (SELINSKY et al, 2001) e 1CX2 para COX-2 (KURUMBAIL et al, 2001). Os inibidores, as moléculas de água cristalizada e outras moléculas coordenadas foram retiradas do arquivo PDB. Os resíduos e os ligantes foram protonados (pH = 7,0) usando o algoritmo de *Protonate 3D* dentro do programa *Molecular Operating Environment* (MOE) versão 2014.1 (MOE, 2014).

As estruturas moleculares 3D das moléculas EPIT e EPIL foram geradas utilizando o MOE. A energia das estruturas moleculares foi minimizada usando um campo de força MMFF94x e exportado no formato MOL2.

- **Protocolo de triagem virtual**

Uma estrutura baseada na triagem virtual do *docking* molecular foi realizada com o software GOLD 5.1.0 (COLE et al., 2005), usando opções padrão para triagem virtual e utilizando o ChemPLP foi selecionado como função *fitness*. O processo foi repetido 500 vezes e foram escolhidas cinco poses por estrutura do composto com melhores valores de interação para posterior análise. Para esse estudo, a triagem virtual para COX-1 foi realizada com três resíduos de aminoácidos *Glu140*, *Glu239* e *Tyr242* e para COX-2 com dois resíduos de aminoácidos *Ser353* e *Tyr355*. Esses resíduos foram selecionados devido a significativas interações formadas com os ligantes. A afinidade de ligação de cada complexo foi estabelecida através escores de ligação e energia PLP (potencial linear por partes - *piecewise linear potential*), uma aproximação da energia livre de Gibbs, ou seja, quanto mais negativo for o valor de PLP, mais favorável é a ligação. O ranking de conformações foi sujeito a inspeção visual com o MOE.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (USA). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

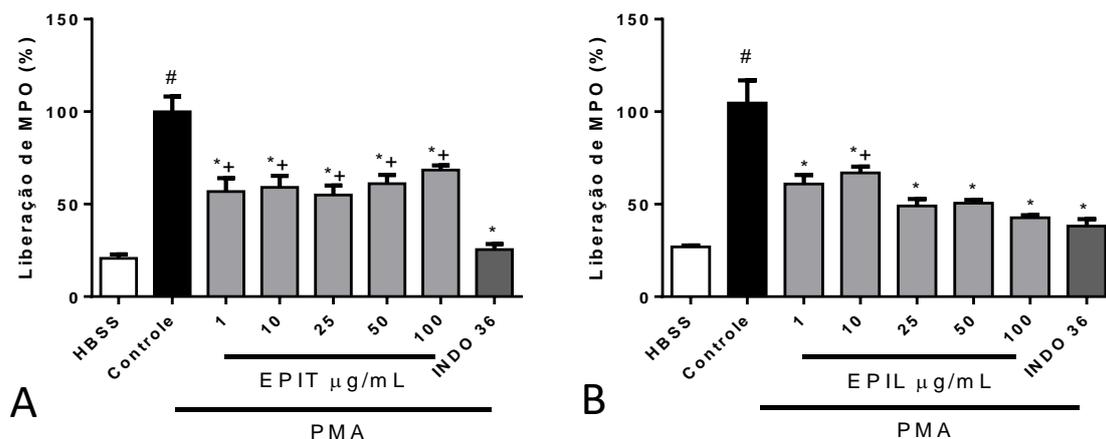
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória e antioxidante em neutrófilos humanos

- **Efeito da EPIL e da EPIT na degranulação em neutrófilos humanos induzida por PMA ou fMLP: liberação de enzima mieloperoxidase (MPO)**

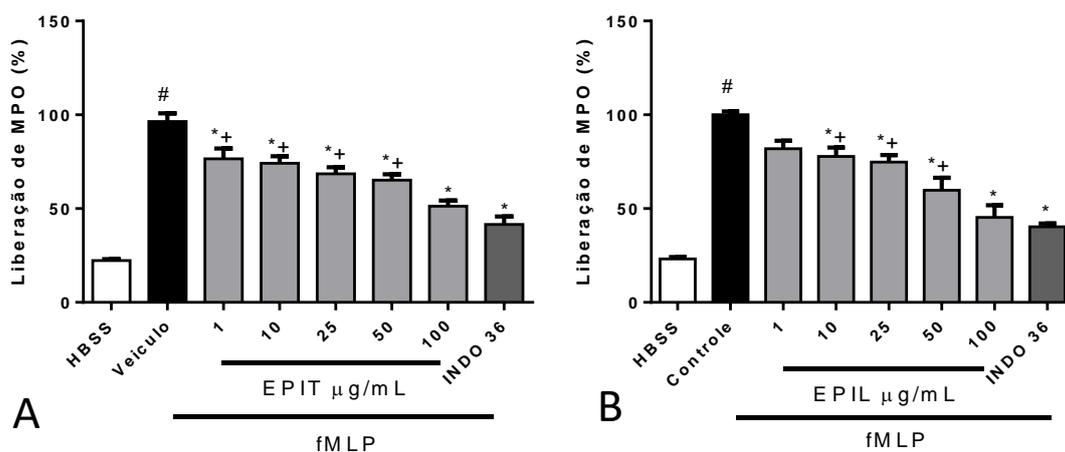
Os efeitos de EPIT e EPIL sobre a inibição da degranulação de neutrófilos humanos estão representados nas **Figuras 10 e 11** e **Tabela 1**. A adição de PMA (0,1 μ M) (grupo controle) à suspensão de neutrófilos aumentou em cinco vezes a secreção de MPO quando comparada às células não tratadas (grupo HBSS). Porém esse efeito foi reduzido tanto pela EPIT ($CI_{40} = 29,5 \mu\text{g/mL}$) quanto pela EPIL ($CI_{40} = 14,3 \mu\text{g/mL}$), que desde a menor concentração (1 $\mu\text{g/mL}$) inibiram significativamente a liberação de MPO (44 e 40%, respectivamente) em relação ao grupo controle (100% de liberação) (**Figura 10**). EPIL nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ mostrou efeito comparável a droga padrão, indometacina. Quando o fMLP foi utilizado como estímulo, também houve um aumento de cinco vezes a liberação de MPO pelos neutrófilos em relação ao grupo HBSS. EPIT ($CI_{40} = 62,3 \mu\text{g/mL}$) e EPIL ($CI_{40} = 45,2 \mu\text{g/mL}$) (1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziram significativamente a liberação de MPO em até 51 e 54,6%, respectivamente, e na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram efeito comparável a indometacina (**Figura 11**).

Figura 10. Efeito de EPIT (A) e EPIL (B) sobre a degranulação neutrofílica induzida por PMA determinada pela liberação da mieloperoxidase.



Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. # vs HBSS; * vs Controle + vs INDO ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 11. Efeito de EPIT (A) e EPIL (B) sobre a degranulação neutrofílica induzida por fMLP determinada pela liberação da mieloperoxidase.



Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. # vs HBSS; * vs Controle + vs INDO ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

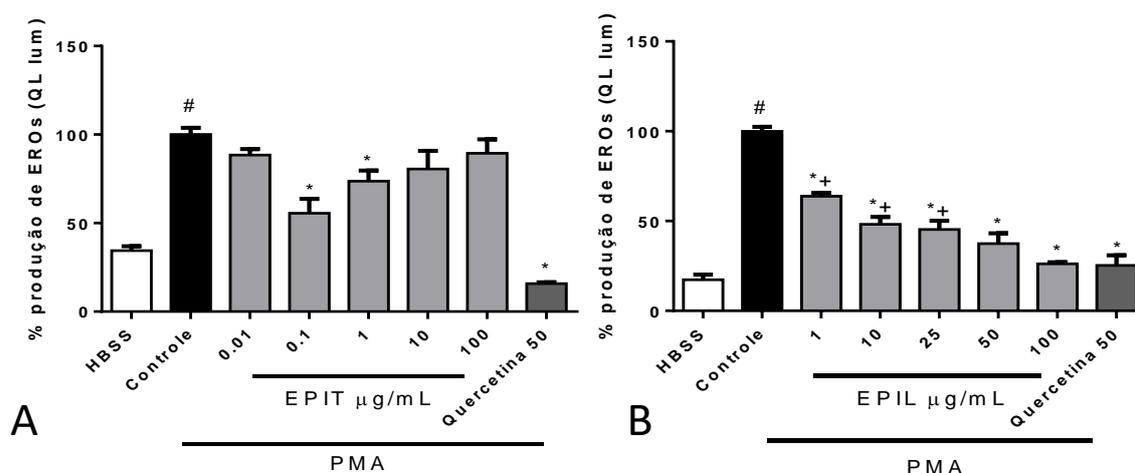
Tabela 1 - Concentração de EPIT e EPIL capaz de inibir em 40% a degranulação de neutrófilos induzida por PMA ou fMLP e determinada pela liberação de MPO.

| Grupos | Liberação de MPO – CI ₄₀ (µg/mL) | |
|--------|---|------|
| | EPIT | EPIL |
| PMA | 29,5 | 14,3 |
| fMLP | 62,3 | 45,2 |

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos mensurado por quimioluminescência**

Para os ensaios de quimioluminescência, os neutrófilos foram ativados por PMA (0,1 μ M) e foi utilizado como sonda, o luminol (QL lum). A adição de PMA à suspensão de neutrófilos provocou o aumento de até cinco vezes a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando comparada às células não tratadas (grupo HBSS). Quando os neutrófilos foram tratados com EPIT (0,01 – 100 μ g/mL), foi observado que esta reduziu significativamente a produção de EROs / QL lum em até 44% (**Figura 12A**). No entanto, não houve uma relação concentração-efeito nessa redução da produção de EROs. A adição de EPIL à suspensão de neutrófilos reduziu de 35 a 74% a produção de EROs / QL lum induzida por PMA e nas maiores concentrações (50 e 100 μ g/mL) mostrou efeito comparável à inibição da quercetina (74,7%), empregada como a droga padrão (**Figura 12B**).

Figura 12. Efeito da EPIT (A) e da EPIL (B) sobre a produção de quimioluminescência dependente de luminol (QL lum) de neutrófilos ativados com PMA em percentual.

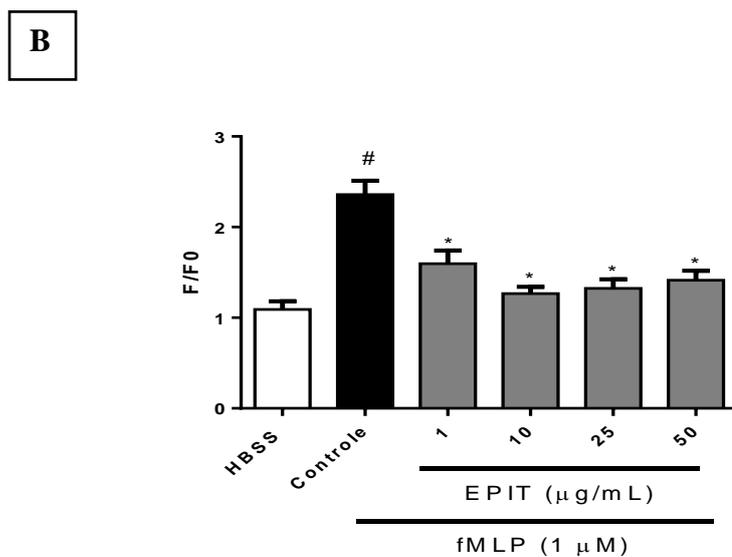
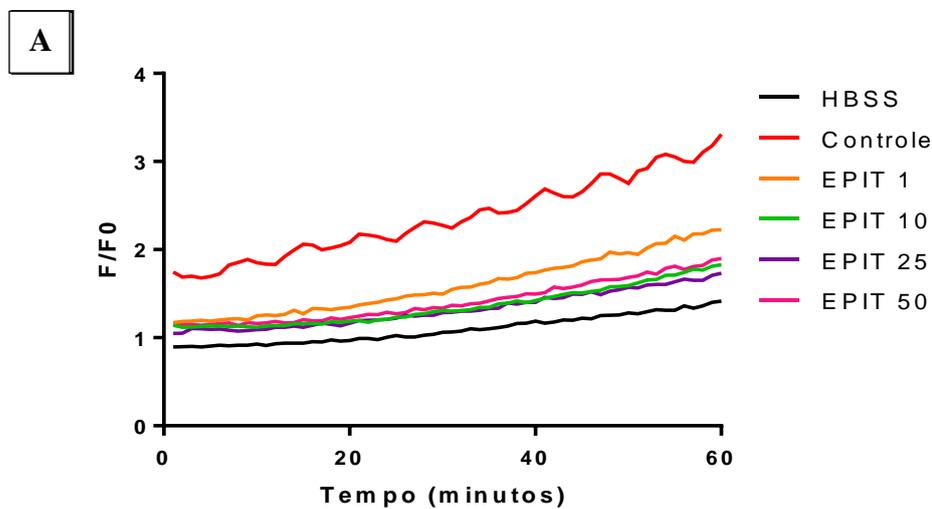


Os resultados estão como média \pm E.P.M. # vs HBSS; * vs Controle + vs Quercetina ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre os níveis de cálcio intracelular**

A liberação do Ca^{+2} é uma importante via de sinalização em inúmeras respostas biológicas, incluindo a ativação de fatores de transcrição nuclear pró-inflamatórios, mediadores inflamatórios e mediar respostas celulares. A adição de fMLP (1 μM) (grupo controle) (F/F_0 : $2,36 \pm 0,15$) à suspensão de neutrófilos levou a um aumento progressivo no influxo de cálcio para o meio intracelular em relação ao grupo HBSS (grupo não tratado) (F/F_0 : $1,091 \pm 0,09$), como pode ser observado nas **Figuras 13A e 14A**. No entanto, na presença de EPIT (1 – 50 $\mu\text{g/mL}$) (F/F_0 : $1,60 \pm 0,14$; $1,30 \pm 0,07$; $1,32 \pm 0,10$; $1,41 \pm 0,10$), a concentração de Ca^{+2} intracelular foi reduzida significativamente em relação ao grupo controle. A EPIT, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, inibiu em torno de 79% a liberação do cálcio intracelular (**Figura 13B**). O tratamento dos neutrófilos com a EPIL (1 – 50 $\mu\text{g/mL}$) também reduziu significativamente o influxo de cálcio para o interior das células, porém isso ocorreu apenas nas concentrações de 1 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (F/F_0 : $1,32 \pm 0,17$; $1,05 \pm 0,19$, respectivamente) (**Figura 14B**).

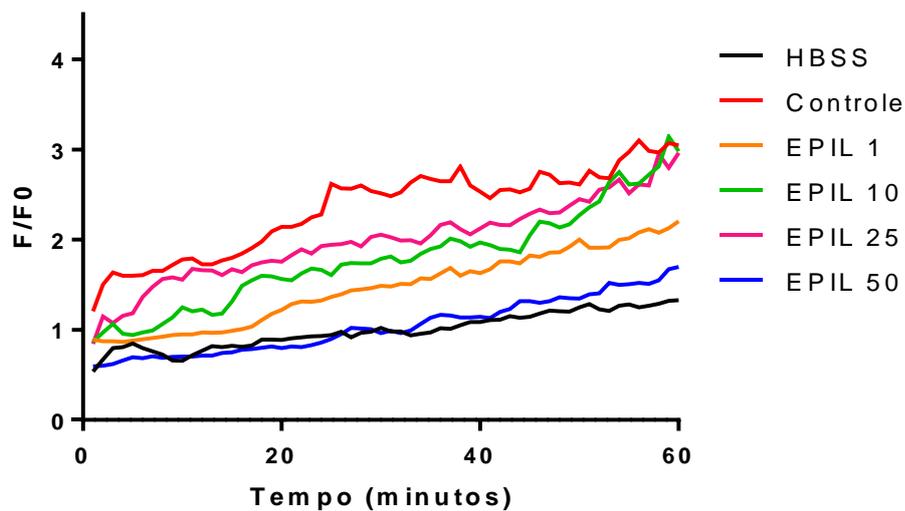
Figura 13. Efeito da EPIT no influxo de cálcio induzido por fMLP em neutrófilos humanos mensurado por fluorescência. (A) Registro original do influxo de cálcio em neutrófilos. (B) Proporção de intensidade de fluorescência/basal (F/F0) da liberação de cálcio em 60 minutos.



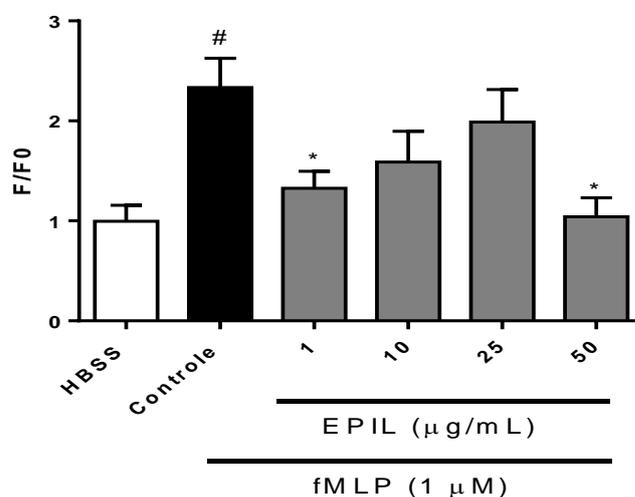
Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. # vs HBSS; * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

Figura 14. Efeito da EPIL no influxo de cálcio induzido por fMLP em neutrófilos humanos mensurado por fluorescência. (A) Registro original do influxo de cálcio em neutrófilos. (B) Proporção de intensidade de fluorescência/basal (F/F0) da liberação de cálcio em 60 minutos.

A



B

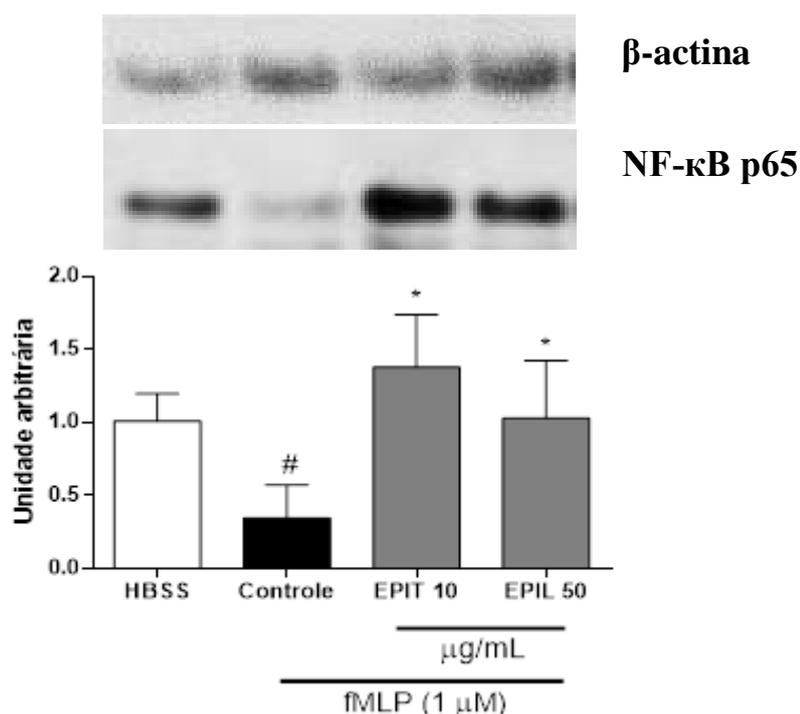


Os valores estão expressos como média ± E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. # vs HBSS; * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre a expressão gênica de NF- κ B**

A mensuração da expressão de NF- κ B, heterodímero constituído pelas subunidades p50 e p65, no citoplasma (forma inativa) ou no núcleo (forma ativa) constitui um alvo molecular de interesse na pesquisa de novos fármacos anti-inflamatórios. Na **Figura 15** pode ser observado que a adição de fMLP (1 μ M) à suspensão de neutrófilos promoveu uma redução significativa da expressão da subunidade p65 NF- κ B no extrato citosólico de neutrófilos (Unidade arbitrária: $0,35 \pm 0,11$) em relação ao grupo HBSS (grupo não estimulado) (Unidade arbitrária: $1,01 \pm 0,07$). Contudo, tanto EPIT (10 μ g/mL) quanto EPIL (50 μ g/mL) foram capazes de inibir a ativação do NF- κ B induzido por fMLP proporcionando um grau de expressão desse fator de transcrição no citosol (Unidade arbitrária: $1,38 \pm 0,20$ e $1,03 \pm 0,19$, respectivamente) comparável ao grupo HBSS.

Figura 15. Efeito da EPIT e da EPIL na expressão de NF- κ B em extrato citosólico de neutrófilos ativos por fMLP.



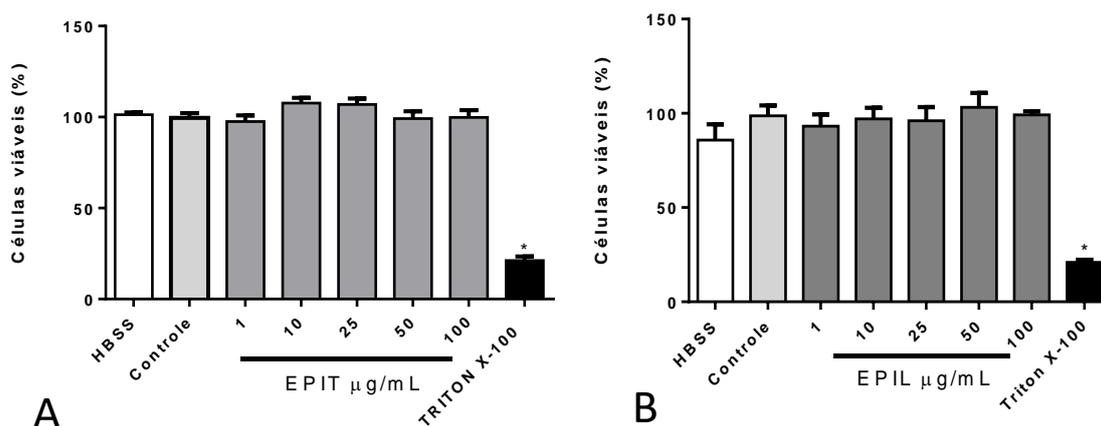
Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. As análises foram realizadas em triplicatas em três dias diferentes. # vs HBSS; * vs Controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.2 Avaliação da citotoxicidade dos alcaloides em neutrófilos humanos

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre a avaliação da citotoxicidade mensurada através do teste do MTT**

A adição da EPIT em concentrações crescentes (1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) aos neutrófilos humanos não causou redução significativa da viabilidade celular ($97,55 \pm 3,37$; $107,6 \pm 2,97$; $107,6 \pm 2,97$; $99,22 \pm 3,92$; $99,81 \pm 3,98\%$ de células viáveis) avaliada através do teste do MTT quando comparada ao grupo controle (veículo) (100% de células viáveis). (**Figura 16A**). Em neutrófilos tratados com EPIL (1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) a viabilidade celular manteve-se em torno de 100%. Por outro lado, o Triton X-100 0,2% v/v (padrão citotóxico) apresentou redução da viabilidade celular de 80% quando comparado ao grupo controle (**Figura 16B**).

Figura 16. Efeito da EPIT (A) e da EPIL (B) sobre a viabilidade de neutrófilos humanos / metabolismo mitocondrial determinado pelo teste do MTT.

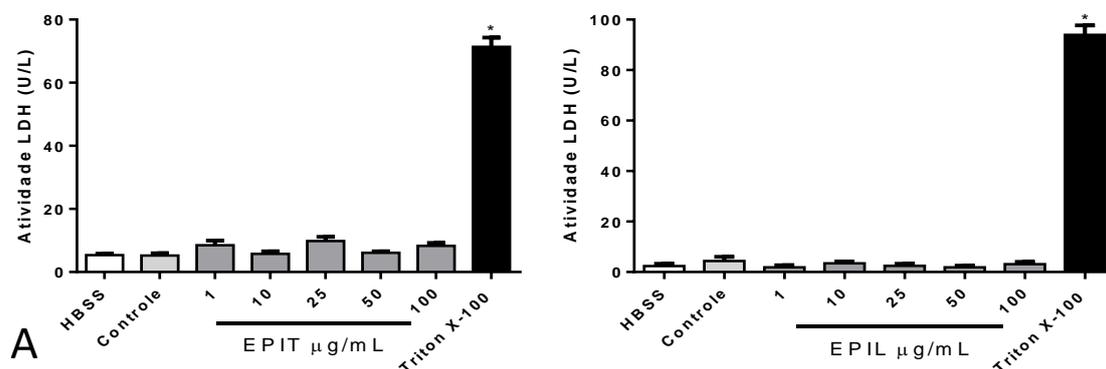


Os resultados estão expressos como % de células viáveis * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)**

A **Figura 17** mostra o efeito da EPIT e da EPIL sobre a viabilidade de neutrófilos mensurada através da atividade da enzima LDH. Pode ser observado que a adição do veículo à suspensão de células (grupo controle – DMSO 1%) ($5,21 \pm 0,72$ U/L) não alterou significativamente a atividade da enzima LDH em relação ao grupo HBSS (células não tratadas) ($5,35 \pm 0,49$ U/L). O tratamento das células com Triton X-100 (padrão citotóxico) aumentou significativamente a atividade LDH ($93,92 \pm 3,76$ U/L). A adição de EPIT e EPIL (1, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não promoveu o aumento significativo da atividade LDH ($8,52 \pm 0,82$; $5,73 \pm 0,45$; $9,84 \pm 0,96$; $6,08 \pm 1,45$; $8,28 \pm 0,67$ U/L e $2,86 \pm 0,82$; $3,45 \pm 0,77$; $2,42 \pm 0,88$; $1,90 \pm 0,62$; $3,09 \pm 0,93$ U/L, respectivamente) em relação ao grupo controle. No entanto, a EPIT nas concentrações 1, 25 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tenha aumentado em até 45% a atividade LDH quando comparado ao grupo controle.

Figura 17. Avaliação da toxicidade da EPIT (A) e da EPIL (B) em neutrófilos humano através da mensuração da enzima lactato desidrogenase (LDH).



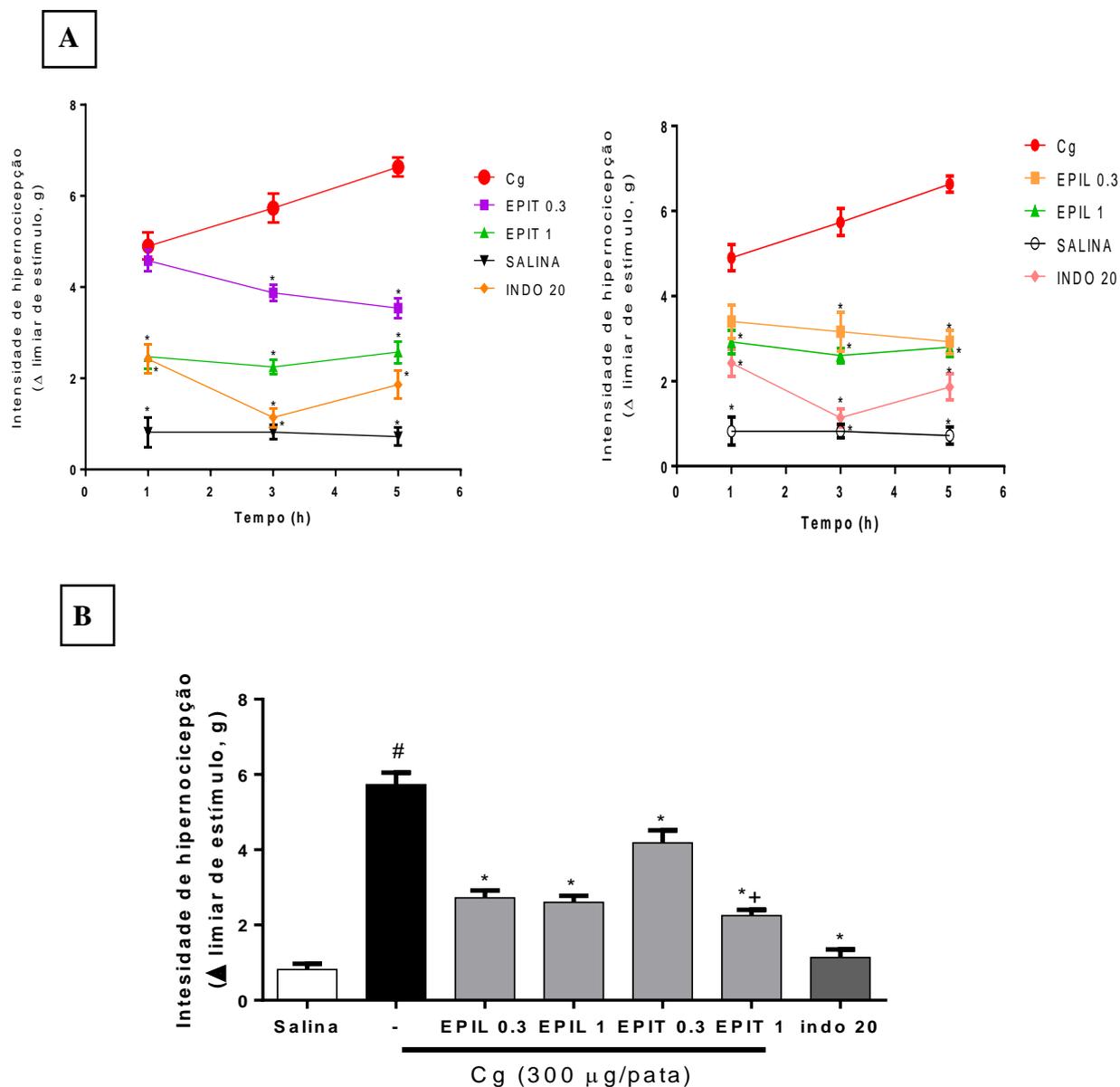
Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * vs HBSS ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.3 Avaliação do potencial antinociceptivo dos alcaloides EPIT e EPIL

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre a hipernocicepção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg)**

Os animais tratados com Cg (i.p.) apresentaram aumento significativo da hipernocicepção mecânica (1h: $4,90 \pm 0,30$; 3h: $5,73 \pm 0,31$ e 5h: $6,63 \pm 0,20$ g) quando comparados àqueles tratados com salina (i.p.) (1h: $0,82 \pm 0,32$; 3h: $0,82 \pm 0,15$ e 5h: $0,72 \pm 0,19$ g) (**Figura 18A**). O pré-tratamento dos animais com EPIT (0,3 e 1 mg/kg, i.p.) diminuiu a hipernocicepção (1h: $4,58 \pm 0,24$ e $2,47 \pm 0,27$; 3h: $4,18 \pm 0,33$ e $2,25 \pm 0,15$ e 5h: $3,54 \pm 0,21$ e $2,57 \pm 0,23$ g, respectivamente) após a injeção de carragenina quando comparada ao grupo Cg (grupo controle), que corresponderam a inibições de até 71% na terceira hora. A EPIL (0,3 e 1 mg/kg, i.p.) também reduziu a hipernocicepção (1h: $3,40 \pm 0,39$ e $2,92 \pm 0,28$; 3h: $2,72 \pm 0,18$ e $2,60 \pm 1,78$ e 5h: $2,92 \pm 0,27$ e $2,80 \pm 0,22$ g, respectivamente) após a injeção de carragenina, com inibição na terceira hora de até 64%. A indometacina (20 mg/kg), utilizada como droga padrão, também inibiu significativamente a hipernocicepção (1h: $2,42 \pm 0,32$; 3h: $1,14 \pm 0,21$ e $1,86 \pm 0,31$ g). Após três horas da injeção de carragenina, houve um efeito dose dependente com a EPIT (0,3 e 1 mg/kg, i.p.), no entanto as doses de EPIL (0,3 e 1 mg/kg, i.p.) não foram diferentes entre si (**Figura 18B**).

Figura 18. Efeito da EPIT e EPIL na hipernociceção inflamatória aguda induzida por carragenina (Cg). (A) Após 1h, 3h e 5h da administração do estímulo inflamatório, os animais foram submetidos ao teste de Von Frey eletrônico. (B) Intensidade da hipernociceção mecânica 3h após a injeção de Cg.

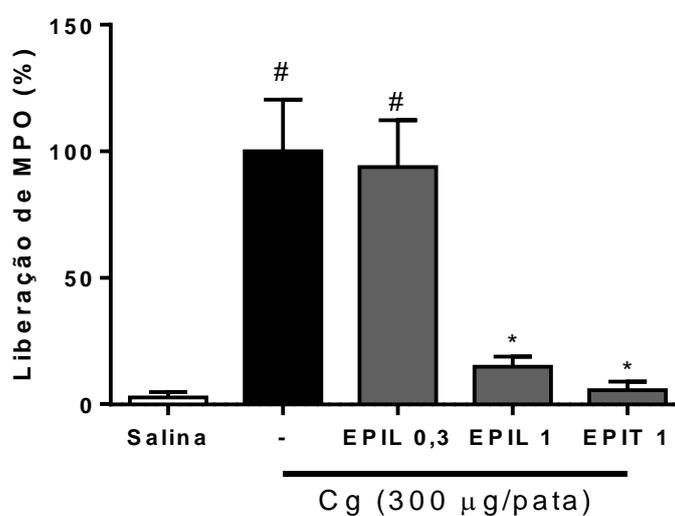


Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. # vs Salina * vs Cg + vs EPIT 0,3 ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

- **Efeito da EPIT e da EPIL sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido subplantar induzido por carragenina (Cg) em camundongos**

A administração intraplantar de Cg (300 µg/pata) provocou acúmulo significativo de neutrófilos em tecido subplantar (100% de liberação de MPO) quando comparado ao grupo tratado com salina (i.pl.). A atividade da enzima foi reduzida de forma significativa nos grupos tratados com EPIT (1 mg/kg, i.p.) e EPIL (0,3 e 1 mg/kg, i.p.) com inibições de 94% e 85%, respectivamente, na dose de 1 mg/kg (**Figura 19**).

Figura 19. Efeito da EPIT e da EPIL na migração de neutrófilos induzida por carragenina (Cg) na pata de camundongos.



Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. # vs salina, * vs Cg ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

- **Efeito da EPIT e da EPIL na imunexpressão de Ciclooxigenase-2 (COX-2) no tecido subplantar de camundongos**

A análise imunohistoquímica do tecido subplantar, animais induzidos com a injeção de carragenina (300 µg/pata), para COX-2 mostrou um aumento na imunexpressão de COX-2 comparando-se com animais do grupo controle, tratados com solução salina. No entanto, os grupos tratados com EPIT (1 mg/kg), EPIL (0,3 mg/kg) e INDO (20 mg/kg) apresentaram fraca imunomarcção de COX-2 em relação ao grupo carragenina (**Figura 20**). Na contagem de células imunomarcadas para COX-2 por campo após indução por carragenina, observou-se uma redução significativa no número de células imunomarcadas nos grupos tratados com EPIT (1 mg/kg) ($7,66 \pm 1,38$), EPIL (0,3 mg/kg) ($15,0 \pm 2,92$) e indometacina (20 mg/kg) – droga padrão ($10,4 \pm 2,35$) quando comparados ao grupo carragenina ($31,09 \pm 2,53$), que correspondem a inibições de 88,6; 60,9 e 78,3%, respectivamente (**Figura 21**).

Figura 20. Fotomicrografias da imunohistoquímica no tecido subplantar para COX-2 em camundongos. Aumento de 400x.

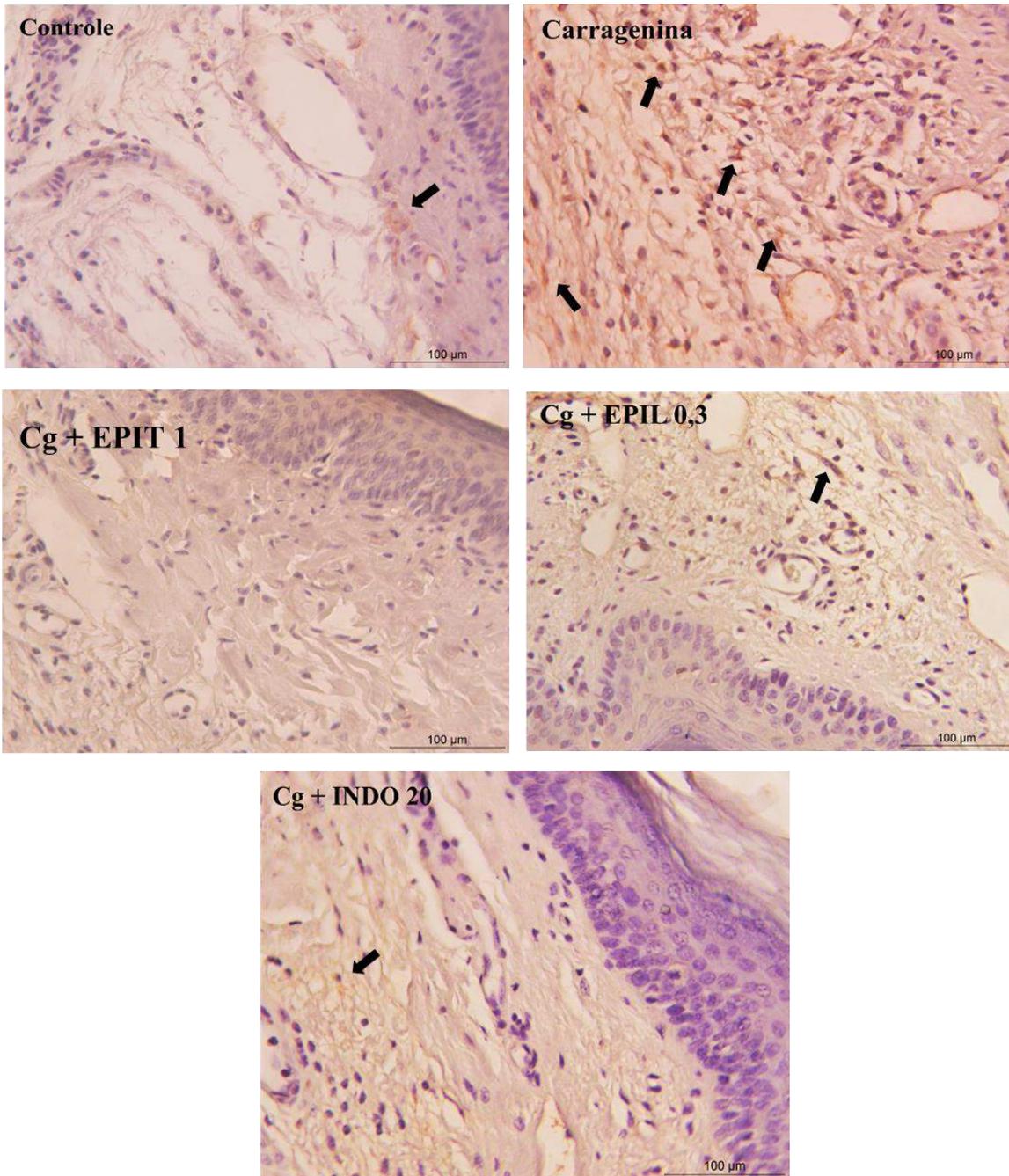
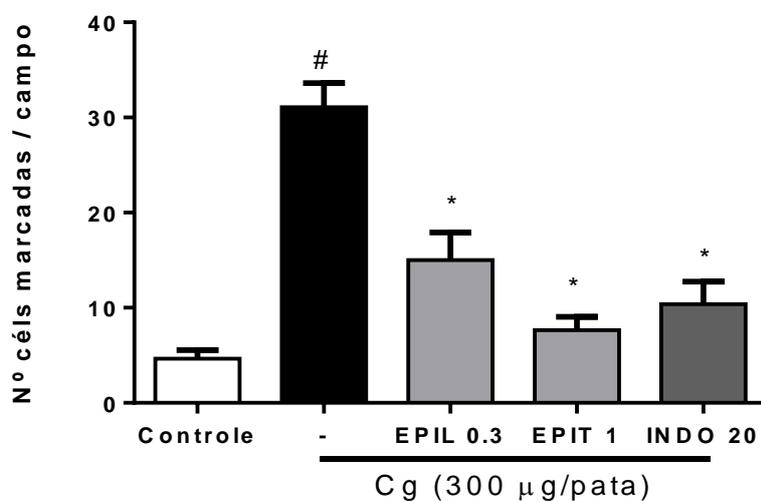


Figura 21. Contagem de células imunomarcadas para COX-2 em tecidos subplantares.



Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. # vs Controle e * vs Cg ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.4 Avaliação da interação molecular dos alcaloides com as isoformas da COX *in silico*

- **Efeito da EPIT e da EPIL na interação molecular com as isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2)**

O *docking* para as entradas PDB 1HT5 e 1CX2 foi validado a partir da remoção dos ligantes co-cristalizados do arquivo PDB (flurbiprofeno metil éster e SC-588, respectivamente) e validados (*redocked*) para o sítio de ligação (**Tabela 2**). O desvio quadrático médio (RMSD – *root mean square deviation*) das ligações foi calculado para os ligantes cristalográficos, e em todos os resíduos de aminoácidos testados, os valores foram menores que 2 Å, limite máximo aceito para validação da metodologia utilizada (PLEWCZNSKI *et al.*, 2011).

Tabela 2. Valores de RMSD de validação de entradas PDB

| Entradas PDB | 1HT5 | | | 1CX2 | |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | <i>Glu140*</i> | <i>Glu239*</i> | <i>Tyr242*</i> | <i>Ser353*</i> | <i>Tyr355*</i> |
| RMSD (Å) | 0,214 | 0,282 | 0,090 | 0,031 | 0,015 |
| Escore | 49,71 | 45,01 | 44,87 | 73,89 | 52,74 |

*Resíduos de proteína

Além disso, foi realizado o *docking* para os alcaloides EPIT e EPIL nas mesmas condições. O procedimento de triagem virtual para COX-1 com EPIL e EPIT mostrou valores de scores maiores e de energia PLP mais negativos (PLP: -56,16; -67,89; -67,64 e -49,45; -49,17; -47,17, respectivamente) para os resíduos de aminoácidos testados quando comparados ao composto de referência, indometacina (PLP: -48,08; -54,26 e -49,02) (**Tabela 3**). As conformações de ligação previstas para a melhor pontuação das moléculas EPIL e EPIT no sítio de ligação da COX-1 (PDB código 1HT5) estão mostradas nas **Figuras 22 e 23**.

Tabela 3. Escores de *docking* dos resíduos específicos de ligantes da COX-1

| Composto | Glu140* | | Glu239* | | Tyr242* | |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | Escore | S (PLP) | Escore | S (PLP) | Escore | S (PLP) |
| Epiisopilosina | 64,95 | -56,16 | 69,30 | -67,89 | 69,13 | -67,64 |
| Epiisopiloturina | 57,29 | -49,45 | 53,29 | -49,17 | 52,55 | -47,17 |
| Indometacina | 55,88 | -48,08 | 57,45 | -54,26 | 50,78 | -49,02 |

*Resíduos de proteína

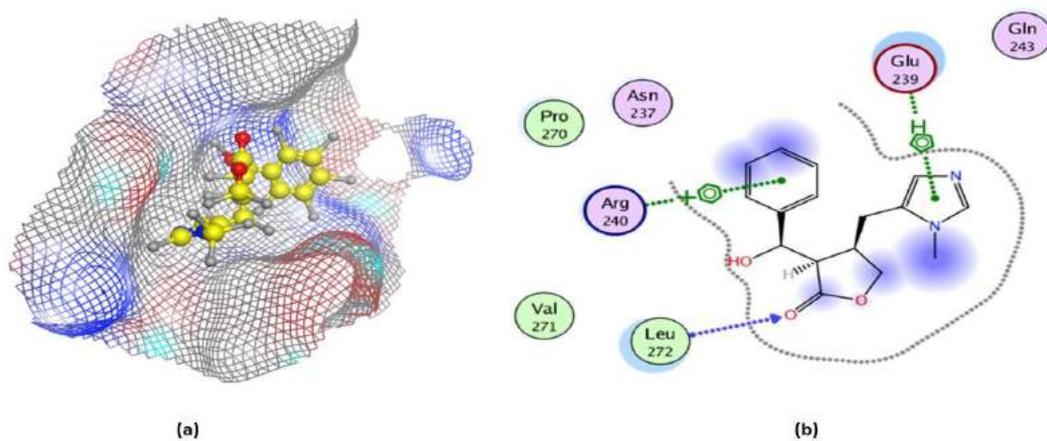
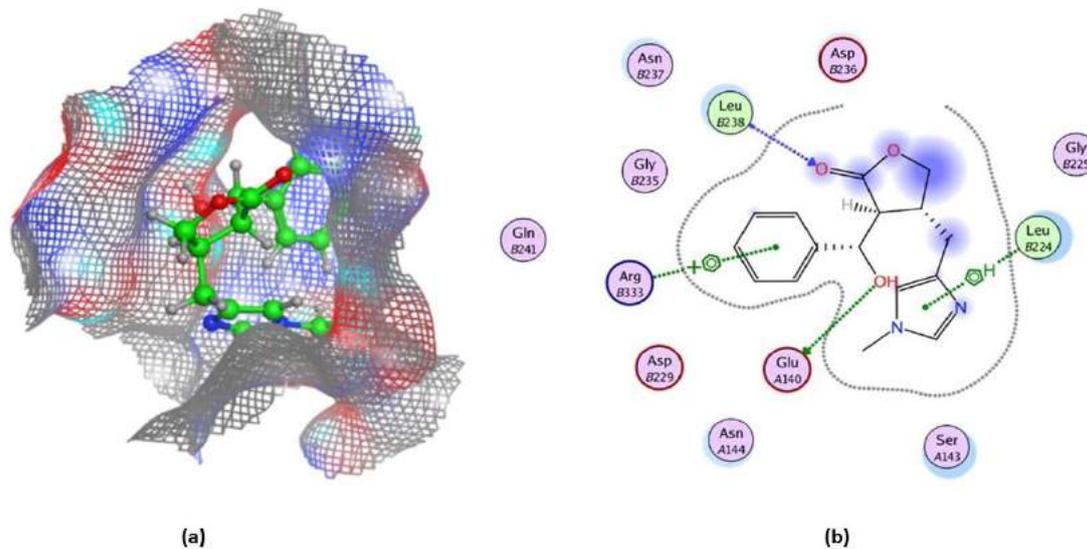
Figura 22. (a) Conformação de ligação prevista para EPIL no sítio de ligação da COX-1 no resíduo Glu239 (b) Interações entre EPIL e COX-1 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1HT5)

Figura 23. (a) Conformação de ligação prevista para EPIT no sítio de ligação da COX-1 no resíduo Glu140 (b) Interações entre EPIT e COX-1 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1HT5)



Os resultados para COX-2 geraram resultados ainda mais promissores (**Tabela 4**), as pontuações para EPIL e EPIT (PLP: -77.86; -68.08 e -64.58; -62.08, respectivamente) também foram maiores que a indometacina (PLP: -55.82 e -56.01), no qual foi realizado o *docking* nas mesmas condições. As conformações previstas com os melhores valores para as moléculas EPIL e EPIT no sítio de ligação COX-2 e as interações entre esses compostos e os resíduos dos sítios de ligação da COX-2 (código PDB 1CX2) estão mostrados das **Figuras 24 e 25**.

Tabela 4. Escores de *docking* dos resíduos específicos de ligantes da COX-2

| Compostos | Ser353* | | Tyr355* | |
|-------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Escore | S (PLP) | Escore | S (PLP) |
| Epiisopilosina | 76.82 | -77.86 | 68.08 | -68.08 |
| Epiisopiloturina | 65.22 | -64.58 | 67.19 | -62.08 |
| Indometacina | 58.10 | -55.82 | 58.74 | -56.01 |

*Resíduos de proteínas

Figura 24. (a) Conformação de ligação prevista para EPIL no sítio de ligação da COX-2 no resíduo Ser353 (b) Interações entre EPIL e COX-2 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1CX2)

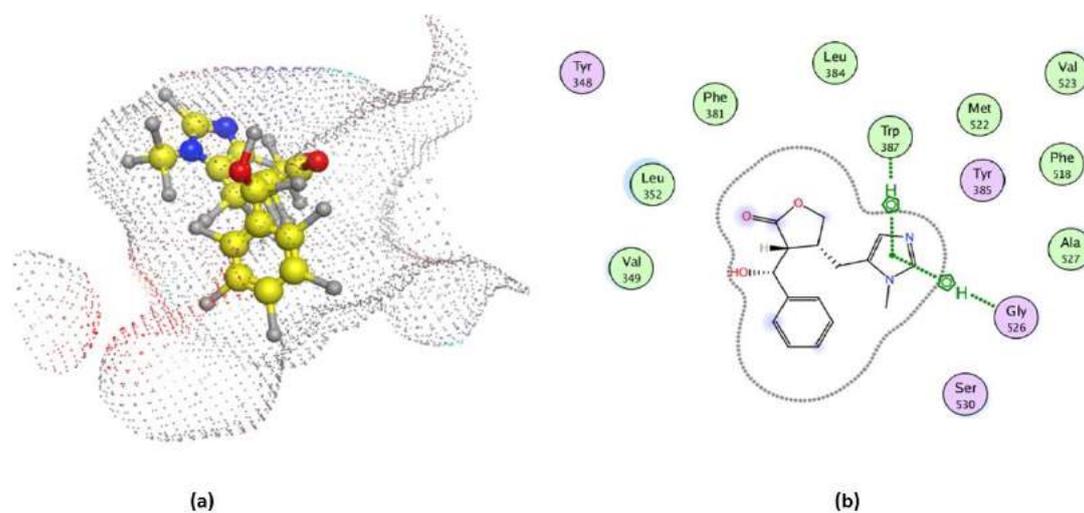
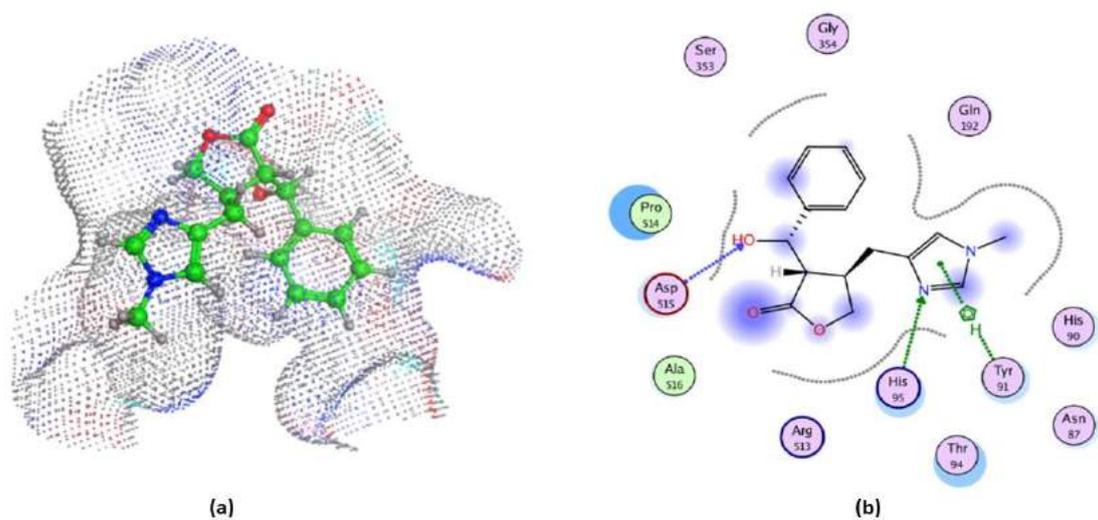


Figura 25. (a) Conformação de ligação prevista para EPIT no sítio de ligação da COX-2 no resíduo Tyr355 (b) Interações entre EPIT e COX-2 no sítio de ligação dos resíduos (código PDB 1CX2)



6 DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos a atividade anti-inflamatória dos alcaloides imidazólicos isolados de *Pilocarpus microphyllus*, epiisopiloturina (EPIT) e epiisopilosina (EPIL), em neutrófilos humanos, seus efeitos antinociceptivo em modelo de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina em camundongos e iniciamos a avaliação do possível mecanismo de ação. Os alcaloides modularam a ativação de neutrófilos, bem como reduziram a hipernocicepção inflamatória.

A avaliação do potencial biológico de novos fármacos anti-inflamatórios com o emprego de modelos experimentais em neutrófilos humanos pode contribuir consideravelmente no desenvolvimento desses produtos, afinal essas células formam a primeira linha de defesa na imunidade inata apresentando um papel importante na resposta inflamatória aguda e crônica induzida por diferentes estímulos (MEDZHITOV et al, 2008). Dessa forma, o potencial anti-inflamatório/antioxidante dos alcaloides foi investigado avaliando seus efeitos sobre degranulação de neutrófilos, a produção de EROs, o influxo de cálcio para o meio intracelular e a expressão de fator de transcrição.

Os alcaloides EPIT e EPIL reduziram significativamente a degranulação de neutrófilos induzida por fMLP ou PMA mensurada pela liberação de MPO pelas células, entretanto esses alcaloides foram mais potentes em inibir a degranulação induzida por PMA em relação a degranulação induzida por fMLP. EPIT e EPIL inibiram a degranulação neutrofílica induzida por fMLP, em suas maiores concentrações, de maneira comparável ao efeito da indometacina (INDO), enquanto que ao serem estimulados por PMA, inibiram significativamente a liberação de MPO desde a concentração de 1 µg/mL, ou seja, uma concentração 36 vezes menor que a concentração de INDO utilizada no ensaio.

O PMA (forbol- miristato-acetato), análogo do diacilglicerol (DAG), pertence à classe dos ésteres de forbol e é um mediador solúvel que atravessa a membrana plasmática e ativa diretamente as diferentes isoformas da proteína quinase C (PKC) (WRIGHT et al, 2010). Também promove o *burst* respiratório de neutrófilos através da ativação da PKC citosólica, que por sua vez, ativa algum constituinte ou a NADPH-oxidase diretamente na membrana plasmática, criando um sistema de geração de ânion superóxido ativo (COX et al, 1985).

O fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) é um potente fator quimiotático para leucócitos que se liga a receptores de superfície acoplados a proteína G (IIRI et al, 1989). Após a ligação do fMLP, o receptor sofre mudança conformacional, que o possibilita a interagir com a proteína G, fosforilando GDP para formar GTP no sítio de ligação da subunidade α e causando a dissociação das subunidades $\beta\gamma$. A ativação da proteína G desencadeia diversos sistemas de sinalização em neutrófilos, envolvendo quinases e fosfolipases (NICK et al, 1997; SELVATICI et al, 2006). Em resposta a estimulação do fMLP, a fosfolipase C (PLC) é rapidamente ativada e hidroliza o fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PI4,5P₂) para gerar DAG e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). O DAG ativa a PKC e o IP₃ desencadeia o influxo de Ca²⁺ do meio extracelular para o citosol e a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (STEINBERG, 2008; SUH et al, 2008). Alguns autores comprovaram a participação também da fosfolipase D (PLD) na ativação de neutrófilos por fMLP. Uma vez ativada, a PLD catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina (PC) para produzir ácido fosfatídico (PA), que pode ser convertido em DAG pela ação de uma fosfolipase, aumentando a ativação de PKC (BAGGIOLINI et al., 1993). Alguns autores (KESSELS et al., 1993) observaram que haviam diferenças na inibição da degranulação de neutrófilos induzida por fMLP e PMA, mesmo utilizando inibidores específicos de PKC. Eles concluíram que a menor potência de inibição da ativação neutrofílica estimulada por fMLP estava possivelmente relacionada ao papel da PLD.

A inespecificidade do efeito anti-inflamatório da EPIT e da EPIL sobre a degranulação de neutrófilos, sugere que seus efeitos envolvam possivelmente uma etapa comum da ativação celular induzida por PMA ou fMLP. Contudo, há indícios de que PKC parece ter um papel importante no efeito desses alcaloides, mas estudos adicionais ainda são necessários para ratificar essa afirmação.

Vários mecanismos estão envolvidos na degranulação de neutrófilos, entre eles a produção de EROs que possui um papel importante na ativação celular. Assim, prosseguindo os estudos, investigamos se parte do efeito anti-inflamatório dos alcaloides sobre a degranulação de neutrófilos estaria relacionado a uma possível modulação na produção de EROs. Dessa forma, no ensaio de quimioluminescência (QL lum) foi observado que tanto EPIL quanto EPIT modularam a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos ativados por PMA, no entanto, os resultados mostraram que EPIL

foi mais potente em reduzir o *burst* respiratório dos neutrófilos, sendo comparável ao efeito da droga padrão utilizada no ensaio, a quercetina, um flavonol antioxidante.

A técnica de quimioluminescência é amplamente utilizada por ser uma metodologia sensível e exata para a avaliação da capacidade de produção de EROs em neutrófilos. Para amplificar a quimioluminescência produzida por fagócitos durante o *burst* oxidativo, são utilizadas sondas quimioluminescentes, como o luminol (WARDMAN, 2007). O luminol reage com as EROs geradas pelos neutrófilos produzindo o ânion aminoftalato excitado que emite fótons de luz ao retornar ao estado fundamental (ALLEN & LOOSE, 1976). O luminol é capaz de detectar diversas espécies reativas, inclusive o O_2^- , no entanto possui uma maior sensibilidade para $HOCl^-$, por isso trata-se de uma quimioluminescência dependente do sistema MPO- H_2O_2 - $HOCl^-$ (MAHOMOODALLY et al, 2012). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a atividade modulatória do metabolismo oxidativo de neutrófilos pelos alcaloides parece estar relacionada ao sistema MPO- H_2O_2 - $HOCl^-$. Esse resultado corroborou o efeito mostrado no ensaio de degranulação, no qual houve uma inibição da liberação de MPO, confirmando assim que EPIT e EPIL agem sobre o sistema MPO- H_2O_2 - $HOCl^-$.

O cálcio possui um papel central na iniciação e modulação da responsividade funcional dos neutrófilos, estando ligado à regulação da maioria, senão de todas as funções dos neutrófilos incluindo quimiotaxia, fagocitose, degranulação e estimulação do *burst* oxidativo (NIESSEN et al, 1991; WATSON et al, 2004; LINDEMANN et al, 2015). Além disso, o Ca^{2+} possui ainda um sítio de ligação na enzima fosfolipase A2 (PLA2), estando conseqüentemente envolvido também na síntese de produtos do metabolismo do ácido araquidônico (BERG et al., 2001; BURKE & DENNIS, 2009).

O estímulo dos neutrófilos com fMLP desencadeia uma mobilização de cálcio dos compartimentos intracelulares e do meio extracelular para o citoplasma. Nosso estudo demonstrou que a ativação mediada pelo fMLP foi acompanhada por um aumento prolongado no influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, que foi significativamente reduzido pelo tratamento dos neutrófilos com EPIT e EPIL. Dessa forma, o efeito modulatório da EPIT e da EPIL sobre a ativação celular parece estar relacionado, pelo menos em parte, à redução do influxo de Ca^{2+} para o interior das células. Essa característica de inibição do influxo de Ca^{2+} intracelular tem sido observada em moléculas que apresentam anel imidazólico em sua estrutura ou são derivados deste, como

itraconazol, miconazol e cetoconazol, fármacos antimicóticos, que apresentaram efeito antagonista de canais de Ca^{2+} operados por estoque em neutrófilos e em outros tipos de células de mamíferos (STEEL & ANDERSON, 2004; WANG et al, 1999).

Seguindo na investigação do mecanismo de ação anti-inflamatório dos alcaloides, foi avaliado o papel do fator de transcrição NF- κ B nesse efeito. O NF- κ B é uma proteína dimérica, que inclui as subunidades p50 e p65, encontrada em sua forma inativa (ligado ao inibidor κ B (I κ B α/β)) no citoplasma das células. Particularmente, a subunidade p50 sozinha não possui atividade transcrricional, logo para análise da expressão desse fator de transcrição, foi mensurada a expressão da subunidade p65 no ensaio (YU et al., 2009).

A ativação da via do NF- κ B tem um papel central na inflamação, através da regulação de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento, enzima cicloxigenase-2 (COX-2) e enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e fatores quimiotáticos (fMLP, por exemplo) ao interagirem com seus respectivos receptores ativam proteínas quinases, como a I κ B quinase/IKK (um complexo protéico composto por duas quinases IKK1/IKK α e IKK2/IKK β) ou MAPK. A IKK ou MAPK fosforilam o I κ B α/β , o qual é ubiquitinado e degradado no proteassoma, liberando o NF- κ B para interagir com região promotora do DNA e estimular a expressão de genes que codificam proteínas inflamatórias (ROBBESYN et al, 2004; KUNDU & SURH, 2004).

No ensaio de *western blotting*, utilizando o extrato citosólico de neutrófilos induzidos por fMLP, EPIT e EPIL mantiveram a expressão da subunidade de NF- κ B em níveis semelhantes aos de células não estimuladas. Esses resultados sugerem que esses alcaloides bloqueiam a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B, inibindo a sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, sua ação na regulação gênica.

Diante dos resultados obtidos, sugere-se que EPIT e EPIL agem sobre a ativação celular através da modulação do influxo de cálcio intracelular e da fosforilação do fator de transcrição NF- κ B citosólico. Além disso, a redução na produção de EROs pelos alcaloides também contribui para o efeito anti-inflamatório destes, afinal as EROs são capazes de ativar NF- κ B, um fator de transcrição redox-sensível (TEDGUI & MALLAT, 2006). No entanto, um efeito direto sobre enzimas envolvidas nesse processo de ativação não pode ser descartado.

Um resultado importante nos estudos em neutrófilos humanos, foi que a adição de concentrações crescentes dos alcaloides à suspensão de células não alterou significativamente a viabilidade celular dos neutrófilos, tanto pelo teste do MTT quanto pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). O teste do MTT avalia a atividade metabólica através da redução do sal de MTT a sal de formazan pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase que faz parte da cadeia respiratória da mitocôndria (MOSMANN, 1983). Enquanto que a medida da atividade da LDH, enzima presente no citoplasma celular, constitui um marcador de integridade da membrana, pois essa enzima terá sua atividade aumentada no meio extracelular quando ocorre lesão na membrana ou morte celular. Assim, os resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório dos alcaloides EPIT e EPIL demonstrado no presente estudo não estão possivelmente relacionados a uma ação citotóxica, pois estes parecem não provocar alterações no metabolismo mitocondrial e na permeabilidade plasmática. Esses resultados corroboram estudos anteriores em macrófagos peritoneais de camundongos e em linhagem de células Vero (células renais de macaco verde africano) nos quais a EPIT não causou alteração significativa na viabilidade celular até a concentração de 500 µg/mL (VERAS et al, 2012).

Estudos anteriores também demonstraram o potencial anti-inflamatório de alcaloides benzofenantridínicos e indólicos obtidos de plantas medicinais como a decarina de *Zanthoxylum ailanthoides* e a 11-metoxi henningsamina de *Strychnos cathayensis*, respectivamente, na inibição da geração do ânion superóxido e da liberação da enzima elastase em neutrófilos humanos (CHEN et al, 2008; CHEN et al, 2009). Assim como, alcaloides isoquinoleicos obtidos de *Stephania tetrandrae*, fangchinolina e tetrandrina, foram capazes de inibir a adesão e a migração de neutrófilos humanos ativados por fMLP (CHOI et al, 2000; SHEN et al, 2001).

Durante o processo inflamatório, a dor é tipicamente o sintoma mais persistente e, quando passa a se repetir ou sustentar-se por um período prolongado, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar apenas sofrimento. Algumas alterações na via da dor podem levar à hipersensibilidade, fazendo com que seu caráter frequentemente protetor seja perdido (JULIUS & BASBAUM, 2001). Apesar do grande número de analgésicos e anti-inflamatórios disponíveis atualmente para uso clínico, ainda não dispomos do analgésico ideal, com maior especificidade, de menor toxicidade e com indicação para algumas modalidades de dor ainda de difícil terapêutica. Dentro deste

contexto, a busca por medicamentos que sejam capazes de reduzir a dor e que possuam efeitos adversos toleráveis deve ser constante. Diante disso, vários modelos de nociceção em animais de laboratório têm sido propostos, a fim de avaliar a ação antinociceptiva de novos fármacos.

Nesse sentido, o presente estudo buscou avançar na investigação do efeito antinociceptivo da EPIT e, de maneira inédita, avaliar o efeito da EPIL em modelo de hipernociceção inflamatória mecânica. Na avaliação do potencial antinociceptivo dos alcaloides EPIT e EPIL, foi observado que estes reduziram significativamente a hipernociceção inflamatória induzida por carragenina em camundongos.

A hipernociceção inflamatória induzida por carragenina promove a sensibilização dos nociceptores para estímulos mecânicos e térmicos, além de migração celular, entre outras manifestações da resposta inflamatória (RADHAKRISHNAN et al, 2003; MORRIS, 2003; GUAY et al, 2004). Além disso, injeção intraplantar de carragenina está associada a uma diminuição do limiar de retirada da pata em resposta a um estímulo mecânico provocada por uma inflamação aguda que envolve duas fases. (NACIFE et al., 2004). A primeira fase acontece uma hora após a administração do agente flogístico, em razão da produção de radicais livres e da liberação dos mediadores pró-inflamatórios como serotonina, histamina, leucotrienos e óxido nítrico (PINHEIRO et al, 2001; FOX et al., 2003). Na segunda fase (1-6h), há produção mais efetiva de TNF- α , IL-1 β e expressão de enzimas como a COX-2, os quais contribuem para o aumento da permeabilidade vascular, reforçando a formação do edema (POSADAS et al., 2004). Os anti-inflamatórios não-esteroidais reduzem preferencialmente a fase tardia, em virtude da inibição da isoforma COX-2, que está envolvida na geração de prostanoídes pró-inflamatórios (CHAKRABORTI et al, 2010). Dessa forma, o efeito antinociceptivo da EPIT e da EPIL está possivelmente relacionado, pelo menos em parte, à uma ação anti-inflamatória destes através da modulação da ativação das células que migram para o foco inflamatório. Essa hipótese é corroborada por estudo anterior que demonstrou o potencial anti-inflamatório da EPIT em modelo de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos (carragenina, sulfato de dextrano, serotonina e bradicinina) e reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β em modelo de peritonite (SILVA et al, 2013).

A hipernociceção inflamatória induzida por carragenina caracteriza-se pelo acúmulo de células no foco inflamatório, predominantemente neutrófilos, além da

participação de várias enzimas pró-inflamatórias, como MPO e COXs (HENRIQUES et al, 1987; SADIK et al, 2011). Na avaliação da possível modulação dessas respostas inflamatórias pelos alcaloides imidazólicos, foi observado que estes foram capazes de reduzir significativamente a atividade MPO, bem como diminuíram a expressão de COX-2 no tecido subplantar de camundongos.

A MPO, enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares, é usada como índice quantitativo para avaliar a migração celular para o sítio da inflamação em vários tecidos (SADIK et al, 2011). Logo, EPIT e EPIL ao reduzirem a atividade da enzima MPO mostram sua capacidade de inibir o acúmulo de células, predominantemente neutrófilos, no foco inflamatório. Esses resultados são corroborados por estudo anterior que mostrou que EPIT inibiu a atividade da MPO no homogenato do tecido subplantar de camundongos tratados com carragenina (SILVA et al, 2013).

Diversos estudos também demonstraram o papel das ciclooxigenases e prostaglandinas na dor inflamatória induzida pela carragenina (POSADAS et al., 2004; TORIYABE et al., 2004; SCARPELLI et al, 2016). Além disso, a COX-2, isoforma da ciclooxigenase na forma induzida, desempenha um papel importante nas respostas inflamatórias e a sua inibição representa um potente efeito anti-inflamatório (SMITH et al., 2000). No sentido de avançar na elucidação do possível mecanismo de ação anti-inflamatório/antinociceptivo dos alcaloides EPIT e EPIL, os estudos prosseguiram investigando a interação dessas moléculas com as isoformas da ciclooxigenase, por meio de ensaio imunohistoquímica e *docking* molecular.

EPIT e EPIL reduziram significativamente a expressão de COX-2 no tecido subplantar de camundongos na contagem de células marcadas positivamente para essa enzima quando comparados ao grupo tratado com carragenina. A isoforma COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e está envolvida na produção de prostaglandinas que são responsáveis por sensibilizar os nociceptores, provocar a febre e promover a inflamação, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Essa resposta inflamatória também é mediada pela regulação dos genes das citocinas pró-inflamatórias, tais como IL1- β , TNF α e pela ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B (JEAN et al, 2008; LAM et al, 2010; EL-SHITANY et al, 2010).

No ensaio de *docking* molecular, foi observado que EPIT e EPIL estabeleceram importantes interações com resíduos de aminoácidos considerados essenciais para a ligação com as isoformas COX-1 e COX-2, sendo essas interações maiores para COX-2. Entre os dois alcaloides, EPIL apresentou os melhores escores de interação molecular em todos os resíduos de aminoácidos testados, inclusive com valores maiores que os da indometacina que foi submetida as mesmas condições de *docking*.

O sítio ativo da COX-1 é formado por um longo canal hidrofóbico, uma parte desse canal, que corresponde a região onde os AINES liga-se a enzima, engloba a metade superior do canal estendendo-se do aminoácido *arg120* até perto da *tyr385*. Já a região inicial formada pela metade inferior do canal, localizada no domínio de ligação à membrana, permite a entrada direta do ácido araquidônico e de O₂ pela zona apolar da bicamada lipídica (DANNHARDT, 2001; GARAVITO et al., 2003; CARVALHO et al., 2004). Para a COX-2, o sítio de inibição corresponde aos resíduos de aminoácidos *his90*, *arg120*, *gln192*, *val349*, *leu352*, *ser353*, *tyr355*, *leu359*, *tyr385*, *trp387*, *arg513*, *ala516*, *phe518*, *val523*, *gly526*, *ala527* e *leu531* (KURUMBAIL et al, 1996). No presente estudo, os resíduos testados no ensaio de *docking* e outros resíduos que também apresentaram interação com os alcaloides pertencem aos sítios de ligação que promovem a ação dessas enzimas, isso provavelmente contribui para a maior estabilidade do complexo proteína + ligante e seu possível efeito inibitório. Assim, os resultados indicam que o efeito antinociceptivo da EPIT e da EPIL parece estar associado não só a redução da expressão de COX-2, mas também a uma interação direta com as isoformas COX-1 e COX-2.

Estudos anteriores também demonstraram o efeito anti-inflamatório *in vivo* de alguns alcaloides e o envolvimento da COX nesse efeito. Os alcaloides quinolizidínicos, matrina e oximatrina, obtidos de *Sophora subprostrata* (AO et al, 2009) e o alcaloide indólico, picrinina, obtido de *Alstonia scholaris* (SHANG et al, 2010) apresentaram atividade inibitória sobre as isoformas da cicloxigenase (COX-1 e COX-2).

Diante desses resultados, podemos dizer que os alcaloides apresentam uma ação anti-inflamatória e antinociceptiva, muito provavelmente pela modulação da ativação celular, redução da migração neutrofílica e expressão de COX-2, além de uma interação direta com as isoformas (COX-1 e COX-2) dessa enzima.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante dos resultados com os alcaloides epiisopiloturina e epiisopilosina, demonstramos:

- EPIT e EPIL inibiram a degranulação de neutrófilos humanos, mostrando-se mais potentes frente ao estímulo que envolve a ativação direta da PKC;
- A modulação de mecanismos pró-inflamatórios de neutrófilos para EPIT e EPIL está relacionada a diminuição da produção de EROs (MPO-H₂O₂-HOCl), da ativação do NF-κB e do influxo de cálcio. Isso, sem afetar a viabilidade celular.
- A EPIT e a EPIL possuem efeito antinociceptivo possivelmente relacionado ao seu potencial anti-inflamatório, por reduzir a atividade da enzima MPO e a expressão de COX-2, além da interação direta com as isoformas da cicloxigenase.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da EPIT e da EPIL parecem estar relacionadas a modulação da ativação celular com inibição da degranulação, da produção de EROs, do influxo de cálcio intracelular e da fosforilação do NF- κ B em neutrófilos humanos, além de redução da migração de polimorfonucleares e da expressão de COX-2. Dessa forma, sugere-se que essas moléculas são potenciais candidatas a fármacos anti-inflamatórios e analgésicos.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; AL-BADR, A. A. Prognosis of the pilocarpine receptor sites. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 321–329, 1982.
- ABRAHAM, E.; NICK, J. A.; AZAM, T.; et al. Peripheral blood neutrophil activation patterns are associated with pulmonary inflammatory responses to lipopolysaccharide in humans. **J Immunol**, v. 176, n. 12, p. 7753–7760, 2006.
- AGIER, J.; EFENBERGER, M.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Cathelicidin impact on inflammatory cells. **Central European Journal of Immunology**, v. 2, n. 2, p. 225–235, 2015.
- AHMED, A. U. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. **Frontiers of Biology**, v. 6, n. 4, p. 274–281, 2011
- ALLEN, R. C.; LOOSE, L. D. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, n. 1, p. 245–252, 1976.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol**, v. 30, p. 459–489, 2012.
- AO, C.W.; ARAKI, N.; TAWATA, S. Cyclooxygenase inhibitory compounds with antioxidant activities from *Sophora subprostrata*. **Asian J. Chem.**, 21, 745-754. 2009.
- APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; MITCHELL, J. A.; WILLOUGHBY, D. A. Distribution of cyclooxygenase isoforms in murine chronic granulomatous inflammation. Implications for future anti-inflammatory therapy. **The Journal of pathology**, v. 176, n. 4, p. 413–420, 1995.
- AURIEL, E.; REGEV, K.; KORCZYN, A. D. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 119, p. 577–584, 2014.
- BADRI, W.; MILADI, K.; NAZARI, Q. A.; et al. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1, p. 757–773, 2016.
- BAGGIOLINI, M.; BOULAY, F.; BADWEY, J. A.; CURNUTTE, J. T. Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 11, p. 1004–1010, 1993.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **The Lancet**, v. 373, n. 9678, p. 1905–1917, 2009.
- BARTON, G. M. A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413–420, 2008.

- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **NIH Public Access**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2010.
- BELKOUCH, M.; DANSEREAU, M.-A.; TÉTREAULT, P.; et al. Functional up-regulation of Na(v)1.8 sodium channel in A β afferent fibers subjected to chronic peripheral inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, 2014.
- BELTRAN, B.; NOS, P.; DASI, F.; et al. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 16, n. 1, p. 76–86, 2010.
- BEN-BASSAT, A. A.; LAVIE, D. Quaternary pilocarpine derivatives as potential acetylcholine antagonists. 2. Alterations in the lactone and imidazole moieties. **Journal of medicinal chemistry**, v. 19, n. 7, p. 928–933, 1976.
- BEN-BASSAT, A.; LAVIE, D.; EDERY, H.; PORATH, G. Quaternary pilocarpine derivatives acting as acetylcholine antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1066–1069, 1971.
- BENTO, R. R. F.; SILVA, L. E. DA; FARIA, J. L. B.; et al. Comparative vibrational spectra of pilosine and epiisopilosine crystals. **Brazilian Journal of Physics**, v. 40, n. 2, p. 217–223, 2010.
- BERG, O. G.; GELB, M. H.; TSAI, M. D.; JAIN, M. K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. **Chemical reviews**, v. 101, n. 9, p. 2613–2654, 2001.
- BERGMEYER HU, BERNT E. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU, editor. **Methods of Enzymatic Analysis**. London: Academic Press; 1963. pp. 574–579.
- BONNINGTON, J. K.; MCNAUGHTON, P. A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. **The Journal of physiology**, v. 551, n. Pt 2, p. 433–446, 2003.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.
- BORREGAARD, N.; KJELDSSEN, L.; LOLLIKE, K.; SENDELØV, H. Ca²⁺-dependent translocation of cytosolic proteins to isolated granule subpopulations and plasma membrane from human neutrophils. **FEBS Letters**, v. 304, n. 2–3, p. 195–197, 1992.
- BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 8, p. 340–345, 2007.
- BOTZ, B.; BÖLCSKEI, K.; HELYES, Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.** **72**, 248–254. 1976.

- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- BROCK, T. G.; MCNISH, R. W.; MANCUSO, P.; COFFEY, M. J.; PETERS-GOLDEN, M. Prolonged lipopolysaccharide inhibits leukotriene synthesis in peritoneal macrophages: mediation by nitric oxide and prostaglandins. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 71, n. 3–4, p. 131–145, 2003.
- BURGOS, R. A.; CONEJEROS, I.; HIDALGO, M. A.; WERLING, D.; HERMOSILLA, C. Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 143, n. 1–2, p. 1–10, 2011.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A(2) structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, Apr. 2009.
- CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.
- CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Sociedade Brasileira de Anestesiologia. v. 54, n. 3, p. 448–464, 2004.
- CHAKRABORTI, A. K.; GARG, S. K.; KUMAR, R.; MOTIWALA, H. F.; JADHAVAR, P. S. Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1563–1593, 2010.
- CHANDRASEKHARAN, J. A.; SHARMA-WALIA, N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **Journal of inflammation research**, v. 8, p. 181–192, 2015.
- CHANG, C. F.; CHAU, Y. P.; KUNG, H. N.; LU, K. S. The lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in RAW264.7 cells is attenuated by an unsaturated fatty acid-bovine serum albumin complex and enhanced by a saturated fatty acid-bovine serum albumin complex. **Inflammation Research**, v. 61, n. 2, p. 151–160, 2012.
- CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet (London, England)**, v. 353, n. 9171, p. 2233–2237, 1999.
- CHEN, J.-J.; CHUNG, C.-Y.; HWANG, T.-L.; CHEN, J.-F. Amides and Benzenoids from *Zanthoxylum ailanthoides* with Inhibitory Activity on Superoxide Generation and Elastase Release by Neutrophils. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 107–111, 2009.
- CHEN, J.-J.; LUO, Y.-T.; HWANG, T.-L.; et al. A new indole alkaloid and anti-inflammatory constituents from *Strychnos cathayensis*. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 7, p. 1345–52, 2008.
- CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 58–66, 2013.
- CHOI, H. S.; KIM, H. S.; MIN, K. R.; et al. Anti-inflammatory effects of fangchinoline and tetrandrine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p. 173–179, 2000.

COLE, J. C.; NISSINK, J. W. M.; TAYLOR, R. Protein-ligand docking and virtual screening with GOLD. **Virtual Screening in Drug Discovery**, 379-415, 2005.

COX, J. A.; JENG, A. Y.; SHARKEY, N. A.; BLUMBERG, P. M.; TAUBER, A. I. Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. **Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 5, p. 1932–1938, 1985.

CUNHA, T. M.; BARSANTE, M. M.; GUERRERO, A. T.; et al. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 460–470, 2008.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 2, p. 109–126, 2001.

DAVIS, L. S.; HUTCHESON, J.; MOHAN, C. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 31, n. 10, p. 781–789, 2011.

DAY, R. O.; GRAHAM, G. G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **British Journal of Sports Medicine**, v. 48, n. 18, p. 1396–1396, 2013.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 7, p. 1035–1042, 2010.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192–4199, 2005. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, United States.

DELAVARY, B. M.; VEER, W. M. VAN DER; EGMOND, M. VAN; NIESSEN, F. B.; BEELEN, R. H. J. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011.

DIMASI, D.; SUN, W. Y.; BONDER, C. S. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1167–1175, 2013.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935–950, 2010.

DINARELLO, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 9, p. 1355–1359, 2005

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 2011.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; et al. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, p. 126–134, 2012. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

EL KEBIR, D.; JÓZSEF, L.; PAN, W.; FILEP, J. G. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**, v. 103, n. 4, p. 352–359, 2008.

EL-SHITANY, N. A.; EL-MASRY, S. A.; EL-GHAREIB, M. A.; EL-DESOKY, K. Thiocctic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation in rats by reduction in oxidative stress, downregulation of COX-2 mRNA and enhancement of IL-10 mRNA. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 91–99, 2010.

FARID, T. M.; NOUR, A. M.; DIN, E.; et al. Kidney Diseases Association of Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Polymorphisms With Juvenile Systemic Lupus Erythematosus Nephritis in a Cohort of Egyptian Patients. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 5, n. 6, p. 392–397, 2011.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317–1327, 2003.

FLINT, S. M.; MCKINNEY, E. F.; SMITH, K. G. C. Emerging concepts in the pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. **Current opinion in rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 197–203, 2015.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 3, p. 179–191, 2003.

FLYVBJERG, A. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 94–101, 2010. Journal Article, Review, England.

FOX, A.; WOTHERSPOON, G.; MCNAIR, K.; et al. Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 683–691, 2003.

FRÖDE-SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B. Synergistic anti-inflammatory effect of NF- κ B inhibitors and steroidal or non-steroidal anti-inflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. **Inflammation Research**, v. 49, n. 7, p. 330–337, 2000.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–67, 2016.

GARAVITO, R. M., MALKOWSKI, M. G., & DEWITT, D. L. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. **Prostaglandins & other lipid mediators**, 68-69, 129-52. 2002.

GARAVITO, R. M.; MULICHAK, A. M. The structure of mammalian cyclooxygenases. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, p. 183–206, 2003.

- GENSEL, J. C.; ZHANG, B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. **Brain Res**, v. 1619, p. 1–11, 2015.
- GHOSH, S.; PANACCIONE, R. Anti-adhesion molecule therapy for inflammatory bowel disease. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 3, n. 4, p. 239–58, 2010.
- GIORGETTI, M.; NEGRIS, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacol.** v. 109, p. 338-347, 2007.
- GRATTENDICK, K.; STUART, R.; ROBERTS, E.; et al. Alveolar Macrophage Activation by Myeloperoxidase A Model for Exacerbation of Lung Inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 26, n. 6, p. 716–722, 2002.
- GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24866–72, 2004.
- GUIMARÃES, M. A.; OLIVEIRA, R. N. DE; VÉRAS, L. M. C.; et al. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–18, 2015.
- GUINDON, J.; LEAN, A. DE; BEAULIEU, P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. **Pain**, v. 121, n. 1–2, p. 85–93, 2006.
- HÄGER, M.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 1, p. 25–34, 2010.
- HART, D. A. Curbing Inflammation in Multiple Sclerosis and Endometriosis: Should Mast Cells Be Targeted? **International Journal of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015.
- HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res**, v. 20, n. 2, p. 243–249, 1987.
- HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2—10 Years Later. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 2, p. 367–375, 2002.
- HOLLE, J. U.; WINDMÖLLER, M.; LANGE, C.; et al. Toll-like receptor TLR2 and TLR9 ligation triggers neutrophil activation in granulomatosis with polyangiitis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 52, n. 7, p. 1183–1189, 2013.
- HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 29, n. 11, p. 1349–1353, 1981.
- HUANG, J.; ZHANG, X.; MCNAUGHTON, P. A. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Current neuropharmacology**, v. 4, n. 3, p. 197–206, 2006.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. February, p. 83–91, 2001.

IASP - International Association for the Study of Pain. IASP Pain Terminology. 3. ed. Kyoto, 2007. Disponível em: <[http:// www.iasp-pain.org/terms-p.html](http://www.iasp-pain.org/terms-p.html) >.

IBGE, **Prod. Extr. veg. e Silvic.**, Rio de Janeiro, 2006.

ISAAC, B. M.; ISHIHARA, D.; NUSBLAT, L. M.; et al. N-WASP has the ability to compensate for the loss of WASP in macrophage podosome formation and chemotaxis. **Experimental cell research**, v. 316, n. 20, p. 3406–3416, 2010.

JEAN, Y.-H.; CHEN, W.-F.; DUH, C.-Y.; et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory and analgesic effects of the natural marine compound lemnalol from Formosan soft coral *Lemnalia cervicorni*. **European Journal of Pharmacology**, v. 578, n. 2, p. 323–331, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 12, p. 691–699, 2011.

KAROU, S.D.; TCHACONDO, T.; ILBOUDO, D.P.; SIMPORE, J.. Sub-Saharan *Rubiaceae*: a review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. **Pak J Biol Sci.** v. 14, p. 149-169, 2011.

KAZUMURA, K.; SATO, Y.; SATOZONO, H.; et al. Simultaneous monitoring of superoxides and intracellular calcium ions in neutrophils by chemiluminescence and fluorescence: Evaluation of action mechanisms of bioactive compounds in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 90–96, 2013.

KESSELS, G. C.; KRAUSE, K.-H.; VERHOEVEN, A. J. Protein kinase C activity is not involved in N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced phospholipase D activation in human neutrophils, but is essential for concomitant NADPH oxidase activation: studies with a staurosporine analogue with improved selectivity for protein kinase C. **Biochemical Journal**, v. 292, n. 3, p. 781–785, 1993.

KIELY PD, BROWN AK, EDWARDS CJ, O'REILLY DT, OSTÖR AJ, QUINN M . Contemporary treatment principles for early rheumatoid arthritis: a consensus statement. **Rheumatology (Oxford)**;48(7):765-72. 2009.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase : friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, p. 598–625, 2005.

KNIGHT, J. S.; CARMONA-RIVERA, C.; KAPLAN, M. J. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. DEC, p. 1–12, 2012.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 1, n. 3, p. 309–33, 2009.

- KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. **Expert reviews in molecular medicine**, 11. Jul. 2011.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.
- KUDOH, S.; KATSUHIKO, S.; YAMADA, M.; LIU, Q.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Contribution of nitric oxide synthase to human neutrophil chemoluminescence. **Luminescence**. v. 14, p. 335-39, 1999.
- KUMAR, VINAY, ABUL K. ABBAS, NELSON FAUSTO, JON C. ASTER. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2015.
- KUNDU, J. K.; SURH, Y.-J. Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 555, n. 1, p. 65–80, 2004.
- KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, v. 384, n. 6610, p. 644–648, 1996.
- LACY, P. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 358–376, 2005.
- LAM, P. D.; MANDAL, P. K.; HAK, S. Y.; HWANG, S. Study of the Molecular Mechanism of Anti-inflammatory Activity of Bee venom in Lipopolysaccharide Stimulated RAW 264 . 7 Macrophages. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. November 2009, p. 19–26, 2010.
- LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 2, p. 431–6, 2005.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85–94, 2007.
- LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131–134, 2003.
- LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131–134, 2003.
- LINDEMANN, O.; STRODTHOFF, C.; HORSTMANN, M.; et al. TRPC1 regulates fMLP-stimulated migration and chemotaxis of neutrophil granulocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 9, p. 2122–2130, 2015.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.
- LUCIO, E. M. R. D. A.; SHARAPIN, N.; FRANÇA, H. S. Estudo de alcalóides de *Pilocarpus pennatifolius* Lemaire. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 130–132, 2002.
- LUO, J.; CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacol Sin**, v. 26, n. 3, p. 259–264, 2005.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorfonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and IgG. **The Journal of Immunology**. v.132, p. 2015-2020, 1984.

MAEDLER, K.; DHARMADHIKARI, G.; SCHUMANN, D. M.; STORLING, J. Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. **Expert opinion on biological therapy**, v. 9, n. 9, p. 1177–1188, 2009.

MAHOMOODALLY, F.; MESAİK, A.; CHOUDHARY, I. M.; SUBRATTY, A. H.; GURIB-FAKIM, A. In vitro modulation of oxidative burst via release of reactive oxygen species from immune cells by extracts of selected tropical medicinal herbs and food plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 440–447, 2012.

MALEKINEJAD, H.; REZABAKHSH, A.; RAHMANI, F.; RAZI, M. Paraquat Exposure Up-regulates Cyclooxygenase-2 in the Lungs, Liver and Kidneys in Rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, v. 12, n. 4, p. 887–896, 2013.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P. G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British journal of pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838–854, 2007.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G. B.; et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science (New York, NY.)**, v. 330, n. 6002, p. 362–366, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. July, p. 428–435, 2008. MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain**. 2nd Ed ed. Seattle, 1994.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain**. 2nd Ed ed. Seattle, 1994.

MIURA L.M.C.V. Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

MOE, Chemical Computing Group Inc, Montreal. 2014.

MORRIS, C. J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. In: P. G. Winyard; D. A. Willoughby (Eds.); **Inflammation Protocols**. p.115–121, 2003.

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

MOTA, L. M. H. DA; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; et al. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 53, n. 2, p. 141–157, 2013. Sociedade Brasileira de Reumatologia.

- MOTA, L. M. H. DA; MAGALHÃES LAURINDO, M.; LUIZ DOS SANTOS NETO, L. Artrite reumatoide inicial - conceitos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 2, p. 227–9, 2010.
- MYERS, L. K.; KANG, A. H.; POSTLETHWAITE, A. E.; et al. The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 43, n. 12, p. 2687–2693, 2000.
- NACIFE, V. P.; SOEIRO, M. DE N. C.; GOMES, R. N.; et al. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. **Cell structure and function**, v. 29, n. 2, p. 27–34, 2004.
- NICK, J. A.; AVDI, N. J.; YOUNG, S. K.; et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 5, p. 975–86, 1997.
- NIEDERBERGER, E.; GEISLINGER, G. The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? **The FASEB Journal**, v. 22, n. 10, p. 3432–3442, 2008.
- NIESSEN, H. W. M.; TACO W. KUIJPERS, D. R. AND A. J. V. Release of azurophilic granule contents in fmlp- stimulated neutrophils requires two activation signals, one of which is a rise in cytosolic free Ca^{2+} ions. **Cellular Signalling**, v. 3, n. 6, p. 625–633, 1991.
- ODOBASIC, D.; KITCHING, A. R.; YANG, Y.; et al. Regular Article Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell 2 driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 1–3, 2014.
- OLCZYK PAWEL, MENCNER ŁUKASZ, AND KOMOSINSKA-VASSEV KATARZYNA, The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing, **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 747584, 8 pages, 2014.
- OLIVEIRA F., AKISUE, G., AKISUE, M. K., **Farmacognosia**, Editora Atheneu, São Paulo – Brasil, p. 216, 412; 1991.
- OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.
- PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 513–521, 2009.
- PAULA, F. S.; KABEYA, L. M.; KANASHIRO, A.; et al. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of Tamarindus indica L. fruit pulp. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 163–170, 2009.
- PETERSON, L. J.; FLOOD, P. M. Oxidative Stress and Microglial Cells in Parkinson's Disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 401264, 2012.
- PHILLIPSON, M.; HEIT, B.; COLARUSSO, P.; et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 12, p. 2569–75, 2006.

- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381–1390, 2011.
- PIETERSE, E.; VLAG, J. VAN DER. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 164, 2014.
- PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 2, p. 141–150, 2002.
- PINHEIRO, R. M.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Analysis of the mechanisms involved in the inflammatory response induced by des-Arg9-bradykinin in the rat pleural cavity. **Inflammation Research**, v. 50, n. 11, p. 570–576, 2001.
- PLEWCZYNSKI, D.; LAZNIEWSKI, M.; AUGUSTYNIAK, R.; GINALSKI, K. Can we trust docking results? Evaluation of seven commonly used programs on PDBbind database. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 4, p. 742–755, 2011.
- POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331–8, 2004.
- QUAX, R. A.; MANENSCHIJN, L.; KOPER, J. W.; et al. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 11, p. 670–686, 2013.
- RADHAKRISHNAN, R.; MOORE, S. A.; SLUKA, K. A. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 567–577, 2003.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England journal of medicine**, v. 353, p. 1711–1723, 2005.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.
- ROBBESYN, F.; SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A. Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. **Free radical research**, v. 38, n. 6, p. 541–551, 2004.
- RODRIGUES, N. R. **CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DO GÊNERO PILOCARPUS: *Pilocarpus microphyllus* Stapf . e *Pilocarpus carajaensis***, Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em química orgânica. Universidade Federal Do Ceará. Centro De Ciências. 2005.
- RODRIGUEZ, J. M.; MONSALVES-ALVAREZ, M.; HENRIQUEZ, S.; LLANOS, M. N.; TRONCOSO, R. Glucocorticoid Resistance in Chronic Diseases. **Steroids**, v. 115, p. 182–192, 2016.
- SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.

SALMON, M. D.; AHLUWALIA, J. Pharmacology of receptor operated calcium entry in human neutrophils. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 145–148, 2011.

SAMARASINGHE, A. B. The Hallmarks of Cancer : 8 – Promoting Inflammation. Disponível em: <<http://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-8-tumor-promoting-inflammation/>>. Acesso em: 1/1/2016.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. Pilocarpus spp.: a survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 116–137, 2004.

SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Screening species of Pilocarpus (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 3, p. 471–480, 2011.

SCARPELLI, R.; SASSO, O.; PIOMELLI, D. A Double Whammy: Targeting Both Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) and Cyclooxygenase (COX) To Treat Pain and Inflammation. **ChemMedChem**, v. 11, n. 12, p. 1242–51, 2016.

SCHENKEL, A. R.; MAMDOUH, Z.; MULLER, W. A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. **Nature immunology**, v. 5, n. 4, p. 393–400, 2004.

SCHNAKERS, C.; CHATELLE, C.; DEMERTZI, A.; MAJERUS, S.; LAUREYS, S. What about Pain in Disorders of Consciousness? **The AAPS Journal**, v. 14, n. 3, p. 437–444, 2012.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, n. november, p. 1062–1067, 2002.

SCHUG, S. A.; PALMER, G. M.; SCOTT, D. A.; HALLIWELL, R.; TRINCA, J. Acute pain management: scientific evidence, fourth edition, 2015. **The Medical journal of Australia**, v. 204, n. 8, p. 315–317, 2016.

SCHYMEINSKY, J.; MÓCSAI, A.; WALZOG, B. Molecular mechanisms and clinical implications. **Thromb Haemost**, v. 98, p. 262–273, 2007.

SCOTT DL, WOLFE F, HUIZINGA TW. **Rheumatoid arthritis**. *Lancet*; 376(9746):1094-108. 2010.

SELINSKY, B. S.; GUPTA, K.; SHARKEY, C. T.; LOLL, P. J. Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. **Biochemistry**, v. 40, p. 5172–5180, 2001.

SELVATICI, R.; FALZARANO, S.; MOLLICA, A.; SPISANI, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, n. 1, p. 1–11, 2006.

SENGELØV H, KJELDSEN L, BORREGAARD N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. **J Immunol**. ;150(4):1535–1543. 1993

- SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. **International Review of Neurobiology**, v. 97, p. 179–206, 2011.
- SHAFTEL, S. S.; GRIFFIN, W. S. T.; O'BANION, M. K. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 7, 2008.
- SHANG, J. H.; CAI, X. H.; FENG, T.; et al. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: Anti-inflammatory and analgesic effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 174–181, 2010.
- SHEN, Y.-C.; CHOU, C.-J.; CHIOU, W.-F.; CHEN, C.-F. Anti-Inflammatory Effects of the Partially Purified Extract of *Radix Stephaniae tetrandrae*: Comparative Studies of Its Active Principles Tetrandrine and Fangchinoline on Human Polymorphonuclear Leukocyte Functions. **Mol. Pharmacol.**, v. 60, n. 5, p. 1083–1090, 2001.
- SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071–1077, 2013.
- SMITH, M. T.; WYSE, B. D.; EDWARDS, S. R. Small Molecule Angiotensin II Type 2 Receptor (AT2R) Antagonists as Novel Analgesics for Neuropathic Pain: Comparative Pharmacokinetics, Radioligand Binding, and Efficacy in Rats. **Pain Medicine**, v. 14, n. 5, p. 692 LP-705, 2013.
- SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 145–182, 2000.
- SMOLEN, J. S. Pharmacotherapy: How well can we compare different biologic agents for RA? **Nature reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 5, p. 247–248, 2010.
- SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121–132, 2010.
- STEEL, H. C.; ANDERSON, R. Itraconazole antagonizes store-operated influx of calcium into chemoattractant-activated human neutrophils. **Clinical and Experimental Immunology**, May. 2004.
- STEINBERG, S. F. Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1341 LP-1378, 2008.
- SUH, P.-G.; PARK, J.-I.; MANZOLI, L.; et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. **BMB reports**, v. 41, n. 6, p. 415–434, 2008.
- SUMMERS, C.; RANKIN, S. M.; CONDLIFFE, A. M.; et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 8, p. 318–324, 2010.
- TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiological reviews**, v. 86, n. 2, p. 515–581, 2006.

TEODORO, M. L.; PHILLIPS, J.; KAVRAKI, L. E. Molecular docking: A problem with thousands of degrees of freedom. **Proceedings - IEEE International Conference on Robotics and Automation**, v. 1, p. 960–965, 2001.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, v. 101, n. 4, p. 983–990, 2004.

TRACEY, K. J.; WEI, H.; MANOGUE, K. R.; et al. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 3, p. 1211–1227, 1988.

ÚBEDA, A.; FERRÁNDIZ, M. L.; HERENCIA, F. Activación celular: desgranulación leucocitária. In: ALCARAZ, M. J.; CALIXTO, J. B.; DELGADO, R. **Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos antiinflamatorio**. CYTED – Subprograma X Proyecto X.6. Espanha, 2002.

UNDERHILL, D.; OZINSKY, A. PHAGOCYTOSIS OF MICROBES: Complexity in Action. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 825–852, 2002.

URBAN, C. F.; ERMERT, D.; SCHMID, M.; et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.

VAN DER GOES, M.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F.; BIJLSMA, J.; JACOBS, J. Can adverse effects of glucocorticoid therapy be prevented and treated? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 6566, n. September, 2016.

VAN DER VEEN, B. S.; WINTHER, M. P. DE; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2899–2937, 2009.

VÉRAS, L. M. C.; CUNHA, V. R. R.; LIMA, F. C. D. A.; et al. Industrial Scale Isolation, Structural and Spectroscopic Characterization of Epiisopiloturine from *Pilocarpus microphyllus* Stapf Leaves: A Promising Alkaloid against Schistosomiasis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116–138, 2006.

VILLACORTA, H.; MASETTO, A. C.; MESQUITA, E. T. Proteína C-reativa: marcador inflamatório com valor prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca descompensada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 5, p. 585–589, 2007. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*.

VINOLA AM, MIRABELLA F, COSTANZO G, DI GIORGI R, GJOMARKAJ M, BELLIA V. Airway remodeling in asthma. **Chest**. 123(3):417S-22S. 2003.

VITAL, M. A. B. F.; ACCO, A. Agonistas e antagonistas colinérgicos. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 67-79 p, 2006.

VOIGTLANDER, H. W.; BALSAM, G.; ENGELHARDT, M. Epiisopiloturin, ein Neues Pilocapus-Alkaloid. **Archiv der Pharmazie**, v. 311, p. 927-935, 1978.

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: Antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 8, p. 775–783, 2009.

VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: Antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **Journal of Molecular Medicine**, v. 87, n. 8, p. 775–783, 2009.

VONKEMAN, H. E.; BROUWERS, J. R. B. J.; LAAR, M. A. F. J. VAN DE. Understanding the NSAID related risk of vascular events. **BMJ**, v. 332, n. 7546, p. 895 LP-898, 2006.

VONKEMAN, H. E.; LAAR, M. A. F. J. VAN DE. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 294–312, 2010.

YU, Y.; WAN, Y.; HUANG, C. The biological functions of NF-kappaB1 (p50) and its potential as an anti-cancer target. **Curr. Cancer Drug. Targets**, v. 9, p. 566-571, 2009

WANG, J. S.; WEN, X.; BACKMAN, J. T.; et al. Midazolam alpha-hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by calcium channel blockers, itraconazole and ketoconazole. **Pharmacology & toxicology**, v. 85, n. 4, p. 157–161, 1999.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free radical biology & medicine**, v. 43, n. 7, p. 995–1022, 2007.

WATSON, E. L.; JACOBSON, K. L.; SINGH, J. C.; DIJULIO, D. H. Arachidonic acid regulates two Ca²⁺ entry pathways via nitric oxide. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 2, p. 157–165, 2004.

WATSON, T. Tissue repair: The current state of the art. **Sportex-Medicine**. 28: 8-12. 2006.

WILLIS, W. D. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. **Brain Research Reviews**, v. 55, n. 2, p. 297–313, 2007.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B.; LIVESEY, J. H.; KETTLE, A. J. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: Implications for microbial killing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 39860–39869, 2006.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353–364, 2007.

WOOLF, C. Neurobiology of disease. **Pain**, v. 7, p. 505-510, 2002.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 49, n. 9, p. 1618–31, 2010.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 10, p. 593–601, 2014.

WU, Y.-S.; CHEN, S.-N. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1, 2014.