



RENORBIO
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Efeitos de *Morus nigra* L. (amoreira negra) sobre a resposta
inflamatória e modulação de neutrófilos: estudos *in vivo* e *in vitro***

Ahirlan Silva de Castro

São Luís – MA
2016

AHIRLAN SILVA DE CASTRO

**Efeitos de *Morus nigra* L. (amoreira negra) sobre a resposta
inflamatória e modulação de neutrófilos: estudos *in vivo* e *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges

São Luís
2016

Castro, Ahirlan Silva de

Efeitos de *Morus nigra* L. (amoreira negra) sobre a resposta inflamatória e modulação de neutrófilos: estudos in vivo e in vitro / Ahirlan Silva de Castro, 2016.

126 f.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges

Tese (Doutorado em Biotecnologia - Rede Nordeste de Biotecnologia) - Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, 2016.

1. *Morus nigra* L. 2. Amora-preta 3. Inflamação 4. Neutrófilos.

CDU

AHIRLAN SILVA DE CASTRO

Efeitos de *Morus nigra* L. (amoreira negra) sobre a resposta inflamatória e modulação de neutrófilos: estudos *in vivo* e *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em / /2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges
UFMA- (Orientador)

(Examinador 1)

(Examinador 2)

(Examinador 3)

(Examinador 4)

São Luís
2016

Aos meus pais, Jucileide de Maria Silva de Castro e Zeferino Santos de Castro (in memoriam), que são a base e espelho da pessoa na qual me tornei. E ao meu companheiro de hoje e sempre Leonardo Pinheiro Marques.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que de forma direta ou mesmo indiretamente está sempre guiando meus caminhos.

Ao meu orientador, professor *Dr. Antônio Carlos Romão Borges*, principalmente por ter depositado a confiança para que eu pudesse junto com ele realizar este trabalho e também por ter me dado a oportunidade de poder estar cursando este doutorado.

À *Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges*, que para mim sempre é um exemplo de professora e pesquisadora. Esteve comigo desde a época da graduação e me acompanha até hoje como discente e docente desta Universidade. Só tenho gratidão pela educação e carinho que ela sempre demonstrou por mim.

À minha amiga, professora e colega de trabalho, *Selma do Nascimento Silva*, que apesar das suas muitas atividades, da maternidade, está sempre disposta a ajudar. Obrigado pela amizade de tantos anos e pelo incentivo e sinceridade fundamental para esta caminhada de muitos tempo juntos.

Aos integrantes do Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia (LPPF) da UFMA, do qual faço parte desde a graduação, que estão sempre dispostos a ajudar e que tornaram possível a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, em especial à *Profa. Dra. Cláudia do O Pessoa* e ao amigo e colega de RENORBIO *Caio Moraes de Farias* por terem aberto as portas do laboratório, pela disposição e colaboração na realização de experimentos e pela amizade que surgiu através do convívio no laboratório.

Ao laboratório de Laboratório de Imunologia e Microbiologia das Infecções Respiratórias – LIMIR, da Universidade CEUMA, em especial ao *Prof. Dr. Lídio Gonçalves Lima Neto* e ao aluno de mestrado *Aruanã Joaquim Matheus Costa Rodrigues Pinheiro* pela ajuda e disponibilidade na realização de alguns experimentos fundamentais para esta pesquisa.

Aos meus familiares e à minha família agregada Muniz/Marques, pelo incentivo e colaboração mesmo que de forma indireta para que eu pudesse estar passo tão importante na minha vida.

À todos os meus amigos, que carrego no coração o tempo inteiro, e que mesmo neste período de ausência devido à realização desta tese, sempre demonstram palavras de carinho e incentivo. Amo muito vocês.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação do RENORBIO, que contribuíram intensamente na minha formação e na composição desta tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão - FAPEMA e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – *CNPq*, e à Universidade Federal do Maranhão pelo apoio financeiro fornecido para o desenvolvimento desta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta pesquisa. O meu muito obrigado.

"Aquele que salva uma pessoa, salva o mundo inteiro."

Oskar Schindler

RESUMO

A inflamação compreende um mecanismo biológico de defesa do organismo em resposta a lesão por agentes exógenos ou endógenos e tem por finalidade restaurar a homeostase do organismo. *Morus nigra* L., popularmente conhecida por amoreira negra, é tradicionalmente utilizada no tratamento de doenças inflamatórias. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial farmacológico do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila das folhas de *Morus nigra* e os prováveis mecanismos de ação em modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro* envolvendo neutrófilos e mediadores do processo inflamatório. Para tanto, as folhas secas foram pulverizadas e maceradas em etanol a 70%, para obtenção do extrato hidroalcoólico (EHA). O EHA foi submetido ao particionamento com hexano (FH), clorofórmio (FC) e acetato de etila (FAE). A quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais demonstraram níveis maiores destes metabólitos secundários no EHA e FAE. A análise por HPLC-UV demonstrou a presença de ácido clorogênico, rutina, quercetina e canferol no EHA e FAE de *Morus nigra*. No estudo toxicológico agudo, o tratamento de ratos machos e fêmeas com o EHA (2000 mg/kg, v.o.) em dose única, não produziu morte nem alterações no estado de consciência, motoras e do sistema nervoso central e autônomo; de peso corporal e de órgãos; consumo de água e ração; de parâmetros hematológicos e bioquímicos; quando comparados ao grupo controle. O EHA e FAE de *Morus nigra* apresentaram atividade antiedematogênica e anti-inflamatória através da redução do edema de pata de rato induzido por carragenina. O EHA e FAE diminuíram a migração de leucócitos e neutrófilos para bolsa de ar subcutânea com estimulação inflamatória por carragenina, inibindo a produção de TNF- α e mieloperoxidase. O EHA e FAE também promoveram a diminuição da migração de leucócitos e neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos estimulados com LPS, diminuindo a produção de óxido nítrico, TNF- α , IL-1 β e IL-8. Ainda, o EHA e FAE de *Morus nigra* diminuíram a quimiotaxia de neutrófilos em ensaio de câmara de Boyden modificado frente aos agentes quimiotáticos fMLP e IL-8. Em conjunto, os dados apresentados demonstram que o EHA e FAE de *Morus nigra* apresentaram atividade anti-inflamatória importante, podendo desta forma serem utilizados no tratamento de processos inflamatórios.

Palavras-chave: *Morus nigra* L., inflamação aguda, neutrófilos, anti-inflamatório.

ABSTRACT

Inflammation comprises a biological mechanism of the body's defense in response to injury by exogenous or endogenous agents and aims to restore homeostasis. *Morus nigra* L., commonly known as black mulberry tree is traditionally used to treat inflammatory diseases. Thus, the aim of this study was to evaluate the pharmacological potential of the hydroalcoholic extract and ethyl acetate fraction of *Morus nigra* leaves and the likely mechanisms of action in models of inflammation *in vivo* and *in vitro* involving neutrophils and mediators of the inflammatory process. Therefore, the dried leaves were sprayed and soaked in 70% ethanol to obtain the hydroalcoholic extract (EHA). EHA was subjected to partitioning with hexane (FH), chloroform (FC) and ethyl acetate (FAE). Quantification of phenolic and total flavonoid compounds showed higher levels of these secondary metabolites in the EHA and FAE. Analysis by HPLC-UV showed the presence of chlorogenic acid, rutin, quercetin and kaempferol in EHA and FAE of *Morus nigra*. In the acute toxicology studies, treatment of male and female rats with EHA (2000 mg / kg, o.v.) in a single dose produced no death, nor change in consciousness, motor and autonomic and central nervous system; body weight and organs; consumption of water and food; haematological and biochemical parameters; when compared to the control group. EHA and FAE of *Morus nigra* presented antiedematogenic and anti-inflammatory activity by reducing the paw edema induced by carrageenan. EHA and FAE decreased migration of leukocytes and neutrophils for subcutaneous air pouch inflammatory stimulation by carrageenan, inhibiting TNF- α production and MPO. EHA and FAE also promoted decreased migration of leukocytes and neutrophils into the peritoneal cavity of rats stimulated with LPS, decreasing the production of NO, TNF- α , IL-1 β and IL-8. Further, the EHA and FAE of *Morus nigra* decreased neutrophils chemotaxis in Boyden chamber assay modified front of chemotactic agents fMLP and IL-8. Together the data presented demonstrate that the EHA and FAE of *Morus nigra* had significant anti-inflammatory activity and can thus be used to treat inflammatory processes.

Keywords: *Morus nigra* L., acute inflammation, rats, neutrophils, anti-inflammation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 5-LO - 5-lipoxigenase
- 12-LO - 12-lipoxigenase
- 15-LO - 15-lipoxigenase
- AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais
- CAMs - Moléculas de adesão
- CHP - Complexo de histocompatibilidade principal
- COX - Ciclooxigenase
- COX- 1 - Ciclooxigenase isoforma 1
- COX- 2 - Ciclooxigenase isoforma 2
- DAMPs - Padrões moleculares associados ao dano celular
- eNOS - Óxido nítrico sintase isoforma endotelial
- fMLP - N-formil Metionil-Leucil-Fenilalanina
- G-CSF - Fator de estimulação de colônia de granulócitos
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- HClO - Ácido hipocloroso
- ICAM-1 - Molécula de adesão intracelular 1
- IFN- γ - Interferon gama
- IL - Interleucina
- IL-1 - Interleucina-1
- IL-1 β - Interleucina-1 β
- IL-6 - Interleucina-6
- IL-8 - Interleucina-8
- IL-10 - Interleucina-10
- iNOS - Óxido nítrico sintase isoforma induzida
- LOS - Lipooxigenase
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LT - Leucotrieno
- LTB₄ - Leucotrieno B₄
- LX - Lipoxina
- Mac-1 - Antígeno de macrófago 1

MMR - Receptor de manose de macrófago
MPO - Mieloperoxidase
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NF-kB - Fator de transcrição nuclear kb
NLR - Receptore do tipo NOD-like
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
nNOS - Óxido nítrico sintase isoforma neural
NOx - Nitrito/nitrato
PAF - Fator de ativação plaquetario
PAMPs - Padrões moleculares associados aos patógenos
PCs - Prostaciclina
PECAM-1 - Molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1
PGs - Prostaglandinas
PGE2 - Prostaglandina E2
PLA2 - Fosfolipases A2
PMN - Polimorfonucleares
PSGL1 - Ligante de glicoproteína da P-selectina 1
ROS - Espécies reativas de oxigênio
TLR - Toll like receptor
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (α)
TX - Tromboxanos
VCAM 1 - Molécula de adesão vascular 1
VLA-4 - β 1 integrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	INFLAMAÇÃO	16
2.2	INFLAMAÇÃO AGUDA	18
2.3	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	19
2.3.1	Aminas vasoativas	19
2.3.2	Cininas	19
2.3.3	Metabólitos do ácido araquidônico.....	20
2.3.4	Citocinas	22
2.3.5	Óxido nítrico	24
2.3.6	Mieloperoxidase	25
2.4	NEUTRÓFILOS	27
2.5	MODELOS EXPERIMENTAIS	30
2.6	FARMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E BIOPROSPECÇÃO	33
2.7	<i>Morus nigra</i> Linnaeus	35
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.2.1	Capítulo I	39
3.2.2	Capítulo II	39
3.2.3	Capítulo III	40
	REFERÊNCIAS	41
4	CAPÍTULO I	
	Artigo a ser submetido ao periódico <i>Food and Chemical Toxicology</i> : “Acute toxicity of <i>Morus nigra</i> L. and their effects on inflammation in rats”	50

5	CAPÍTULO II	
	Artigo a ser submetido ao periódico <i>International Immunopharmacology</i> : “Efeitos de <i>Morus nigra</i> L. (amoreira negra) sob a migração de neutrófilos em modelo de inflamação aguda: estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> ”	79
6	CAPÍTULO III	
	Patente depositada: “Formulações de uso oral do extrato bruto e fração das folhas de <i>Morus nigra</i> L. com propriedades anti-inflamatórias”	109
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
	ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é caracterizada por uma resposta fisiológica do organismo à agressão tecidual e tem por finalidade combater os agentes nocivos, de natureza infecciosa ou não. O processo inflamatório geralmente é uma resposta benéfica e é essencial para manter a homeostase. No entanto, a resposta inflamatória pode ser prejudicial para as células quando ela se torna exacerbada (CHOVATYA e MEDZHITOV, 2014; AMULIC et al., 2012). Macroscopicamente, a inflamação aguda caracteriza-se pela presença de dor, rubor, calor e edema, devido a alterações vasculares coordenadas por mediadores inflamatórios. Tais alterações englobam a vasodilatação, a expressão de moléculas de superfície pelas células endoteliais dos vasos e o aumento da permeabilidade vascular (DORWARD et al., 2012).

O processo de elaboração da resposta imunológica inclui, dentre outros fatores, o recrutamento de leucócitos. Dentre as populações de células leucocitárias, a primeira população a ser recrutada para o sítio inflamatório é a de neutrófilos. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares e são considerados um dos principais representantes dos fagócitos durante processos inflamatórios agudos. Eles exercem papel crucial na primeira linha de defesa contra bactérias, fungos e protozoários invasores, além de reações autoimunes (WILLIAMS et al., 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) representam uma classe importante de compostos com aplicações terapêuticas que têm sido utilizados por muitos anos. No entanto, de acordo com a literatura disponível sobre o tema, são relatados vários efeitos adversos como úlceras, osteoporose, falência renal e aumento dos riscos de doenças cardiovasculares associados a drogas anti-inflamatórias não esteroidais convencionais (MCGETTIGAN e HENRY, 2011; CONAGHAN, 2012).

Logo, devido o grande impacto social e econômico das doenças inflamatórias, os fármacos anti-inflamatórios atuais têm várias limitações referentes a sua eficácia, efetividade, segurança e custo de produção. Portanto, esforços para desenvolver novos e seguros agentes anti-inflamatórios são necessários, onde a migração de neutrófilos e a ação de mediadores envolvidos na inflamação são potenciais alvos

terapêuticos. Assim, o desenvolvimento de compostos anti-inflamatórios que possuam menos efeitos colaterais ainda permanece um desafio para a comunidade científica. Por isso, a identificação de novas drogas que possam promover a resolução da inflamação e que sejam eficientes e bem toleradas pelo organismo é de importância relevante.

Diversos fatores têm incentivado a busca por novas drogas de origem vegetal para as mais diversas patologias, dentre elas os processo inflamatórios. Dentro destes fatores podemos destacar a crise econômica, o alto custo dos medicamentos industrializados, a ineficiência da medicina convencional no tratamento de algumas doenças, uso abusivo e/ou incorreto de fármacos sintéticos podendo gerar sérios efeitos colaterais e ainda o difícil acesso da população à assistência médica. Desta forma tem crescido a pesquisa de drogas mais eficazes e de maior acesso à população, além de estudos que visem preservar a biodiversidade, agregando valor às espécies. Dentro desse contexto deve-se enfatizar a vasta diversidade florística brasileira e a enorme potencialidade farmacológica que a mesma oferece.

No Brasil, as plantas pertencentes ao gênero *Morus* estão listadas pelo governo como de interesse para a pesquisa por serem amplamente usadas na medicina popular e pelo seu potencial fitoterápico (PORTAL DA SAÚDE, 2013). Sendo assim a validação científica das amoras é um passo necessário, impulsionada pelo uso popular já existente e bastante difundido desta planta.

Morus nigra L., popularmente conhecida por amoreira preta, além dos valores nutricionais, contém vários compostos com ação terapêutica, não somente nos frutos, mas também em outras partes da planta. Várias pesquisas já demonstraram que extratos à partir dos frutos, raízes ou folhas de *Morus nigra* apresentam atividade antioxidante (OZGEN et al., 2009; MAZIMBA et al., 2011; PEREZ-GREGORIO et al., 2011; HUANG et al., 2013; ABBAS, 2014; FENG, 2015; TURGUT, 2015). No que se refere à atividade anti-inflamatória, HASSIMOTTO (2013) e HUANG (2013) demonstraram esta atividade nos frutos, enquanto que ZELOVA (2015) encontrou um grande potencial anti-inflamatório nos extratos das raízes.

Portanto, devido o uso popular da espécie vegetal *Morus nigra* na inflamação e a necessidade de validação da atividade anti-inflamatória das folhas de *Morus*

nigra, este estudo propôs avaliar as ações dos extratos em protocolos de inflamação *in vivo* e *in vitro*, além de explorar possíveis mecanismos de ação farmacológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação compreende um mecanismo biológico complexo e altamente regulado de defesa do organismo em resposta a lesão por agentes exógenos ou endógenos; e tem por finalidade eliminar o agente nocivo, restituir o tecido lesado e restaurar a homeostase do organismo (MEDZHITOV, 2008; NEWTON e DIXIT, 2012; CHOVIATYA e MEDZHITOV, 2014).

Em geral, o processo inflamatório segue uma via particular que consiste de indutores, sensores, mediadores e efetores (Figura 1). Os indutores, que podem ser classificados como exógenos e endógenos, são os responsáveis por iniciar a resposta inflamatória. Eles ativam sensores especializados, que, por sua vez, aumentam a produção de grupos de mediadores específicos. Estes mediadores alteram o estado funcional de órgãos, tecidos e células, que são os efetores da inflamação. A alteração funcional dos efetores permite que estes se adaptem de forma específica às condições estabelecidas por um determinado indutor (MEDZHITOV, 2010).

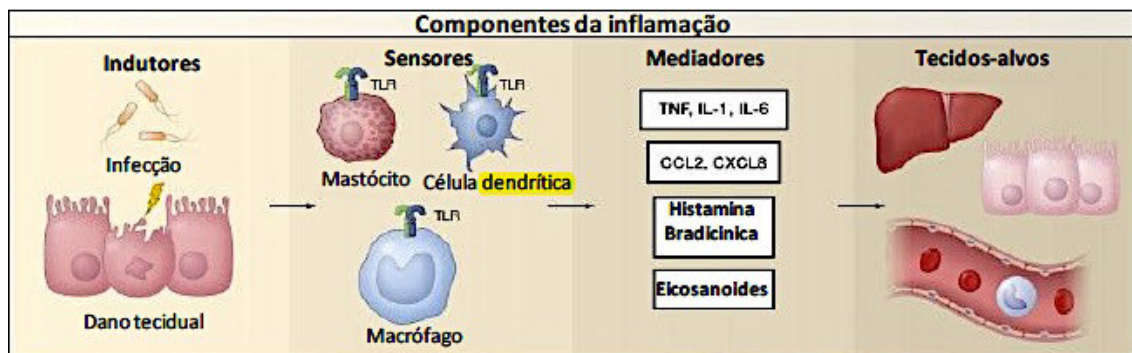


Figura 1. Componentes da inflamação. A via inflamatória consiste de indutores, sensores, mediadores, e os tecidos-alvos. Indutores iniciam a resposta inflamatória e são detectados por sensores. Sensores, como os receptores do grupo Toll-like (TLRs), são expressos em células como macrófagos teciduais residentes, células dendríticas, e mastócitos. Elas induzem a produção de mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, histamina, bradicinina e eicosanoides. Estes mediadores inflamatórios atuam em vários tecidos-alvos envolvidos na resposta inflamatória. (Fonte: Adaptado de Medzhitov, 2010).

A reação inflamatória pode ser desencadeada por diversos estímulos como: infecções bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias ou por toxinas microbianas; reações autoimunes ou de hipersensibilidade, em que o sistema imunitário destrói os próprios tecidos do indivíduo; necrose tecidual em decorrência de isquemia, trauma ou lesões por agentes físicos e químicos; hipóxia, produzida pelas células privadas de oxigênio que possuem a capacidade de ativar a transcrição de muitos genes envolvidos na inflamação, e, finalmente, outros estímulos como corpos estranhos, que possuem a capacidade de causar lesão tecidual traumática ou de transportar micro-organismos (KUMAR et al., 2013).

Didaticamente, a resposta inflamatória pode ser dividida em aguda ou crônica, divisão esta baseada na duração e características patológicas da reação inflamatória. A inflamação aguda trata-se de uma resposta rápida (minutos, horas e/ou dias), normalmente benéfica para o hospedeiro, que envolve eventos vasculares e celulares, caracterizados por vasodilatação, exsudação de fluido ou exsudato rico em proteínas de fase aguda com formação de edema, migração de células, primariamente neutrófilos, para o sítio lesado. Se a inflamação aguda é bem sucedida, restaurando a arquitetura do tecido normal, a homeostasia é restabelecida (LAWRENCE, 2002; BUCKLEY et al., 2015).

No entanto, se há falha na eliminação do agente indutor, ou um desequilíbrio de mediadores pró e anti-inflamatórios, a resposta inflamatória adquire novos aspectos, intensificando-se e podendo tornar-se crônica (GRIVENNIKOV et al., 2010). Assim, caracteriza-se uma inflamação crônica que possui maior duração (semanas, meses e/ou anos) e está associada à proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual. Tem sido relatado que algumas inflamações crônicas podem predispor o hospedeiro a várias doenças crônicas não diretamente relacionadas, incluindo o câncer, artrite reumatoide, asma, hipertensão e obesidade (REUTER et al., 2010; NATHAN e DING, 2010; RICKLIN e LAMBRIS, 2013; LYMAN et al., 2014). Para evitar a progressão da inflamação para o processo crônico é necessário limitá-lo desde a fase aguda com a redução do infiltrado celular e liberação e ação de seus produtos potencialmente tóxicos (REUTER et al., 2010; GOMEZ-MUÑOZ, 2013).

2.2 INFLAMAÇÃO AGUDA

Já são bem descritos na literatura os sinais clínicos clássicos desencadeados pelo processo inflamatório agudo: dor, rubor, calor, edema, e eventualmente perda função (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; DORWARD et al., 2012). A cascata de reações que inicia a inflamação promove vasodilatação, que ocorre após um breve período inicial de vasoconstrição e leva a um aumento da perfusão sanguínea do tecido (calor e rubor). O aumento da permeabilidade vascular, em capilares e vênulas, permitindo a infiltração de células inflamatórias tais como os leucócitos, inicialmente os neutrófilos, no tecido lesionado, os quais são atraídos pela ação de diferentes mediadores com a função quimiotática (PHILLIPSON; KUBES, 2011).

Durante o processo inflamatório agudo, em que a migração de leucócitos para o local da inflamação é facilitada pelo aumento da síntese de moléculas de adesão nos vasos sanguíneos, ocorre a passagem de proteínas plasmáticas para o local onde foi iniciada a resposta inflamatória, dando origem ao edema, que é resultante do acúmulo de exsudato composto por proteínas plasmáticas, leucócitos e mediadores inflamatórios (POBER e SESSA, 2007).

Além disso, a ação de compostos endógenos, produzidos em resposta ao estímulo inicial, como as citocinas, ou mesmo compostos exógenos, por exemplo, o componente da parede de bactérias gram-negativas, lipopolissacarídeo (LPS), os quais atuam sobre os mecanismos hipotalâmicos reguladores da temperatura corporal, podem desencadear a febre (GRIFFIN et al., 2012).

A produção exacerbada de mediadores pró-inflamatórios no local da lesão e a incapacidade de eliminar o patógeno levam à formação de granulomas e podem induzir danos irreparáveis no tecido. Ainda, os radicais livres e proteases liberados pelas células ativadas no local inflamado podem causar mais dano ao hospedeiro do que ao patógeno. Dependendo da extensão do dano, a reparação só pode ser feita por fibrose, levando a uma perda de função tecidual (SERHAN e SAVILL, 2005).

2.3 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória são decorrentes da ação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo lesivo, denominadas mediadores químicos da inflamação. Estes atuam de maneira inter-relacionada, nos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória (MAJNO e JORIS, 2004; RANKIN, 2004).

Provenientes do plasma ou secretados por células ativadas, os mediadores inflamatórios são liberados concomitante ou sequencialmente nos sítios da lesão, em resposta a um fator etiológico. Vários mediadores inflamatórios como os componentes do sistema complemento, do sistema da coagulação, cininas ou ainda originados de células e de tecidos, tais como a histamina, a serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetário (PAF), óxido nítrico (NO) e interleucinas atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2008).

2.3.1 Aminas vasoativas

Histamina e serotonina, aminas vasoativas, são mediadores pré-formados, armazenados em grânulos celulares, e estão entre os primeiros a serem liberados durante a inflamação. Estão envolvidas no processo doloroso da inflamação, além de formação de edema e prurido, uma vez que participam dos mecanismos causadores da vasoconstrição inicial e vasodilatação subsequente (KUMAR et al., 2010; YAKUGAKU et al., 2011; SEPIASHVILI et al., 2013).

2.3.2 Cininas

A resposta inflamatória parece ser, na verdade, parcialmente mediada por componentes (sistemas enzimáticos) presentes nos fluidos corporais como o sistema calicreína-cininas. As cininas são peptídeos formados por proteases conhecidas como calicreínas (tissular e plasmática) a partir do precursor cininogênio. As cininas, representadas pela bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lysbradicinina são

peptídeos vasoativos potentes liberados a partir de substratos proteicos, denominados cininogênios, pela ação de certas proteases, conhecidas genericamente como cininogenases. Estes peptídeos medeiam a inflamação através da ativação de receptores de bradicinina B1 e B2. Os receptores B1 são escassamente expressos em tecidos não inflamados, mas sua expressão pode ser aumentada sob condições particulares, como injúria e infecção. Por outro lado, os receptores B2 que são expressos constitutivamente e distribuídos em diversos tecidos, ativam a fosfolipase C, com consequente hidrólise do fosfato de inositol e produção de diacilglicerol, modulando a expressão e ativação de receptores vaniloides que estão relacionados com sensações nociceptivas e de calor (ANTONI, 2011; DE FALCO et al., 2013).

2.3.3 Metabólitos do ácido araquidônico

O metabólitos do ácido araquidônico (Figura 2), também conhecidos como eicosanoides, são derivados de fosfolipídios presentes nas membranas celulares. Quando as células são ativadas por diferentes estímulos, mecânicos, químicos ou físicos, os fosfolipídios de membrana sofrem ação de fosfolipases celulares, como por exemplo, a fosfolipase A2, liberando o ácido araquidônico (EL ALWANI et al., 2006; HARIZI et al., 2008). Este por sua vez, pode ser metabolizado enzimaticamente por por ciclooxigenases (COX1 e COX2), que geram prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PCs) e tromboxanos (TX), ou por lipoxigenases (LOS), que geram leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) (GDEK-MICHALSKA et al., 2013; SIVAMANI et al., 2014).

A via das ciclooxigenases é composta por duas isoformas: COX-1, que é uma proteína expressa constitutivamente por uma variedade de células e tecidos, e sua atividade predomina em condições fisiológicas, agindo como citoprotetora gástrica e mantenedora da homeostase renal e plaquetária. A expressão de COX-2 é induzida por estímulos extra e intracelulares, como por exemplo citocinas como IL-1 e TNF- α (GDEK-MICHALSKA et al., 2013).

As prostaglandinas são subdivididas em subclasses, das quais D, E, F, G, H e I são as mais importantes na inflamação. A COX catalisa a conversão do ácido

araquidônico a prostaglandina H₂, que é um precursor de mediadores com atividades biológicas como a prostaglandina E₂ (PGE₂) (JEON et al., 2012). Na inflamação, a PGE₂ apresenta interesse particular por estar envolvida em todos os processos que levam aos sinais clássicos da inflamação. Uma das prostaglandinas mais abundantes produzidas pelo organismo, largamente caracterizada em espécies animais como mediadora importante na regulação da respostas imunes, pressão sanguínea, integridade gastrointestinal e fertilidade. A desregulação na síntese ou degradação da PGE₂ tem sido destacada em várias condições patológicas. (DUBOIS et al., 1998; SEREZANI et al., 2007).

As LOS são mais numerosas e entre estas podemos destacar as 5-lipoxigenase (5-LO), 12-lipoxigenase (12-LO) e a 15-lipoxigenase (15-LO). Esses eicosanoides gerados pelas diferentes vias ligam-se aos receptores acoplados a proteína-G presentes nas membranas celulares e ativam uma cascata de sinalização intracelular, mediando assim, as diferentes fases da inflamação (HARIZI et al., 2008). Os leucotrienos são predominantemente produzidos por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. O leucotrieno B₄ (LTB₄) é o principal envolvido no processo inflamatório, sendo um potente regulador da quimiotaxia dos neutrófilos e adesão dos leucócitos às células endoteliais (PETERS-GOLDEN e HENDERSON, 2007; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Já as lipoxinas, atuam como importantes agentes anti-inflamatórios contribuindo para a resolução da resposta inflamatória, envolvendo a interação de diferentes tipos celulares, tais como leucócitos, plaquetas e endotélio vascular (SERHAN, 2005).

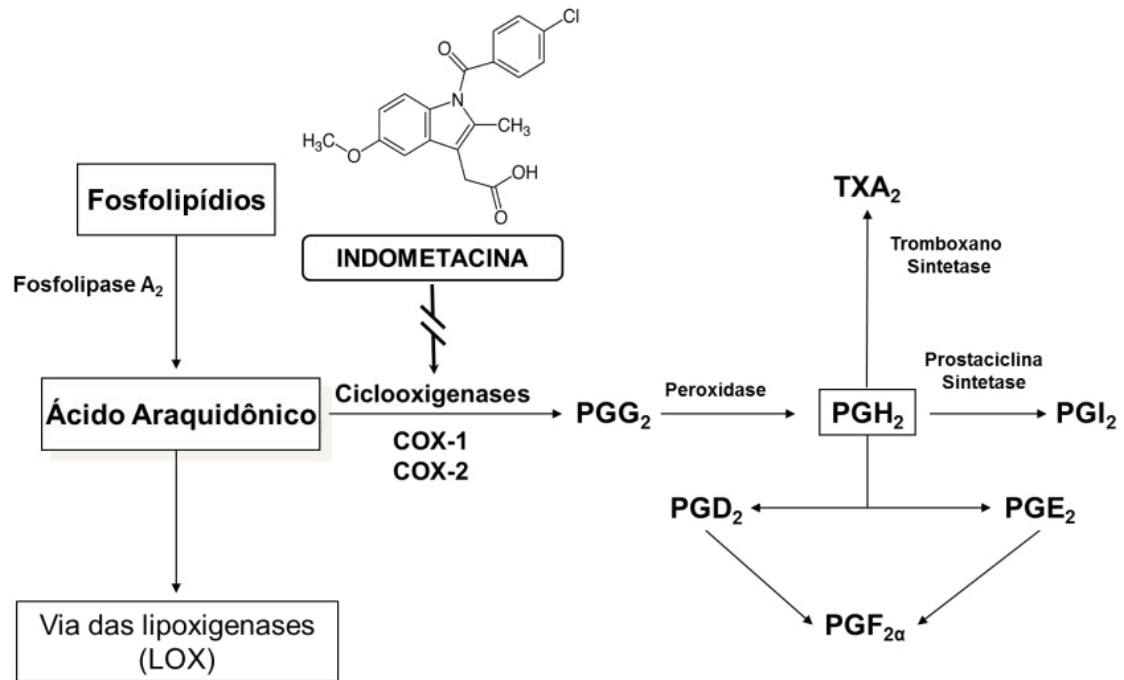


Figura 2. Via do ácido araquidônico e Mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs). COX = ciclooxigenase; LOX = lipoxigenase; PGD₂ = prostaglandina D₂; PGE₂ = prostaglandina E₂; PGF₂ = prostaglandina F₂; PGG₂ = prostaglandina G₂; PGH₂ = prostaglandina H₂; PGI₂ = prostaglandina I₂; TXA₂ = tromboxano A₂. Fonte: Adaptado de Dannhardt e Kiefer (2001).

2.3.4 Citocinas

As citocinas são um grupo diversificado de peptídeos e glicopeptídeos de baixo peso molecular, que coordenam e ativam as respostas das células do sistema imune, além de apresentarem importante papel regulador sobre o início, manutenção e término das reações inflamatórias. São secretadas por diferentes células em resposta a uma variedade de estímulos e induzem efeitos característicos sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função das células alvo (CAVAILLON, 2001; ABBAS et al., 2011; HELED et al., 2013). Uma citocina pode induzir a expressão de outras citocinas ou mediadores, formando assim, uma cascata de efeitos biológicos que amplificam a resposta inflamatória e influenciam a sua evolução. Desta forma, há uma necessidade de equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias para o desenvolvimento de uma resposta imune efetora e bem regulada, pois o excesso da produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou a deficiência de citocinas anti-inflamatórias pode gerar um desequilíbrio na resposta imunológica (ASTRY et al., 2011; KANG et al., 2015).

As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons, interleucinas (IL), fator estimulador de colônias, fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento.

O IFN- γ é um potente ativador de neutrófilos, promovendo a apresentação de antígenos e a formação de espécies reativas de oxigênio. O IFN- γ induz também a expressão de moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) no endotélio aumentando o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório. Além disso, o IFN- γ também pode ser a base de doenças autoimunes devido sua capacidade de induzir a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) em células que normalmente não o expressam (SCHURGERS et al., 2011).

Quando receptores do tipo NOD-like (NLR) detectam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) ou sinais de perigo no citoplasma de células hospedeiras induzem a produção e maturação de IL-1 β que estão relacionadas com quadros de inflamação aguda e crônica e podem levar a um tipo de morte celular chamada piroptose. Sabe-se que a produção dessas citocinas é induzida por ativação de um complexo proteico intracelular denominado inflamassomo, que ativa a caspase-1, que por sua vez promove a maturação e liberação de IL-1 β , que, então, deixam a célula e desempenham diversas funções pró-inflamatórias (BROZ e MONACK, 2011; SAID-SADIER e OJCIUS, 2012)

O TNF- α e a IL-1 β são encontrados juntos em inúmeros cenários inflamatórios e possuem efeitos fisiológicos essencialmente idênticos. São produzidos principalmente por fagócitos mononucleares e polimorfonucleares ativados e exercem potentes efeitos inflamatórios locais e sistêmicos (REN e TORRES, 2009). Diferentemente do TNF- α , a IL-1 β pode ser produzida por outras células (endoteliais, neutrófilos, linfócitos, células Natural Killer e mastócitos) em resposta a diversos estímulos inflamatórios (HASSELBALCH, 2013). TNF- α e IL-1 β induzem expressão de moléculas de adesão no endotélio ICAM-1 e VCAM-1; síntese de mediadores químicos (incluindo outras citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanoides e NO); ativam neutrófilos e fagócitos mononucleares; induzem a produção do fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (MAMBOLE et al., 2010); aumentam a permeabilidade vascular; promovem a

liberação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) no citosol. O NF- κ B regula a síntese de muitas proteínas que funcionam em vias inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , INF- γ e COXs (EL ALWANI et al., 2006; HASSELBALCH, 2013).

A IL-6 é outra importante citocina em respostas inflamatórias agudas que também apresenta efeitos locais e sistêmicos; é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e outras células em resposta aos PAMPs, IL-1 β e TNF- α (ABBAS et al., 2011; YOSHIDA e TANAKA, 2014). Entretanto, enquanto o TNF- α e a IL-1 β induzem a produção de IL-6, esta última inibe a síntese dos primeiros, produzindo desta forma, um efeito antiinflamatório por meio de retroalimentação (feedback) negativo (EL ALWANI et al., 2006).

As quimiocinas são um grupo de proteínas dentro da família das citocinas cuja função genérica é induzir a migração celular. Essas "citocinas quimiotáticas" são produzidas pelos leucócitos e outras células e estão envolvidas na quimiotaxia de leucócitos e tráfego de células do sistema imunológico para locais em todo o corpo. Quimiocinas inflamatórias, são produzidas durante as infecções ou como uma resposta a um estímulo inflamatório e facilitam uma resposta imune por guiar as células do sistema imune inato e adaptativo (ABBAS et al., 2011; RAMESH et al., 2013). Dentre as substâncias quimiotáticas para neutrófilos destaca-se interleucina-8 (IL-8). Esta, liga-se a receptores de membrana, em geral, receptores transmembranas ligados à proteína G (STILLIE et al., 2009). A ativação destes receptores leva a sinalizações intracelulares complexas, que desencadeiam não somente a migração orientada de neutrófilos, mas também a desgranulação, a secreção de mediadores inflamatórios e a ativação do burst respiratório (JANETOPOULOS e FIRTEL, 2008).

2.3.5 Óxido nítrico

Outro importante mediador expresso em grandes concentrações na resposta inflamatória é o óxido nítrico (NO). É um gás solúvel produzido pelas células endoteliais, neutrófilos e alguns neurônios e é produzido a partir da L-arginina pela ação da NO sintase (NOS). Três isoformas da NOS foram identificadas: as NOS

endotelial (eNOS) e neural (nNOS), que são produzidas de forma constitutiva e suas expressões aumentam com o efluxo de cálcio, produzem pequenas quantidades de NO, que atua como vasodilatador e neurotransmissor, respectivamente. Em adição, estudos indicam que o aumento na produção de NO, devido a indução da expressão de NOS induzível (iNOS) por citocinas inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6) e lipopolissacarídeo (LPS), é um importante instrumento da fisiopatologia da inflamação (PACHER et al., 2007; LOSCALZO, 2013).

O NO também regula a atividade dos neutrófilos. Estudos in vitro demonstraram que o NO inibe a degranulação e a formação de fatores quimiotáticos e de espécies reativas em neutrófilos ativados. O NO também regula o recrutamento dessas células para o foco inflamatório por meio da diminuição do rolamento e da adesão no endotélio vascular e da inibição da produção das moléculas de adesão (KOSONEN et al., 2000; LINDEMANN et al., 2000).

Após ativação, os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) em um processo denominado explosão respiratória. O complexo enzimático do NADPH oxidase se forma na membrana plasmática e na membrana do fagossomo dando início a cascata que reduz o oxigênio molecular a superóxido. Este pode levar a formação de peróxido de hidrogênio, pode formar peroxinitrito em uma reação com óxido nítrico e produzir outras espécies reativas quando em contato com mieloperoxidase (MPO) liberada dos grânulos dos neutrófilos (WINTERBOURN, 2008).

2.3.6 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é membro da família das hemeperoxidases, enzimas que utilizam íon ferro em suas reações de peroxidação, e funciona como um componente fundamental na maquinaria efetora dos neutrófilos durante a inflamação. Esta enzima representa cerca de 5% do peso seco de neutrófilos, sendo a maior constituinte dos grânulos primários, podendo também ser encontrada em menores quantidades em monócitos e macrófagos.

A ativação de neutrófilos promove aumento expressivo da atividade da MPO, promovendo desta forma a conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em ácido

hipocloroso (HClO), um composto com ação antimicrobiana e importante durante a resposta imune inata (Figura 3). Porém, a liberação do HClO e as demais espécies reativas, em altas concentrações, exercem ações citotóxicas e conseqüentemente geram lesões teciduais (PROKOPOWICZ et al., 2012). Por outro lado, o papel da MPO também tem sido associado a uma série de eventos celulares, como a quimiotaxia de neutrófilos, demonstrado, em estudos, pela diminuição do influxo dessas células, no tecido pulmonar de camundongos knockout para MPO, após a estimulação com lipopolissacarídeo (LPS) (HAEGENS et al., 2009).

A MPO quando presente no local da inflamação pode interagir com os receptores de manose de macrófagos (MMR), o que leva a liberação, por estas células, das citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 potencializando assim o recrutamento de neutrófilos pra o local da inflamação (KUMAR e SHARMA, 2010).

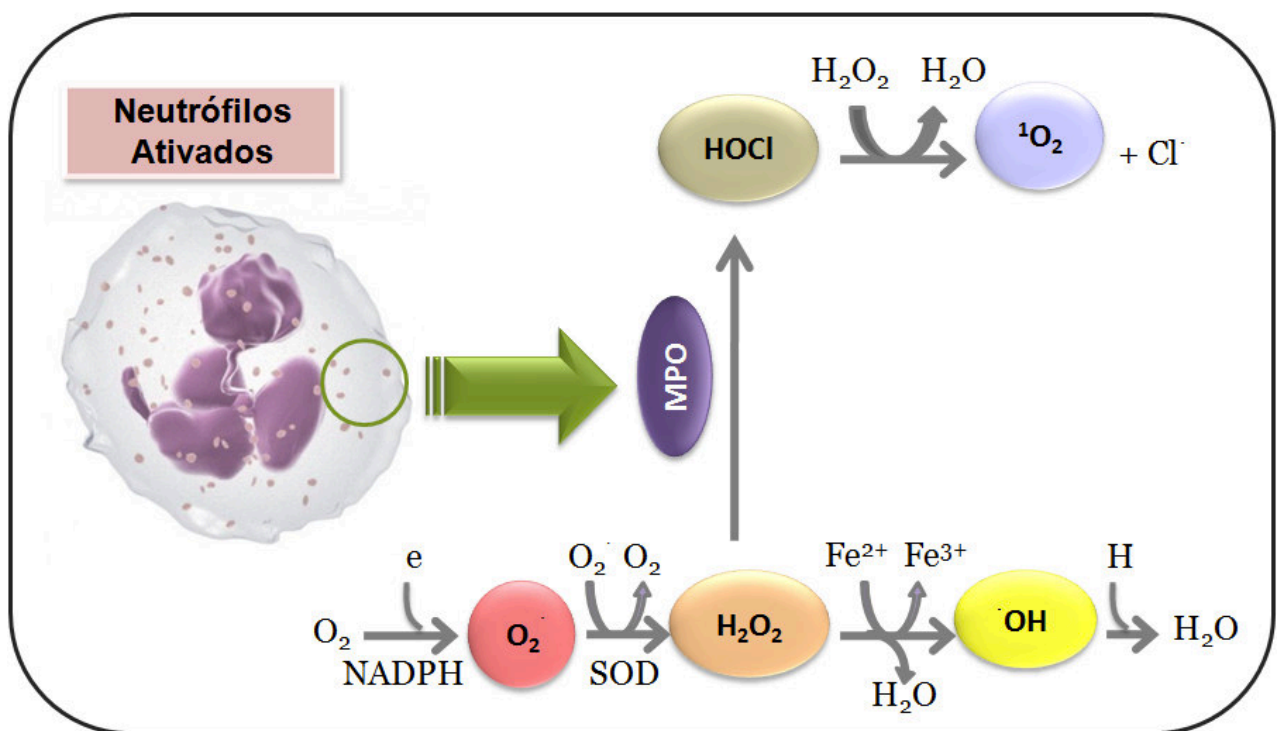


Figura 3 – Mecanismo de ação da enzima mieloperoxidase (MPO) na resposta inflamatória. A MPO é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HClO), um composto com ação antimicrobiana e importante durante a resposta imune inata. Adaptado de Prokopowicz e colaboradores (2012).

2.4 NEUTRÓFILOS

Dentre as células envolvidas no processo inflamatório, os neutrófilos compõem o sistema imune inato, desempenhando um papel essencial em processos inflamatórios agudos e na defesa do organismo contra patógenos (MANTOVANI et al., 2011; BARDOEL et al., 2014). Desta forma, os neutrófilos exercem a linha de frente de defesa do hospedeiro e são os primeiros e mais numerosos leucócitos a alcançarem o sítio de lesão e exercerem suas funções fagocíticas e secretoras importantes para a evolução do processo (PETERSEN et al., 2013).

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares, provenientes da medula óssea, originados a partir de células precursoras mieloides, e sua produção é induzida pelo fator de estimulação de colônia de granulócitos (G-CSF, Granulocyte-colony stimulating factor). A medula óssea não é apenas o local de produção de neutrófilos, mas também de grande armazenamento celular com aproximadamente 20 vezes mais a quantidade dessas células presentes do que na circulação (BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Os neutrófilos são células formadas por 2 a 5 lóbulos ligados entre si por finas pontes de cromatina e representam cerca de 50 a 60% dos leucócitos circulantes totais em humanos. São células de meia-vida curta, permanecendo viáveis no sangue periférico por aproximadamente 6-8 horas. Em um adulto saudável, estima-se que a produção diária de neutrófilos é de aproximadamente 10^{13} células, e pode aumentar consideravelmente durante processos infecciosos e algumas doenças (SUMMERS, 2010; SADIK et al., 2011).

Em condições normais, os leucócitos circulam na parte central do vaso sanguíneo e, na vigência de um estímulo inflamatório, são recrutados para o foco da lesão. O processo de extravasamento de leucócitos a partir das vênulas pós-capilares para um tecido infectado, inflamado ou lesado, é mediado através de processos moleculares, mecânicos e químicos sequenciados temporalmente, e em geral, bastante semelhantes para as diferentes subpopulações de leucócitos, incluindo os neutrófilos (GANE e STOCKLEY, 2011; CHAVAKIS, 2012; PADMANABHAN e GONZALEZ, 2012).

O processo de migração do neutrófilo (Figura 4) da corrente sanguínea para a área inflamada, conhecido como diapedese, requer regulação temporal e espacial de vias de sinalização intracelular, que permitem aos neutrófilos detectar substâncias quimioatraentes e migrarem em direção a estes estímulos (quimiotaxia). Tais substâncias podem ser produzidas pelo hospedeiro ou pelo patógeno invasor. Além disso, este processo envolve uma complexa interação entre o neutrófilo e o endotélio vascular adjacente (DIMASI et al., 2013). Por sua vez, as citocinas também agem nas células endoteliais próximas à região com processo inflamatório induzindo um aumento da expressão de moléculas de adesão (CAMs), deixando esse epitélio em um estado de ativação. Logo, a passagem dos neutrófilos do lúmen vascular para o tecido é guiada por interações adesivas específicas, dependentes da existência de diferentes famílias de moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas) e seus respectivos receptores nos leucócitos e nas células endoteliais (MCDONALD et al., 2010; SUNDD et al., 2011).

A primeira classe de moléculas de adesão envolvida neste processo pertence à família das selectinas (P; E; e L - Selectinas). A interação entre as selectinas e seus ligantes medeia a captura e o rolamento (rolling) dos neutrófilos sobre o endotélio inflamado, o que permite que os neutrófilos deslizem sobre o endotélio. Como estas interações são de baixa afinidade, elas são rompidas facilmente pela força de cisalhamento do fluxo sanguíneo, assim, os neutrófilos se ligam e se desprendem repetidamente e, conseqüentemente, rolam ao longo da superfície endotelial (CHAVAKIS et al., 2009; ZARBOCK et al., 2011).

Após poucos minutos de estímulo por um agente inflamatório, as moléculas de P-selectina, que são pré-armazenadas nos corpos de Weibel-Palade, são redistribuídas para a superfície da célula endotelial, bem como a E-selectina é sintetizada no período máximo de 90 minutos e expressa também na superfície endotelial. Estas duas selectinas contribuem para rolamento dos neutrófilos sobre a superfície endotelial via ligação com seus ligantes glicosilados presentes na membrana dos neutrófilos, incluindo o ligante de glicoproteína da P-selectina 1 (PSGL1), levando à captura de neutrófilos circulantes livres na superfície endotelial e seu subsequente rolamento ao longo do vaso em direção do fluxo sanguíneo. O rolamento lento exige rápida formação e quebra das ligações adesivas entre P-selectina e PSGL1 (SUNDD et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011; KOLACZKOWSKA

e KUBES, 2013). A P-selectina pode ser regulada transcricionalmente e sua expressão induzida por LPS ou citocinas como TNF- α e IL-1 β . A expressão de E-selectina é dependente de síntese proteica após estimulação por mediadores específicos e é induzida na célula endotelial por citocinas como IL-1 β ou TNF- α , sendo sua expressão máxima após 4 horas de ativação, com redução de expressão a níveis basais após 24 horas (SMITH, 2007).

A expressão das integrinas medeia a firme adesão dos neutrófilos ao endotélio e são capazes de formar ligações entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de neutrófilos, promovendo uma mudança conformacional em proteínas da família das integrinas, aumentando sua afinidade por moléculas de adesão intercelular (ICAMs) situadas no endotélio. A família das integrinas possui duas subunidades α e β , mas existem 16 tipos de subunidades α e 8 tipos de subunidades β constituindo mais de 20 receptores conhecidos. Na adesão firme dos neutrófilos ao endotélio há a participação de duas integrinas: antígeno de macrófago 1 (Mac-1; α M β 2; CD11b/CD18) e antígeno associado à função dos linfócitos 1 (LFA-1; α L β 2; CD11a/CD18). Os neutrófilos também podem expressar β 1 integrina (VLA-4) e ligar-se à imunoglobulina VCAM-1 do endotélio (ALBELDA et al., 1994; BURG e PILLINGER, 2001; SEELY et al., 2003; LANGER e CHAVAKIS, 2009).

No que se refere às moléculas de adesão, podemos destacar a superfamília das imunoglobulinas: ICAM-1 e/ou 2, VCAM-1, e PECAM-1. As expressões de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente são baixas, mas suas expressões são aumentadas na presença de estímulo inflamatório, diferentemente das expressões constitutivas de ICAM-2 e PECAM-1 (HUO; LEY, 2001). Posteriormente à adesão firme, a migração de neutrófilos entre as células endoteliais é mediada pela molécula de adesão de plaquetas e células endoteliais 1 (PECAM-1; CD31) e ICAMs (BURG, 2001). Os neutrófilos se aplainam sobre o endotélio, resultando em um aumento do contato e formação de um grande número de pontes de ligação pelas integrinas. A seguir, os neutrófilos sofrem alterações na sua forma, permitindo que eles passem entre as junções interendoteliais, migrando para o espaço tissular extra vascular e para os sítios inflamatórios (ZEN e PARKOS, 2003).

Uma vez na matriz extravascular, os neutrófilos migram, orientadamente, em direção ao foco de lesão, respondendo a um gradiente de moléculas dispersas ou ligadas à matriz extravascular. Como citado anteriormente, dentre as substâncias

quimiotáticas para neutrófilos se destacam o PAF, peptídeos formilados constituintes da parede bacteriana, como o fMLP, fator C5a do sistema complemento, o LTB4 e a IL-8. (JANETOPOULOS e FIRTEL, 2008; HICKEY e KUBES, 2009).

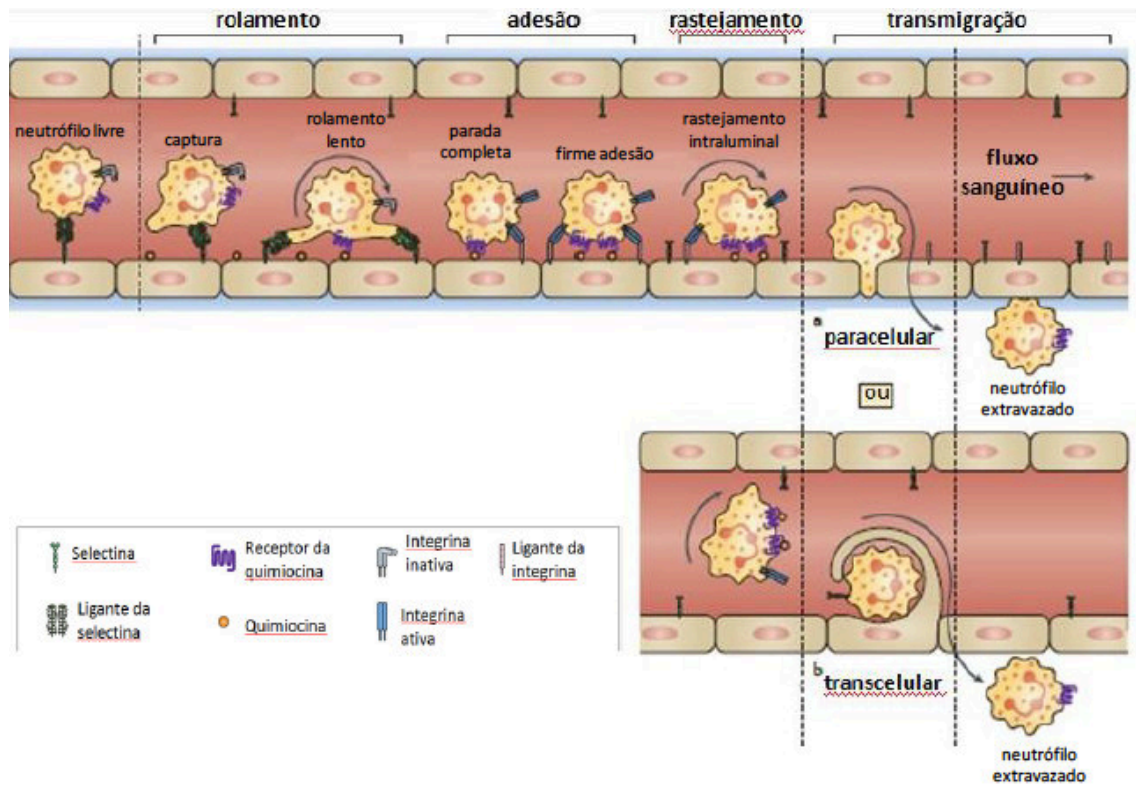


Figura 4. Sequencia de migração dos neutrófilos da vasculatura para o tecido. Transmigração paracelular (entre as células endoteliais) e transcelular (através das células endoteliais). O rolamento é principalmente selectina-dependente, enquanto a adesão, rastejamento e transmigração dependem de interações integrina. Quimiocinas que revestem a parte luminal do endotélio ativam neutrófilos rolantes, induzindo, assim, mudanças conformacionais das integrinas na superfície dos neutrófilos permitindo eventos subsequentes. Neutrófilos rastejantes seguem o gradiente quimiotático ao longo do endotélio. (Fonte: Adaptado de Kolaczowska e Kubes, 2013).

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS

O modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina baseia-se no fato de que a administração de agentes flogísticos na pata de um animal produz uma reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, reprodutível e facilmente mensurável. Essa metodologia permite observar a atividade anti-edematogênica e anti-inflamatória da amostra teste a partir de um estímulo inflamatório local, bem como avaliar a melhor dose do tratamento a ser empregado nas metodologias seguintes (LEVY, 1969).

As carrageninas são polissacarídeos sulfatados provenientes de algas marinhas (Rhodophyceae) (VAN ARMAN, 1979) e compreendem três subtipos κ , ι e λ (DE RUITER e RUDOLPH, 1997). Modelos utilizando a carragenina (Cg) como agente inflamatório são amplamente utilizados tanto para a investigação da fisiopatologia da inflamação aguda, como também para a triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório (VINEGAR et al., 1982; TSUJI et al., 2003; BHATTACHARYYA et al., 2008). A injeção intraplantar de carragenina induz uma resposta inflamatória marcante com desenvolvimento de edema e hiperalgesia (NAKAMURA E FERREIRA, 1987).

Posadas e colaboradores (2004) demonstraram que em camundongos, o edema de pata induzido pela carragenina é bifásico e dependente da idade e do peso dos animais. Além disso, esse edema é mediado pela expressão de eNOS, iNOS, COX-1 e COX-2, além da migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos. O primeiro pico de edema é caracterizado pelo aumento da expressão de óxido nítrico, enquanto que o segundo pico, mais tardio, difere do primeiro pelo aumento da expressão de COX-2, a qual começa a ser detectada a partir de 24 horas após a injeção do agente.

No que se refere à resposta celular inflamatória induzida pela carragenina, Vinegar e colaboradores (1973) demonstraram por meio de análise histológica que a injeção intraplantar promove infiltração de neutrófilos no tecido subcutâneo da pata de ratos. Em relação à cinética de migração de neutrófilos, os mesmos autores observaram que após 20 minutos estas células localizavam-se em vasos próximos ao local da inoculação do agente. Após 60 minutos, observava-se a migração dessas células para o tecido subcutâneo adjacente, a qual se intensificava 2 horas após a injeção de carragenina. Wallace e colaboradores (1999) demonstraram que em modelo de bolsa de ar estimulada com carragenina, a migração celular é mediada principalmente pela COX-1.

É importante destacar também que a resposta celular envolve a participação de importantes mediadores pró-inflamatórios e de moléculas de adesão na migração celular induzida pela carragenina, uma vez que foram detectados altos níveis de prostaglandina E₂, TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , além de um aumento da expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 4 horas após a injeção desse agente

inflamatório (CUZZOCREA et al., 1999; DALMARCO et al., 2008; IWATA et al., 2010).

O teste da permeabilidade VASCULAR baseia-se no fato de que a administração intraperitoneal (i.p.) de uma solução de ácido acético provoca reação inflamatória local envolvendo a liberação de mediadores que induzem o aumento da permeabilidade vascular levando ao extravasamento de líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício, que pode ser quantificadas pela dosagem de proteínas de fase aguda (HE e ZHANG, 2011; KROHN, 2011).

O modelo de inflamação peritoneal induzido por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) é um modelo experimental de inflamação aguda amplamente utilizada para testar novas terapias anti-inflamatórias, a qual permite ao pesquisador quantificar ou analisar a permeabilidade vascular e a migração celular, bem como, mudanças nos parâmetros inflamatórios como a produção de citocinas pró-inflamatórias (DA SILVA, 2011).

O LPS é um lipopolissacarídeo de membrana de bactéria gram negativa que é liberado de forma livre ou em agregados com proteínas de superfície quando a bactéria se multiplica ou morre. Toll-like receptor 4 (TLR4) é o receptor que reconhece o LPS e é considerado a molécula de reconhecimento do sistema imune inato. Desde sua descoberta, no final da década de 1990, os receptores Toll-like têm sido identificados como sensores primários de infecções microbianas e permitido avanços significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida. TLR4 é um receptor de membrana com um domínio extracelular rico em resíduos de leucina e um domínio citoplasmático Toll. Este receptor detecta bactérias gram-negativas através do reconhecimento da camada lipídica A de LPS (POLTORAK et al., 1998; TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

O reconhecimento de LPS é mediado por quatro moléculas: proteína ligadora de LPS (LBP), CD14, proteína mielóide diferenciadora 2 (MD2) e TLR4 (GUHA e MACKMAN, 2001). LBP funciona como uma proteína de trânsito catalizando a transferência de LPS da membrana externa de bactérias gram-negativas ao CD14 (TOBIAS et al., 1995). CD14 tem um papel no carregamento de LPS ao complexo TLR4/MD2. Proteína mielóide diferenciadora 2, uma glicoproteína que é essencial

para a resposta inata ao LPS, se liga ao LPS e ao domínio extracelular do TLR4 (SHIMAZU et al. 1999).

2.6 FARMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E BIOPROSPECÇÃO

Dentre principais fármacos utilizados na clínica para inflamação aguda destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os antiinflamatórios esteroidais (AIEs) ou glicocorticoides (BILATE, 2007).

Os AINEs representam uma classe de diversos medicamentos, e estão entre os fármacos mais comumente utilizados em todo mundo. Esta classe de medicamentos tem efeito analgésico, anti-inflamatório e antipirético. A ação dos AINEs foi primeiro descrita em 1971 por Vane e Piper, quando eles demonstraram que esta classe inibia a biosíntese de prostaglandinas pela prevenção da ligação de ácido araquidônico no sítio ativo da enzima ciclooxigenase (COX), impedindo assim a síntese de eicosanóides e de prostanóides (SULEYMAN et al., 2007; RAO e KNAUS, 2008; CONAGHAN, 2012).

Os AINEs podem ser classificados ainda como inibidores seletivos da COX-2 e inibidores não-seletivos, atuando desta forma na inibição da COX-1 e COX-2 (Figura 2). A COX-1 é encontrada na grande maioria das células na forma de enzima constitutiva, sendo responsável pela homeostasia dos tecidos e produção de prostaglandinas. Quando inibida, a COX-1 pode desencadear efeitos adversos, principalmente os gastrintestinais (WYATT et al., 2012; KID, et al., 2013). Buscando evitar as consequências da inibição da COX-1, foram desenvolvidos AINEs que inibem seletivamente a COX-2, que por sua vez é uma enzima liberada pelas células inflamatórias por vários estímulos, como a presença de citocinas, fatores de crescimento, estimulantes tumorais, sendo expressa especialmente durante as fases iniciais do processo de reparação óssea. Ao ser inibida a COX-2 é responsável por efeitos terapêuticos (RAINSFORD, 2006; RECIO et al., 2012; KRASNY et al., 2013; RIBEIRO et al., 2015).

Em contrapartida, de acordo com a literatura especializada, são relatados vários efeitos adversos como úlceras, osteoporose, falência renal e aumento dos riscos de doenças cardiovasculares associados aos AINEs não seletivos e seletivos

da COX-2, limitando assim a aplicação em larga escala desses agentes. Além disso, pesquisas evidenciaram uma importante relação da COX-2 na carcinogênese, porém esse mecanismo não foi claramente elucidado. Ainda, inibidores seletivos da COX-2 estão relacionados a efeitos cardiovasculares negativos (KHUDER e MUTGI, 2001; HARRIS et al., 2003; BOMBARDIER et al., 2010). A expressão de COX-2 também é inibida por glicocorticoides, onde estes fármacos apresentam potente efeito anti-inflamatório, no entanto com expressivos efeitos colaterais, como por exemplo a imunossupressão, inibição da proliferação celular, da síntese e secreção de insulina estimulada pela glicose (SHAO et al., 2004)

Assim, o desenvolvimento de novos compostos anti-inflamatórios que possuam menos efeitos secundários, que possam promover a resolução da inflamação e que sejam homeostáticas, modulatórias, eficientes e bem toleradas pelo organismo é de suma importância e ainda permanece um desafio para a comunidade científica.

Produtos naturais derivados de plantas estão sendo investigados e utilizados para prevenir ou tratar doenças desde o início da história humana. Estas substâncias apresentam características como diversidade química, especificidade bioquímica, entre outras propriedades moleculares que favorecem à descoberta de novos fármacos à partir destes compostos (NEWMAN e CRAGG, 2007).

A bioprospecção de produtos naturais é importante para a farmacologia, pois através dela se avalia por ensaios biológicos a ação destas substâncias com estruturas químicas definidas ou fitocomplexos para a seleção de novos compostos com ação terapêutica. Sendo assim, a química dos produtos naturais envolve o estudo de biossíntese, isolamento, determinação da estrutura, investigação das propriedades biológicas e, por fim, a produção em grande escala, ou mesmo a validação de atividades farmacológicas de substâncias utilizadas de forma empírica (KOEHN e CARTER, 2005; MCCHESENEY et al., 2007). Usualmente, são feitas triagens com modelos experimentais menos complexos e após a seleção das substâncias puras ativas, estas são avaliadas em ensaios mais específicos, e posteriormente submetidas à análise do mecanismo de ação biológica (CECHINELFILHO & YUNES, 1998).

Nos últimos anos, a fitoterapia ganhou destaque como alternativa ao tratamento das mais diversas enfermidades, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde existe grande acessibilidade da população às plantas medicinais e os serviços públicos de saúde são limitados (AGRA et al, 2007). Além da produção de fármacos originados de moléculas bioativas, é importante destacar também a produção de fitoterápicos, que são preparações que apresentam extratos padronizados de uma ou mais plantas que possuem substâncias ativas presentes. Os efeitos farmacológicos de um fitoterápico são atribuídos a um único constituinte químico presente ou a uma interação de vários constituintes químicos do mesmo extrato (WAGNER e WISENAUER, 2006).

As drogas anti-inflamatórias atuais têm apresentado diversas limitações, dentre elas a falta de resposta farmacológica, efeitos adversos, problemas no custo de produção e entrega. Sendo assim, há necessidade de uma busca constante de novos agentes farmacológicos com atividade anti-inflamatória eficaz e redução do número de efeitos adversos, estabelecendo-se uma boa relação risco/benefício ao usuário.

2.7 *Morus nigra* Linnaeus

Morus nigra L. (Figura 5), conhecida popularmente como amoreira negra, pertence a família Moraceae, representada por cerca de 61 gêneros com mais de 1000 espécies e se encontra bem representada no Brasil tanto por espécies silvestres como por cultivadas. É frequente de um modo geral nas regiões tropicais de todo o mundo (SOUZA e LORENZI, 2008).

Classificação Botânica do gênero *Morus*

A amoreira, nome popular, está classificada no (LORENZI et al., 2003):

Reino Plantae;

Divisão Magnoliophyta;

Classe Magnoliopsida;

Ordem: Urticales;

Família: Moraceae;

Gênero: *Morus*.



Figura 5. Folhas e frutos da espécie *Morus nigra* L (amoreira negra). Fonte: elaborada pelo autor, 2013.

Morus sp. de um modo geral é frequente nas regiões tropicais de todo o mundo. As espécies mais populares compreendem: *Morus alba* (Amoreira branca), *Morus australis* (amoreira chinesa), *Morus insignis* (amoreira americana), *Morus mesozygia* (amoreira africana), *Morus microphylla* (amoreira do Texas), *Morus nigra* (amoreira negra) e *Morus rubra* (amoreira vermelha) (LORENZI et al., 2003; ZHAO et al., 2005; ERCISLI e ORHAN, 2007).

A maioria dos estudos fitoquímicos realizados com *M. nigra* estão voltados aos frutos. Ercisli e Orhan (2007) observaram que frutos de *M. nigra* apresentam teores de flavonoides e fenóis totais maiores do que as espécies *M. alba* e *M. rubra*. Outro estudo relatou que *Morus nigra* L. apresenta elevadas quantidades de metabólitos secundários, sendo os principais, pertencentes à classe dos compostos fenólicos, responsáveis pela adstringência e sabor ácido que o fruto apresenta (ÖZGEN et al., 2009). Cinco ácidos orgânicos, entre eles, málico, cítrico, tartárico, oxálico, e fumárico foram identificados nos frutos da *Morus nigra*, sendo o ácido málico o predominante, seguido pelo cítrico e tartárico. O teor de ácidos orgânicos é um fator importante nas propriedades organolépticas dos frutos, contudo, este teor pode variar de acordo com as condições geográficas em que a árvore se desenvolve (KOYUNCU, 2004). Pawlowska e colaboradores (2008), isolaram e identificaram nos

frutos de *M. nigra* e *M. Alba* quatro compostos do extrato metanólico, entre os quais, os compostos (quercetina-3-O-glucoside, quercetina-3-O-rutinosídeo, canferol-3-O-rutinoside e 5-O-ácido cafeoilquínico). Estas substâncias são muito estudadas na modulação de mediadores do processo inflamatório.

Devido à presença destes metabólitos secundários, as amoras tem sido estudadas para avaliar suas atividades biológicas como antioxidante, antiangiogênica, antibacteriana e antiviral, o que poderia levar à melhora a resposta imune, melhora o perfil lipídico, redução da agregação plaquetária e melhora do metabolismo hormonal (ZAFRA-STONE et al., 2007).

No Brasil, as plantas pertencentes ao gênero *Morus* estão listadas pelo governo como extremamente interessantes para a pesquisa por serem amplamente usadas na medicina popular e pelo seu potencial fitoterápico (PORTAL DA SAÚDE, 2013). Sendo assim a validação científica da amora é um passo necessário, impulsionada pelo uso popular já existente e bastante difundido desta planta.

Além disso, já é bem relatado que *Morus nigra* L. não apresenta somente valores alimentares nutricionais, mas contém vários compostos com ação terapêutica em outras partes da planta como folhas e raízes, onde é utilizada em todo o mundo como adstringente, antiinflamatório, anti-térmica, cicatrizante, depurativa e diurética, analgésica, anti-séptica e vermífuga, hipoglicemiante, tratamento do climatério e emética (QUER, 2007).

As atividades farmacológicas de raízes e principalmente das folhas, são mais vastamente estudadas que os frutos. A raiz da *Morus nigra* contém elevada quantidade de monringa G e moringa M, lectinas capazes de se ligar a galactose e manose, respectivamente. Estas proteínas apresentam atividade hemaglutinante (DAMME et al., 2002). Raízes e galhos da *Morus nigra* apresentaram a substância oxiresveratrol, que apresenta efeito inibidor da enzima tirosinase, estando envolvida na formação da melanina (ZHENG et al., 2010).

Sabe-se que a amoras contém substâncias químicas solúveis conhecidas como flavonoides. Pesquisas já demonstraram que extratos obtidos a partir dos frutos de *Morus nigra* exibem potencial antioxidante. Segundo ARFAN et al., (2012) o extrato fluido livre de açúcar da *Morus nigra* possui maiores teores de compostos fenólicos totais: 164 mg/g (metanólico SFE) e 173 mg/g (acetônico SFE) e também

ácidos fenólicos, flavonoides, ácido clorogênico e rutina quando comparados ao extrato fluido livre de açúcar de *Morus alba* (amora branca). VOLPATO et al., (2005) relatou que o extrato de *Morus nigra* não apresenta efeito hipoglicemiante em ratas diabéticas e não-diabéticas grávidas. Porém, o tratamento com a amora teve efeito antioxidante, contribuindo para reduzir a incidência de anomalias internas nas proles de ratas diabéticas. Além disso, existem estudos relatando que as folhas de *Morus nigra* possuem propriedades antioxidantes (Hassimoto, 2007; OZGEN, 2009; MAZIMBA, 2011; PEREZ-GREGORIO, 2011; HUANG, 2013; ABBAS, 2014; FENG, 2015; TURGUT, 2015), anticarcinogênica (SKUPIEN et al., 2008; DAT et al., 2010), hipoglicêmiantes (CHUNG et al., 2013), antiobesidade (OH et al., 2009 ; TSUDUKI et al., 2013), antifúngica (YIGIT et al., 2007) e vasodilatadora (XIA et al., 2008).

No que se refere à atividade anti-inflamatória, HASSIMOTTO (2013) e HUANG (2013) demonstraram esta atividade nos frutos, enquanto que ZELOVA (2015) encontrou um grande potencial anti-inflamatório nos extratos das raízes. Padilha, 2010 mostrou um potencial anti-inflamatório das folhas de *Morus nigra*, no entanto sem estabelecer mecanismos de ação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos extratos das folhas de *Morus nigra* L. sobre a inflamação aguda e migração de neutrófilos através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Capítulo I

- Identificar a presença de metabólitos secundários no extrato hidroalcoólico e frações por meio de screening fitoquímico.
- Quantificar os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila.
- Determinar a ação do extrato hidroalcoólico na toxicidade aguda em ratos Wistar machos e fêmeas.
- Avaliar a ação do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila no edema de pata induzido por carragenina.
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila sobre a exsudação e migração de leucócitos.
- Investigar o efeito do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila sobre a atividade das enzima mieloperoxidase (MPO) e concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE₂).

3.2.2 Capítulo II

- Identificar os constituintes químicos presentes no extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila, por meio do método de HPLC-UV.
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila no modelo

de peritonite induzida por LPS.

- Investigar o efeito do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila sobre a migração de leucócitos e as concentrações de nitrito/nitrato (NO_x), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8).
- Avaliar o efeitos do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila sobre a quimiotaxia de neutrófilos frente aos agentes fMLP e IL-8.
- Avaliar o efeitos do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila sobre a inibição das concentrações de prostaglandina E2 (PGE₂) e leucotrieno B4 (LTB₄) induzidos por LPS *in vitro*.

3.2.3 Capítulo III

- Validar a atividade anti-inflamatórias dos extratos e frações ativos que possibilitem o depósito de patente.

REFERENCIAS

ABBAS, G. M.; BAR, F. M.; BARAKA, H. N.; GOHAR, A. A. ; LAHLOUB, M. A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. *Natural Product Research*, Vol. 28, No. 13, 952–959, 2014.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALBELDA, S.; SMITH, C.; WARD, P. Adhesion molecules and inflammatory injury. *The FASEB Journal*, v. 8, p. 504-512, 1994.

AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *The Annual Review of Immunology*, v. 30, pp. 459-489, 2012.

ANTONI, S. Intestinal tissue kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, v.17, 645-54, 2011.

ARFAN, M.; KHAN, R.; RYBARCZYK, A.; AMAROWICZ, R. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 13, n. 2, p. 2472-2480, 2012.

ASTRY, B.; HABERTS E.; MOUDGIL, K.D. A Cytokine-Centric View of the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Arthritis. *Rev. Journal of interferon & cytokine research*, v.31, n.12, 2011.

BARDOEL, B. W.; KENNY, E. F.; SOLLBERGER, G.; ZYCHLINSKY, A. The Balancing Act of Neutrophils. *Cell Host & Microbe*. 2014;15(5):526-36.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *T. Reumat. Clín.*, v. 8 (2), p. 47-51, 2007.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

BROZ, P.; MONACK, D.M. Molecular Mechanisms of Inflammasome Activation during Microbial Infections. *Immunol Rev*. v. 243, p. 174–190, 2011.

BUCKLEY, C.D; BARONE; NAYAR, S.; C; CAAMAÑO J. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. *Rev. Annu Immunol.*, v.22, p.715-45, 2015.

BURG, N.; PILLINGERM H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol.*, v. 99, n. 1, p. 7-17, 2001.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol*, 47 (4): 695-702, 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHAVAKIS, T. Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. *Eur J Clin Invest*, v. 42 p. 686–691, 2012.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Mol Cell*, v. 54, n. 2, p. 281-8, Apr 24 2014.

CHUNG, H. I.; KIM, J.; KIM, J. Y.; KWON, O. Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: randomized double-blind placebo controlled pilot study. *J. Funct. Foods*, v.5: 1502-1506.

CONAGHAN, P. G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumatol Int*, v. 32, n. 6, p. 1491-502, Jun 2012.

DAMME, E. J. M. V.; HAUSE, B.; HU, J. et al. Two Distinct Jacalin-Related Lectins with a Different Specificity and Subcellular Location Are Major Vegetative Storage Proteins in the Bark of the Black Mulberry Tree. *Plant Physiol.*, v. 130, n. 2, p. 757-769, 2002.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem*, 36, 109-26,2001.

DARSHAN, S.; DORESWAMY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. September 2003, p. 343–357, 2004.

DAT, N. T.; BINH, P. T. X.; QUYNH, L. T. P.; NINH, C. V.; HOUNG, H. T.; LEE J. J. Cytotoxic prenylated flavonoids from *M. alba* and *M. nigra*. *Fitoterapia*, v.81:1224-1227, 2010.

DE FALCO L, FIORAVANTI A, GALEAZZI M, TENTI S. Bradykinin and its role in osteoarthritis. *Reumatismo*, vol.65, p.97-104, 2013.

DIMASI, D.; SUN, W. Y.; BONDER, C. S. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int Immunopharmacol*, v. 17, n. 4, p. 1167-75, Dec 2013.

DORWARD, D.A.; LUCAS, C.D.; ROSSI, A.G.; HASLETT, C.; DHALIWAL, K. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 135, p. 182 – 199, 2012.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L. S.; PUTTE, L. B. A. V.; LIPSKY P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB journal*, vol. 12, 1998.

EL ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 171–183, 2006.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, v. 103, p. 1380-1384, 2007.

FENG, R.; WANG, Q.; TONG, W.; XIONG, J.; WEY, Q.; et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus nigra*. *Int J Clin Exp Med*, 8(12):22328-22336, 2015.

GANE, J.; STOCKLEY, R. Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD. *Thorax*, May 4 2011.

GDEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacological Reports*, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013.

GRIFFIN GK, NEWTON G, TARRIO ML, BU D-X, MAGANTO-GARCIA E, AZCUTIA V. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol*, v.188, n.12, p.6287–99, 2012.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, v. 140, p. 883 - 899, 2010.

HAEGENS, A.; HEERINGA, P.; VAN SUYLEN, R. J.; STEELE, C.; ARATANI, Y.; O'DONOGHUE, R. J. J.; MUTSAERS, S. E.; MOSSMAN, B. T.; WOUTERS, E. F. M.; VERNOOY, J. H. J. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production. *Journal of Immunology*, v. 182, p. 7990 – 7996, 2009.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, v.14, n.10, p. 461-469, 2008.

HARRIS, R. E.; CHELEBOWSKI, R. T.; JACKSON, R. D.; FRID, D. J.; ASCENSO, J. L.; ANDERSON, G.; LOAR, A.; RODABOUGH, R. J.; WHITE, E.; MCTIERNAN, A. Breast Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Prospective Results from the Women's Health Initiative, *Cancer Research*, v. 63, p. 6096–6101, 2003.

HASSELBALCH, H.C. The role of cytokines in the initiation and progression of myelofibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, vol.24, p.133-45, 2013.

HASSIMOTTO, N. M.; MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N. G.; SOUTO, P. C.; TEIXEIRA, C.; LAJOLO, F. M. Inhibition of carrageenan-Induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild Mulberry and Cyanidin-3-Glucoside. *BioMed Research International*, vol. 213, n. 10, pp. 959–969, 2013.

HICKEY MJ, KUBES P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat Rev Immunol.* v. 5, p. 364-75, 2009.

HUANG, H.; OU, T.; WANG, C. Mulberry and its bioactive compounds, the chemoprevention effects and molecular mechanisms in vitro and in vivo. *J Tradit Complement Med.* Jan-Mar; 3(1): 7–15, 2013.

HUO, Y. & LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.*, Charlottesville, v. 173, n. 1, p. 35-43, 2001.

JANETOPOULOS, C.; FIRTEL, R.A. Directional sensing during chemotaxis. *FEBS Lett.*, Nashville, v.582, n.14, p.2075-2085, 2008.

JEON, I. H.; MOK, J. Y.; PARK, K.; HWANG, H. M.; SONG, M. S.; LEE, D.; LEE, W-Y.; CHAI, K. Y.; JANG, S. Inhibitory Effect of Dibutyl Chitin Ester on Nitric oxide and prostaglandin E2 Production in LPS- stimulated Raw 264.7 cells. *Arch Pharm. Res.*, vol. 35, N. 7, p.1287-1292, 2012.

KANG, S.; TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody. *Int Immunol*, v. 27, n. 1, p. 21-29, 2015.

KHUDER, S. A.; MUTGI, A. B. Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, v. 84, p. 1188–1192, 2001.

KIDD, L. J.; COWLING, N. R.; WU, A. C.; KELLY, W. L.; FORWOOD. M. R. Selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors delay stress fracture healing in the rat ulna. *J Orthop Res*, v.31(2):235-42, 2013.

KOEHN, F. F.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 206-220, 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 13(3):159-75, 2013.

KOSONEN, O. et al. Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, v. 394, n. 1, p. 149-56, Apr 2000.

KOYUNCU, F. Organic Acid Composition of Native Black Mulberry Fruit. *Chem. Nat. Compd.*, v. 40, n. 4, p. 367-369, 2004.

KRASNY, M.; ZADURSKA, M.; CESSAK, G.; FIEDOR P. Analysis of effect of non-steroidal anti inflammatory drugs on teeth and oral tissues during orthodontic treatment. Report based on literature review. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, v.70 (3): 573-577, 2013.

KUMAR V, ABBAS A. K., ASTER J. C. Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Eds. Robbins Basic Pathology. *Philadelphia: Elsevier Saunders*, p 29-73, 2013.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*, v. 10, n. 11, p. 1325-34, 2010.

LANGER, H.F. & CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.*, Bethesda, v.13, n.7, p.1211-1220, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. *Nature reviews*, vol. 2 n.10, p.787-795, 2002.

LINDEMANN, S. et al. NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res*, v. 97, n. 3, p. 113-23, 2000.

LORENZI, HARRI. SOUZA, HERMES MOREIRA, et al. Árvores exóticas do Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003.

LYMAN, M.; LLOYD D.G.; JI, X.; VIZCAYCHIPI, M.P.; MA D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Rev. Neuroscience Research*, v.79, p.1-12, 2014.

MAMBOLE, A.; BIGOT, S.; BARUCH, D. et al. Human neutrophil integrin alpha9beta1: up-regulation by cell activation and synergy with beta2 integrins during adhesion to endothelium under flow. *Journal of leukocyte biology*, v. 88, n. 2, p. 321-7, 2010.

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(8):519-31, 2011.

MAZIMBA, O.; MAJINDA, R. R. T.; MOTLHANKA, D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5: 751-4, 2011.

MCDONALD, B. et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, v. 330, n. 6002, p. 362-6, Oct 2010.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. *PLoS Med*, v. 8, n. 9, p. e1001098, Sep 2011.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, n.6, p. 771-6, 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 871-82, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, v. 70, n. 3, p. 461–77, 2007.

NEWTON, K.; DIXIT, V.M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, pii. a006049, 2012.

OH, K. S.; RYU, S. Y.; LEE, S.; SEO, H. W.; OH, B. K.; KIM, Y. S.; LEE B. H. Melanin concentrating hormone-1 receptor antagonism and anti-obesity effects of ethanolic extract from *M. alba* and *Morus nigra* leaves in diet-induced obese mice. *J. Ethnopharmacol.* v.122:216-220, 2009.

ÖZGEN, M.; SERÇEB, S.; KAYAC, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. *Scientia Horticulturae*, 119: 275-279, 2009.

PADMANABHAN J., GONZALEZ A. L. The Effects of Extracellular Matrix Proteins on Neutrophil-Endothelial Interaction - A Roadway To Multiple Therapeutic Opportunities. *Yale journal of biology and medicine*, p.167-185, 2012.

PAWLOWSKA AM, OLESZEK W, BRACA A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 56, p. 3377-3380, 2008.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L. M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1793-1801, 2011.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W.R. Leucotrienes. *The New England Journal of Medicine*, v.357, n.18, p.1841-1854, 2007.

PETERSEN, H. J.; SMITH, A. M. The role of the innate immune system in granulomatous disorders. *Front Immunol*, v. 4, p. 120, 2013.

POBER, J.S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 803 – 815, 2007.

PORTAL DA SAÚDE. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agenciasaude/noticias-anterioresagencia-saude/3487-> (acessado em março 2016).

PROKOPOWICZ, Z. *et al.* Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v. 60, n. 1, p. 43-54, Feb 2012.

QUER, P. F. Plantas medicinales: el discórides renovado. 6ª. Ed. Barcelona: Editorial Labor, p. 117-121, 2007.

RAINSFORD, K. D. Nimesulide: a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. *Current Medical Research and Opinion*, v.22: 1161-1170, 2006.

RAMESH, G.; MACLEAN, A.G.; PHILIPP, M.T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm*, v. 2013, 2013.

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical issues*, v.15, n.1, p.3-17, 2004.

RAO, P.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci*, v. 11, n. 2, p. 81s-110s, 2008.

RECIO, C.; ANDÚJAR, I.; RÍOS, J. L. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 14, p. 2088–2103, 2012.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev*, v. 60, n. 1, p. 57-64, Apr 2009.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGAR WAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 1603 - 1616, 2010.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Rev. Medicinal Research Reviews*, v.35, n. p.877-936, 2015.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 31, n.5, p.986-1000, 2011.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *Journal of Immunology*, v. 190, n. 8, p. 3831-8, 2013.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*, v. 32, n. 10, p. 452-60, Oct 2011.

SAID-SADIER, N.; OJCIUS, D.M. Alarmins, Inflammasomes and Immunity. *Biomed J*. v. 35, p.447-449, 2012.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. *Annual review of biomedical engineering*, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHURGERS, E.; BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma. *J Interferon Cytokine Res*, v. 31, n. 12, p. 917-26, 2011.

SEELY, A.J.E.; PASCUAL, J.L.; CHRISTOU, N.V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care*, Ottawa, v. 7, p. 291-307, 2003.

SEPIASHVILI, R.I.; BALMASOVA, I.P.; STAURINA, L.N. Serotonin and its immune and physiological effects. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, vol.99, p.17-32, 2013.

SEREZANI, C.H.; CHUNG, J.; BALLINGER, M.N.; MOORE, B.B.; ARONOFF, D.M.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v.37, p.562-570, 2007.

SERHAN, C. N., SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol*, v.6, p. 1191–1197, 2005.

SHAO, J.; QIAO, L.; FRIEDMAN, J. E. Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 286, p. E304-310, 2004.

SIVAMANI, R. K. Eicosanoids and Keratinocytes in Wound Healing. *Rev. Advances In Wound Care*, v. 3, n.7, 2014.

SKUPIEN, K.; KOSTRZEWA-NOWAK, D.; OSZMIANSKI, J.; TARASIUK, J. In Vitro antileukaemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa*[Michx] Elliott) and Mulberry (*M. alba L.*) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Phytother. Res.*, v.22: 689-694, 2008.

SMITH et al. Neutrophil traction stresses are concentrated in the uropod during migration. *Biophys. J*, v. 92, n. 7, p. L58-60, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; INSTITUTO PLANTARUM DE ESTUDOS DA, F. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II. 2ª. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

STILLIE, R.; FAROOQ, S.M.; GORDON, J.R.; STADNYK, A.W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *J Leukoc Biol*, v.86, n.3, p.529-543, 2009.

SULEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGOZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep*, v. 59, n. 3, p. 247-58, May-Jun 2007.

SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, v.31, n. 8, p. 318-24, Aug 2010.

SUNDD, P.; POSPIESZALSKA, M. K.; CHEUNG, L. S. et al. Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology*, v. 48, n. 1, p. 1-35, 2011.

TSUDUKI, T.; KIKUCHI, I.; KIMURA, T.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. *Food Chem.* v.139: 16-23, 2013.

TURGUT, N. H.; MERT, D. G.; KARA, H.; EGILMEZ, H. R.; ARSLANBAS, E.; TEPE, B.; GUNCOR, H.; YILMAZ, N.; TUNCEL, N. B. Effect of black mulberry (*Morus nigra*)

extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of d-galactose-induced aging mice. *Pharmaceutical Biology*, At: 04:48, 2015.

VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; SINZATO, S. et al. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal – fetal outcome , oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, v. 138, n. 3, p. 691-696, 2011.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 5, p. 278–286, 2008.

WYATT, J. E.; PETTIT, W. L.; HARIRFOROOSH, S. Pharmacogenetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacogenomics J*, v. 12, n. 6, p. 462-7, Dec 2012.

XIA, M.; QIAN, L.; ZHOU, X.; GAO, Q.; BRUCE, I. C.; XIA, Q. Endotheliumindependent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *M. alba* (L.). *J. Ethnopharmacol.* v. 102: 442-446, 2008.

YIGIT, N.; YIGIT, D.; OZGEN, U. AKTAS, A.E. Abnticandidal activity of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Turk Mikrobiyoloji Cem Derg*, v.37 n.3, p. 169-73, 2007.
YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int*, v. 2014, p. 698313, 2014.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M. et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol. Nutr. Food Res.*, v. 51, n. 6, p. 675-83, 2007.

ZARBOCK, A. et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, v. 118, n. 26, p. 6743-51, Dec 2011.

ZELOVA, H.; HANAKOVA, Z.; CERMAKOVA, Z.; SMEJKAL, K.; DALL'ACQUA, S'; BALULA. P.; CVACKA, J.; HOSEK, J. Evaluation of anti-Inflammatory activity of prenylated substances isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. *Journal of Natural Products*, 2013.

ZEN, K.; PARKOSC, A. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol*, v. 15, n. 5, p. 557-64, 2003.

ZHAO, W.; PAN, Y.; ZHANG, Z.; MIAO, X & HUANG, Y. Phylogeny of the genus *Morus*. *African Journal of Biotechnology*, v.4, n. 6, p. 563-569, 2005.

ZHENG, Z.-P.; CHENG, K.-W.; ZHU, Q. et al. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 9, p. 5368-73, 2010.