

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

POLLIANE MARIA CAVALCANTE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO TRITERPENO
NATURAL UVAOL EM MACRÓFAGOS *IN VITRO***

ORIENTADOR: EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO

Maceió – AL
2020

POLLIANE MARIA CAVALCANTE DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO TRITERPENO
NATURAL UVAOL EM MACRÓFAGOS *IN VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió – AL
2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

A663c Araújo, Polianne Maria Cavalcante de.

Caracterização via potencial anti-inflamatório do triterpeno natural uvaol em macrófagos *in vitro* / Polianne Maria Cavalcante de Araújo. – 2020.

73 f. : il.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 61-73.

1. Uvaol - Triterpeno. 2. Macrófagos. 3. Inflamação. I. Título.

CDU: 615.276:616-008.853



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, 574
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgc09@gmail.com
Fone: 81 3214 1850

Folha de Aprovação

Polliane Maria Cavalcante de Araújo

Caracterização do potencial anti-inflamatório do triterpeno natural uvaol em macrófagos in vitro

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 29 de abril de 2020.

Banca Examinadora



Profa. Dra. Maria Danielina dos Santos Reis – (UFAL)



Profa. Dra. Juliane Cabral Silva – (UNCISAL)



Prof. Dr. João Herminio Martins da Silva – (Fiocruz -CE)

Dedico esta tese ao meu pai, Paulo de Araújo (*in memoriam*), cujos ensinamentos, amor, dedicação, força, luta e fé, foram essenciais para me fazer prosseguir neste caminho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me concedido a dádiva da vida e por ter colocado pessoas tão maravilhosas em minha vida. Por me dar forças para continuar, apesar de todas as dificuldades e provações enfrentadas ao longo do caminho.

Aos meus pais, Paulo (*in memoriam*) e Lúcia, pelo amor incondicional, carinho, apoio, confiança, cuidados, força. Por me fazerem acreditar que apesar de todas as dificuldades que passamos em nossa vida, nada é impossível quando se tem fé e perseverança, sendo a educação sempre o melhor caminho. Agradeço incondicionalmente por tudo que fizeram por mim durante todos esses anos da minha vida. Ao meu pai, que sempre se orgulhou da sua pequeninha aqui, meu agradecimento especial por TUDO! Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando aquela garotinha que sempre estudou em escola pública, que convivia com inúmeras greves e falta de professores e não acreditava que teria a chance de estudar numa Universidade Federal, não tinha mais esperanças; obrigada por fazerem o impossível para nunca nos faltar a passagem do ônibus e a comida na mesa, todos os nossos sacrifícios valeram a pena!!!

Aos meus irmãos, Paula e Paulo, que apesar das brigas e chateações sempre estiveram ao meu lado, durante todos os momentos. Muito obrigada por todo incentivo.

Ao meu fiel companheiro, Emerson Cupertino, por todo apoio, companheirismo, conselhos, paciência, por me ajudar a passar por todos os obstáculos da vida, por estar sempre ao meu lado, me fazendo sorrir. Suas palavras de forças, amor, carinho e fé sempre me ajudaram a seguir em frente, muito obrigada por tudo. Obrigada por me acompanhar nesse tortuoso caminho da vida.

Às minhas amigas-irmãs, Gabriella e Steffanny, por todos esses anos de apoio, por estarem do meu lado durante toda essa jornada colégio-universidade, por toda força, carinho, conselhos e muito amor. Obrigada por se fazerem presentes na minha vida por todos esses anos de amizade.

Ao Professor Emiliano, primeiramente pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de conduzir esse projeto. Agradeço muito pela orientação, pelos conselhos e ensinamentos que foram partilhados e que de muito contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada pelas palavras amigas de incentivo, compreensão e força!

A todos os membros do Laboratório de Biologia Celular, aqueles que permanecem e aos que não estão mais que sempre tornaram o nosso ambiente de trabalho um segundo lar, minha segunda família. Ao longo destes 8 anos LBC passaram muitas pessoas que ficarão

para sempre no meu coração, se fazendo uma verdadeira família. Ana Rúbia, bióloga da física, muito obrigada por tudo. Lilian, coisa linda... Seus conselhos sempre me foram de muita valia. Cami, sempre uma amiga tão especial. A todos aqueles que se fizeram presentes em minha vida no LBC, Julius, Bia, Mirele, Jenifer, Karen, Marvin,

Àquelas amigas que iniciaram no LBC e perduram fora dele... Nanda, que sempre me ajudou nos momentos em que mais precisei, que sempre sorriu e chorou comigo... Jor, minha companheira de luta... Nalva, minha amiga de longa data... Laís, minha musa inspiradora, uma amiga tão querida... Ever, que já chegou conquistando minha amizade com esse coração maravilhoso, e a tantos que eu sei que sempre posso contar.

À Juliane, que não tenho palavras para definir... Essa técnica que já chegou dando um up no lab, mas também conquistando com esse sorriso contagiante. Ju, você é LUZ! É uma amiga, mãe, conselheira, incentivadora, e tudo mais que você precisar! Muito obrigada por me ajudar nos momentos difíceis, por se alegrar das minhas conquistas e por sempre me incentivar, você mora no meu coração.

À professora Danielma, que sempre incentivou todos nós, que me ajudou tanto a padronizar protocolos, a aprender PCRq e citometria. Que vibrou e chorou comigo quando minha bolsa finalmente saiu e que sempre se alegra com nossas conquistas e nos incentiva a crescer, obrigada por tudo Elma.

Aos demais professores do LBC, Salete e Alexandre, meu muito obrigada pelos ensinamentos diários. Em especial à profa Janylle, que acompanhou toda saga como companheira de laboratório e agora como professora, obrigada por tudo Jams.

Aos professores da Universidade Federal de Alagoas, pelo conhecimento transmitido, por contribuírem imensamente na minha formação de Doutora em Ciências da Saúde.

Agradeço ao órgão de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pela concessão da bolsa nos últimos anos do doutorado, que foram de fundamental importância para desenvolver meus trabalhos e para obtenção desta tese.

*“Não é o mais forte que sobrevive,
nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta às mudanças”*

Charles Darwin

RESUMO

O uvaol, urs-12-ene-3,28-diol, é um triterpeno pentacíclico encontrado em abundância no azeite de oliva, e possui reconhecidas propriedades antioxidantes. Recentes estudos reportaram os efeitos inibitórios do uvaol sobre a resposta imunoinflamatória. Em particular, os macrófagos mostram-se como células cruciais tanto para o estabelecimento/propagação quanto para a resolução das reações inflamatórias. Porém, as ações deste triterpeno sobre as funções de macrófagos não foram investigados até o presente momento. Assim, neste estudo objetivamos caracterizar as atividades anti-inflamatórias do uvaol em macrófagos ativados *in vitro*. Inicialmente, o efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 foi avaliada pelo método de MTT. Em seguida, constatamos que em macrófagos estimulados com LPS, o uvaol nas concentrações incapazes de induzir efeitos citotóxicos, reduziram de forma significativa a secreção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, sem interferir na secreção de IL-10. Para verificar se estes efeitos do uvaol também se estendiam as células humanas, utilizamos macrófagos derivados de monócitos humanos da linhagem THP-1. Com estas células constatamos um mesmo perfil de citotoxicidade, bem como um perfil semelhante de inibição na produção de mediadores, uma vez que o tratamento com uvaol também inibiu a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 e IL-8 em células estimuladas com LPS. Em macrófagos J774 estimulados com LPS o uvaol também inibiu a geração de óxido nítrico. Ao ser avaliado o índice de fagocitose dos macrófagos, foi verificado que o tratamento com uvaol induziu de forma significativa um aumento na porcentagem de células que fagocitaram, bem como na quantidade de partículas fagocitadas por células, demonstrando claramente uma melhoria na habilidade de fagocitose. Considerando que as características pró-inflamatórias dos macrófagos foram inibidas pelo tratamento com uvaol, buscou-se quantificar a expressão do marcador de superfície CD86, uma molécula típica de macrófagos do perfil M1 (pró-inflamatório). Os resultados revelaram que macrófagos tratados com uvaol exibiram uma redução significativa na expressão do marcador CD86. Adicionalmente, a secreção da citocina típica para o perfil M1, a IL-6, bem como para o perfil M2, a IL-10, em macrófagos apenas submetidos a diferenciação funcional foram significativamente inibidas pelo tratamento com uvaol. Além disso, ao se avaliar a expressão RNAm de genes típicos para o perfil M1, como TNF- α e IL-6, e para o perfil M2, como a Arg1 e TGF- β , verificamos que o uvaol inibiu de maneira significativa a expressão dos genes TNF- α , IL-6 e Arg1, exceto a expressão do gene TGF- β . Ao ser avaliada a ativação da via de sinalização intracelular do NF-kB constatou-se que o tratamento com uvaol inibiu a translocação do p65-NF-kB, o que pode justificar os efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo tratamento com uvaol em macrófagos. Em conjunto, estes resultados sugerem que o uvaol exerce efeito anti-inflamatório nos macrófagos, diminuindo a secreção de citocinas e aumentando a atividade fagocítica, estes fenômenos parecem estar relacionados a atenuação na polarização de macrófagos M1 e a redução na translocação nuclear de NF-kB, reforçando seu uso como agente benéfico para a saúde em condições inflamatórias.

Palavras-chave: Uvaol. Macrófago. Inflamação.

ABSTRACT

Uvaol, urs-12-ene-3,28-diol, is a pentacyclic triterpene found in abundance in olive oil and has recognized with antioxidant properties. Recent studies have reported the inhibitory effects of uvaol on the immunoinflammatory response. Macrophages, particularly, are shown to be crucial cells both for the establishment/propagation and for the inflammatory resolution reactions. However, the actions of this triterpene on the macrophage's functions have not been investigated until this date. Thus, in this study, we aimed to characterize the anti-inflammatory activities of uvaol in macrophages activated *in vitro*. Initially, the effect of uvaol on J774 macrophages viability was evaluated by the MTT method. Then, we found that in macrophages stimulated with LPS, uvaol in concentrations unable to induce cytotoxic effects, significantly reduced the secretion of TNF- α , IL-1 β , and IL-6, without interfering with the secretion of IL-10. To check whether these effects of uvaol also extended to human cells, we used macrophages derived from human monocytes of the THP-1 cell line. With these cells, we found the same cytotoxicity profile, as well as a similar inhibition profile in the production of mediators, since treatment with uvaol also inhibited the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1 and IL-8 in cells stimulated with LPS. In J774 macrophages stimulated with LPS, uvaol also inhibited the generation of nitric oxide. When evaluating the its phagocytosis, it was found that treatment with uvaol significantly induced an increase in the percentage of cells that phagocytosed, as well as in the number of particles phagocytosed by cells, clearly demonstrating an improvement in phagocytosis ability. Considering that the pro-inflammatory characteristics of macrophages were inhibited by treatment with uvaol, we sought to quantify the expression of the surface marker CD86, a typical molecule of macrophages of the M1 profile (pro-inflammatory). The results revealed that macrophages treated with uvaol exhibited a significant reduction in the expression of the CD86 marker. Additionally, secretion of the typical cytokine for the M1 profile, IL-6, as well as for the M2 profile, IL-10, in macrophages only submitted to functional differentiation was significantly inhibited by treatment with uvaol. Furthermore, when evaluating the mRNA expression of typical genes for the M1 profile, such as TNF- α and IL-6, and the M2 profile, such as Arg1 and TGF- β , we found that uvaol significantly inhibited the expression of the TNF- α , IL-6 and Arg1 genes, except for the expression of the TGF- β gene. When evaluating the activation of the intracellular signaling pathway of NF- κ B, it was found that treatment with uvaol inhibited the translocation of p65-NF- κ B, which may justify the anti-inflammatory effects induced by treatment with uvaol in macrophages. Together, these results suggested that uvaol exerts an anti-inflammatory effect on macrophages, decreasing cytokine secretion and increasing phagocytic activity, these phenomena seem to be related to attenuation in the polarization of M1 macrophages and reduction in nuclear translocation of NF- κ B, reinforcing its use as a beneficial health agent in inflammatory conditions.

Keywords: Uvaol. Macrophages. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dinâmica da resposta inflamatória.....	19
Figura 2 – Componentes celulares e mediadores essenciais na inflamação.....	20
Figura 3 – Translocação nuclear no NF-kB.....	22
Figura 4 – Formação e diferenciação de monócitos em macrófagos.....	24
Figura 5 – Esquema representativo da fagocitose.....	26
Figura 6 – Perfis de macrófagos no sítio inflamatório.....	27
Figura 7 – Perfil de Polarização dos macrófagos.....	28
Figura 8 – Exemplos de estruturas químicas de terpenos.....	33
Figura 9 – Estrutura química do triterpeno uvaol.....	34
Figura 10 – Esquema de diferenciação da linhagem THP-1.....	37
Figura 11 – Esquema de tratamento.....	37
Figura 12 – Efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos.....	42
Figura 13 – Efeito do uvaol sobre a produção de citocinas em macrófagos J774.....	43
Figura 14 – Efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos de macrófagos humanos da linhagem THP-1.....	44
Figura 15 – Efeito do uvaol sobre a produção de citocinas na linhagem THP-1.....	45
Figura 16 – Efeito do uvaol sobre a produção de NO.....	46
Figura 17 – Efeito do uvaol sobre a fagocitose de macrófagos J774.....	47
Figura 18 – Fotomicrografias do efeito do uvaol sobre a fagocitose em macrófagos J774.....	48
Figura 19 – Efeito do uvaol sobre a polarização de macrófagos J774.....	49
Figura 20 – Efeito do uvaol sobre a produção de citocinas em macrófagos polarizados.....	50
Figura 21 – Efeito do uvaol sobre a expressão gênica de mediadores inflamatórios.....	51
Figura 22 – Efeito do uvaol na translocação nuclear de NF-kB na linhagem J774.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos adversos associados ao uso de AINEs.....	30
Tabela 2 – Lista de genes-alvo utilizados.....	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μM	Micromolar
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacarídeo
INF- γ	Interferon- γ
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
SBF	Soro Bovino Fetal
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

Observação: As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	Inflamação.....	18
3.1.1	NF-kB e resposta inflamatória.....	21
3.2	Macrófagos.....	23
3.2.1	Perfis de ativação dos macrófagos.....	26
3.3	Abordagem farmacológica para a inflamação.....	29
3.4	Produtos naturais.....	31
3.4.1	Metabólitos secundários obtidos a partir de plantas.....	32
3.4.2	Terpenos.....	32
3.5	Uvaol.....	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Reagentes.....	36
4.2	Linhagens Celulares.....	36
4.2.1	Diferenciação em macrófagos a partir da linhagem THP-1.....	31
4.2.2	Tratamento.....	37
4.3	Avaliação da viabilidade celular.....	37
4.4	Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	38
4.5	Quantificação de Óxido Nítrico (NO).....	38
4.6	Avaliação da atividade fagocítica	39
4.7	Análise da expressão do marcador de superfície CD86 por citometria de fluxo...39	
4.8	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (PCRq).....40	
4.9	Localização de p65 (NF-kB) por imunofluorescência.....40	
4.10	Análise estatística.....41	
5.	RESULTADOS.....	42
5.1	Efeito do uvaol sobre a viabilidade celular de macrófagos.....42	
5.2	Efeito do tratamento com uvaol sobre a produção de citocinas e quimiocinas.....42	
5.3	Efeito do uvaol sobre a viabilidade celular de macrófagos humanos.....43	

5.4	Efeito do tratamento com uvaol sobre a produção de citocinas em macrófagos humanos.....	44
5.5	Efeito do uvaol sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos.....	46
5.6	Efeito do uvaol sobre a produção de NO em macrófagos murinos.....	46
5.7	Efeito do uvaol sobre a expressão de CD86, um marcador de polarização de macrófago para o perfil M1.....	48
5.8	Efeito do uvaol sobre a produção de IL-6 e IL-10 em macrófagos murinos polarizados para os perfis M1 e M2	49
5.9	Efeito do uvaol sobre a expressão gênica de mediadores inflamatórios em macrófagos murinos polarizados para os perfis M1 e M2.....	50
5.10	Efeito do uvaol sobre a translocação nuclear de p65-NF-kB.....	51
6.	DISCUSSÃO.....	53
7.	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória é um processo fisiopatológico que ocorre em tecidos vascularizados em resposta a agressões físicas, químicas, mecânicas ou biológicas, com o objetivo de limitar a área da lesão e restaurar a homeostase do sítio inflamatório (MEDZHITOV, 2008). Os sinais clássicos desta resposta são o calor, o rubor, a dor, o edema e a perda de função que estão relacionados a fatores, como: o aumento no fluxo sanguíneo, o aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos no tecido, e a liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão; caso o estímulo não seja cessado ou reparado poderá haver perda da função local (MENTEN et al., 2002).

Durante o processo inflamatório, os leucócitos migram para o sítio da lesão em resposta a fatores quimiotáticos, como as quimiocinas. Dentre estas células mobilizadas para o local da inflamação, os monócitos possuem um papel importante, pois ao chegarem no tecido são capazes de se diferenciarem em macrófagos e passam a atuar tanto na manutenção quanto na resolução da resposta inflamatória. Após ativados, os macrófagos servem como fonte primária para a produção de uma vasta gama de mediadores químicos (pró- e anti-inflamatórios), realizam intensa atividade fagocitária e atuam de forma determinante para resolução da inflamação (OHASHI; HATTORI; HATTORI, 2015).

Os macrófagos são reconhecidos por sua grande plasticidade funcional, pois podem apresentar diferentes perfis de ativação ao longo da resposta inflamatória, sendo classificados, de acordo com suas funções, em macrófagos do perfil M1 ou M2. Este espectro de populações distintas de macrófagos tem sido caracterizado por uma combinação de marcadores de membrana e perfis de expressão gênica. Os macrófagos M1 apresentam atividade pró-inflamatória, microbicida e citotóxica, enquanto o perfil M2, possui papel anti-inflamatório, que é importante na resolução da inflamação (CASSETTA et al., 2011). Os macrófagos M1 mediam a inflamação através da expressão de mediadores como TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, CD86, COX-2, produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A falha em regular esses mediadores leva à destruição das células e danos aos tecidos. Em contraste, os macrófagos M2 medeiam a resolução da inflamação e melhoram o reparo tecidual através da regulação positiva de IL-10, IL-4, IL-13, arginase-1 (arg-1) e CD206 (GENSEL; ZHANG, 2015).

Dentre os fatores de transcrição envolvidas com a polarização dos macrófagos cabe destacar que o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (CORDOVA et al., 2014). É sabido que as vias de NF- κ B desempenham um papel central na regulação dos processos imunes e inflamatórios

que regulam a expressão de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação, na apoptose e na proliferação (KIM et al., 2016). Além disso, a ativação da via de sinalização do NF- κ B é responsável pela polarização de macrófagos M1 e pelos subsequentes efeitos pró-inflamatórios (LIU et al., 2017). Devido à sua plasticidade e capacidade de adotar diversos estados de ativação em resposta ao seu microambiente, a reprogramação funcional de macrófagos pode se tornar uma abordagem terapêutica para o tratamento de doenças com alto envolvimento de macrófagos, como as doenças de base inflamatória, incluindo as alergias.

O arsenal terapêutico para o tratamento da inflamação envolve o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais, esteroidais e inibidores de leucotrienos, os quais, quando utilizados por períodos prolongados, levam ao surgimento de efeitos adversos, assim como resistência ao tratamento. Desta forma, estudos direcionados à descoberta de novas moléculas com potencial anti-inflamatório mostram-se necessários (BARNES, 2010).

Nesse contexto, os metabólitos secundários de plantas, como os flavonoides, compostos fenólicos e terpenos, têm se destacado como fontes para identificação de moléculas com vasta gama de atividades terapêuticas. A partir destes metabólitos secundários várias moléculas de interesse farmacológico já foram desenvolvidas tendo como alvo de interesse suas propriedades antitumorais, antioxidantes e anti-inflamatórias (GILBERT; FAVORETO, 2012). Dentre estes metabólitos, os triterpenos se distribuem amplamente na natureza (MAHATO et al., 1988; MIURA et al., 1999).

O uvaol é um triterpeno pentacíclico presente em grande quantidade nas folhas e no óleo de oliva (*Olea europaea* L.) (ALLOUCHE et al., 2010). A literatura científica destaca seus relevantes efeitos farmacológicos na inflamação através da supressão da geração de ânions superóxido induzido por ácido araquidônico (CHEN et al., 2002), na produção de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) em células mononucleares (MARTIN et al., 2006) e na inflamação alérgica (AGRA et al., 2016). No entanto, o efeito do uvaol sobre as funções de macrófagos e os mecanismos moleculares associados à sua atividade anti-inflamatória não foram avaliadas até o momento. Portanto, o objetivo geral deste estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos do uvaol sobre as funções de macrófagos e identificar os possíveis mecanismos moleculares associados a estes efeitos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar *in vitro* os efeitos anti-inflamatórios do uvaol em macrófagos e identificar possíveis mecanismos moleculares associados a estes efeitos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos.
2. Analisar o efeito do uvaol sobre a produção/liberação de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados por LPS.
3. Avaliar o efeito do uvaol sobre a fagocitose de macrófagos.
4. Analisar o efeito do uvaol sobre a expressão do marcador CD86, característico de macrófagos com perfil M1.
5. Analisar o efeito do uvaol sobre a diferenciação funcional e fenotípica de macrófagos, quantificando a liberação de mediadores inflamatórios e a expressão gênica de marcadores característicos dos perfis M1 e M2.
6. Verificar o efeito do uvaol frente a translocação nuclear de NF- κ B em macrófagos estimulados por LPS.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação

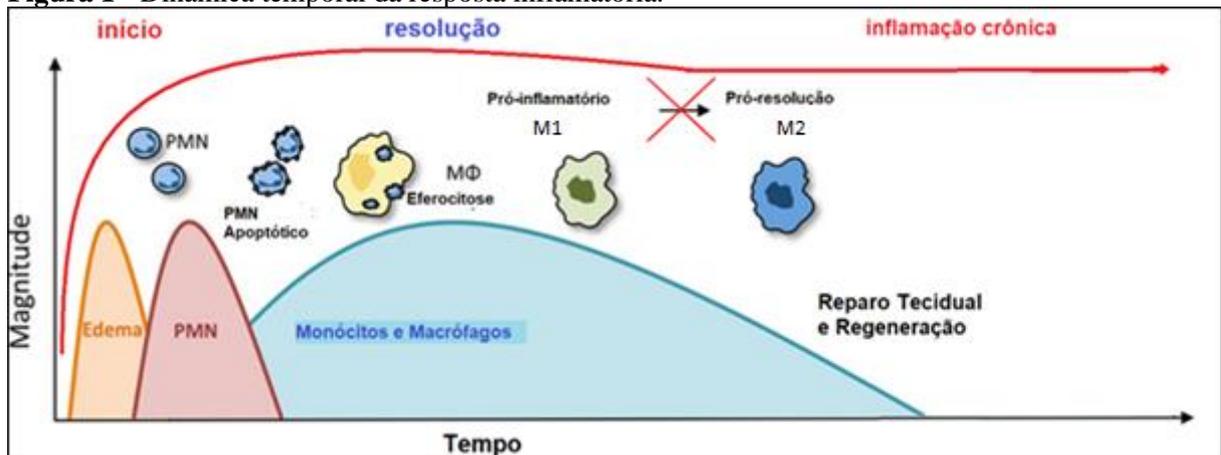
A inflamação é uma resposta de tecidos vascularizados contra agentes físicos, químicos ou biológicos, que visa eliminar a agressão e restaurar a integridade tecidual. Mesmo sendo um processo essencial para a vida do organismo, se a inflamação ocorrer de maneira persistente ou mesmo se ultrapassar os limites fisiológicos do organismo, a resposta inflamatória torna-se responsável por danos teciduais que estão envolvidos na patogênese de inúmeras doenças, como a artrite reumatoide e o câncer (MEDZHITOV, 2008; SERHAN, 2017).

A inflamação, a depender de suas características, pode ser classificada de várias maneiras, dentre elas, em aguda, que se caracteriza por ser uma resposta com curto tempo de duração, e em crônica, que é caracterizada pela constante exposição ao agente agressor ou então quando o processo inflamatório agudo não conseguiu eliminar o agente causador (FULLERTON; GILROY, 2016). A inflamação é um processo complexo que envolve a migração de células efetoras para o sítio inflamatório e de células imunes para órgãos linfoides para iniciar assim a resposta imunológica. Toda esta movimentação coordenada necessita da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, além da presença de seus receptores nas células-alvo, sendo a interação dos fatores quimiotáticos e das células responsáveis por desencadear uma série de eventos bioquímicos e celulares (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014).

A resolução da inflamação ocorre em fases sobrepostas (Figura 1) regidas pela produção espacial e temporal de mediadores pró-resolução. Nos estágios iniciais da inflamação, há um aumento no tamanho dos vasos (ao redor do sítio inflamatório) e da liberação de líquidos. Os processos fundamentais para a resolução incluem a limitação ou término da infiltração tecidual de neutrófilos nas primeiras 24 horas, a posterior contra regulação de quimiocinas e citocinas, a indução de apoptose em neutrófilos ativados e sua subsequente eferocitose por macrófagos que migram para o sítio inflamatório após 48 horas da deflagração da inflamação (REVILLE et al., 2005). No entanto, nos estágios iniciais da inflamação, os macrófagos destroem os microrganismos restantes que escapam dos neutrófilos, removem os corpos apoptóticos dos neutrófilos mortos e apresentam antígeno aos linfócitos T, iniciando assim os mecanismos de imunidade adquirida, que termina na produção de anticorpos, de citocinas e de células de memória. A atividade dos macrófagos passa então de pró-inflamatória (M1) para

anti-inflamatória (ou pró-resolutiva – M2), removendo todos os detritos teciduais, promovendo o restabelecimento do tecido. Em conjunto, esses eventos culminam em um retorno à homeostase tecidual. Assim, os macrófagos e os neutrófilos são importantes componentes celulares do processo de resolução associado à inflamação aguda. Uma resposta inflamatória eficaz, por sua vez, alimenta uma resposta de resolução apropriada do hospedeiro (CELADA, 2008; SEHRAN; SAVILL, 2005).

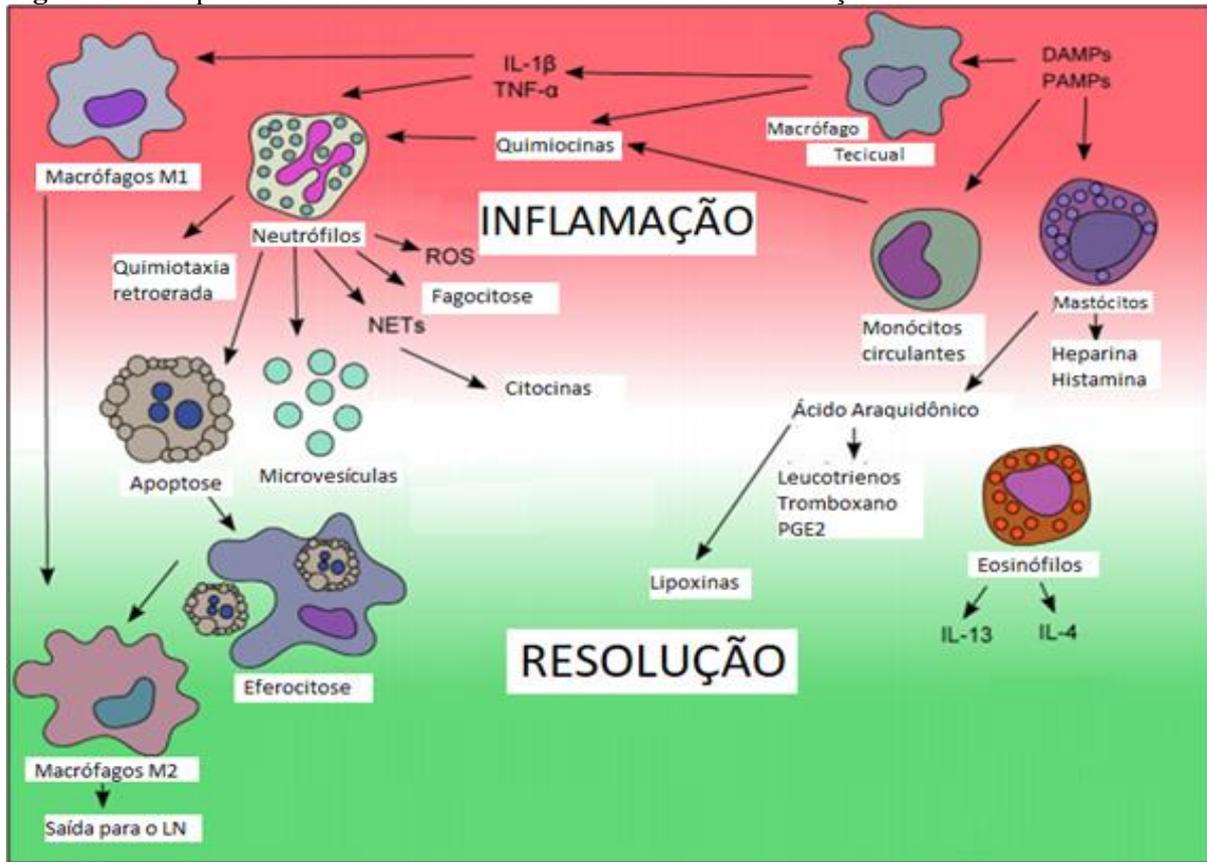
Figura 1 - Dinâmica temporal da resposta inflamatória.



Esquema mostrando as fases da inflamação. PMN – Polimorfonucleares. MΦ - Macrófago. A resposta inflamatória é uma sequência coordenada de eventos, tais como: 1) fase de início com a participação de quimiocinas, de citocinas e de mediadores pró-inflamatórios que é seguida 2) por uma fase de resolução ativa provocada pelo envolvimento de mecanismos celulares sob o controle de vários mediadores pró-resolutivos para promover a homeostase do tecido, assim como a cura e reparação. Caso haja uma falha nas vias de pró-resolução, a inflamação pode persistir, havendo exacerbados mecanismos pró-inflamatórios, resultando em inflamação prolongada ou crônica. (Adaptado de BARNIG; FROSSARD; LEVY, 2018 e SANSBURY; SPITE, 2016).

As mudanças vasculares associadas à inflamação são fenômenos determinantes para as fases e eventos inflamatórios, pois são capazes de favorecer a migração das células inflamatórias para o sítio inflamatório (LARSEN et al., 2010). Após um estímulo inflamatório, as células residentes, como os macrófagos, mastócitos e células epiteliais ou as migrantes (eosinófilos, neutrófilos, monócitos e linfócitos) são induzidas a liberar diferentes classes de mediadores químicos que contribuem para a ativação de diferentes células (Figura 2) que irão determinar o curso da inflamação (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012; FULLERTON; GILROY, 2016).

Figura 2 - Componentes celulares e mediadores essenciais na inflamação.



Esquema ilustrando células e mediadores químicos envolvidos com a inflamação e a resolução. NETs – *Neutrophil Extracellular Traps*. ROS – *Reactive Oxygen Species*. IL – Interleucina. DAMPs – Padrões Moleculares Associados à Danos. PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos. (Adaptado de HEADLAND; NORLING, 2015).

Os macrófagos possuem um importante papel na resposta imunoinflamatória do hospedeiro por participar ativamente da resposta imediata contra agentes estranhos (LEE et al., 2010). Durante a resposta inflamatória, a ativação de macrófagos contribui para danos causados ao hospedeiro pela liberação excessiva de diversas citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α. A liberação destas moléculas já foi vista na literatura como responsáveis pela regulação de cascata de mediadores inflamatórios e atividades pró-inflamatórias em diversas doenças (LIN; KARIN, 2007).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF-α é estimulado na fase aguda da resposta imune, sendo uma das primeiras a serem liberadas no local da lesão, estimulando a resposta inflamatória pela síntese de proteína C reativa e outros mediadores. Esta citocina, amplifica as reações vasculares e contribui para a ativação de distintas células no sítio inflamatório (GRIFFIN et al., 2012). Assim como o TNF-α, a IL-1β e a IL-6 também atuam nos estágios iniciais da resposta imune, estimulando a produção de proteínas de fase aguda no fígado e no sistema nervoso central para induzir febre e a secreção de prostaglandina, e tem como suas

principais fontes os monócitos e macrófagos (BEM-SASSON et al., 2009; BARKHAUSEN et al., 2011).

Além da liberação de citocinas, outro importante fator do desencadeamento e perpetuação da resposta inflamatória é o estresse oxidativo, no qual o conteúdo de EROs (espécies reativas de oxigênio) mostram-se com grande participação. A geração de EROs é uma condição capaz de alterar o metabolismo celular por gerar danos aos constituintes da célula, devido a ação direta e/ou indireta sobre a degradação de proteínas, peroxidação lipídica e oxidação do DNA, tendo envolvimento direto na fisiopatologia de diversas doenças, incluindo aterosclerose, câncer, Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas. Dentre os EROs, podemos destacar a óxido nítrico-sintase (NOS), que possui três isoformas, a neuronal (NOS-1), a endotelial (NOS-3) e a induzível (iNOS), que é uma importante enzima para o macrófago, sendo produzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IFN γ , endotoxinas ou LPS (lipopolissacarídeo) (FRANCHINI et al., 2013; McNEILL et al., 2015).

O óxido nítrico (NO) é uma potente molécula que permeia importantes funções dos macrófagos, como citotoxicidade contra patógenos intracelulares, vírus e tumores, além de auxiliar na regulação imunológica. Nos macrófagos, o NO é sintetizado pela iNOS; enquanto a superóxido é produzida principalmente pela NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidase. Em macrófagos, a liberação de EROs leva a eliminação dos microrganismos invasores num processo infeccioso, evento que pode ser mediado pela ativação do NF- κ B. A reação do superóxido com NO leva à formação de peroxinitrito *in vivo*. Essas reações desencadeiam respostas celulares que variam de modulações sutis da sinalização celular a lesões oxidativas avassaladoras. *In vivo*, a geração de peroxinitrito tem sido atribuída a doenças como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca crônica, diabetes, choque circulatório, câncer e neurodegeneração (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; RATH et al., 2014).

3.1.1 NF- κ B e resposta inflamatória

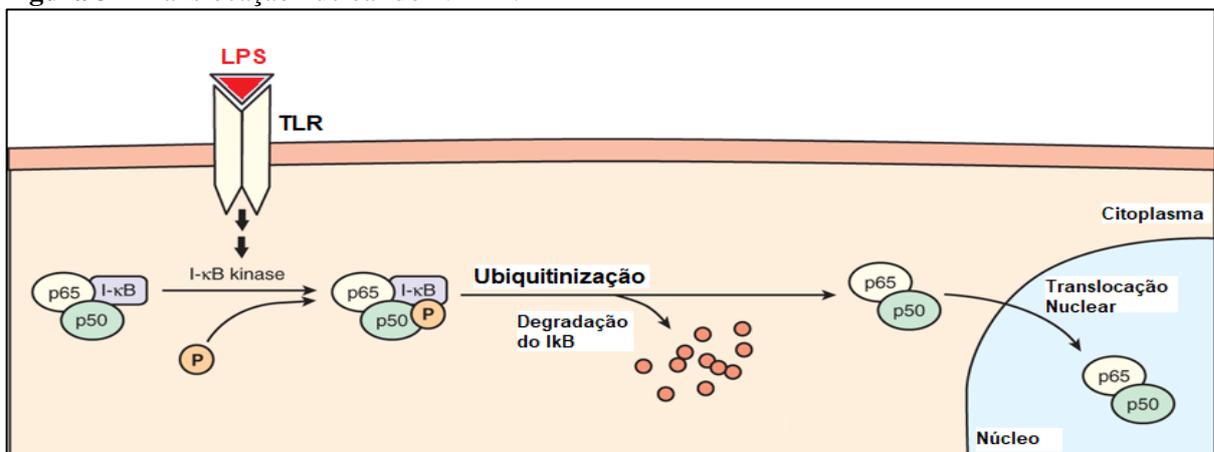
O NF- κ B (descoberto por Sen e Baltimore em 1986) representa uma família de fatores de transcrição, que regula uma grande variedade de genes envolvidos em diferentes processos de resposta imune e inflamatória (OECKINGHAUS; GOSH, 2009). Essa família é composta por cinco membros relacionados estruturalmente, incluindo NF- κ B1 (também denominado p50), NF- κ B2 (também denominado p52), RelA (também denominado p65), RelB e c-Rel,

que medeiam a transcrição de genes alvo, como vários hetero ou homo dímeros (SUN; CHANG, 2013). As proteínas NF- κ B são normalmente sequestradas em um complexo citoplasmático por uma proteína inibidora, a I κ B (SUN, 2011; SURH, 2001).

O NF- κ B é um mediador central da indução de genes pró-inflamatórios e funciona tanto em células imunes inatas quanto adaptativas. O NF- κ B tem sido implicado na patogênese de diversas doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, aterosclerose, lúpus eritematoso sistêmico, diabetes tipo I, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma (PAI; THOMAS, 2008).

A exposição das células a estímulos externos como mitógenos, citocinas inflamatórias, radiação, proteínas virais, LPS e EROs, causam uma rápida fosforilação de I κ B, com posterior degradação por proteossomas. A dissociação de I κ B do heterodímero, permite que este seja translocado para o núcleo, levando a transcrição de uma grande variedade de genes alvo que codificam importantes mediadores inflamatórios (SURH, 2001), como observado na Figura 3. O NF- κ B está presente no citosol como a forma ligada com a proteína inibitória I κ B em macrófagos em repouso. A ativação de macrófagos resulta na fosforilação desta proteína para liberar o heterodímero de NF- κ B (KARIN; BEM-NERIAH, 2000). O NF- κ B livre transloca para o núcleo e liga-se aos sítios de ligação do NF- κ B nas regiões promotoras de vários genes inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS e COX-2, levando a indução da expressão do seu RNAm (SURH, 2001).

Figura 3 - Translocação nuclear do NF- κ B.



Esquema ilustrativo da translocação nuclear NF- κ B. Os fatores de transcrição NF- κ B estão presentes no citoplasma como heterodímeros, mais comumente as subunidades p65 e p50 em um complexo com um inibidor, I κ B. Quando a sinalização pró-inflamatória ocorre via ativação de receptores da superfície celular (por exemplo, TLRs), o I κ B torna-se fosforilado, conduzindo a sua degradação pelo sistema proteossoma. Isso permite que as subunidades ativas entrem no núcleo onde regulam positivamente a transcrição de dois a trezentos genes. Os produtos característicos de eventos precoces da resposta imune mediada por NF- κ B incluem a liberação de ILs. (Adaptado de BRUNICARDI et al., 2014; NATOLI et al., 2005; WANG et al., 2018).

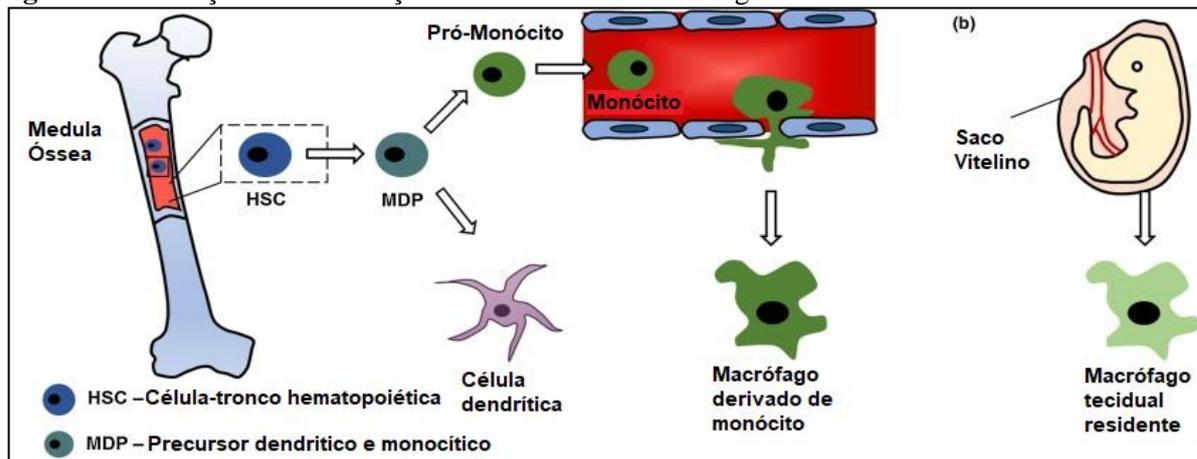
Doenças inflamatórias como artrite reumatoide, psoríase e doença inflamatória intestinal são mantidas e progridem devido à infiltração de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos e linfócitos T), bem como à produção de citocinas, quimiocinas e proteases. Muitos desses processos são dependentes de NF- κ B, sugerindo que a inibição dessa via apresenta um grande potencial terapêutico para o tratamento da inflamação crônica (BARNES; KARIN, 1997; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

A função pró-inflamatória do NF- κ B tem sido extensamente estudada em macrófagos, uma grande família de células imunes inatas que residem em diferentes tecidos e funcionam na linha de frente de uma resposta imune contra infecções (MURPHY, 2010). Em resposta a diversos PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) e DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), os macrófagos tornam-se rapidamente ativados e secretam uma grande variedade de citocinas e quimiocinas.

3.2 Macrófagos

Os macrófagos têm origem a partir da medula óssea, de um precursor comum da linhagem granulocítica, os monócitos (DAVIES, 1994). Após saírem da medula, os monócitos permanecem na circulação sanguínea até migrarem para o tecido, onde se diferenciam em macrófagos (Figura 4). Quando diferenciadas, essas células serão funcionalmente e fenotipicamente distintas, a depender do sítio que a recrutou e das citocinas presentes (GORDON; TAYLOR, 2005; MOSSER; EDWARDS, 2008; LAWRENCE; NATOLI, 2011). Os macrófagos residentes também podem se diferenciar a partir de células embrionárias, provenientes do saco vitelínico (EPELMAN et al., 2014).

Figura 4 - Formação e diferenciação do monócito em macrófago.



Esquema ilustrativo da origem dos macrófagos. (a) Monócitos circulantes são principalmente derivados de células progenitoras comprometidas na medula óssea (derivadas de HSC), que migram para o sangue periférico. Os monócitos migram através dos vasos sanguíneos quando recrutados como parte da homeostase do tecido ou eventos de lesão, onde subsequentemente se diferenciam em macrófagos derivados de monócitos. (b) Em contraste, macrófagos residentes em tecidos são derivados *in utero* no saco vitelino e preenchem tecidos como o cérebro (microglia), fígado (células kuppfer) e coração. (Adaptado de Sridharan, 2015).

Os macrófagos estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos começando durante a embriogênese e continuando durante toda a vida adulta, possuindo múltiplas funções como a fagocitose de patógenos, restos celulares e células mortas e também desempenha um importante papel na apresentação de antígenos e produção de diferentes mediadores a depender do estímulo (WYNN et al., 2013). Além de possuir um importante papel coordenando a defesa e favorecendo o reparo tecidual após injúria. Eles também podem desempenhar um papel prejudicial durante a inflamação crônica, alimentando uma reação inflamatória de baixo grau que leva à progressão de doenças e complicações. Assim, os macrófagos são indispensáveis para processos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento, a homeostase e em estados patológicos (GAUTIER; YVAN-CHARVET, 2014).

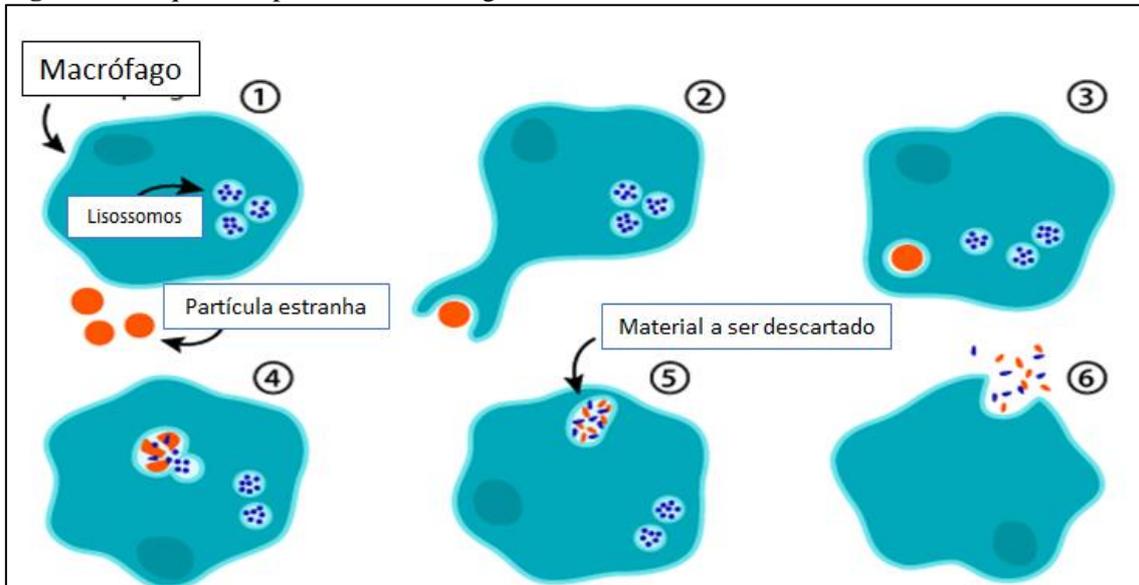
Como os macrófagos são predominantes no meio inflamatório e responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios, essas células surgiram como importantes reguladores que levam à iniciação, promoção e progressão de diversas doenças. Assim, foi sugerido que os macrófagos podem representar um alvo adequado para a terapia anti-inflamatória, pois, a inibição da infiltração de macrófagos mostrou eficácia em pacientes com osteoartrite (YOUNG et al., 2001). Além disso, vários estudos com animais revelaram que a depleção de macrófagos com lipossomas de clodronato resulta na atenuação da lesão pulmonar após endotoxina, isquemia-reperfusão e ventilação mecânica (KOAY et al., 2002; NAIDU et al.,

2003; FRANK et al., 2006; ZHAO et al., 2006). No entanto, tem sido relatado que a depleção significativa de macrófagos está associada à imunossupressão, infecção e má cicatrização de feridas (BURNETT et al., 2004; CAILHIER et al., 2005; MIRZA et al., 2009).

Uma das principais funções efetoras do macrófago é a fagocitose, um importante componente das respostas imunes inata e adaptativa aos patógenos, além de ser crucial para a homeostase e remodelamento tecidual, possuindo assim um papel biológico de extrema importância. Este fenômeno pode ser definido como a ingestão de grandes partículas ($\geq 0.5 \mu\text{m}$) por células, envolvendo o reconhecimento e a ligação das partículas por meio de receptores na superfície celular. Corpos estranhos como bactérias e fungos podem ser retirados de sítios inflamatórios por meio de fagócitos profissionais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Sendo assim, a fagocitose é dita como a primeira linha de defesa contra infecções, e possui um importante papel na iniciação da resposta imune adaptativa através da promoção da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Enquanto os fagócitos profissionais desencadeiam uma reação inflamatória quando fagocitam corpos estranhos, eles liberam mediadores anti-inflamatórios quando fagocitam com corpos apoptóticos, reparando o dano tecidual (FLANNAGAN; JAUMOILLÉ; GRINSTEIN, 2012).

A fagocitose (Figura 5) é um processo biológico complexo e integrado no espaço e no tempo determinando os resultados protetores e/ou deletérios do hospedeiro. Ele molda a natureza e a qualidade das respostas imunes inata e adaptativa à estímulos próprios e externos; por outro lado, a imunidade humoral e celular regula a especificidade, eficiência, duração e memória da fagocitose (GORDON, 2016). A capacidade fisiológica fagocitária é adquirida durante a diferenciação dos fagócitos e pode ser modulada pela adesão à matriz, bem como pelos fatores estimuladores de colônia hospedeira, citocinas (VARIN et al., 2010), glicocorticoides (ZIZZO; COHEN, 2013) e estímulos microbianos (GORDON, 2016).

Figura 5 - Esquema representativo da fagocitose.



Esquema ilustrativo do macrófago fagocitando. Quando o macrófago entra em contato e fagocita a partícula estranha (1-3), esta é lisada por enzimas dos lisossomos (4-5) e então é liberada pela célula como um material não mais nocivo para o organismo. Fonte: Adaptado de Ask a Biologist (Arizona State University), 2011.

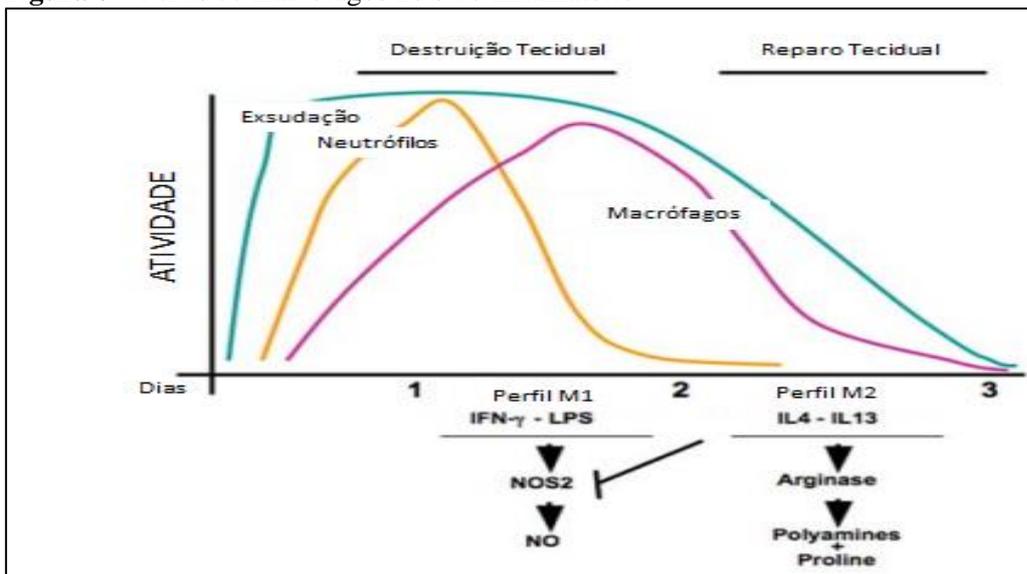
As consequências fisiológicas e imunológicas da fagocitose variam dependendo do tipo de célula, dos receptores envolvidos no reconhecimento e absorção e da natureza da carga. Os macrófagos contêm um arsenal de hidrolases ácidas que degradam extensivamente as macromoléculas ingeridas (GORDON, 2016). A biossíntese e a secreção de macrófagos medeiam a morte microbiana, a inflamação e o reparo, bem como a lesão tecidual. Os produtos secretórios incluem metabólitos de baixo peso molecular (araquidonatos e radicais derivados de oxigênio e nitrogênio resultantes da ativação de NADPH e iNOS), proteinases neutras (como elastase, colagenase e uroquinase), além de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10), e vários metabólitos lipídicos envolvidos no metabolismo do fosfoinositol e da resolução da inflamação (BUCKLEY et al., 2014). Finalmente, a estimulação fagocítica pode resultar em estímulo ou tolerância e regular o crescimento, a sobrevivência ou a morte das células (GORDON, 2016).

3.2.1 Perfis de ativação do macrófago

Macrófagos possuem uma importante plasticidade, podendo mudar de fenótipo frente a estímulos. A polarização destas células é um processo que ocorre através de sinais presentes

no meio, sendo fenotipicamente polarizados gerando uma resposta funcional frente a estímulos específicos (SICA; MANTOVANI, 2012). Eles exibem heterogeneidade fenotípica, que resulta em diferentes atividades funcionais dependendo da situação biológica. Essa polarização (Figura 6) é dividida em perfil M1 e perfil M2 com perfil funcional pró-inflamatório e com perfil funcional pró-resolutivo, ou anti-inflamatório, respectivamente (CASSETTA et al., 2011; GUNDRA et al., 2014).

Figura 6 – Perfis de macrófagos no sítio inflamatório



Esquema ilustrando a atividade dos diferentes perfis de ativação dos macrófagos. Evidenciando que o macrófago do perfil M1 possui atividades mais pró-inflamatórias ao passo que os macrófagos do perfil M2 são anti-inflamatórios. Fonte: Adaptado de CELADA, 2008.

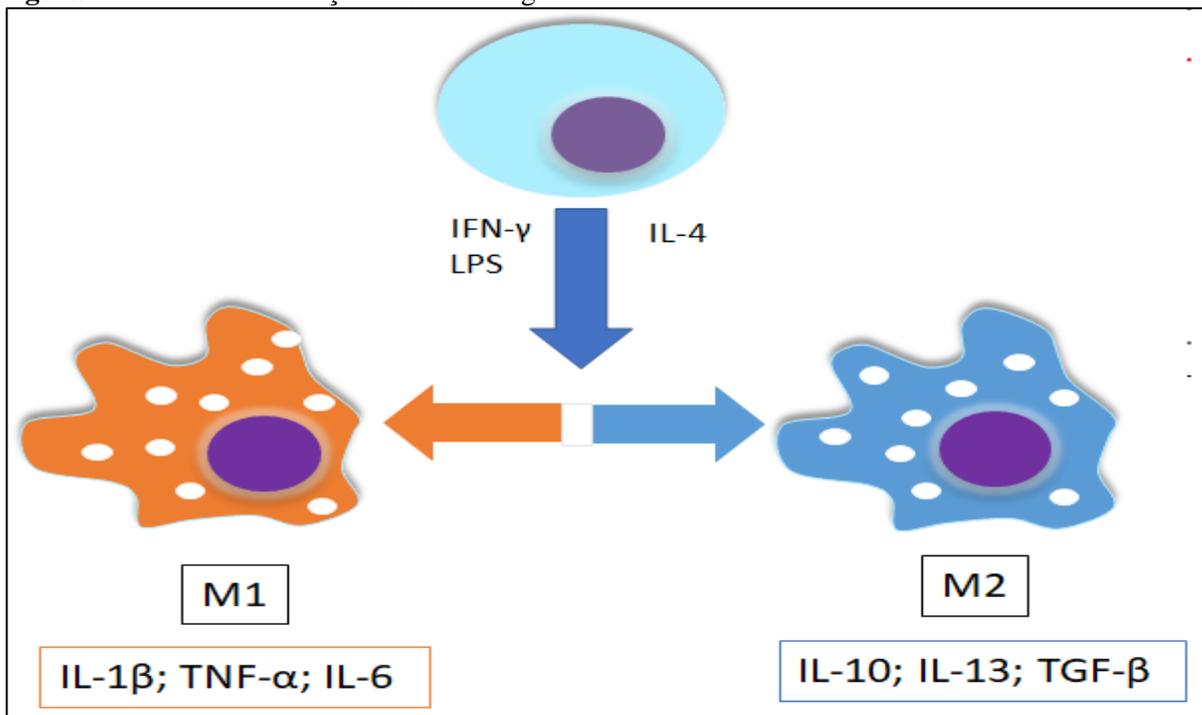
Os macrófagos M1, são tipicamente induzidos por citocinas Th1 como TNF- α e IFN- γ , além do LPS que medeia a inflamação através da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, CD86, ciclooxigenase-2 (COX-2), e a produção de NO e EROs. O perfil M1 participa na remoção de patógenos durante a infecção através da ativação de NADPH e subsequente geração de EROs. Além disso, este perfil possui importante atividade antitumoral e mediar o dano induzido pela geração de EROs, dificultando a regeneração tecidual e a cicatrização. Neste cenário, vale a pena destacar o envolvimento do NF- κ B como um fator relacionado diretamente com a diferenciação de macrófagos para o perfil de ativação M1, uma vez que este fator regula a expressão de um grande número de genes pró-inflamatórios, incluindo TNF α , IL-1 β , COX-2, IL-6 e IL-12 (WANG et al., 2014). Para proteger o organismo contra o dano, a resposta inflamatória crônica é inibida por mecanismos regulatórios lideradas por macrófagos do perfil M2 (BISWAS et al., 2012; SICA et al., 2015). Sendo a falha em regular

esses mediadores responsável por promover destruição celular e dano tecidual (SHIN et al., 2013).

Em contraste, os macrófagos M2 são polarizados em resposta ao estímulo de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13. Medeiam a resolução da inflamação e melhoram o reparo tecidual através da regulação positiva de IL-10, IL-4, IL-12 IL-13, TGF- β , arginase-1 (arg-1), heme oxigenase 1 (HMOX-1) e CD206 (GENSEL; ZHANG, 2015). Funcionalmente, macrófagos do perfil M2 possuem uma grande capacidade de fagocitose, para remover detritos e células apoptóticas, promovendo o reparo e remodelamento tecidual e a cicatrização, possuindo também propriedades pró-angiogênica e pró-fibrótica (SICA; MANTOVANI, 2012; WANG et al., 2014).

Além de ser importante na imunorregulação, o perfil M2 também é importante na formação de tumor e na sua progressão, devido a sua importante função angiogênica (BELGIOVINE et al., 2016). Diferente do perfil M1 na qual as citocinas pró-inflamatórias levam a ativação da via de sinalização do NF- κ B e a repressão de genes anti-inflamatórios, a polarização de macrófagos M2 é mediada pela sinalização STAT-3 e STAT-6 em resposta a IL-4 e IL-13 com diminuição da resposta do NF- κ B (OREKHOV et al., 2019).

Figura 7- Perfil de Polarização dos macrófagos.



Perfil esquemático de polarização dos macrófagos de acordo com o estímulo através da liberação de citocinas. Macrófagos M1 são induzidos por IFN γ ou PAMPs (como o LPS) e caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, já o perfil M2 é induzido principalmente por IL-4 e caracterizado pela produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Adaptado de SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018; BOHLSON et al., 2014).

Outra diferença importante entre esses fenótipos é a via bioquímica usada para processar o aminoácido arginina. O IFN- γ ou o LPS induzem a enzima NOS2, produzindo óxido nítrico (NO), que possui grande poder destrutivo e nas primeiras fases da inflamação para eliminar os microrganismos. Nos macrófagos anti-inflamatórios, a arginase é induzida e produz prolina e poliaminas, que catalisam a reconstituição da matriz extracelular danificada, evento que ocorre durante as fases finais da inflamação (ARPA et al., 2009).

3.3 Abordagem farmacológica para a inflamação

O tratamento de doenças inflamatórias, como as doenças respiratórias de origem alérgica ou não alérgica é sintomático e realizado, principalmente, através do uso de anti-inflamatórios (esteroidais e não-esteroidais) (BARNES, 2010). Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os medicamentos mais utilizados, seja sob prescrição médica ou por automedicação, porém, seu uso apresenta risco de toxicidade, possuindo de 2 a 4% de incidência anual de graves complicações gastrointestinais, além de possuir interação farmacológica com diversas medicações (WYNNE; CAMPBELL, 1994; VANDRAAS et al., 2010).

Os AINEs atuam inibindo as enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que estão envolvidas na síntese de prostaglandinas, resultando em efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos (DAY; GRAHAM, 2013). O uso prolongado de AINEs causa diversos efeitos colaterais, principalmente quando usados por longos períodos de tempo, como inibição plaquetária, inibição da formação de prostaglandinas necessárias para o trato gastrointestinal (TGI) e o sistema renal funcionarem corretamente, cardiotoxicidade e hepatotoxicidade e respostas asmáticas induzidas por fármacos, estes efeitos, observados na Tabela 1, são causados pela farmacodinâmica do medicamento, podendo ser agravado frente a interações medicamentosas (BOZIMOWSKI, 2015).

Os glicocorticoides (anti-inflamatórios esteroidais), estão entre os fármacos mais eficazes para o tratamento de doenças de base inflamatória como asma, artrite reumatoide, doenças autoimunes. Os glicocorticoides penetram a membrana celular para se ligar aos seus receptores, sendo translocado para o núcleo no qual pode reprimir a expressão de genes pró-inflamatórios como o NF-kB, e ativar genes anti-inflamatórios, ou seja, modulando genes inflamatórios e assim, coordenando as ações anti-inflamatórias (BARNES; ADCOCK, 2009).

TABELA 1 - Efeitos adversos associados ao uso de AINEs.

SISTEMA	EFEITOS ADVERSOS RELATADOS
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Desconforto, náuseas e diarreia • Ulceração péptica • Sangramento gastrointestinal • Indução ou exacerbação de colite
Relacionado ao Sistema Nervoso Central	<ul style="list-style-type: none"> • Dor de cabeça • Vertigem, tontura, zumbido • Depressão, sonolência • Insônia
Reações de hipersensibilidade	<ul style="list-style-type: none"> • Febre, agiodema broncoespasmo e erupções cutâneas • Hepatotxicidade, meningite asséptica (raramente)
Hematológica	<ul style="list-style-type: none"> • Anemia, trombocitopenia, neutropenia, eosinofilia e agranulocitose
Renal	<ul style="list-style-type: none"> • Nefrotoxicidade (nefrite intersticial, síndrome nefrótica) • Insuficiência renal ou comprometimento • Hematúria • Uso ou abuso a longo prazo, tem sido associado a nefropatia • Retenção de fluidos
Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> • Pressão arterial elevada • Insuficiência cardíaca • Eventos trombóticos
Outros e raros efeitos adversos	<ul style="list-style-type: none"> • Fotossensibilidade • Alveolite, eosinofilia pulmonar • Pancreatite • Síndrome de Stevens-Johnson • Necrólise epidérmica tóxica

Fonte: Modificado de BOZIMOWSKI, 2015.

Os corticoides, possuem a capacidade de interferir em todas as fases da inflamação, mas, apesar de sua eficácia, pacientes que fazem uso de corticoides podem apresentar pouca ou nenhuma resposta (resistência a medicação), principalmente quando usados por longos períodos ou em altas doses. Além disso, a terapia com glicocorticoides pode vir acompanhada por diversos efeitos colaterais, devido a sua ampla gama de ações nos processos fisiológicos, pois eles atuam em todos os sistemas biológicos, como alterações endócrinas, metabólicas e celulares, causando patologias secundárias como osteoporose, imunossupressão, síndrome de Cushing e diabetes (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008 ; BARNES; ADCOCK, 2009). Sendo assim, a busca por novos compostos que apresentem efeitos anti-inflamatórios, mas que não

possuam todos estes efeitos colaterais, se faz necessária. Neste contexto, os produtos de origem natural apresentam grande importância.

3.4 Produtos naturais

Os produtos naturais vêm sendo usados pelo homem há milhares de anos e até hoje se fazem presentes em todo mundo como fonte de alimentos ou medicamentos (SKIRYCZ et al., 2016). A OMS (Organização Mundial da Saúde), define plantas medicinais como: “espécies vegetais a partir das quais produtos de interesse terapêutico podem ser obtidos e usados na espécie humana como medicamento”, sendo assim, o Ministério da saúde (2006) preconiza a necessidade da realização de estudos que possam comprovar a segurança e eficácia de produtos de origem vegetal para que haja benefício a população.

No Brasil, houve uma valorização das plantas medicinais como fonte de princípios ativos, por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (PNPIC-SUS) pelo Decreto no. 5.813 de 22 de junho de 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A partir disto, em 2009, o Ministério da Saúde divulgou um livro denominado Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) para garantir um acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Já em 2010 foi lançado a RENISUS (Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), que contém uma lista de plantas elencadas a partir de dados etnobotânicos e estudos pré-clínicos e clínicos sobre os seus efeitos terapêuticos e farmacológicos (MS, 2010).

Diversos compostos derivados de plantas, que possuem propriedades terapêuticas, foram utilizados como base para a produção de medicamentos, visando tratamento de diversas patologias (VALENÇA; SILVA; BERINI, 2015). Como exemplo destes compostos podemos citar a salicilina, um glicosídeo proveniente da *Salix alba* (Salicaceae), que foi a base para o desenvolvimento de uma das classes de medicamento mais utilizadas: os AINES. Além desta, as cromonas, isoladas de *Asmi visnaga*, utilizadas na clínica por suas propriedades anti-inflamatória, e sua capacidade de diminuir a obstrução brônquica (por estabilizar mastócitos inibindo a liberação de histamina, leucotrienos e reduzindo a ativação de eosinófilos) e a teofilina, isolada de *Camellia sinensis*, utilizada na clínica para o tratamento da obstrução reversível das vias aéreas, possuindo efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e imunomoduladores, ambas utilizadas no tratamento de doenças alérgicas (SHARA; STOHS, 2015; EDWARDS, 2014; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010).

3.4.1 Metabólitos secundários obtidos a partir de plantas

Durante a evolução, as plantas desenvolveram diversas vias bioquímicas secundárias que as permite dispor de diversos produtos químicos, estes produzidos muitas vezes em resposta a estímulos ambientais específicos, como por exemplo privação de nutrientes e danos induzidos por ataques de patógenos (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). As plantas sintetizam uma enorme variedade de compostos classificados como metabólitos primários, que são utilizados para síntese dos metabólitos secundários, que por sua vez estimulam as interações ecológicas entre as plantas e seu ambiente (CROTEAU et al., 2000).

Estes metabólitos secundários podem ser exclusivos de determinadas espécies e/ou gêneros e podem aumentar sua capacidade de sobrevivência, superando os desafios locais, permitindo maior interação das plantas com seu meio. Além disso, os metabólitos secundários são essenciais para a sobrevivência da planta contra raios ultravioleta e hospedeiros, sendo capazes de remover radicais livres, possuem propriedades antioxidante e antiproliferativa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus) e muitos possuem toxicidade contra herbívoros (HARBONE, 1993; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Alguns metabólitos secundários vegetais possuem função protetora semelhante em humanos, desempenhando função antioxidante ou antimicrobiana, protegendo contra vírus, fungos, bactérias ou até infecções parasitárias, podendo assim exercer propriedades bioativas no corpo humano (SIDDIQUI et al., 2012).

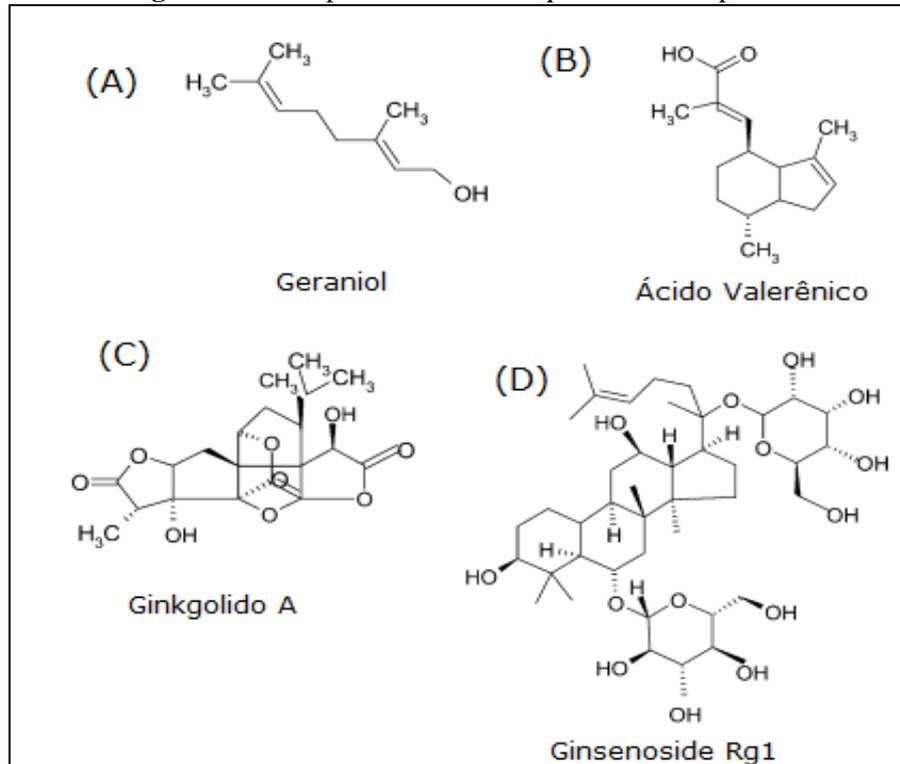
3.4.2 Terpenos

Os terpenos possuem uma ampla distribuição na natureza, constituindo o maior grupo de metabólitos secundários vegetais, encontrados em todas as partes da planta, tais como nas folhas, pólen, frutos e sementes. Esta classe é composta por cerca de 50.000 compostos em diversas espécies vegetais, nos quais estão relacionados a diversos efeitos farmacológicos como antioxidante, anti-inflamatório, analgésico e antitumoral (MAHATO *et al.*, 1988; MIURA et al., 1999; PATERAKI; HESKES; HAMBERGER, 2015).

Estes compostos, (Figura 8) possuem estrutura química variada, nos quais são formados e classificados de acordo com suas unidades isoprênicas de hidrocarbonetos (C_5H_8), como os hemiterpenos (possuem 1 unidade isoprênica), os monoterpenos (que incorporam duas unidades de isopreno), os sesquiterpenos (3 unidades de isopreno), os diterpenos (4 unidades), os sesterpenos (incluem 5 unidades de isopreno), o triterpenos (incorporam 6

unidades) e os tetraterpenos (incorporam 8 unidades) (JANOCHA, SCHIMITZ; BERNAHARDT, 2015; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Figura 8 - Exemplos de estruturas químicas de terpenos.



Estruturas de terpenos como: (A) monoterpene, (B) sesquiterpene, (C) diterpene e (D) triterpene. (Adaptado de KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Muitos terpenos têm importante valor comercial e são usados como agentes quimioterápicos, como pigmentos, polímeros, fibras, colas, ceras, fármacos e agroquímicos (WAGNER; ELMADFA, 2003). Os triterpenos são amplamente estudados por sua abundância no meio ambiente e por possuírem diversas atividades biológicas como cardioprotetora (MARTÍN et al., 2012), hepatoprotetora (LIU et al., 1994), antibacteriana (MARTINS et al., 2011), atividade cicatrizante e protetora contra radiação UV (SHARATH et al., 2010; LEE et al., 2012), antioxidante (YANG et al., 2011; ALLOUCHE et al., 2011), antialérgica (LINDNER et al., 2010), dentre outras. Sabe-se que os triterpenos são formados por seis unidades isoprênicas com trinta átomos de carbono, sendo semelhantes a corticoides. Além disso, podem estar presentes no seu estado livre, como éster ou glicosídeo e são classificados como triterpene tetracíclicos ou pentacíclicos (RADAD et al., 2006).

Os triterpenos pentacíclicos, como o ácido ursólico e o ácido oleanólico, são amplamente distribuídos em diversas frutas; estes compostos são usados em nutracêuticos

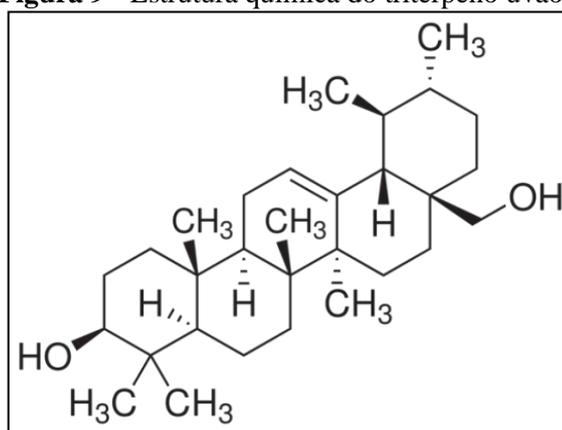
para o tratamento de várias doenças (JAGER et al., 2009; FRIGHETTO et al., 2008). Dentre estes triterpenos pentacíclico, o uvaol apresenta importantes propriedades farmacológicas.

3.5 Uvaol

O uvaol é um triterpeno pentacíclico que possui em sua estrutura química um grupo hidroximetil (CH_2OH) em R2 e um grupo metil (CH_3) na posição C-29, este já foi identificado em folhas de *Crataegus pinnatifida* Bunge. (MIN et al., 2000), em folhas de *Diospyros kaki* Thunberg. (CHEN et al., 2002), em flores das espécies de *Carthamus morifolium* Ramat. (crisântemo), *Helianthus annuus* L. (girassol), *Taraxacum platycarum* Dahlst. (dente-de-leão) (YASUKAWA et al., 1996; UKIYA et al., 2002), nas raízes de *Geum iranicum* Khatamsaz. (SHAHANI et al., 2012) e na casca das raízes de *Morus alba* var. *multicaulis* Perronas. Além destas, o uvaol está presente na folha e no óleo de oliva (*Olea europea* L.) (GUINDA et al., 2010; ALLOUCHE et al., 2010).

O uvaol, por ser um triterpeno pentacíclico possui uma estrutura química semelhante (Figura 9) a anti-inflamatórios esteroidais (corticoides) (RADAD et al., 2006).

Figura 9 - Estrutura química do triterpeno uvaol.



Fonte: Sigma-Aldrich.

Já foram atribuídas ao uvaol diversas propriedades biológicas, como leshimanicida (FILHO et al., 2009; SAUDAGAR et al., 2011), antitripanossomal (TAKETA et al., 2004), antibacteriana (MARTINS et al., 2011), efeito cardioprotetor (SOMOVA; SHODE; MIPANDO, 2004; MARTÍN et al., 2012), hepatoprotetor (LIU et al., 1994) e atividade antitumoral com propriedades que servem como adjuvantes na quimioterapia do câncer (MARTÍN et al., 2009; MARTINS et al., 2011; ALLOUCHE et al., 2011). Também foi observado que o uvaol é capaz de inibir a PDE4D2 (Phosphodiesterase 4D2) *in vitro* (TAN et

al., 2017) assim como promove uma redução na produção de óxido nítrico em linhagem murina de macrófagos, RAW264 (YANG et al., 2011). Este triterpeno também diminui a geração de ânion superóxido em neutrófilos humanos (CHEN et al., 2002). Além destes efeitos, em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa na UFAL, foi demonstrado que em um modelo de asma experimental o tratamento local com uvaol diminuiu significativamente a inflamação desencadeada por alérgenos nos animais asmáticos (AGRA et al., 2016).

Com base nestas informações, e considerando que os macrófagos mostram-se como as células do sistema imune mais abundante nas vias aéreas e pulmão (CAI et al., 2014), e que a polarização dos macrófagos tem sido demonstrada com um fator determinante para a fisiopatologia da asma (SARADNA et al., 2018), é possível que a modulação fenotípica dos macrófagos através da intervenção farmacológica possa modular os fenótipos de macrófagos tornando-se um potencial terapêutico para o tratamento da asma e outras doenças alérgicas. Além disso, prévios estudos já reportaram que outros terpenoides, tais como o neorogioltriol e celastrol mostram-se capazes de suprimir a polarização pró-inflamatória de macrófagos M1 (DASKALAKI et al., 2019; LUO et al., 2017). Adicionalmente, triterpenos pentacíclico, como por exemplo o lupeol, foram descritos como indutores de mudança na polarização dos macrófagos de um perfil M1 para um perfil M2 (ZHU et al., 2016). Portanto, no presente estudo avaliamos os efeitos do uvaol na ativação e modulação fenotípica dos macrófagos *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

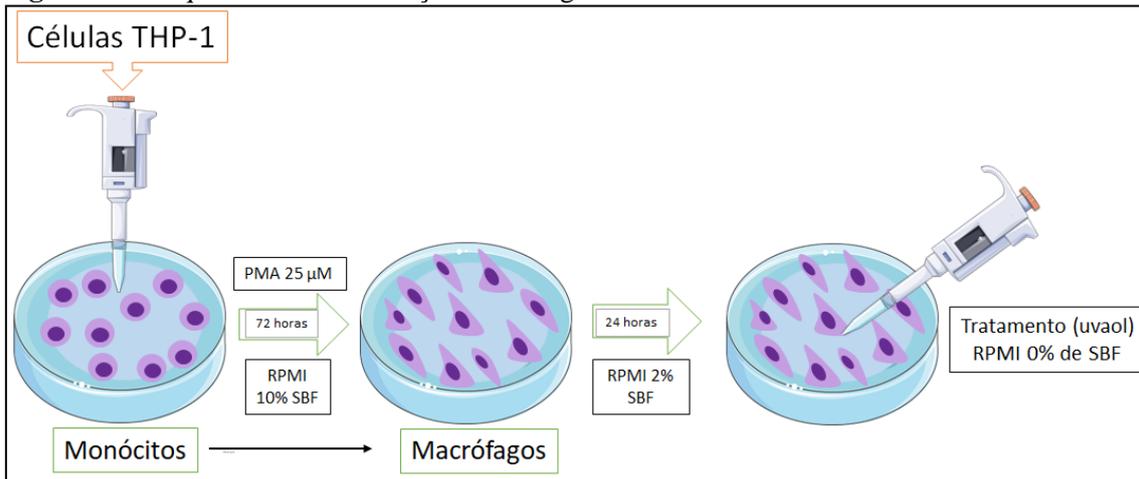
O uvaol, urs-12-ene-3,28-diol (CID 92802) foi obtido da Sigma-Aldrich (U6628, \leq 95% de pureza - HPLC) e dissolvido em 2% de DMSO. A solução tampão de fosfato (phosphate buffered saline – PBS), o Tween-20, Triton X-100, o zimosan A de *Saccharomyces cerevisiae*, o LPS (Lipolissacrídeo, *E. coli* I0127:B8), os meios de cultivo celular (RPMI-1640 e DMEM), a L-glutamina, o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) e o PMA (*Phorbol Myristate Acetate*), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, EUA). O entellan, foi obtido da Merck Millipore (Darmstadt, Germany). O dimetilsufóxido (DMSO), foi obtido da Synth (Diadema, SP, BRA), o corante Giemsa, da Vetec. O soro bovino fetal (SBF) e a penicilina/estreptomicina foram obtidos da Gibco (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os kits para quantificação de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 e MCP-1 foram adquiridos da PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). O anticorpo anti-NF-kBp65 foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), já o CD86 (FITC Anti-mouse CD86), foi obtido da Biolegend (San Diego, CA, USA).

4.2 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de macrófagos murinos J774A.1 e de monócitos humanos THP-1, ambas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ). As células foram mantidas seguindo as instruções do BCRJ sendo cultivadas em meio de cultura DMEM e RPMI-1640, respectivamente, suplementados com soro fetal bovino (SBF) à 10%, penicilina/estreptomicina (1%) e L-glutamina (2 mM), mantidas em estufa de CO₂ à 37 °C.

4.2.1 Diferenciação em macrófagos a partir da linhagem THP-1

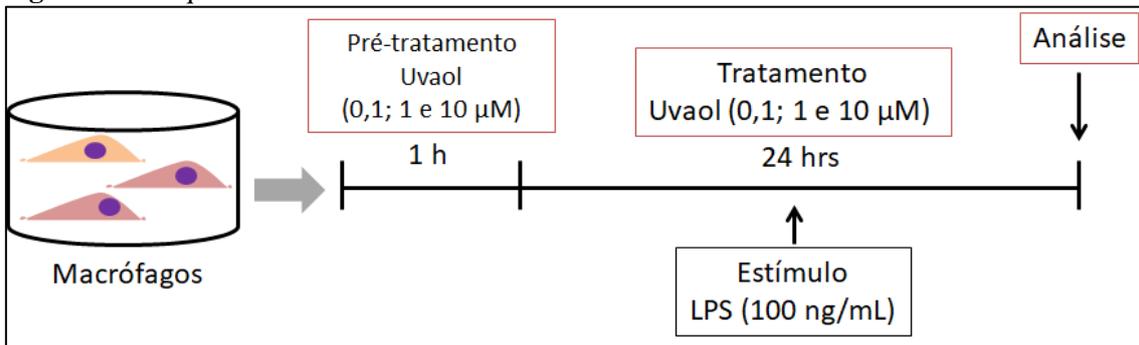
Monócitos humanos (THP-1) foram semeados (2×10^5 células/poço) em placas de 24 poços com a presença de PMA (phorbol myristate acetate) à 25 μ M (Figura 10) junto ao meio de cultura RPMI-1640 (SBF 10%) e mantidos em estufa de CO₂ à 37 °C por 72 horas. Em seguida, os macrófagos diferenciados permaneceram 24 horas na presença de meio de cultura RPMI-1640 (SBF 2%).

Figura 10 - Esquema de diferenciação da linhagem THP-1.

Fonte: Autor, 2018.

4.2.2 Tratamento

As células em cultivo foram pré-tratadas com uvaol por 1 h nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µM. Posteriormente, o meio foi retirado e as células foram tratadas novamente nas mesmas concentrações e estimuladas com LPS (100 ng/mL), por 24 horas, após este período foram realizadas as análises, como pode ser evidenciado na Figura 11.

Figura 11 - Esquema de tratamento.

Fonte: Autor, 2019.

4.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células foi mensurada após o tratamento com uvaol por 24 h utilizando o método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT), descrito por Mosmann (1986). As células J774 ($1,5 \times 10^4$ células/poço) ou macrófagos THP-1 (2×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas sob tratamento com uvaol (0,1, 1, 10, 100 e 1000 µM) em meio de cultivo por 24 horas. Células mantidas apenas com

meio de cultivo foram utilizadas como controle. Após este período, foi adicionado a cada poço 50 µl de MTT (5 mg/mL) por mais 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e adicionado solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (150 µL/poço) para a formação de cristais de formazan e posterior leitura em espectrofotômetro (540 nm). A atividade de redução do MTT foi expressa como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle ($[\text{absorbância das células tratadas}/\text{absorbância das células não tratadas}] \times 100$).

4.4 Quantificação de citocinas e quimiocinas

Os níveis de citocinas e quimiocinas presentes no sobrenadante das células foram quantificados através do ensaio de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). As células J774 e THP-1 foram pré-tratadas por 1 h com uvaol (0,1, 1 e 10 µM) e estimuladas com LPS (100 ng/mL) juntamente com uvaol por mais 24 horas. Após este período, o sobrenadante livre de células foi recolhido e a quantificação seguiu as instruções do fabricante (Peprotech®, Rocky Hill, New Jersey, EUA) e a leitura da absorbância realizada em leitor de microplacas (Polaris, Celer Biotecnologia S.A.). Do sobrenadante das células J774 foram quantificados os níveis de IL-1β, IL-6 e TNF-α, enquanto dos macrófagos THP-1 foram quantificados os níveis de IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1 e IL-8.

4.5 Quantificação de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada pelo método de Griess. Neste método, a produção de NO é avaliada indiretamente medindo-se o nitrito nos sobrenadantes das culturas de macrófagos. Para isto, 100 µl de sobrenadante de cada poço de células J774 previamente tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 µM), foram transferidos para uma placa de 96 poços. As concentrações de nitrito presentes nos sobrenadantes foram obtidas através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando-se diluições duplas seriadas de nitrito de sódio a partir de 200 µl até a décima primeira diluição. Foi adicionado o reagente de Griess nas amostras bem como na curva padrão. A absorbância foi determinada à um comprimento de onda de 540 nm, através de espectrofotômetro

4.6 Avaliação da atividade fagocítica

Macrófagos J774 foram semeados (3×10^5 /poço) em lamínulas de vidro de 13 mm dispostas em placas de 24 poços em DMEM (SBF 10%, L-glutamina 2 mM e penicilina/estreptomicina 1%) e mantidas em estufa de CO₂ à 37 °C. Posteriormente as células foram tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 µM) por 24 h. Após o tratamento, partículas de zimosan foram adicionadas as células numa proporção de 10 partículas por célula, durante 1 h em estufa de CO₂ à 37 °C. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol P.A. por 10 minutos e coradas com Giemsa (1:10) por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas e montadas em lâminas com Entellan®. As lâminas foram examinadas por microscopia de luz, utilizando o microscópio Olympus BX41. A fagocitose foi determinada a partir de fotomicrografias com aumento de $\times 400$, contando 100 macrófagos por poço. A fagocitose foi avaliada como o número médio de partículas por célula (NMP), pela porcentagem de células que fagocitaram (PF), e pelo índice fagocitário (IF) que foi determinado da seguinte forma: $IF = NMP \times PF$.

4.7 Polarização dos macrófagos e análise por citometria de fluxo da expressão do marcador de superfície CD86 para macrófago M1

Para avaliar o efeito do uvaol sobre a perfil pró-inflamatório de macrófagos (M1), as células J774 foram semeadas (5×10^5 /poço) em placas de 24 poços com DMEM suplementado (SBF 10%, L-glutamina 2 mM e penicilina/estreptomicina 1%) e mantidos em estufa de CO₂ à 37 °C. Posteriormente as células foram pré-tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 µM) por 1 h, e, em seguida, foram polarizadas para o perfil M1 (LPS 100 ng/mL e IFN- γ 30 ng/mL) simultaneamente ao tratamento com uvaol (0,1, 1 e 10 µM) por mais 24 h em meio DMEM. Após este período, as células foram incubadas com anticorpos específicos anti-CD86-FITC, que identifica o subtipo M1 de macrófagos, diluídos em PBS-SBF 2%, por 20 minutos a 4°C. Após marcação, as células foram lavadas, fixadas em PBS com formaldeído a 2%. As aquisições foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Canto II equipado com o programa de computador Diva (BD biosciences). Após aquisição, os dados foram analisados através do programa Flowing.

4.8 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (PCRq)

As células J774 foram semeadas em placas de 6 poços, no qual foram tratadas ou não com uvaol (10 μ M) e estimuladas ou não com LPS (LPS 100 ng/mL e IFN- γ 30 ng/mL) e IL-4 (100 ng/mL) por 24 horas. Após o tratamento, o RNA foi extraído com auxílio do Kit de Extração PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies) conforme descrição do fabricante. Após extração do RNA, o mesmo foi quantificado com auxílio do NanoDrop One e tratado com a enzima DNase, para garantir a eliminação de qualquer resíduo de DNA genômico, em seguida, o RNA foi transcrito reversamente para obtenção do DNA complementar (cDNA). A reação de PCRq foi realizada através da utilização do equipamento QuantiStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabela 2 – Lista de genes-alvo utilizados.

Gene-alvo (símbolo)	Sequência Forward	Sequência Reverse
Tumoral necrosis fator alpha (<i>Tnf-α</i>)	CCGATGGGTTGTACCTTGTC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
Interleucina 6 (<i>Il-6</i>)	AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGA	GGAAATTGGGGTAGGAAGGA
Transforming growth fator, beta (<i>Tgf-β</i>)	GAAGGACCTGGGTTGGAAGT	TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC
Arginase (<i>ArgI</i>)	AGAAACAGAGTATGACGTGAG	GACCGTGGGTTCTTACAAT

Fonte: Autor, 2020.

4.9 Localização de p65 (NF-kB) por imunofluorescência

As células J774 (2×10^4 células/poço) foram cultivadas em lâminas de vidro (Lab-Tek), no qual foram tratadas ou não com uvaol (10 μ M) e estimuladas ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Depois do tratamento, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol P.A. por 15 min, e, posteriormente, hidratadas com PBS por 5 min, e permeabilizadas com Triton X-100 (0,05%) por 10 min. Em seguida, os antígenos inespecíficos foram bloqueados com PBS/BSA (2%) por 30 min para incubação com o anticorpo primário anti-NF-kB p65 (Invitrogen® concentração 1:300) overnight a 4 ° C. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário GAR-FITC (1:200). Após incubação, as células foram lavadas com PBS e mantidas com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, concentração 1:1000) por 10 min para marcar o núcleo. As lâminas foram lavadas novamente com PBS e montadas com PBS/glicerol e posteriormente avaliadas através de

microscopia de fluorescência e as fotomicrografias foram obtidas através da câmara Nikon modelo DS-Ri1 (Microscópio Nikon Eclipse 50i). A intensidade de fluorescência dos núcleos foi determinada em pixels e quantificada pelo programa Image J.

4.10 Análise estatística

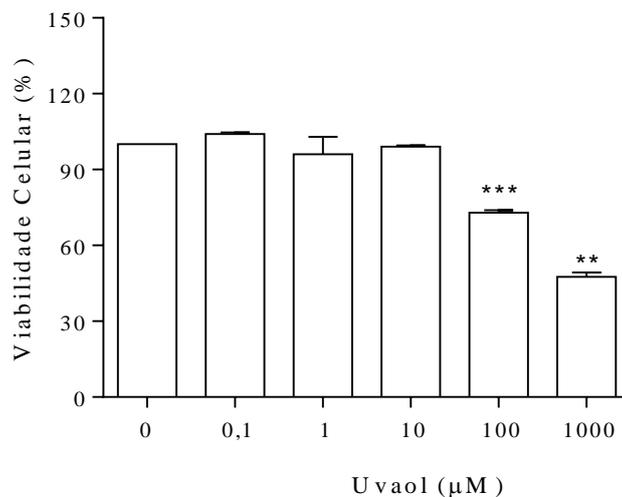
Todos os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Comparação estatística entre os grupos foi realizada por análise de variância One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de $p < 0,05$ usando o programa GraphPad Prism® 7.0 (Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do uvaol sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos.

Inicialmente foi observado o efeito direto do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos murinos (J774). Como demonstrado na Figura 12, o tratamento com uvaol por 24 horas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM não interferiu na viabilidade das células quando comparados ao grupo sem tratamento (controle). Já os tratamentos de 100 e 1000 μM foram capazes de diminuir cerca de 30% e 50%, respectivamente, a viabilidade das células.

Figura 12 - Efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos murinos da linhagem J774.



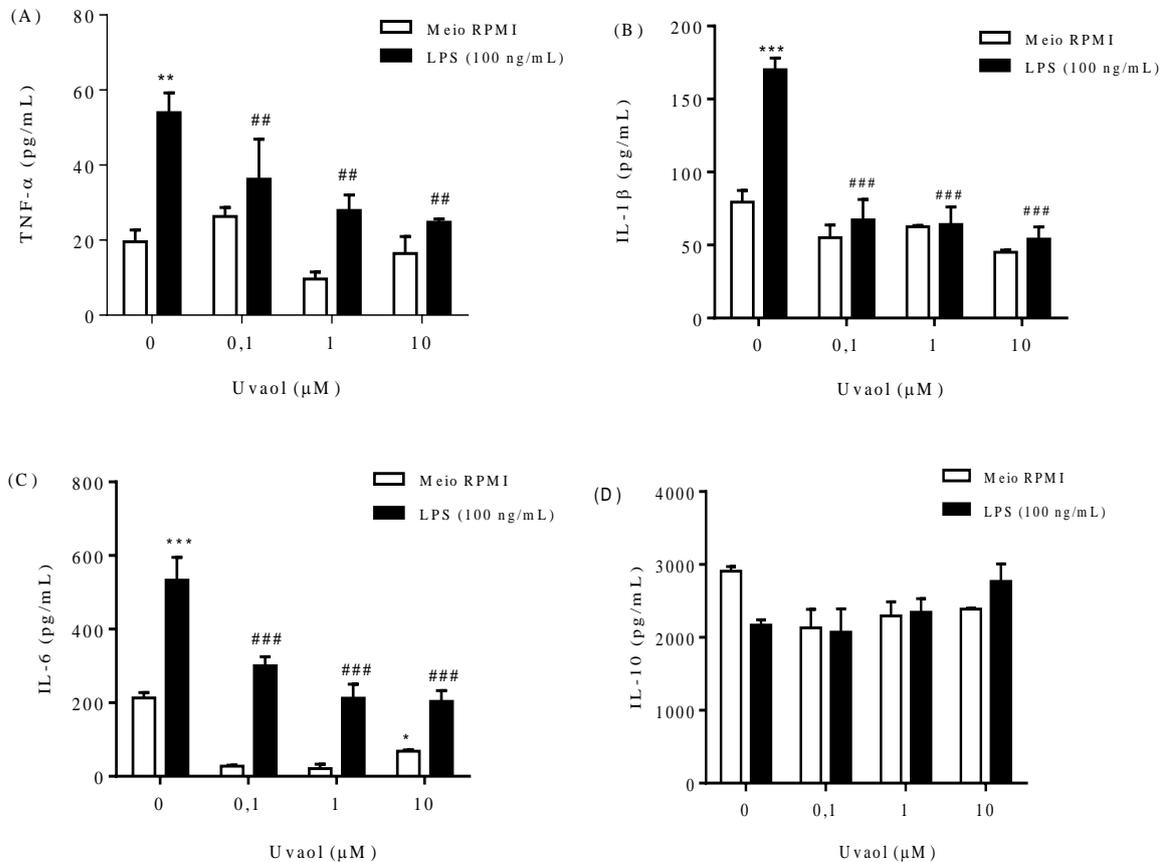
Macrófagos murinos da linhagem J774, foram tratados com uvaol (0,1-1000 μM) por 24 horas. Os dados acima representam a porcentagem de células viáveis (%) quando comparados ao grupo controle. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes e as análises estatísticas foram detectadas por one-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls no qual (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ quando comparado as células não tratadas.

5.2 Efeito do tratamento com uvaol sobre a produção de citocinas

Com o intuito de avaliar o efeito do uvaol sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios, a produção de citocinas foi quantificada pelo ensaio de ELISA. Para este propósito, os macrófagos foram tratados previamente com uvaol (0,1, 1 e 10 μM) por 1 h, e durante as 24 h de estimulação com LPS (100 ng/mL). Após o tempo de estimulação o sobrenadante foi recolhido e os mediadores quantificados. A Figura 13 demonstra que o estímulo com LPS é capaz de aumentar de maneira significativa os níveis de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Figura 13 A, B e C), mas não é capaz de modular o

mediador anti-inflamatório, IL-10 (Figura 12 D). O tratamento com uvaol, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM diminuiu, respectivamente a produção de TNF- α em aproximadamente 31%, 47% e 53%, de IL-1 β em 60%, 62% e 68% e de IL-6 44%, 60% e 62%.

Figura 13 - Efeito do uvaol sobre a produção de citocinas em macrófagos J774 estimulados com LPS.



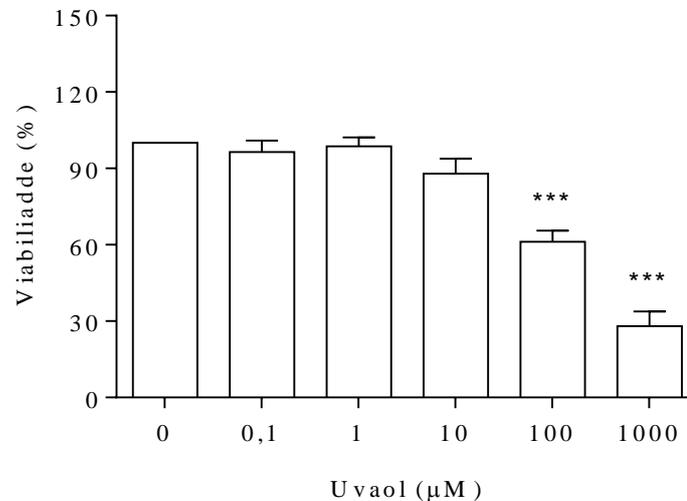
As barras representam os níveis de citocinas produzidas por macrófagos J774 tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 μM) e estimulados com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes e as análises estatísticas foram detectadas por one-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls no qual (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ quando comparado as células não-estimuladas e (***) $p < 0,001$ e (##) $p < 0,01$ quando comparados ao controle estimulado com LPS (100 ng/mL).

5.3 Efeito do uvaol sobre a viabilidade celular de macrófagos humanos.

Com intuito de verificar se o uvaol seria capaz de induzir o mesmo perfil anti-inflamatório em células humanas, decidiu-se utilizar a linhagem de macrófagos humanos THP-1 para confirmar os efeitos do uvaol sobre a viabilidade. Como demonstrado na Figura 14, foi possível verificar que o tratamento com uvaol por 24 horas nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM não possuiu interferência na viabilidade das células quando comparado ao grupo sem

tratamento (controle). Já os tratamentos de 100 e 1000 μM foram capazes de diminuir cerca de 40% e 70%, respectivamente, a viabilidade das células.

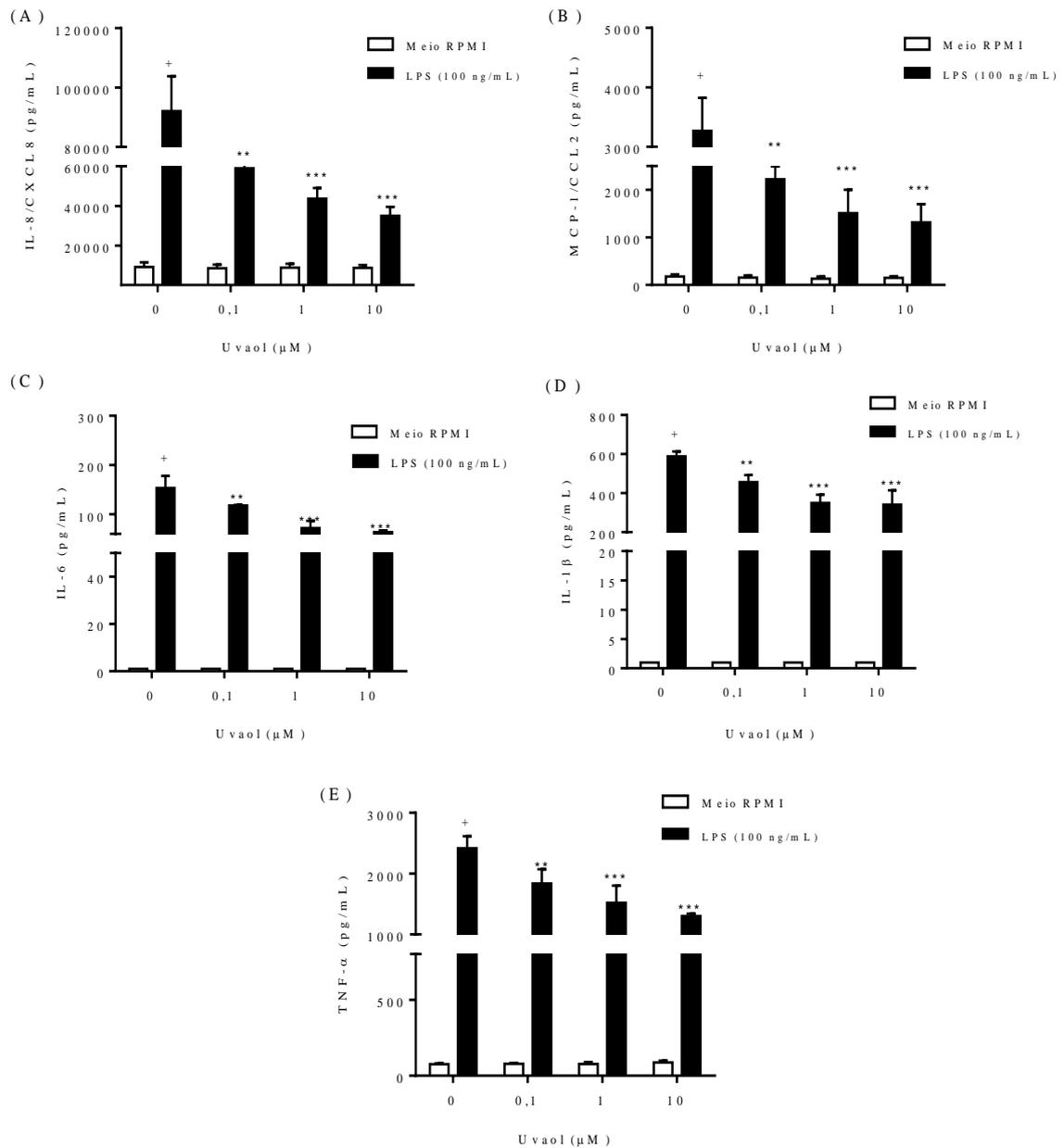
Figura 14 - Efeito do uvaol sobre a viabilidade de macrófagos humanos da linhagem THP-1.



Macrófagos humanos da linhagem THP-1, foram tratados com uvaol (0,1-1000 μM) ou meio de cultivo (controle) por 24 horas. Os dados acima representam a porcentagem de células viáveis (%) quando comparados ao grupo controle. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes e as análises estatísticas foram detectadas por one-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls no qual (***) representa $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ quando comparado as células tratadas com o controle.

5.4 Efeito do tratamento com uvaol sobre a produção de citocinas em macrófagos humanos

Com o propósito de verificar se os efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo uvaol sobre macrófagos de camundongos se estendem para macrófagos humanos, decidiu-se avaliar os efeitos do uvaol sobre células da linhagem humana THP-1 estimulados por LPS. A Figura 15 revela que macrófagos humanos estimulados com LPS exibem uma produção aumentada de citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, bem como uma elevação na produção das quimiocinas CXCL8 e MCP-1, e que o tratamento com uvaol nas três concentrações testadas foi capaz de inibir de maneira significativa tanto a produção de citocinas quanto a produção de quimiocinas.

Figura 15 - Efeito do uvaol sobre a produção de citocinas na linhagem THP-1 estimulada com LPS.

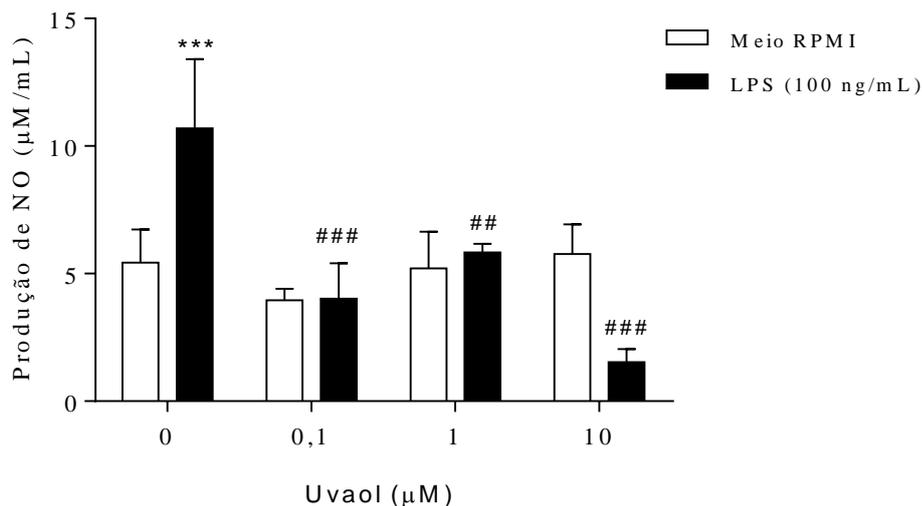
Produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em macrófagos THP-1 tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 μM) e estimulados com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Dados apresentados por média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls sendo (+) $p < 0,001$ quando comparado as células tratadas com meio RPMI (controle) e (***) $p < 0,001$ e (**) $p < 0,01$ quando comparados ao controle estimulado com LPS (100 ng/mL).

A partir deste conjunto de resultados que confirmam/validam os efeitos anti-inflamatórios do uvaol em macrófagos J774, foi decidido dar continuidade a todos os experimentos seguintes utilizando a linhagem de macrófagos murinos J774.

5.5 Efeito do uvaol sobre a produção de NO em macrófagos

Para observar se o tratamento com uvaol seria capaz de inibir a produção de óxido nítrico, este foi mensurado por meio da técnica de Griess. No qual, foi possível observar, na Figura 16, que o tratamento com uvaol, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM foi capaz de diminuir a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS.

Figura 16 - Efeito do uvaol na produção de óxido nítrico.



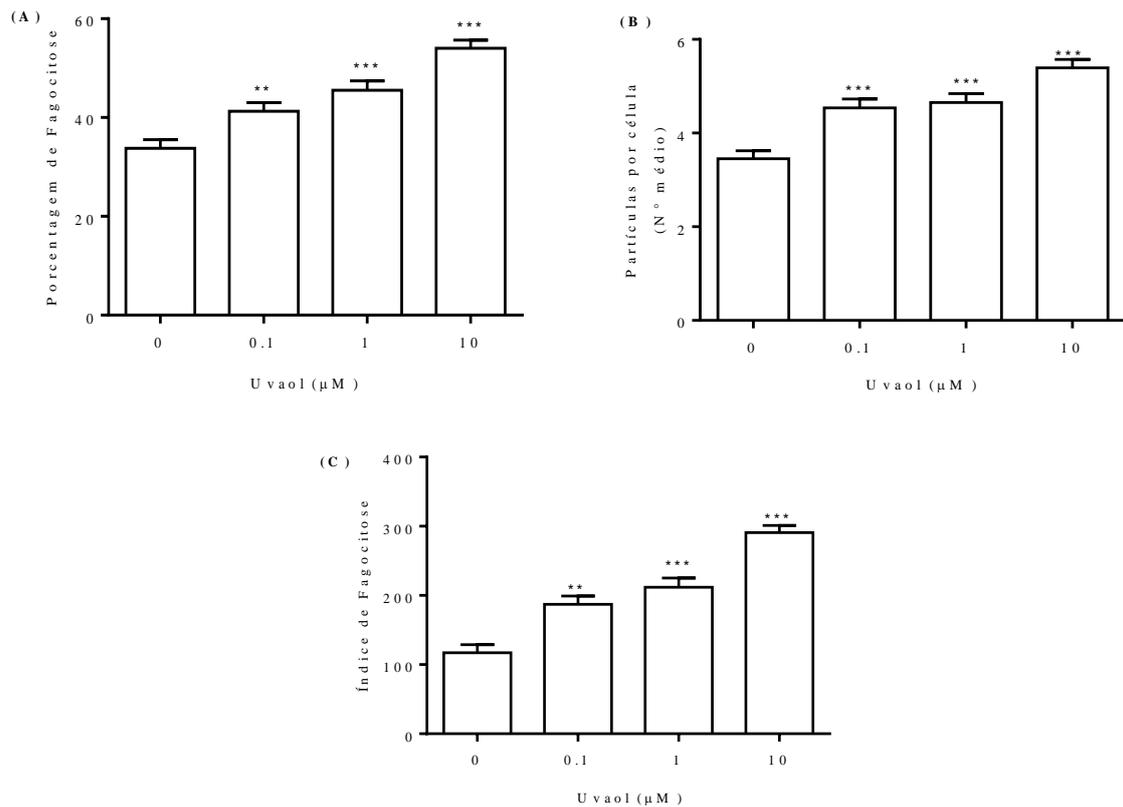
As barras representam os níveis de óxido nítrico produzido por macrófagos J774 tratados com uvaol (0,1, 1 e 10 μM) e estimulados com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes e as análises estatísticas foram detectadas por one-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls no qual (***) $p < 0,001$ comparado as células tratadas com meio RPMI (controle) e (###) $p < 0,001$ e (##) $p < 0,01$ quando comparados ao controle estimulado com LPS (100 ng/mL).

5.6 Efeito do uvaol sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos

Com propósito de verificar se outras funções realizadas pelos macrófagos durante a resposta inflamatória estariam sendo afetadas pelo tratamento com uvaol, decidiu-se então avaliar o efeito deste triterpeno sobre a resposta fagocítica utilizando partículas de zimosan. Neste conjunto de experimentos, partículas de zimosan foram adicionadas aos macrófagos em cultura e a capacidade fagocítica das células avaliada pelo número de células que fagocitaram, pelo número de partículas por célula e pelo índice de fagocitose. Conforme apresentado na Figura 17A, cerca de 40% dos macrófagos J774 exibiram uma habilidade nata de realizar a fagocitose de partículas de zimosan. Nesta mesma figura, observa-se claramente que o tratamento com uvaol, nas três doses testadas, aumentou de forma significativa a porcentagem

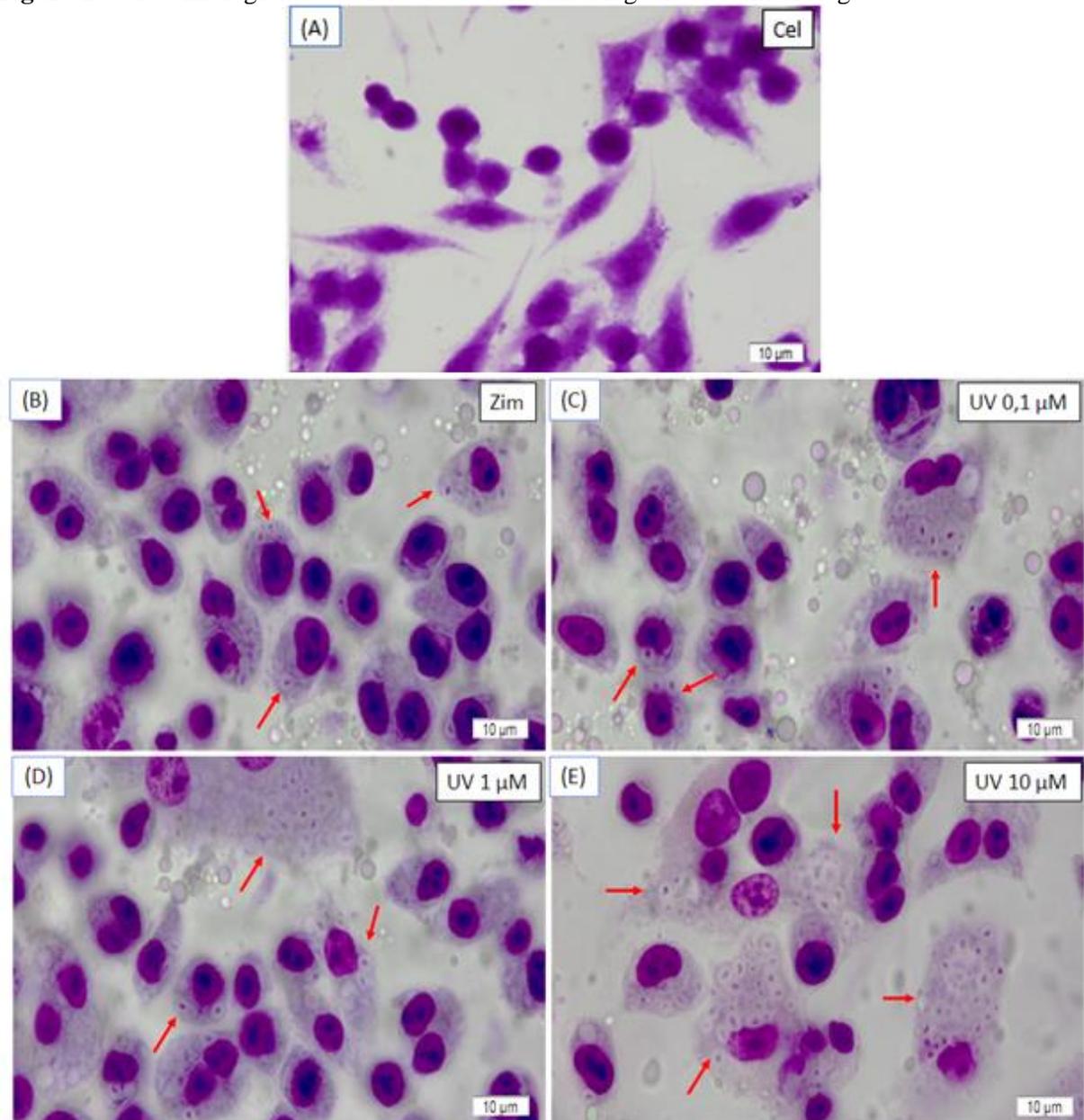
de macrófagos capazes de fagocitar. Já na Figura 17B, pode ser observado que cada macrófago possui habilidade de engolfar cerca de quatro partículas de zimosan, e que o tratamento com uvaol, nas doses testadas, também aumentou de forma significativa a capacidade de fagocitose de cada célula. Na Figura 17C, a habilidade fagocítica, aferida pelo índice de fagocitose de cada macrófago, mostrou-se significativamente melhorada após tratamento com uvaol. Na Figura 18, podemos observar as fotomicrografias indicando as partículas fagocitadas.

Figura 17 - Efeito do uvaol sobre a fagocitose de macrófagos J774.



Perfil de fagocitose por células J774, tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 μM) por 24 horas e estimuladas com zimosan (10 partículas por célula). Dados apresentados por média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Student Newman-Keuls (***) p<0,001 e (**) p<0,01 quando comparado como células sem tratamento mantidas em meio RPMI (controle).

Figura 18 – Fotomicrografias do efeito do uvaol sobre a fagocitose de macrófagos J774.



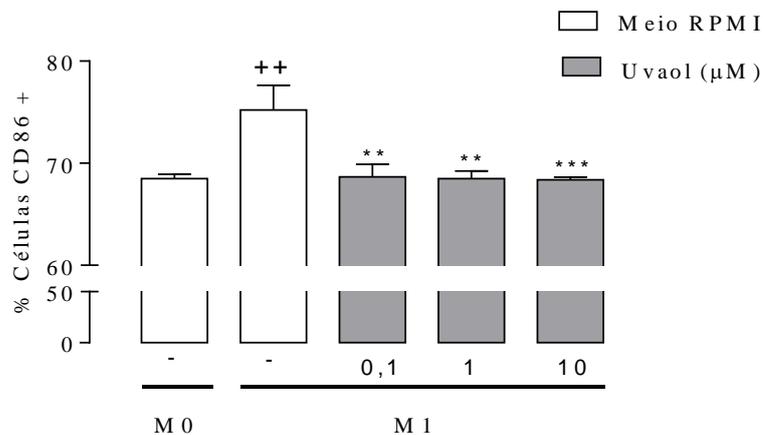
Fotomicrografias ilustrando a fagocitose dos macrófagos J774 expostos ao zimosan e coradas com Giemsa 1:10, num aumento de 100X. Cel – Célula; Zim – Zimosan; UV – Uvaol. Em (A) o grupo apenas de células, em (B) grupo de células apenas estimulado com zimosan, em (C), (D) e (E), os grupos estimulados com zimosan e tratados com uvaol (0,1, 1 e 10 μM), respectivamente. Setas vermelhas indicam as partículas fagocitadas.

5.7 Efeito do uvaol sobre a expressão de CD86, um marcador de polarização de macrófagos para o perfil M1

Uma vez demonstrado que o uvaol mostra-se capaz de reduzir a resposta pró-inflamatória de macrófagos estimados com LPS, decidiu-se avaliar se este triterpeno estaria sendo capaz de afetar o perfil de polarização funcional M1 desta célula. Como apresentado na

Figura 19, os macrófagos submetidos a estimulação para polarização ao fenótipo M1 exibiram um aumento significativo no marcador de superfície CD86. Nesta mesma figura pode ser observado que macrófagos estimulados para uma polarização de fenótipo M1 quando tratados com uvaol nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM exibiram uma redução significativa na expressão do marcador funcional CD86 para 8,72%, 8,94% e 9,1%, respectivamente.

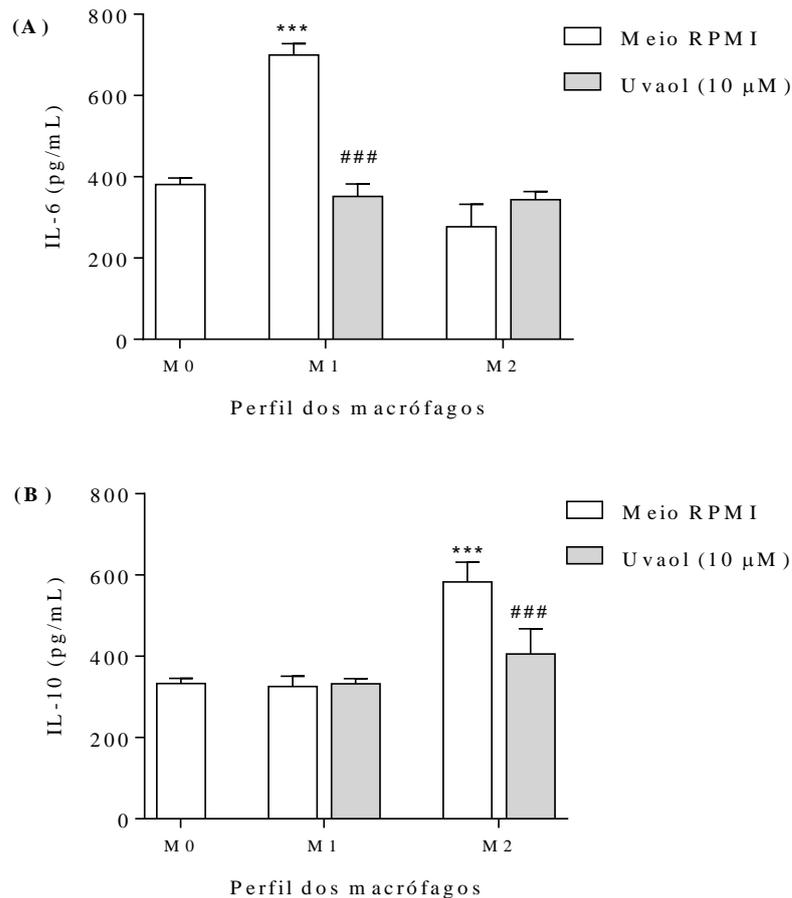
Figura 19 - Efeito do uvaol sobre a polarização de macrófagos.



Perfil M1 de polarização funcional de macrófagos J774 indicado pela marcação para CD86. As células foram tratadas com uvaol (0,1, 1 e 10 μM) e estimuladas LPS + IFN- γ por 24 horas. (A) Dados apresentados por média \pm E.P.M., as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, onde (++) $p < 0,01$ quando comparado como células M0 e (***) $p < 0,001$ e (**) $p < 0,01$ quando comparado as células M1 sem tratamento.

5.8 Efeito do uvaol sobre a produção de IL-6 e IL-10 em macrófagos polarizados para os perfis M1 e M2

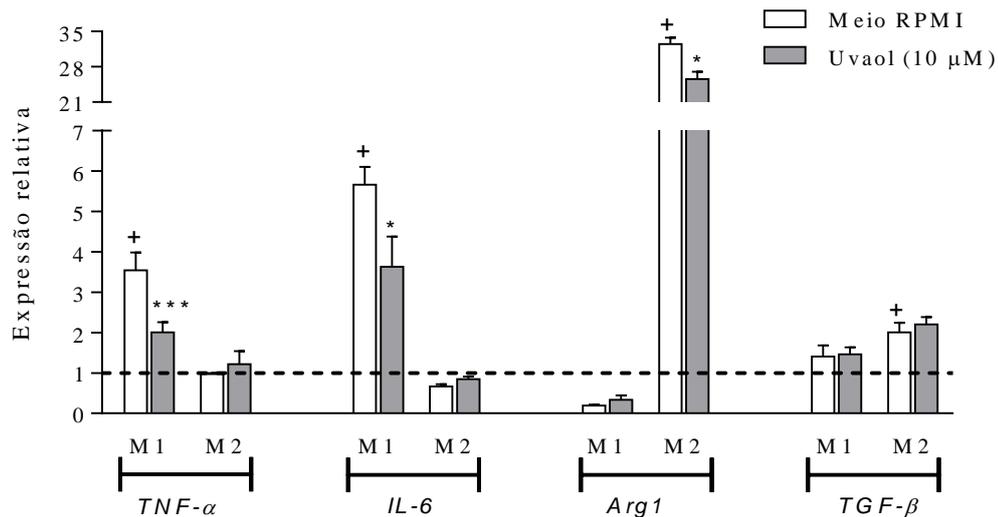
Para avaliar se o uvaol seria capaz de afetar a polarização para os perfis funcionais M1 e M2 de macrófagos, os macrófagos foram polarizados e submetidos ou não ao tratamento com uvaol (10 μM). Como demonstrado na Figura 20, a polarização para ambos perfis foi obtida com sucesso, pois houve um aumento das citocinas IL-6 (Figura 20A) e IL-10 (Figura 20B) representando os perfis M1 e M2, respectivamente. Foi também possível observar que o tratamento com uvaol (10 μM) foi capaz de reduzir a produção de IL-6 (Figura 20A) em células do perfil M1, e inibiu de forma significativa a produção de IL-10 em células do perfil M2 (Figura 20B).

Figura 20 - Efeito do uvaol sobre a produção de citocinas em macrófagos M1 e M2

Perfil de produção de citocinas em macrófagos J774 polarizados. As células foram tratadas com uvaol (10 µM) e estimuladas LPS + IFN- γ (para o perfil M1) ou com IL-4 (para o perfil M2) por 24 horas. (A) Dados apresentados por média \pm E.P.M., as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, onde (***) $p < 0,001$ comparado como células M0 mantidas em meio RPMI (controle) e (###) $p < 0,001$ comparado com a respectiva células mantidas em meio RPMI.

5.9 Efeito do uvaol sobre a expressão de genes marcadores para o perfil de macrófagos M1 e M2

Para observar se o efeito do uvaol (10 µM) se dá em nível transcricional, foi realizado o ensaio de PCRq em tempo real. Como apresentado na Figura 21, a polarização para ambos perfis foi obtida com sucesso, no qual os genes *Tnf- α* e *IL-6* típicos do perfil M1, e os genes *Tgf- β* e *Arg1* típicos do perfil M2 exibiram níveis aumentados após diferenciação fenotípica. O tratamento com uvaol, foi capaz de diminuir a expressão relativa de *Tnf- α* e *IL-6* no perfil de ativação M1 (Figura 21). Quando observada a expressão relativa de macrófagos do perfil M2, observou-se que o tratamento com uvaol induziu uma discreta redução nos elevados níveis de *Arg1* (Figura 21). Já na expressão relativa de *Tgf- β* , o tratamento com uvaol não foi capaz de induzir alterações significativas no aumento da expressão deste gene (Figura 21).

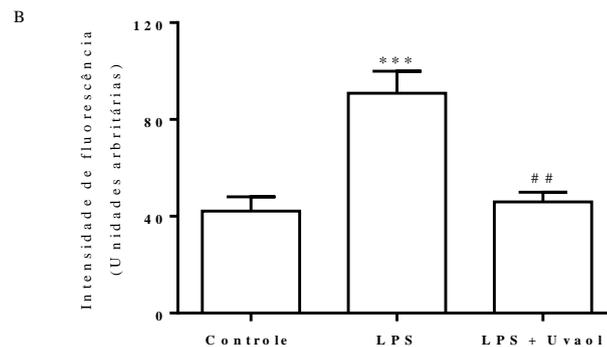
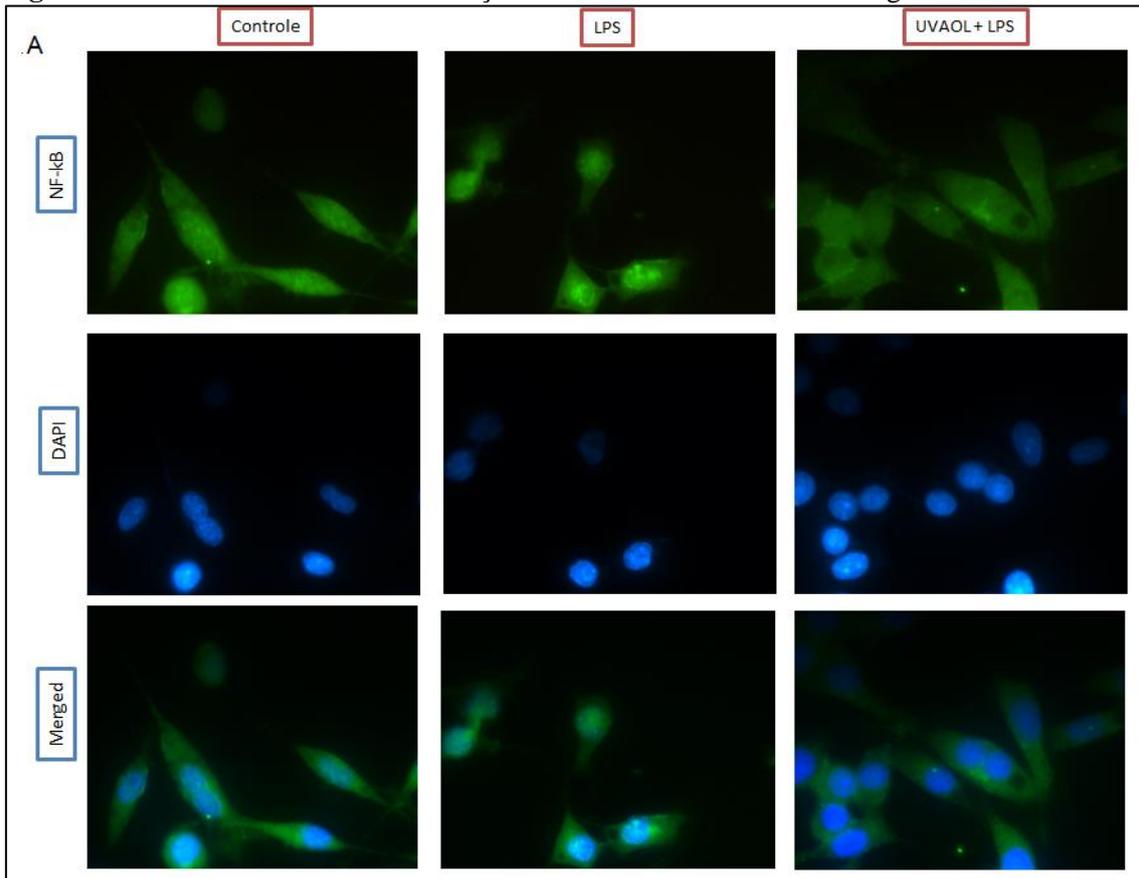
Figura 21 – Efeito do uvaol sobre a expressão gênica de marcadores de diferenciação de macrófagos

Perfil de expressão gênica em macrófagos J774 polarizados. As células foram tratadas com uvaol (10 μ M) e estimuladas LPS + IFN- γ (para o perfil M1) ou com IL-4 (para o perfil M2) por 24 horas. (A) Dados apresentados por média \pm E.P.M., as análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, onde (+) $p < 0,001$ quando comparado como a expressão basal do gene (linha pontilhada) e (***) representa $p < 0,001$ e (*) representa $p < 0,05$ quando comparadas com a expressão do respectivo gene dentro do mesmo perfil de macrófago.

5.10 Efeito do uvaol sobre a translocação nuclear de p65-NF-kB

Considerando a inibição do perfil pró-inflamatório dos macrófagos após tratamento com uvaol, decidiu-se avaliar se este tratamento estaria interferindo em vias de sinalização intracelular sabidamente reconhecidas por governar a diferenciação de macrófagos para o perfil M1. Para isso, decidiu-se avaliar se o uvaol seria capaz de interferir com a translocação do NF-kB em macrófagos estimuladas com LPS. Utilizando a técnica de imunofluorescência mensuramos a translocação da proteína p65-NF-kB do citoplasma para o núcleo em macrófagos após 24 h de estímulo com LPS. Como pode ser observado na Figura 22, o estímulo com LPS foi capaz de induzir a translocação da proteína p65-NF-kB do citoplasma para o núcleo, fenômeno que foi atenuado pelo O tratamento com uvaol (10 μ M).

Figura 22 - Efeito do uvaol na translocação nuclear de NF- κ B em macrófagos estimulados.



Imunomarcagem da proteína p65-NF- κ B em macrófagos J774 tratados com uvaol (10 μ M) e estimuladas ou não com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. (A) Fotomicrografias representativas da translocação nuclear de NF- κ B. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência nuclear (expresso em unidades arbitrárias) pelo software ImageJ. Dados apresentados por média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Fotomicrografias 100X. As análises estatísticas foram detectadas por One-way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls, onde (***) representa $p < 0,001$ quando comparado com o controle (células mantidas em meio RPMI) e (##) representa $p < 0,01$ quando comparado ao grupo estimulado com LPS (controle positivo).

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que as doenças de base inflamatória são responsáveis por elevados números de internações hospitalares e altas taxas de morbidade no mundo (OMS, 2007). No Brasil, doenças inflamatórias como asma e DPOC causam altos índices de morbimortalidade em diferentes regiões do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Logo, estudos capazes de identificar moléculas com potencial anti-inflamatório e que sejam promissoras para desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento das doenças de base inflamatória se fazem necessários.

Nos últimos anos, foram realizados incentivos no Brasil, com intuito de promover a aproximação pesquisador-indústria farmacêutica, proporcionando a caracterização química e farmacológica de princípios ativos de origem natural (FERRARIS et al., 2011). Como o uvaol é um terpeno, que possui diversas atividades biológicas já comprovadas, como antioxidante, antitumoral e antiedematogênica, razões que têm estimulado o interesse neste composto natural para seu potencial uso no tratamento de doenças.

É bem descrito na literatura que macrófagos possuem participação ativa em diferentes fases da resposta imunoinflamatória (MESHKANI; VAKILI, 2016), pois os macrófagos ativados provocam muitos dos seus efeitos através da secreção de mediadores pró-inflamatórios solúveis. O LPS, derivado de bactérias gram-negativas é considerado o mais potente ativador da resposta secretora de macrófagos. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é um dos primeiros e mais importantes mediadores pró-inflamatórios secretados por macrófagos quando estimulados com LPS *in vivo* e *in vitro* (NATHAN, 1992; NUSSLER; BILLIAR; 1993). Após a sua ativação, os macrófagos produzem citocinas (MOLLOY; MANNICK; RODRICK, 1993), como IL-1 β , IL-6 e TNF- α (HINZ; BRUNE, 2002). A liberação em excesso destes mediadores está envolvida no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias como a artrite reumatoide, a asma, a aterosclerose e a fibrose pulmonar (LIN; KARIN, 2007; SURH, 2001). Considerando estas informações, no presente trabalho utilizamos o LPS como agente ativador da função inflamatória dos macrófagos humanos da linhagem THP-1 e murinos da linhagem J774.

O uvaol, um triterpeno pentacíclico, encontrado em plantas com propriedades medicinais, e no azeite de oliva, vem sendo descrito como possuidor de propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, até o momento a caracterização das suas ações anti-inflamatórias em macrófagos não haviam sido descritas. Portanto, este trabalho objetivou caracterizar a atividade anti-inflamatória do uvaol em macrófagos ativados *in vitro*. Nossos

resultados revelaram que o uvaol, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM , inibiu a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) após a estimulação de macrófagos murinos da linhagem J774 com LPS, fenômeno que não mostrou-se associado a morte das células, já que pelo ensaio do MTT, o uvaol até a concentração de 10 μM não se mostrou citotóxico. Efeito semelhante também foi observado na linhagem de macrófagos humanos da linhagem THP-1, no qual, o uvaol, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM , inibiu a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e quimiocinas (IL-8 e MCP-1) após estímulo com LPS e este também não se mostrou associado a morte das células, pois o uvaol não se mostrou tóxico até a concentração de 10 μM .

Cabe destacar, que estudos prévios já reportaram que concentrações maiores de 10 μM de outros triterpenos pentacíclicos, como o ácido ursólico e oleanólico, mostram-se capazes de induzir apoptose por vias intracelulares dependentes da ativação de Akt e Notch1 (GAO et al., 2007). Já em outro estudo, foi reportado que o triterpeno stichoposide A, em elevadas concentrações, induz alteração na permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática além de suprimir o transporte de nucleosídeos e aminoácidos causando morte celular (ANISIMOV et al., 1978). Dessa forma, decidiu-se seguir avaliando os efeitos do uvaol sobre os macrófagos utilizando a concentração de 10 μM .

Em outro conjunto de experimentos, o uvaol nas concentrações de 0,1, 1 e 10 μM foi capaz de induzir o aumento na habilidade fagocítica dos macrófagos, tanto por aumentar o número de células capazes de fagocitar, quanto por elevar o número de partículas fagocitadas, resultando assim, num aumento do índice de fagocitose nos macrófagos. A partir destes resultados, e considerando os achados onde o uvaol reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, seguiu-se por avaliar o efeito do uvaol sobre a diferenciação funcional desta célula. Nesse aspecto, verificamos que o tratamento com uvaol reduziu a expressão do marcador de polarização M1, CD86, e suprimiu a expressão gênica de marcadores de macrófagos polarizados. Além disso, o uvaol também foi capaz de reduzir a translocação do NF- κB para o núcleo em macrófagos ativados por LPS, o que justificaria, a via intracelular responsável pela ação anti-inflamatória do uvaol sobre os macrófagos.

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa em atuação na UFAL demonstrou que o tratamento intranasal com uvaol, em camundongos, mostra-se capaz de inibir a resposta inflamatória alérgica das vias aéreas (AGRA et al., 2016). É amplamente aceito que os macrófagos desempenham importante papel na fase aguda da resposta inflamatória alérgica, bem como na cronicidade da doença (JIANG; ZHU, 2016). Embora ainda não esteja claro quanto à origem dos macrófagos pulmonares, estudos recentes sugerem que esses macrófagos

se desenvolveram a partir da diferenciação de monócitos sanguíneos ou da proliferação de macrófagos residentes (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014). Além disso, os macrófagos são uma população extremamente heterogênea, exibindo uma combinação de funções inflamatórias e anti-inflamatórias (LI et al., 2009). Portanto, fármacos que consigam modular as funções dos macrófagos podem ter importante papel para o tratamento das doenças inflamatórias, tal como a asma.

Nossos resultados revelaram que o uvaol foi capaz de inibir em macrófagos murinos a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , que são importantes citocinas no desencadeamento da inflamação causada por LPS. Para verificar se esta inibição se estendia a macrófagos humanos, utilizamos células da linhagem THP-1, também estimulada com LPS, e verificamos que o perfil de inibição foi semelhante, pois nestas células humanas, o uvaol também inibiu a produção de IL-1 β e TNF- α . Adicionalmente, constatamos também que o uvaol suprimiu a produção de IL-6, CXCL8 e CCL2, o que demonstra o forte potencial anti-inflamatório do uvaol. Em sintonia com este resultado, estudos prévios já reportaram que outros triterpenos de origem natural, como o linalool e o lupeol, são capazes de diminuir de maneira significativa a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6 em macrófagos estimulados por LPS (HUO et al., 2013; KIM et al., 2015). O ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-12-urs-12-en-28-oico), outro triterpeno pentacíclico natural que está presente em uma grande variedade de plantas, incluindo maçãs, manjeriço, mirtilo, hortelã-pimenta, alecrim e orégano (LIU, 1995) foi demonstrado ser possuidor de diversos efeitos farmacológicos, como propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, com a supressão das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, se assemelhando ao uvaol (IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008; TSAI; YIN, 2008). Além disso, o uvaol não foi capaz de alterar a produção de IL-10, o que já foi observado em outros terpenos, no qual possuíam também a capacidade de inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (KU; LIN, 2013), reforçando o papel do uvaol em suprimir fenômenos pró-inflamatórios.

A ativação de macrófagos por LPS, também pode induzir a produção de EROs, que possuem um importante papel na progressão de diversas patologias de base inflamatória, podendo causar danos celulares, lipídicos, proteicos e ao DNA, inibindo a funcionalidade das células. Neste contexto, pode-se destacar o NO, que em produção excessiva é considerado um mediador pró-inflamatório, neste estudo, o uvaol, foi capaz de inibir a produção de NO nas diferentes concentrações testadas, resultado este que corrobora com os achados de outros terpenos, como L-carveol, L-carvona, m-cimeno, valenceno, magnolol e guaieno (MARQUES et al., 2018; CHEN et al., 2019). O mirceno, um terpeno encontrado em diversas

espécies vegetais, como lúpulo, capim-limão e manjeriço, também apresentou a capacidade de diminuir a produção de NO (RUFINO et al., 2015). Além destes triterpenos, o ácido maslinico vem sendo descrito como possuidor de atividades antioxidantes por atuar como um “scavenger” de espécies reativas de oxigênio (ALLOUCHE et al., 2010). Vale a pena mencionar ainda que, a β -amirina, um outro triterpeno pentacíclico encontrado na composição do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC que é o princípio ativo do medicamento Acheflan®, mostrou-se capaz de inibir a produção de óxido nítrico por suprimir a expressão da enzima óxido nítrico sintase (ASKARI et al., 2018). Adicionalmente, estudos prévios já demonstraram que a indução da enzima óxido nítrico sintase em macrófagos mostra-se regulada pela via de sinalização do NF- κ B (CONNELLY et al., 2001), tanto que produtos de origem natural, como as naftoquinonas, mostram-se capazes de inibir a produção de óxido nítrico por suprimir a expressão de enzima óxido nítrico sintase (SONG et al., 2009). Portanto, considerando as propriedades antioxidantes já descritas para outros triterpenos pentacíclicos, podemos especular que o uvaol possa estar diminuindo os níveis de óxido nítrico por atuar como “scavenger” ou suprimir a expressão e/ou atividade da enzima óxido nítrico sintase, ou ainda por inibir a ativação do NF- κ B. Mais estudos serão necessários para melhor esclarecer este ponto.

Considerando que a capacidade pro-inflamatória do macrófago estimulado com LPS mostrou-se reduzida pelo tratamento com uvaol, decidiu-se avaliar se outra habilidade típica desta célula observada no curso da resposta inflamatória, como a fagocitose, também seria influenciada pelo uvaol. Já é bem descrito na literatura que a fagocitose é um importante evento imunoinflamatório e esta consiste no englobamento de partículas por fagócitos profissionais como os neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (GORDON, 2016). Como a fagocitose possui um importante papel em situações fisiopatológicas, este processo é de suma importância para o auxílio na resolução da inflamação, bem como na resolução de infecções. Para mensurar a influência do uvaol neste fenômeno, realizamos o ensaio de fagocitose em macrófagos estimulados por zimosan, que é uma substância derivada da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* conhecida por promover a ativação fagocítica de macrófagos *in vitro* (UNDERHILL, 2003; ZAFFRAN et al., 1995). Nossos resultados revelaram que o uvaol aumentou a habilidade fagocitária de macrófagos frente ao estímulo com zimosan, sugerindo que este triterpeno pode contribuir para melhorar a remoção de detritos realizados por macrófagos no sítio inflamatório. Sustentando esta proposição, já foi demonstrado previamente que macrófagos que perderam o perfil fenotípico M1 são capazes de exibir maior atividade fagocítica (TARIQUE et al., 2015). Além disso, é

importante mencionar que já foi reportada que a supressão na atividade do NF- κ B melhora a fagocitose em macrófagos através da ativação da proteína transdutor de sinal e ativador da transcrição -1 (STAT1) (YI et al., 2015). A partir deste racional, nós hipotetizamos que o uvaol poderia estar atingindo seus efeitos anti-inflamatórios por modular o perfil funcional dos macrófagos.

Sabendo-se que os macrófagos atuam decisivamente no curso da resposta inflamatória, seja diferenciando-se em um perfil de ativação M1, ou ainda num perfil de ativação anti-inflamatório/pró-resolutivo M2 (MILLS; LEY, 2014), o controle sobre o perfil de diferenciação funcional desta célula mostra-se estratégico para o manejo da inflamação. Para confirmar esta proposta, nós quantificamos o marcador de superfície específico para macrófagos M1, o CD86. Nossos resultados revelaram uma redução no percentual de células positivas para o receptor, sugerindo uma diminuição na ativação de M0 para um perfil M1. Nossos estudos encontram-se em sintonia com estudos prévios, nos quais reportam que outro triterpeno, o lupeol, mostrou-se capaz de diminuir a expressão de CD86 na superfície de macrófagos M1, demonstrando que o lupeol possui sua função anti-inflamatória devido a mudança do fenótipo M1 para o fenótipo M2 (ZHU et al., 2016). Além disso, vale mencionar que a expressão de CD86 é regulada positivamente pela ativação de receptores que estimulam a via de sinalização dependente do NF- κ B (LI et al., 1999). Reforçando esta relação, em células dendríticas a inibição da translocação do NF- κ B pela aspirina resultou na redução da expressão de CD86 (BUCKLAND; LOMBARDI, 2009).

Sabendo que o perfil M1 é importante para liberar citocinas para inibir a proliferação de células malignas e para a contenção de diversos patógenos, ao passo que o perfil M2 libera citocinas que favorecem o crescimento e a disseminação de células tumorais além de promover o reparo tecidual (BISWAS; MANTOVANI, 2010; VINOGRADOV; WARREN; WEI, 2014), nós observamos a produção de duas importantes citocinas em macrófagos polarizados para os dois perfis de ativação frente ou não, ao tratamento com uvaol. Foi observado então, que quando polarizadas para o perfil de ativação M1, o tratamento com uvaol se mostrou eficaz em inibir a produção de IL-6, importante marcador pró-inflamatório, já quando polarizadas para o perfil de ativação M2, o tratamento com uvaol reduziu a produção de IL-10, importante citocina pró-resolutiva/anti-inflamatória. Já é descrito na literatura que diversos terpenos, como lupeol, resveratrol, quercetina e narigerina, são capazes de modular macrófagos M1-M2, conferindo a estes uma importante ação anti-inflamatória por inibir o perfil e ativação M1 e favorecer M2 (ZHU et al., 2016; BUTTARI et al., 2014; DONG et al., 2014; SAQIB et al., 2018.). A luteonina é capaz de inibir a secreção de citocinas

pró-inflamatórias em macrófagos M1 tratados, mas o tratamento não foi capaz de aumentar a produção de IL-10 em macrófagos M1 tratados com luteonina (WANG et al., 2019).

Para observar se estes efeitos se davam em nível gênico, foi observada a expressão gênica de importantes genes marcadores de ambos perfis de ativação, no qual foi visto que o uvaol foi capaz de inibir a expressão de importantes genes associados ao perfil M1 (TNF- α e IL-6), porém sem modular na mesma proporção os genes característicos do perfil M2 como a Arg1, e não interferir na expressão de TGF- β . O lupeol, um triterpeno pentacíclico, foi capaz de inibir a expressão relativa de TNF- α e IL-6, corroborando com nossos resultados e de aumentar a expressão de Arg1 (ZHU et al., 2016). Resultados semelhantes foram encontrados quando macrófagos foram tratados com luteonina, porém alguns em marcadores M2 (Arg1, IL-10 e CD206), só foi observado o aumento nas maiores concentrações, bem como a inibição de marcadores M1 (iNOS e IL-1 β) (WANG et al., 2019). Já foi observado que o aumento de TGF- β pode estar relacionado com o aumento das atividades funcionais dos macrófagos, como a fagocitose. Nossos resultados revelaram que o tratamento com uvaol não interferiu nos níveis elevados de expressão do TGF- β , que, em conjunto com suas ações anti-inflamatórias, pode justificar, pelo menos em parte, o aumento na taxa de fagocitose dos macrófagos.

Com propósito de identificar um possível mecanismo molecular sensível aos efeitos do uvaol, e que seria capaz de justificar suas ações anti-inflamatórias, decidiu-se avaliar a translocação do p65-NF- κ B do citoplasma para o núcleo de macrófagos estimulados com LPS. É reconhecido que o NF- κ B se mostra importante na resposta mediada por LPS, e está intimamente relacionada ao estabelecimento da resposta pró-inflamatória (ALY et al., 2008). Quando macrófagos são estimulados, o complexo p50/p65 inativo e conectado a I κ B α no citoplasma, é ubiquitinado e a proteína degradada, sendo a p65 ativa liberada no núcleo para se ligar a genes pró-inflamatórios, o que resulta na ativação de vários genes envolvidos na inflamação capazes de estabelecer um perfil de resposta pró-inflamatória (KIM; AHN; JE, 2016; HWANG et al., 2011). Portanto, a expressão da proteína I κ B α e a forma ativa da transcrição p65 são marcadores importantes da reação inflamatória (WANG et al., 2018).

Nossos resultados revelaram que macrófagos J774 estimulados com LPS apresentaram um aumento da translocação da proteína p65-NF- κ B, para o núcleo da célula, indicando a ativação pró-inflamatória do LPS. Este fenômeno foi completamente inibido pelo tratamento com uvaol, indicando um possível alvo molecular de ação do uvaol. Sabe-se que após o estímulo por LPS, a via de sinalização do NF- κ B é ativada, através de uma cascata intracelular e estimulada a produzir citocinas inflamatórias e regular a resposta inflamatória

no macrófago (MIYAKE, 2007). Além disso, já foi demonstrado que a inibição da ativação do NF- κ B em macrófagos mostra-se relacionada a inibição do perfil fenotípico M1 de macrófagos (TAN et al., 2019)

Evidências experimentais indicam que a inibição de NF- κ B será uma ferramenta valiosa para o tratamento de doenças humanas. O NF- κ B é um ponto de convergência para resposta celular a múltiplos estímulos e regula genes envolvidos no desenvolvimento de doença inflamatória (FRASER, 2006). Assim como o uvaol, um outro triterpeno, o lupeol, foi capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias e bloquear a fosforilação do I κ B α em macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 estimuladas por LPS e em mucosa inflamada de cólon de camundongos (LEE et al., 2016). Além deste, a avicina, uma família de triterpenos isolada de sementes da *Acacia victoriae* (Bentham), proveniente da Austrália, foi capaz de inibir a via do NF- κ B, além de apresentar respostas anti-inflamatórias (HARIDAS; ARNTZEN. GUTTERMAN, 2001). O ácido ursólico, também se mostrou capaz de inibir a ativação da via do NF- κ B (CHECKER et al., 2012; SHISHODIA et al., 2003). O celastrol, um triterpeno pentacíclico extraído de *Tripterygium wilfordij* (Hook), também é conhecido por inibir a via de sinalização NF- κ B e suprimir as citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (SALMINEN et al., 2008; LEE; KOO; YOON, 2006). O magnolol, foi capaz de inibir a ativação da via do NF- κ B, diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias e a produção de NO, além de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos (CHEN et al., 2019), assim como o uvaol. Dessa forma, o uvaol parece atingir seus efeitos anti-inflamatórios por inibir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e por aumentar a capacidade de fagocitose, fenômenos que podem estar diretamente relacionados a redução no perfil de polarização de macrófagos para M1 e pela inibição da translocação de NF- κ B.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o triterpeno uvaol mostra-se capaz de diminuir a resposta inflamatória induzida por LPS em macrófagos, pela diminuição na liberação de citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α e quimiocinas CXCL8, CCL2. Constatamos também que o uvaol melhorou a capacidade fagocítica dos macrófagos e reduziu o perfil pró-inflamatório M1. Além disso, o uvaol foi capaz de modular a expressão gênica de citocinas do perfil M1 sem afetar com a mesma proporção as citocinas do perfil M2. Estes efeitos anti-inflamatórios induzidos pelo uvaol parecem depender da via intracelular de sinalização NF- κ B. Portanto, o uvaol mostra-se como um promissor agente para o desenvolvimento de um medicamento anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

AGRA L.C.; LINS M.P.; MARQUES P.S.; SMANIOTTO S.; MELO C. B.; LANGENTE V.; BARRETO E.. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European J of Pharmac.**v.780, n. 6, p. 232-242, 2016.

ALLOUCHE Y.; BELTRAN G.; GAFORIO J.J.; UCEDA M.; MESA M.D. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. **Food and Chemical Toxicol.**, v. 48, p. 2885-2890, 2010.

ALLOUCHE Y.; WARLETA F.; CAMPOS M.; SÁNCHEZ-QUESADA C.; UCEDA M.; BELTRAN G.; GAFORIO J.J. Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p.121–130, 2011.

ALY, S. M.; ABDEL-GALIL AHMED, Y.; ABDEL-AZIZ GHAREEB, A.; MOHAMED, M. F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish Shellfish Immunol**, v. 25, p. 128-136, 2008.

ANDERSON, C.A., SOLARI, R., PEASE, J. E. Based agonism at chemokine receptors: obstacles or opportunities for drug discovery? **J of Leucoc. Biol.** v. 99, p. 1-9, 2015.

ANISIMOV, M.M.; SHENTSOVA, E.B.; SHCHEGLOV, V.V.; SHUMILOV, YU. N.; RASSKAZOV, V.A.; STRIGINA, L.I.; CHETYRINA, N.S.; ELYAKOV, G.B. Mechanism of cytotoxic action of some triterpene glycosides. **Toxicon**; v.16, n.3, p.207-218, 1978.

ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticoides. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. 159-165, 2008.

ARPA, L.; VALLEDOR, A.F.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. IL-4 blocks M-CSF-dependent macrophage proliferation by inducing p21Waf1 in a Stat6-dependent way. **Eur J Immunol**, v. 39, n.2, p. 514-26, 2009.

ASHLEY, N.T., WEIL, Z.M., NELSON, R. J. Inflammation mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Rev. of Ecol, Evol and Systemat.** v. 43, n. 1, p. 385-406, 2012.

ASKARI, V.R.; FEREDOUNI, N.; BARADARAN, R.V.; ASKARI, V.; SAHENBKAR, A.H.; RAHMANIAN-DEVIN, P.; SAMZEDEH-KERMANI, A. β -Amyrin, the cannabinoid receptors agonist, abrogates mice brain microglial cells inflammation induced by lipopolysaccharide/interferon- γ and regulates M ϕ 1/ M ϕ 2 balances. **Biomed Pharmacot.** v.101, p.738-446, 2018.

BARKHAUSEN, T.; TSCHERNIG, T.; ROSENSTIEL, P.; VAN GRIENSVEN, M.; VONBERG, R.P.; DORSCH, M. et al. Selective blockade of interleukin-6trans-signalingimprovesurvival in a murine poly microbial sepsis model. **Crit Care Med.** v. 39, n. 6, p.1407–13, 2011.

BARNES, P.J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **J of steroid bioch. and molec. Biol.** v. 120, n.2-3, p. 76-85, 2010.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**, v.336, p.1066-71, 1997.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I.M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet** v. 342, p. 1905–1917, 2009.

BARNIG C.; FROSSARD N.; LEVY B.D. Towards targeting resolution pathways of airway inflammation in asthma. **Pharmac. & Therapeut.** n. 186, p. 98–113, 2018.

BEN-SASSON, S. Z.; HU-LI, J. QUIEL, J.; CAUCHETAUX, S.; RATNER, M.; SHAPIRAI, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. **Proc Natl Acad Sci.** v. 106, n.17, p. 7119–24, 2009.

BELGIOVINE, C.; D'INCALCI, M.; ALLAVENA, P.; FRAPOLLI, R. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: Complex links. **CMLS**, v. 73; n. 13, p. 2411–2424, 2016.

BESCHIN, A.; DE BAETSELIER, P.; VAN GINDERACHTER, J. A. Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection. **The J of Pathol.** v. 229; n. 2, p. 186–197, 2013.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol.** v. 11, p. 889–896, 2010.

BISWAS, S. K.; CHITTEZHATH, M.; SHALOVA, I. N.; LIM, J. Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. **Immunol. Resear.** v. 53, n. 1–3, p. 11–24, 2012.

BOHLSON, S.S.; O'CONNOR, S.D.; HULSEBUS, H.J.; HO, M.; FRASER, D. A. Complement, C1q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. **Front in Immunol**, v. 5, n.402, 2014.

BOZIMOWSKI, G. A review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **AANA J**, v.83, n.6, 2015.

BUTTARI, B.; PROFUMO, E.; SEGONI, L.; D'ARCANGELO, D.; ROSSI, S.; FACCHIANO, F.; SASO, L.; BUSINARO, R.; IULIANO, L.; RIGANO, R. Resveratrol counteracts inflammation in human M1 and M2 macrophages upon challenge with 7-oxo-cholesterol: potential therapeutic implications in atherosclerosis. **Oxid Med Cell Longev**, 2014.

BRUNE, M.W. Atividade funcional de fagócitos do sangue periférico humano modulados por citocinas na presença de *Giardia lamblia*. **Tese de Doutorado** – UFMG, 2015.

BRUNICARDI, F.C.; ANDERSEN, D.K.; BILLIAR, T.R.; DUNN, D.L.; KAO, L.S.; HUNTER, J.G.; MATTHEWS, J.B.; POLLOCK, R.E. **Schwartz's Principles of Surgery**. Chapter 2: Systemic Response to Injury and Metabolic Support. 10 ed, McGraw-Hill Medical, 384 p., 2014.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S; PARKER, K. L. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª Edição. Rio de Janeiro: **McGrawHill**, 2010.

- BUCKLAND, M.; LOMBARDI, G. Aspirin and the induction of tolerance by dendritic cells. **Hanb Exp Pharmacol.** v. 188, p. 197-213, 2009.
- BUCKLEY, C.D., GILROY, D.W., AND SERHAN, C.N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immuni.** v.40, p.315–327, 2014.
- BURDO, T.H.; WALKER, J.; WILLIAMS, K.C. Macrophage polarization in AIDS: Dynamic interface between anti-viral and anti-inflammatory macrophages during acute and chronic infection. **J of Clinical & Cellular Immunol.**v.6; n.3, 2015.
- BURNETT S.H.; KERSHEN E.J.; ZHANG J.; ZENG L.; STRALEY S.C.; KAPLAN A.M.; COHEN D.A. Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. **J Leukoc Biol** v.75, p.612–623, 2004.
- CAI, Y.; SUGIMOTO, C.; ARAINGA, M.; ALVAREZ, X.; DIDIER, E.S.; KURODA, M.J. In vivo characterization of alveolar and interstitial lung macrophages in rhesus macaques: implications for understanding lung disease in humans. **J Immunol.** v.192; n.6; p.2821-9, 2014.
- CAILHIER J.F.; PARTOLINA M.; VUTHOORI S.; WU S.; KO K.; WATSON S.; SAVILL J.; HUGHES J.; LANG R.A. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. **J Immunol.** v. 174, p. 2336–2342, 2005.
- CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **The Scientific World J**, v. 11, p. 2391–2402, 2011.
- CELADA, A. Inflammation and Macrophages. Molecular Medicine Programme. **Scientific Report**, 2008.
- CHECKER, R.; SANDUR, S.K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R.S.; JAYAKUMAR, S.; KOHLI, V.; SETHI, G.; AGGARWAL, B.; SAINIS, KB. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **P.** v.7; n.2, 2012.
- CHEN G.; LU H.; WANG C.; YAMASHITA K.; MANABE M.; XU S.; KODAMA H. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes. **Clinica Chimica Acta**, v.320, p. 11-16, 2002.
- CHEN, H.; FU, W.; CHEN, H.; YOU, S.; LIU, X.; YANG, Y.; WEI, Y.; HUANG; RUI, W. Magnolol attenuates the inflammation and enhances phagocytosis through the activation of MAPK, NF- κ B signal pathways *in vitro* and *in vivo*. **Molec. Immunol.** v. 105, p. 96-106, 2019.
- CONNELLY, L.; PALACIOS-CALLENDER, M.; AMEIXA, C.; MONCADA, S.; HOBBS, A.J. Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J Immunol**; v. 166, n.6, p.3873-81, 2001.
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. G., *in*: Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (Eds.), **Biochem and Molec Biol of Plants.**, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD2000, pp. 1250–1268.

- CUDA, C.M.; POPE, R.M.; PERLMAN, H. The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases. **Nature Rev Rheumatol**. v. 12; n. 9, p. 543–558, 2016.
- DAY R.O., GRAHAM, G.G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **BMJ**, 2013.
- DASKALAKI, M.G.; VYRLA, D.; HARIZANI, M.; DOXAKI, C.; ELIOPOULOS, S.G.; ROUSSIS, V.; IOANNOU, E.; TSATSANIS, C.; KAMPRANIS, S.C. Neurogoltriol and related diterpenes from the Red Alga *Laurencia* inhibit inflammatory bowel disease in mice by suppressing M1 and promoting M2-like macrophage responses. **Mar Drugs**; v.17, n.2, 2019.
- DONG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; BIAN, H.X.; XU, N.; BAO, B.; LIU, J. Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK α 1/SIRT1. **J Lipid Res**. v. 55, p.363–374, 2014.
- EDWARDS, A.M., BERGMANN, K.C., RING, J. Chromones. History of Allergy. **Chemical Immunol and Allergy**, v. 100, p. 317-322, 2014.
- EPELMAN S.; LAVINE K.J.; RANDOLPH G.J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity** v. 41, p. 21–35, 2014.
- FERRARIS, F.K., RODRIGUES, R., SILVA, V.P., FIGUEIREDO, R., PENIDO, C., HENRIQUES, M.D.G.M.O. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **Inter Immuno Pharmac**. v.11, n.1, p.1-11, 2011.
- FLANNAGAN, R.S.; JAUMOUILLE, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annual Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 7, p. 61-98, 2012.
- FILHO, A. A. S. et al. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 478–482, 2009.
- FRANCHINI, A.M.; HUNT, D.; MENDELEZ, J.A.; DRAKE, J.R.; Fc γ R-driven release of IL-6 by macrophages requires NOX2-dependent production of reactive oxygen species. **J Biol Chem**; v. 288, p. 25098-108, 2013.
- FRASER, C.C. Exploring the positive and negative consequences of NF-kB inhibition for the treatment of human disease. **Cell Cycle**, v.5, n. 11, p. 1160-1163, 2006.
- FRIGHETTO R.T.S.; NIGRO E.N.; FRIGHETTO N.; SIANI A.C. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. **Food Chem**. v. 106, p.767–771, 2008.
- FULLERTON J. N.; GILROY D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nat Reviews Drug discov**. v. 12, p.1-17, 2016.
- GAO, X.; DEEB, D.; JIANG, H.; LIU, Y.; DULCHAVSKY, S.A.; GAUTAM, S.C. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling. **J Neurooncol**; v.84, n.2, p.147-57, 2007.

- GENSEL, J.C., ZHANG, B.Z. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. **Brain Research**, v. 1619, p. 1–11, 2015.
- GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Cordia Verbenacea* DC Boraginaceae. **Fitos**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 17-25, 2012.
- GORDON, S. Phagocytosis: An immunobiologic process. **Immuni**. v. 44, p. 463- 476, 2016.
- GORDON S.; TAYLOR P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**. v. 5, p. 953–964, 2005.
- GRIFFITH J.W.; SOKOL C.L.; LUSTER A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol**. v. 32, p. 659-702, 2014.
- GUINDA, A. et al. Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 9685–9691, 2010.
- HADDAD J.J. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun** v. 297, p. 700–713, 2002.
- HARIDAS, V.; ARNTZEN, C.J.; GUTTERMAN, J.U. Avicins, a Family of triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Bentham), inhibit activation of nuclear factor- κ B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. **PNAS**, v.25, n.98, p. 11557-62, 2001.
- HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunol**. v. 27, n.3, p. 149–160, 2015.
- HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2–10 years later. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 300, p. 367–375, 2002.
- HONGMEI, L.; BOGOLJUB, C.; JINGXIAN, Y.; HUI, X.; DENISE, C.F.; MOHAMED, E.; ZOE, F.; SHUO, Y.; GUANG-XIAN, Z.; ABDOLMOHAMAD, R. Intravenous tolerance modulates macrophage classical activation and antigen presentation in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J of NeuroImmunol**; v.208, n.1-2, p.54-60, 2009.
- HOU, W., HU, S., SU, Z., WANG, Q., MENG, G., GUO, T., ZHANG, J., GAO, P. Myricetin attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages and mouse models, **Fut Med Chem**. v.10, n. 19, p. 2253-64, 2018.
- HWANG, P. A.; CHIEN, S. Y.; CHAN, Y. L.; LU, M. K.; WU, C. H.; KONG, Z. L.; WU, C. J. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by Sargassum hemiphyllum sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. **J. Agric. Food Chem.** v. 59, p. 2062-2068, 2011.
- IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and proinflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**. v. 52, p. 26–42. 2008.
- JAGER S.; TROJAN H.; KOPP T.; LASZCZYK M.N.; SCHEFFLER A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multipotent plant extracts. **Molec**. n.14, p. 2016–2031, 2009.

JANOCHA, S., SCHIMITZ, D., BERNHARDT, R. Terpene hydroxylation with microbial cytochrome p450 monooxygenases. **Advan in Biochem Engineering/Biotech.** v.148, p. 215-250, 2015.

JIANG, Z.; ZHU, L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. **J Asthma Aller.** v.9; p. 101-107, 2016.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, **Annu. Rev. Immunol.** v.18, p. 621–663, 2000.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. **American Society for Nutrition. Adv. Nutr.**, v. 2, p. 32–50, 2011.

KIM, M.J. BAE, G.S. CHOI, S.B. JO, I.J. KIM, D.G. SHIN, J.Y. LEE, S.K. KIM, M.J. SONG, H.J. PARK, S.J. Lupeol protects against cerulein-induced acute pancreatitis in mice, **Phytother. Res.** v. 29, p. 1634–1639, 2015.

KIM, Y. S.; AHN, C. B.; JE, J. Y. Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF- κ B and MAPK pathways. **Food Chem.** v. 202, p. 9-14, 2016.

KIM, K.N.; KO, S.C.; YE, B.R.; KIM, M.S.; KIM, J.; KO, E.Y.; et al. 5-Bromo-2-hydroxy-4-methyl-benzaldehyde inhibited LPS-induced production of pro-inflammatory mediators through the inactivation of ERK, p38, and NF- κ B pathways in RAW 264.7 macrophages. **Chem Biol Interact.** v. 258, p.108–114, 2016.

KOAY M.A.; GAO X.; WASHINGTON M.K.; PARMAN K.S.; SADIKOT R.T.; BLACKWELL T.S.; CHRISTMAN J.W. Macrophages are necessary for maximal nuclear factor kappa B activation in response to endotoxin. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 26, p. 572–578, 2002.

KU, C.M.; LIN, J.Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. **Food Chemis.** v. 141; n. 2, p. 1104–1113, 2013.

LARSEN, G.L.; HOLT, P.G. The concept of airway inflammation. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 162, p. S2-S6, 2000.

LAWRENCE, T.; The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2009.

LAWRENCE T.; NATOLI G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol.** v.11, p. 750–761, 2011.

LEE, H.J., LIM, H.j., LEE, D.Y., JUNG, H., KIM, M., MOON, D, KIM, K., LEE, M., RYU, J. Carabrol suppresses LPS-induced nitric oxide synthase expression by inactivation of p38 and JNK via inhibition of I- κ B α degradation in RAW 264.7 cells. **Bioc and Bioph Res Communic**, v. 391, p. 1400-1404, 2010.

LEE, C. W. Study of Skin Anti-Ageing and Anti-Inflammatory Effects of Dihydroquercetin, Natural Triterpenoids, and Their Synthetic Derivatives. *Russian J of Bioorganic Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 328–334, 2012.

LEE, J.H.; KOO, T.H.; YOON, H. Inhibition of NF- κ B activation through targeting I κ B kinase by celastrol, a quinone methide triterpenoid. *Biochem Pharmacol.* v.72, p. 1311-1321, 2006.

LEE J.W.; PARK J.W.; SHIN N.R.; PARK S.Y.; KWON O.K.; PARK H.A.; LIM Y.; RYU H.W.; YUK H.J.; KIM J.H.; OH S.R.; AHN K.S. Picrasma quassiodes (D. Don) Benn. Attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury. *Int J Mol Med* v.38, p.834-44, 2016.

LI, J.; LIU, Z.; JIANG, S.; CORTESINI, R.; LEDERMAN, S.; SUCIU-FOCA, N. T suppressor lymphocytes inhibit NF- κ B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol*; v. 163, n. 12, p. 6386-92, 1999.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2017.

LINDNER I.; MEIER C.; URL A.; UNGER H.; GRASSAUER A.; PRIESCHL-GRASSAUER E.; DOERFLER P. Beta-escina in has potent anti-allergic efficacy and reduces allergic airway inflammation. *BMC Immunol*, v. 11, n. 24, p. 1-10, 2010.

LIU J.; LIU Y.; MAO Q.; KLAASSEN C.D. The effects of 10 triterpenoids compounds on experimental liver injury in mice. *Fundamen.and appl. Toxicol.* v.22, p-34-40, 1994.

LOCKSLEY, R. M. Asthma and allergic inflammation. *Cell*, v. 140; n.6; p. 777–783, 2010.

LUO, D.; GUO, Y.; CHENG, Y.; ZHAO, J.; WANG, Y.; RONG, J. Natural product celastrol suppressed macrophage M1 polarization against inflammation in diet-induced obese mice via regulation Nrf2/HO-1, MAP kinase and NF- κ B pathways. *Aging*; n.9; v.10; p.2069-2082, 2017.

MARQUES, F.M.; FIGUEIRA, M.M.; SCHMITT, E.F.P.; KONDRATYUK, T.P.; ENDRINGER, D.C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. *In vitro* anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway. *Inflammol. Pharmac.* v. 27, n.2; p. 281-289, 2018.

MARTÍN R.; MIANA M.; JURADO-LOPEZ R.; MARTINEZ-MARTINEZ.; GOMEZ-HURTADO N.; DELGADO C.; BARTOLOMÉ M.V.; SAN ROMÁN J.A.; CORDOVA C.; LAHERA V.; NIETO M.L CACHOFEIRO V.. DIOL Triterpenes Block Profibrotic Effects of Angiotensin II and Protect from Cardiac Hypertrophy. *P. one*, v. 7, p. 1-14, 2012.

MARTINS A.; VASAS A.; VIVEIROS M.; MOLNÁR J.; HOHMANN J.; AMARAL.. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *Internat J of Antimicrob. Agen.*v. 37, p. 438–444, 2011.

McNEILL, E.; CRABTREE, M.J.; SAHGAL, N.; PATEL, J.; CHUAIPHICHAJ, S.; IQBAL, A.J.; HALE, A.B.; GREAVES, D.R.; CHANNON, K.M. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. *Free Radical Biol Med*; v. 79, p. 206-26, 2015.

- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Natur.** v. 454 n. 7203, p. 428-435, 2008.
- MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 13, n. 6, p. 455-481, 2002.
- MESHKANI, R., VAKILI, S. Tissue resident macrophages: key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. **Clinic. Chimic. Acta,** v. 462, p. 77–89, 2016.
- MILLS, C.D.; LEY, K.; M1 and M2 macrophages: the chicken and egg of immunity. **J Innate Immun.** v. 6, p. 716-726, 2014.
- MIN B.S; KIM Y.H.; LEE S.M.; JUNG H.J.; LEE J.S.; NA M.K.; LEE C.O.; LEE J.P.; BAE L. Cytotoxic Triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. **Arch Pharm Res.,** v. 23, n. 2, p. 155-158, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Perfil da morbimortalidade por doenças respiratórias crônicas no Brasil, 2003 a 2013. **Boletim epidemiológico.** v.47, n. 19, 2016.
- MIRZA R.; DIPIETRO L.A.; KOH T.J.. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **Am J Pathol** v. 175, p. 2454–2462, 2009.
- MIYAKE, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. **Semin. Immunol.** v. 19, p. 3-10, 2007.
- MOLLOY, R.G.; MANNICK, J.A.; RODRICK, M.L. Cytokines, sepsis and immunomodulation. **Br. J. Surg.** v.80, p. 289–297, 1993.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J. Immunol. Methods** v. 65, p. 55-63, 1983
- MOSSER D.M.; EDWARDS J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol** v. 8, p. 958–969, 2008.
- NAIDU B.V.; KRISHNADASAN B.; FARIVAR A.S.; WOOLLEY S.M.; THOMAS R.; VAN ROOIJEN N.; VERRIER E.D.; MULLIGAN M.S. Early activation of the alveolar macrophage is critical to the development of lung ischemia-reperfusion injury. **J Thorac Cardiovasc Surg.** v. 126, p. 200–207, 2003.
- NATOLI, G.; S. SACCANI; D. BOSISIO; I. MARAZZI. Interactions of NF-kB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. **Nat. Immunol.** v. 6, p.439–445, 2005.
- NATURE IMMUNOL. A current review on inflammation. **Nature Immunol.** v.18, n.825, 2017.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Vigilância, prevenção e controle das doenças respiratórias crônicas: uma abordagem integradora.** Editores: Jean Bousquet e Nikolai Khaltsev, 2007.

OREKHOV, A.N.; OREKHOVA, V.A.; NIKIFOROV, N.G.; MYASOEDOVA, V.A.; GRECHKO, A.V.; ROMANENKO, E.B.; ZHANG, D.; CHISTIYAKOV, D.A. Monocyte differentiation and macrophage polarization. **Vessel Plus**. p.3-10, 2019.

PACHER, P. BECKMAN, J.S.; LIAUDER, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**. v. 87, p. 315-424, 2007.

RADAD, K.; GILLE, G.; LIU, L. *et al.* Use of Ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders. **J Pharmacol Sci**. n. 100; p. 175–86, 2006.

RATH, M.; MULLER, I.; KROPF, P.; CLOSS, E. I.; MUNDER, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Front Immunol**. v.5, n. 532, 2014.

REVILLE K.; CREAN J.K.; VIVERS S.; DRANSFIELD I.; GODSON C. Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes, **J. Immunol** p. 1878–1888, 2006.

RUFINO, A.T.; RIBEIRO, M.; SOUSA, C.; JUDAS, F.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C. MENDES, A.F. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. **Eur. J. Pharmacol**. v. 750, p. 141-150 (2015).

SALMINEN A.; PAIMELA T.; SUURONEN T.; KAARNIRANTA K. Innate immunity meets with cellular stress at the IKK complex: regulation of the IKK complex by HSP70 and HSP90. **Immunol Lett**, v.117, p. 9-15, 2008.

SANSBURY, B.E., SPITE, M. Resolution of acute inflammation and the role of resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. **Circulat. Resear**. n.119, p. 113-130, 2016.

SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Cloning, expression, characterization and inhibition studies on trypanothione synthetase, a drug target enzyme, from *Leishmania donovani*. **Biol. Chem.**, v. 392, p. 1113–1122, 2011.

SARADNA, A.; DO, D.C.; KUMAR, S.; FU, Q-L.; GAO, P. Macrophage polarization and allergic asthma. **Transl Res**. v.191, p. 1-14, 2018.

SAQIB, U.; SARKAR, S.; SUK, K.; MOHAMMAD, O.; BAIG, M.S.; SAVAI, R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarg**. v. 9, n. 25, p. 17937-17950, 2018.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell**. v.47, n.6, p.921-8, 1986.

SERHAN C.N. Treating inflammation and infection in the 21st century: New hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **The FASEB J** v. 31, p. 1273–1288, 2017.

SHAHANI S.; MONSEF-ESFAHANI H.R.; SAEIDNIA S.; SANIEE P.; SIAVOSHI F.; FOROUMADI A.; SAMADI N.; GOHARI A.R. Anti-Helicobacter pylori Activity of the Methanolic Extract of *Geum iranicum* and its Main Compounds. **Z. Naturforsch**, v. 67, p. 172 – 180, 2012.

- SHAPOURI-MOGHADDAM, A.; MOHAMMADIAN, S.; VAZINI, H.; TAGHADOSI, M.; ESMAEILI, S.; MARDANI, F.; SEIFI, B.; MOHAMMADI, A.; AFSHARI, J.T.; SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **J Cell Physiol**, v. 233, p. 6425-6440, 2018.
- SHARA, M., STOHS, S.J. Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) Extracts. **Phytoth. Resear.** v.29, n.8, p.1112-1116, 2015.
- SHARATH R.; HARISH B.G.; KRISHNA V.; SATHYANARAYANA B.N.; SWAMY H.M. Healing and Protease Inhibition Activity of Bacoside-A, Isolated from *Bacopa monnieri* Wettest. R. **Phytoth. resear.** v. 24, p. 1217–1222, 2010.
- SHIN, J.-H., RYU, J.H., KANG, M.J., HWANG, C.R., HAN, J., KANG, D. Short-term heating reduces the anti-inflammatory effects of fresh raw garlic extracts on the LPS-induced production of NO and pro-inflammatory cytokines by downregulating allicin activity in RAW 264.7 macrophages. **Food Chemis and Toxicol.** v, 58, p. 545–551, 2013.
- SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; AGGARWAL, B.B. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. **Cancer Res.** v. 63, p. 4375–4383, 2003.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. **The J of Clinic Investig.** v. 122; n. 3, p. 787–795, 2012.
- SICA, A.; ERRENI, M.; ALLAVENA, P.; PORTA, C. Macrophage polarization in pathology. **CMLS**, v. 72; n. 21, p. 4111–4126, 2015.
- SIDDIQUI, M. S. et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. **FEMS Yeast Res.** v. 12, p. 144–170, 2012.
- SIGMA-ALDRICH. 1 fotografia, p&b. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/u6628?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 12 de ago. 2018.
- SKIRY CZ, A., KIERSZIOWSKA, S., MÉRET, M., WILLMITZER, L., TZOTOS, G.. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado? **Trends in Biotech.** v.34, n. 10, p.781-790, 2016.
- SOMOVA L.I.; SHODE F.O.; MIPANDO M. Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. **Phytomed.** v. 11, p. 121–129, 2004.
- SONG, S.H.; MIN, H.Y.; HAN, A.R.; NAM, J.W.; SEO, E.K.; SEOUNG, W.P.; SANG, H.L.; SANG, K.L. Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF-kappaB activity. **Int Immunopharmacol.** v. 9, n.3, p. 298-302, 2009.
- SURH, Y.; CHUN, K.; CHA, H.; HAN, S.S.; KEUM, Y.; PARK, K.; LEE, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kB activation. **Mutation Research**, v.480-481, p. 243-268, 2001.

TAN B.X.; YANG L.; HUANG Y.Y.; CHEN Y.Y.; PENG G.T.; YU S.; HE X.X. Bioactive triterpenoids from the leaves of *Eriobotrya japonica* as the natural PDE4 inhibitors. **Nat Prod Research**. v. 31, n. 24, p. 2836–2841, 2017.

TAN, R.; LIU, J.; ZHANG, Y.; WANG, H.; LI, J.; LIU, Y.; ZHONG, X.; ZHANG, Y.; YAN, Y.; LAN, H.; WANG, L. Curcumin relieved cisplatin-induced kidney inflammation through inhibiting Mincle-maintained M1 macrophage phenotype. **Phytomed**. v. 52, p. 284-294, 2019.

TARIQUE, A.A.; LOGAN, J.; THOMAS, E.; HOLT, P.G.; SLY, P.D.; FANTINO, E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**; v. 53, n. 5, p. 676-88, 2015.

TSAI, S.J.; YIN, M.C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. **J Food Sci**. v. 73, p.174–178, 2008.

UNDERHILL DM. Macrophage recognition of zymosan particles. **J Endotoxin Res**. v.9, p.176–180, 2003.

UKIYA M.; AKIHISA T.; TOKUDA H.; SUZUKI H.; MUKAINAKA T.; ICHIISHI E.; YASUKAWA K.; KASAHARA Y.; NISHINO H. Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. **Cancer Let**. v. 177, p. 7-12, 2002.

VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; TUCKERMANN, J.; LIBERT, C.; New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. **Endocrinol**. v.154, p.993-1007, 2013.

VARIN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; HERBEIN, G.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages by IL-4 impairs phagocytosis of pathogens but potentiates microbial-induced signalling and cytokine secretion. **Blood**. v.115, p. 353–362, 2010.

VALENÇA, M.M., SILVA, A.A., BORDINI, C.A.. Headache research and medical practice in Brazil: An historical overview. **Headac**. n. 55, v.S1, p.4-31, 2015.

VANDRAAS K.F.; SPIGSET O.; MAHIC M.; SLØRDAL L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: use and co-treatment with potentially interacting medications in the elderly. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 66, n. 8, p. :823-829 2010.

VINOGRADOV, S.; WARREN, G.; WEI, X. Macrophages associated with tumors as potential targets and therapeutic intermediates. **Nanomed. (Lond)**. v. 9, p. 695–707, 2014.

WAGNER, K. H., ELMADFA, I. Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. **Ann. Nutr. Metab**. v,47, p.95–106, 2003.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. **Front. in Immunol**. v. 5, n. 614, 2014.

WANG, H.; ZHANG, L.; XU, S.; PAN, J.; ZHANG, Q.; LU, R. Surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation through

MAPK and NF- κ B signaling pathways in RAW264.7 cells. **Jour. of Agric. and Food Chemis.** v.66, n.29, p. 7655-7662, 2018.

WANG, S.; CAO, M. XU, S.; SHI, J.; MAO, X.; YAO, X.; LIU, C. Luteonin alters macrophage polarization to inhibit inflammation. **Inflamm.** n. 43, v. 1, p. 95-108, 2019.

WEISS, G.; SCHAIBLE, U.E. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological Reviews*, v. 264; n. 1, p. 182–203, 2015.

WHO-WORLD HEALTH ORGANAZATION. WHO **Monographs on selected medicinal plants** – Volume 4, 2009. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16713e/s16713e.pdf>> Acesso em: 28 de jul de 2018.

WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nat.** v. 496; n. 7446, p. 445–455, 2013.

WYNNE H.A.; CAMPBELL M.: Pharmacoeconomics of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS). **Pharmac. Econ.** v. 3: p. 107-23, 1994.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J Clin Invest.** v. 107, p.135-42, 2001.

YANG, Z. G. Inhibitory Effects of Constituents from *Morus alba* var. *multicaulison* Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric Oxide Production in RAW264.7 Cells. **Molec.** v.16, p. 6010-6022, 2011.

YASUKAWA, K. et al. Inhibitory Effect of Di- and Trihydroxy Triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-Tetradecanolyphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 19, n. 10, p. 1329-1331, 1996.

YI, H.; YU, C.; ZHANG, H.; SONG, D.; JIANG, D.; DU, H.; WANG, Y. Cathelicidin-BF suppresses intestinal inflammation by inhibiting the nuclear factor- κ B signaling pathway and enhancing the phagocytosis of immune cells via STAT-1 in weanling piglets. **Int Immunoph.** v. 28, n. 1, p. 61-9, 2015.

YOUNG L.; KATRIB A. CUELLO C.; VOLLMER-CONNA U.; BERTOUCHE J.V.; ROBERTS-THOMSON P.J.; AHERN M.J.; SMITH M.D.; YOUSSEF P.P. Effects of intraarticular glucocorticoids on macrophage infiltration and mediators of joint damage in osteoarthritis synovial membranes: findings in a double-blind, placebo-controlled study. **Arthritis Rheum** v. 44, p. 343–350, 2001.

ZAFFRAN, Y.; ESCALLIER, J.C.; RUTA, S. et al. Zymosan-triggered association of tyrosine phosphoproteins and Lyn kinase with cytoskeleton in human monocytes. **J Immunol.** v.154, p.3488–3497, 1995.

ZHAO M.; FERNANDEZ L.G.; DOCTOR A.; SHARMA A.K.; ZARBOCK A.; TRIBBLE C.G.; KRON I.L.; LAUBACH V.E. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** v. 291, p.1018–1026, 2006.

ZHU, Y.; LI, X.; CHEN, J.; CHEN, T.; SHI, Z.; LEI, M.; ZHANG, Y.; BAI, P.; LI, Y.; FEI, X. The pentacyclic triterpene Lupeol switches M1 macrophages to M2 and ameliorates experimental inflammatory bowel disease. **Int Immunoph.I.** v. 30, p. 74–84, 2016.

ZIZZO, G., AND COHEN, P.L. IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids. **J. Immunol.** v.190, p. 5237–5246, 2013.