



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DE
MOLÉCULAS ISOLADAS DE VEGETAIS E DERIVADOS
SINTÉTICOS, *IN VITRO* E EM MODELO DE
ENDOTOXEMIA**

Feira de Santana, BA
2010

JOSÉ FERNANDO OLIVEIRA COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DE
MOLÉCULAS ISOLADAS DE VEGETAIS E DERIVADOS
SINTÉTICOS *IN VITRO* E EM MODELO DE ENDOTOXEMIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Feira de Santana, BA
2010

Aos meus pais, pelo amor

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas infinitas possibilidades, pela generosidade e amor constantes.

Aos Doutores Milena B. P. Soares e Ricardo Ribeiro dos Santos, pela oportunidade, apoio e orientação.

A Minha Mãe e às minhas irmãs, pelo amor, apoio e compreensão.

A Laura Costa Hirsch, pelo novo que representa, pelas possibilidades que traz em si.

À minha família, em especial a Rúbia Sampaio e a João Paulo Schoucair, pessoas que sempre me apoiaram.

A Mara Zélia de Almeida, pela amizade e estímulo.

Aos meus amigos, tantos, pessoas sem as quais a vida seria menos feliz.

A Daniele Brustolim, pela presença, estímulo e amizade.

A Matheus Sá e Alan Silva, pela amizade e companheirismo

Às colegas Cinara Vasconcelos e Tanira Matutino, pelo apoio em diversos experimentos.

Aos colegas do LETI/CPqGM/FIOCRUZ pelos momentos agradáveis e pelo que cada um a mim ensina, com os seus próprios exemplos.

A Helton Ricardo, pela dedicação e presteza com os trabalhos da secretaria do PpgBiotec/UEFS.

A Lucyvera Imbroinise, Roberta Couto e Flávia Maciel, pela atenção e cuidado na administração do laboratório

Aos meus mestres, seres que a mim facilitaram alguns processos.

À CAPES e à UEFS, pela bolsa de pós-graduação.

Ao CPqGM/FIOCRUZ, pela excelente estrutura e facilidades ao desenvolvimento das atividades de pesquisa.

*"Concedei-nos, Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos
modificar, coragem para modificar aquelas que podemos e sabedoria para distinguirmos
umas das outras"*

Oração da serenidade

RESUMO

A triagem de moléculas isoladas de vegetais é cada vez mais importante diante da necessidade de descoberta de novas substâncias para o desenvolvimento de medicamentos eficazes e seguros, visando ao tratamento de várias doenças, incluindo as imunomediadas. Estima-se que em todo o mundo milhares de pessoas sejam acometidas pela sepse, sendo uma das principais causas de morte. Aqui foram avaliadas as atividades farmacológicas de moléculas isoladas de vegetais e derivados sintéticos em ensaios *in vitro* de inibição da produção de NO por macrófagos e da proliferação de linfócitos ativados. As moléculas também foram avaliadas em modelo *in vivo* de endotoxemia induzida pelo LPS. Dentre as moléculas testadas foram selecionadas 10 ativas *in vitro* (benzopirona, hidroxycumarina, solidagenona, lapachol e seus derivados sintéticos α -lapachona, nor-lapachol, α -I-lapachona, β -I-lapachona e isolapachol acetilado) ou *in vivo* (benzopirona, solidagenona lapachol e derivados nor-lapachol e β -I-lapachona e o ácido betulínico). A benzopirona e o ácido betulínico (AB) foram as moléculas mais ativas *in vivo*, protegendo os animais contra uma dose letal de LPS e inibindo a produção de TNF- α . Estes efeitos foram correlacionados com o aumento da produção de IL-10 e camundongos IL-10^{-/-} não tiveram redução de mortalidade quando tratados com AB, indicando o papel protetor desta citocina. Benzopirona e AB inibiram a produção de TNF- α por macrófagos quando administradas *in vivo*, mas não *in vitro*, sugerindo o metabolismo destas *in vivo*, gerando metabólitos ativos. Em conclusão, identificou-se moléculas com ação imunossupressora *in vivo*, inibindo a produção de TNF- α e potencialmente aplicáveis no tratamento da sepse.

Palavras-chave: sepse, produtos naturais, camundongos, benzopirona, ácido betulínico e citocinas.

ABSTRACT

The screening of bioactive molecules isolated from natural products have acquired a great importance due to the need of discovering new chemical entities for the development of safe and effective medicines, aiming at the treatment of several diseases, including the immunomediated ones. It is estimated that thousands of people around the world suffer with sepsis, one of the most important causes of death. In this work, were evaluated molecules isolated from vegetables and synthetic derivatives in *in vitro* assays of inhibition of NO production by macrophages and activated lymphocyte proliferation and in *in vivo* model of LPS-induced endotoxemia. Among the molecules tested, we selected 10 with *in vitro* (benzopyrone, hydroxicoumarin, solidagenone, lapachol and its syntethic derivatives α -lapachone, nor-lapachol, α -I-lapachone, β -I-lapachoneandacetylated isolapachol) or *in vivo* (benzopyrone, solidagenone, lapachol and derivatives nor-lapachol and β -I-lapachone and betulinic acid) activities. Benzopyrone and betulinic acid (BA) were the most active molecules *in vivo*, protecting mice challenged with a lethal dose of LPS and inhibiting TNF- α production. These effects were related to the overproduction of IL-10 and IL-10^{-/-} mice were not protected when treated with BA in comparison to the IL-10^{+/+} treated with the drug, indicating the importance of this cytokine in the protection. Both molecules, benzopyrone and BA, inhibited the TNF- α production by macrophages when administered *in vivo* but not *in vitro*, suggesting their metabolism *in vivo*, generating active metabolites. In conclusion, we identified *in vivo* immunossupressor molecules, inhibiting the TNF- α production and with a potential use in the treatment of sepsis.

Keywords: sepsis, natural products, mice, benzopyrone, betulinic acid and cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do lipopolissacarídeo.	20
Figura 2	Estrutura do lipídeo A agonista hexa-acilado de <i>E. coli</i> e antagonista penta-acilado de <i>P. aeruginosa</i> .	21
Figura 3	Mecanismo de ativação de fagócitos pelo LPS através da interação com a LBP e associação com CD14 e TLR-4/MD-2.	22
Figura 4	Atividade inibitória das moléculas testadas na produção de NO por macrófagos ativados.	41
Figura 5	Atividade inibitória das moléculas testadas em ensaio de linfoproliferação.	42
Figura 6	Substâncias avaliadas com atividade imunossupressora sobre macrófagos e linfócitos.	42
Figura 7	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> da dexametasona em modelo de endotoxemia.	47
Figura 8	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do lapachol e derivados sintéticos em modelo de endotoxemia.	49
Figura 9	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> da solidagenona em modelo de endotoxemia.	50
Figura 10	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> da benzopirona e hidroxicumarina em modelo de endotoxemia.	51
Figura 11	Avaliação da atividade <i>in vivo</i> do ácido betulínico no modelo de endotoxemia.	52
Figura 12	Dosagem de TNF- α no soro de camundongos tratados com benzopirona e submetidos à endotoxemia.	54
Figura 13	Dosagem de IL-10 e IL-6 no soro de camundongos tratados com benzopirona e submetidos à endotoxemia.	56
Figura 14	Produção de TNF- α em culturas de macrófagos ativados.	57
Figura 15	Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos residentes coletados de camundongos após tratamento <i>in vivo</i> .	58
Figura 16	Dosagem de TNF- α , IL-10 e IL-6 no soro de camundongos submetidos à endotoxemia.	60
Figura 17	Sobrevivência de animais C57BL/6 IL-10 ^{-/-} e IL-10 ^{+/+} tratados ou não com o ácido betulínico e desafiados com LPS.	61
Figura 18	Produção de TNF- α em culturas de macrófagos ativados com LPS em presença do ácido betulínico.	62
Figura 19	Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos residentes coletados de camundongos após tratamento <i>in vivo</i> .	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Definições usadas para descrever o distúrbio do paciente com sepse	18
Tabela 2	Estrutura e atividades biológicas das moléculas selecionadas	45

LISTA DE SIGLAS

AB – Ácido betulínico
BZP - Benzopirona
cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva
Con A – Concanavalina A
COX – Ciclooxigenase
DL₉₀₋₁₀₀ – Dose letal para 90-100 % dos animais
DMEM - meio Eagle modificado por Dulbecco
ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
IFN- γ – Interferon gama
IL - Interleucina
LBP - Proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LPS – Lipopolissacarídeo
MASP – Lectina ligadora de manose associada à serina protease
MB-Lectina - Lectina ligadora de manose
MBP - Proteína ligadora de manose
MTT - (3-(4,5-Dimetil-tiazol-2yl)-2,5-brometo difenil-tetrazolio)
NF- κ B - Factor nuclear kappa B
NO – Óxido nítrico
PAF - Fator de agregação plaquetária
PGE₂ - Prostaglandina E2
PLA₂ - Fosfolipase A2
RML - Reação mista linfocitária
ROS - Espécies reativas do oxigênio
rPAF - Receptor do fator de agregação plaquetária
sPLA2 - Fosfolipase secretora A2
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TH2- T helper 2
TLR-4 - Receptor tipo Toll-4
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	PRODUTOS NATURAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	15
3.2	DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS	16
3.3	FISIOPATOLOGIA DAS SEPSES	16
3.4	MECANISMOS DESENCADEADORES DA SEPSE	19
3.4.1	Estimulação via LPS	19
3.4.2	Mediação celular na sepse	22
3.4.2.1	O macrófago	22
3.4.2.2	Neutrófilos	24
3.4.2.3	Células do endotélio microvascular	25
3.4.3	Mediadores solúveis da sepse	26
3.4.3.1	Sistema Complemento	26
3.4.3.2	Espécies reativas do oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) na sepse	27
3.4.3.3	Citocinas	28
3.4.3.4	Mediadores inflamatórios lipídicos	30
3.5	O MODELO DE ENDOTOXEMIA	31
4	JUSTIFICATIVA	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	MOLÉCULAS ESTUDADAS	34

5.2	ANIMAIS	34
5.3	DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	35
5.4	DOSAGEM DE OXIDO NÍTRICO (NO) <i>IN VITRO</i>	36
5.5	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO	36
5.6	REAÇÃO MISTA LINFOCITÁRIA	37
5.7	INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA	37
5.8	DOSAGEM DE TNF-A EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS	38
5.9	DOSAGEM DE TNF-A EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES	38
5.10	DOSAGEM DE CITOCINAS	39
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6	RESULTADOS	40
6.1	TRIAGEM DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL AÇÃO IMUNOMODULADORA	40
6.2	ATIVIDADE IMUNOMODULADORA <i>IN VITRO</i>	43
6.3	ENSAIOS <i>IN VIVO</i> EM MODELO DE ENDOTOXEMIA	47
6.4	INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BENZOPIRONA E DO ÁCIDO BETULÍNICO	52
6.4.1	Benzopirona	52
6.4.2	Ácido betulínico	58
7	DISCUSSÃO	64
8	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	81

Artigo 1:

Different effects of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela baihensis* on spleen and thymus cells stimulated *in vitro* with different mitogens. 2006

Artigo 2:

Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. 2007

Artigo 3:

Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian Semi-arid. 2007

Artigo 4:

Ryanodane diterpenes from two *Erythroxyllum* species. 2007

Artigo 5:

The flavonoid rutin but not the alkaloid arborinine induces apoptosis in a B-cell hybridoma cell line. 2008

Artigo 6 :

Antiparasitic and immunomodulatory activities of 1,1-bis(4-Hydroxyphenyl)-2-phenyl-but-1-ene Q1 and its protected and free 2-ferrocenyl derivatives. 2009

Artigo 7:

Early toxicity screening and selection of lead compounds for parasitic diseases. 2009

Artigo 8:

Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. 2009

Artigo 9:

In vitro pharmacological screening of macrofungi extracts from the Brazilian northeastern region. 2009

Artigo 10:

Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. 2010

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade mundial tem fornecido inúmeros recursos para o tratamento e profilaxia de diversas patologias, ao longo da história da humanidade. Nos primórdios da civilização humana e por muito tempo os recursos naturais eram a única fonte de substâncias para o tratamento de doenças. Estima-se que a biodiversidade mundial seja composta por um número de espécies vegetais e animais que varia entre 10 e 50 milhões. Os recursos da biodiversidade brasileira ainda não foram valorados e o país apresenta-se megadiverso, diante da grande diversidade biológica existente (GUARATINI, 2010).

O foco da indústria farmacêutica está voltado na atualidade para a biodiversidade como fonte promissora de substâncias químicas, possíveis candidatas a novas moléculas bioativas a serem utilizadas na produção de medicamentos. Assim, tem sido bastante relatada na literatura científica a importância de moléculas derivadas de plantas e animais para o desenvolvimento de novos medicamentos. Deve-se considerar ainda o impacto no mercado farmacêutico produzido pelas moléculas obtidas a partir de modificações químicas de estruturas isoladas de produtos naturais. Em geral essas modificações potencializam a atividade e são consideradas moléculas obtidas por síntese química parcial (NEWMAN, 2007).

Há uma série de patologias para as quais ainda não há tratamento adequado ou cujos tratamentos são feitos com drogas que, apesar de eficazes, apresentam elevada toxicidade. As imunopatologias são incluídas nessa categoria de doença e estão presentes em todo o mundo, afetando pessoas de todas as idades e etnias. Os tratamentos atualmente utilizados para as doenças imunomediadas, apesar de eficazes para a maioria dos casos, apresentam ainda elevada toxicidade, sobretudo devido ao longo período de tempo de utilização das drogas. Diante do exposto, a descoberta de novas moléculas ativas sobre o sistema imunológico é de grande importância social e econômica (KRENSKY, 2006).

Moléculas isoladas de plantas e alguns derivados obtidos por síntese química têm se mostrado promissores pela atividade produzida sobre componentes do sistema imune, em ensaios *in vitro*, e também em ensaios pré-clínicos.

No presente trabalho, avaliou-se a atividade farmacológica imunossupressora de moléculas isoladas de vegetais e derivados sintéticos, em ensaios *in vitro* e em modelo de endotoxemia, além da avaliação do perfil de produção de algumas citocinas *in vivo* para estudo do mecanismo de ação de duas das moléculas ativas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar e avaliar a atividade farmacológica imunossupressora de moléculas isoladas de vegetais e derivados sintéticos, em ensaios *in vitro* e em modelo de endotoxemia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Triar uma biblioteca de compostos naturais e sintéticos quanto à citotoxicidade, atividade inibitória de NO por macrófagos estimulados pelo LPS e IFN- γ e proliferação de linfócitos estimulados pela concanavalina A ou por reação mista linfocitária (RML).
- Avaliar os efeitos do tratamento com moléculas imunossupressoras, ativas *in vitro* ou relatadas na literatura, sobre a mortalidade de camundongos desafiados com uma dose letal de LPS.
- Analisar os mecanismos de ação protetora do ácido betulínico e da benzopirona em modelo de endotoxemia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUTOS NATURAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Os vegetais têm sido utilizados como agentes medicinais desde os tempos mais remotos da civilização. Inicialmente, toda a base do conhecimento de uso era de cunho folclórico (LEE, 2004). No século XIX, com o isolamento dos primeiros princípios ativos de vegetais, é que a abordagem científica para essa área foi estabelecida. Até o advento da indústria farmacêutica, os produtos naturais eram a única fonte de recursos para o tratamento de doenças. De um modo geral, são agentes ainda utilizados como profiláticos e curativos para patologias que afetam grande parte da população mundial, sobretudo em países em desenvolvimento (COSTA, 2004). Além disso, os produtos naturais são uma fonte de grande importância para a descoberta de novos medicamentos, havendo estimativas de que 31% das moléculas descobertas entre os anos de 1991 e 2006 com atividades farmacológicas descritas foram obtidas diretamente da natureza, derivadas dessa e obtidas a partir de processos de semi-síntese ou tenham sido sintetizadas a partir de modelos moleculares isolados de seres vivos (NEWMAN, 2007).

Na atualidade, os produtos naturais têm um papel importante no processo de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Desde os tratamentos para doenças infecciosas até o câncer, há uma predominância de medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. Assim, os recursos naturais permanecem como fonte de busca de novas moléculas capazes de produzir atividade farmacológica, potenciais candidatas a moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Em relação ao potencial terapêutico dos produtos naturais, é possível perceber o quanto a natureza apresenta possibilidades de produção de moléculas de elevada complexidade e também capazes de estabelecer interação com os mais diversos sistemas biológicos. Atualmente a indústria farmacêutica retoma as atenções para a importância das fontes de recursos naturais e intensifica a pesquisa de princípios ativos derivados desses recursos. O Brasil está muito bem colocado dentro deste contexto, considerando-se que é o país detentor de uma megadiversidade, com o maior patrimônio da flora mundial, apresentando cerca de 55.000 espécies de plantas catalogadas. Essa condição coloca o país numa posição de destaque e atrai a atenção da indústria farmacêutica para os recursos provenientes da biodiversidade brasileira (MARINHO, 2008).

3.2 DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS

As doenças imunomediadas são um problema de saúde em todo o mundo e crescem em proporções epidêmicas. Esse fato requer uma aproximação maior e mais agressiva das partes envolvidas no processo de pesquisa e desenvolvimento com a finalidade de descoberta de novas terapias. Dentre as patologias consideradas mediadas pelo sistema imune estão a artrite reumatóide, a diabetes mellitus tipo 1, o lúpus eritematoso sistêmico, a esclerose múltipla, os tumores sólidos, as doenças hematológicas malignas, as doenças infecciosas e a asma, além de várias condições alérgicas. Nessa ampla gama de patologias imunomediadas ainda estão as complicações decorrentes da rejeição a órgãos transplantados, importante barreira ao uso de transplantes alogênicos. A utilização de drogas imunossupressoras diminui a resposta imune em doenças imunomediadas e também em transplantes de órgãos. Na prevenção da rejeição a transplantes, as drogas utilizadas atualmente são os corticoides, os inibidores da calcineurina, os agentes antiproliferativos/antimetabólicos e as terapias com anticorpos. Essas substâncias apresentam um elevado grau de sucesso nos tratamentos clínicos da rejeição aguda ao transplante de órgãos e das doenças autoimunes. Entretanto, o tratamento com essas drogas é longo e a supressão imune deixa o paciente em condição de elevado risco a infecções e também ao câncer. Os inibidores da calcineurina e os corticoides, especialmente, são nefrotóxicos e diabotogênicos, respectivamente, o que restringe o uso em diversas condições clínicas (KRENSKY, 2006). Portanto, é de grande relevância a busca por novas moléculas, candidatas a fármacos imunossupressores que apresentem eficácia e menor toxicidade.

3.3 FISIOPATOLOGIAS DAS SEPPSES

O termo sepse designa uma resposta imunológica sistêmica a uma infecção que pode ter sérias consequências, desde a falência múltipla de órgãos até a morte. A sepse é uma das mais frequentes causas de complicações cirúrgicas em pacientes e uma das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva. É definida como uma síndrome clínica e caracterizada pela presença de infecção e consequente resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro. A sepse pode ser causada pela infecção por bactérias Gram positivas e negativas, por fungos ou vírus (TSIOTOU, 2005; NEMZEK, 2008).

A reação normal do hospedeiro envolve diversos processos mediados pelo sistema imune que, em caso de deficiências, pode permitir o estabelecimento de uma infecção. No entanto,

respostas extremas podem causar danos ao hospedeiro por conta da secreção exacerbada de substâncias inflamatórias. A sepse resulta da liberação extensiva de mediadores inflamatórios em resposta à invasão microbiana. Os mecanismos apresentados pelo hospedeiro contra o invasor vão desde a liberação de citocinas, ativação de neutrófilos, monócitos e células do endotélio microvascular como também a ativação de fatores neuroendócrinos e do plasma, proteínas do sistema complemento, ativadores da coagulação sanguínea, além do sistema fibrinolítico (TSIOTOU, 2005).

A invasão da corrente sanguínea por microorganismos não é condição fundamental para o aparecimento da sepse, pois o hospedeiro pode produzir uma resposta eficiente, eliminando-o. A mediação do processo ocorre por diversos sinais que são rapidamente amplificados, propagando-se além dos tecidos invadidos. Febre ou hipotermia, taquipneia e taquicardia em geral sinalizam o início da sepse como resposta sistêmica à invasão microbiana. Assim, a sepse é caracterizada pela presença de infecção com resposta inflamatória sistêmica. Quando os mecanismos de manutenção da homeostase corporal falham, pode-se instalar um quadro definido como sepse grave, em que há a presença de disfunção de órgãos. Desequilíbrios adicionais conduzem ao choque séptico, caracterizado pela disfunção de outros órgãos e hipotensão, que conduz a uma falha na circulação sanguínea e aumenta o risco de morte. A sepse em geral é reversível, mas o choque séptico não, apesar das terapias adotadas atualmente (MUNFORD, 2002; VINCENT, 2008).

A resposta do hospedeiro a antígenos do invasor ou a danos causados por trauma e isquemia/reperfusão produzem rapidamente a ativação da resposta imune inata e a liberação de diversos mediadores humorais. As manifestações da resposta séptica em geral são mais intensas que a da doença subjacente e infecção primária do paciente. Todos os mediadores inflamatórios atuando conjuntamente durante a sepse produzem danos microvasculares, conduzindo o tecido/órgão à isquemia, disfunção e/ou falha de múltiplos órgãos. Clinicamente, a resposta sistêmica intensifica-se com o tempo, evoluindo de uma forma leve (sepse) até a forma mais grave (choque séptico). A hiperventilação é um sinal inicial e pode ser seguido de desorientação e confusão. Outras manifestações de encefalopatia podem se desenvolver precocemente na sepse, sobretudo em idosos e portadores de deficiências neurológicas (TSIOTOU, 2005; MUNFORD, 2002).

Tecidos periféricos ficam predispostos à acrocianose e à necrose isquêmica em decorrência da hipoventilação e da coagulação intravascular disseminada. Náuseas, vômitos, diarreia e íleo paralítico são manifestações gastrointestinais comuns no paciente séptico. Pode haver também desequilíbrios no aparelho cardiopulmonar em decorrência da desigualdade

ventilação-perfusão, que conduz a uma queda na PO₂ arterial. A hipotensão induzida na sepse é decorrente, em geral, da má distribuição do fluxo e volume sanguíneo e da hipovolemia decorrente do extravasamento capilar difuso do líquido intravascular. Alguns fatores que também influenciam o extravasamento capilar são a desidratação pela doença pré-existente ou ainda por perdas insensíveis (vômito, diarreia e poliúria). Sobre o aparelho renal, com grande frequência, observa-se oligúria, azotemia, proteinúria e cilindros urinários inespecíficos. Em termos laboratoriais, precocemente podem ser achados leucocitose, trombocitopenia, hiperbilirrubinemia e proteinúria. É possível que se desenvolva leucopenia. A trombocitopenia pode ser agravada à medida que a resposta séptica evolui, tornando-se mais grave. Esse quadro, em geral, é acompanhado de aumento no tempo de trombina, fibrinogênio diminuído além da presença de dímeros D (produto da degradação da fibrina), sugerindo um quadro de coagulação intravascular disseminada (MUNFORD, 2002).

Tabela 1. Definições usadas para descrever o distúrbio do paciente com sepse

Síndrome de resposta inflamatória aguda (SIRS)	Dois ou mais dos seguintes distúrbios: (1) febre (temperatura axilar >37,6°C) ou hipotermia (<36°C); (2) taquipnéia (mais de 24 incursões/min); (3) taquicardia (frequência cardíaca > 90 bpm); (4) leucocitose (>12.000/μL), leucopenia (<4.000/μL), ou bastões > 10%. Pode ou não ter etiologia infecciosa
Sepse	SRIS com etiologia microbiana provada ou suspeita
Sepse grave	Sepse com um ou mais sinais de disfunção de órgãos (como acidose metabólica, encefalopatia aguda, oligúria, hipoxemia ou coagulação intravascular disseminada) ou hipotensão
Choque séptico	Sepse com hipotensão (pressão arterial sistólica de < 90 mmHg ou menos de 40 mmHg da pressão arterial normal do paciente) que não responde à reanimação com líquidos, acompanhada de disfunção de órgãos

Fonte: MUNFORD, 2002

É comum a presença de sepse em pacientes que apresentam outras doenças. Aponta-se que um percentual de 15 % dos pacientes com sepse apresentam câncer ou diabetes como comorbidades. Em relação à idade, casos de sepse são mais comuns em indivíduos de faixa etária mais elevada, chegando a ser apontado, por alguns trabalhos da literatura, que indivíduos com idade superior a 65 anos são mais propensos a desenvolver a síndrome. Em relação ao sexo, de acordo com trabalhos que relatam experiências clínicas, pelo menos 50 % dos casos ocorrem em pacientes do gênero feminino (ZANOTTI-CAVAZZONI, 2009).

Sepse é uma síndrome comum, com ocorrência de aproximadamente 751.000 casos de sepse grave nos Estados Unidos. Destes, estima-se que 9 % dos casos de óbito tenham a sepse grave como causa. Este número é bastante elevado, já que é equivalente ao número de mortes causadas pelo infarto agudo do miocárdio (LAMONTAGNE, 2008). Informações da

literatura científica indicam que, na Europa, cerca de 30 % dos pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva desenvolvem sepse grave durante o período de internamento. No Reino Unido, 27 % dos pacientes de unidades de terapia intensiva têm sepse grave nas primeiras 24 horas de admissão. Os percentuais de casos de sepse grave em outros países sofrem variações que vão de 8 % na Eslováquia a 17 % no Brasil. Esses valores não são absolutos, considerando que muitos foram referentes a pacientes admitidos em período pós-operatório que apresentam menores taxas de sepse. A literatura é consensual em relação ao risco de morte causado pela sepse, estimado em 27 %, podendo aumentar para 32 % em caso de sepse grave e ainda chegar a 54 % para pacientes com choque séptico (VINCENT, 2008). Dados mais recentes do Sistema de Informações de Mortalidade do Ministério da Saúde do Brasil indicam que aproximadamente 220.000 pessoas morrem em decorrência de sepse no país. Segundo o último relatório do Instituto Latino-Americano da Sepse, 48,7% dos pacientes com sepse grave e 65,5% dos com choque séptico, morrem no Brasil. No mundo, essas taxas estão em 23,9% e 37,4%, respectivamente (LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE, 2010).

3.4 MECANISMOS DESENCADEADORES DA SEPSE

3.4.1 Estimulação via LPS

O lipopolissacarídeo (LPS), componente predominante da parede celular das bactérias Gram negativas e também potente ativador de resposta do sistema imune, é um dos fatores que desencadeiam a sepse. Esta molécula consiste de uma região polissacarídica ligada à porção externa da parede celular bacteriana através de uma porção denominada lipídeo A ou endotoxina. Essa molécula é um dissacarídeo de glicosamina ligado a ácidos graxos hidroxilados que posteriormente são substituídos por ácidos graxos não-hidroxilados. A forma mais imunogênica do lipídeo A contém seis grupamentos acil-graxos (forma hexa-acilada) e é encontrada em bactérias como *Escherichia coli* e espécies do gênero *Salmonella*. Quando o lipídeo A é composto por quatro ou cinco grupamentos ácidos, a resposta imunológica do paciente é menor e pode inclusive reduzir de forma dose-dependente a intensa resposta desencadeada pela estimulação com cadeias hexa-aciladas (ATABEK, 2008; COATS, 2005; D'ORIO, 1987; MILLER, 2005).

Figura 1

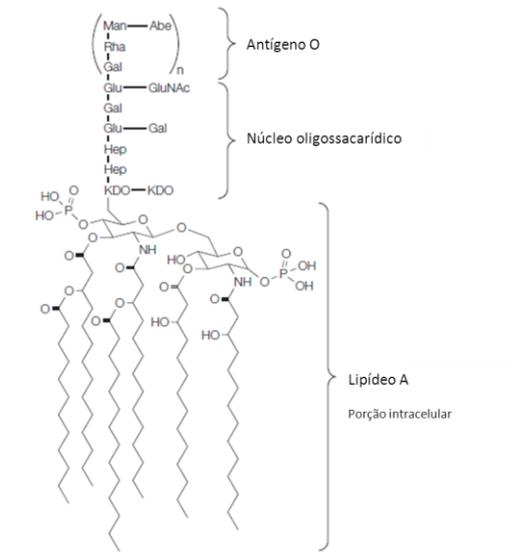


Figura 1. Estrutura do lipopolissacarídeo.

Fonte: Miller 2005

Além do lipídeo A, a molécula de LPS é composta por duas outras porções: antígeno-O e núcleo oligossacarídico. As formas menos imunogênicas do lipopolissacarídeo têm recebido atenção como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento, desde antes do conhecimento da sua ação antagonista (MILLER, 2005).

Figura 2

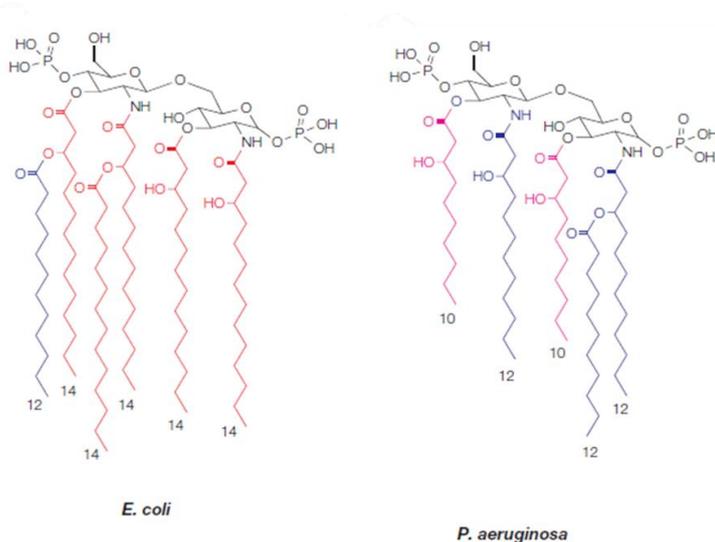


Figura 2. Estrutura do lipídeo A, agonista hexa-acilado de *E. coli* e antagonista penta-acilado de *P. aeruginosa*. Fonte: Miller, 2005.

O LPS liga-se à proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) e o complexo assim formado liga-se ao CD-14 livre no plasma ou ligado à superfície de fagócitos. O CD-14 transfere-o para o MD-2, formando o complexo endotoxina-MD-2, que interage com o TLR-4 (Toll-like receptor-4). A ativação deste receptor desencadeará a ativação do NF- κ B e sua translocação para o núcleo, podendo este processo ocorrer na ausência da LBP e CD-14, mas na dependência de uma grande quantidade da endotoxina (lipídeo A). Esta molécula liga-se à proteína MD-2 e induz a alteração conformacional que inicia a oligomerização e a sinalização disparada pelo TLR-4. O lipídeo A de baixa imunogenicidade parece utilizar pelo menos duas vias distintas para bloquear a ativação do TLR-4 dependente do LPS. O mecanismo principal baseia-se na competição direta da endotoxina hexa-acilada com a endotoxina tetra ou penta-acilada pelo mesmo sítio da proteína MD-2, ao passo em que um segundo mecanismo estaria baseado na capacidade do complexo endotoxina tetra ou penta-acilada-MD-2 inibir a função do complexo endotoxina hexa-acilada-MD-2 junto ao TLR-4 (COATS, 2005; TEGHANEMT, 2005; VISINTIM, 2005; SAITOH, 2004; ATABEK, 2008).

Figura 3

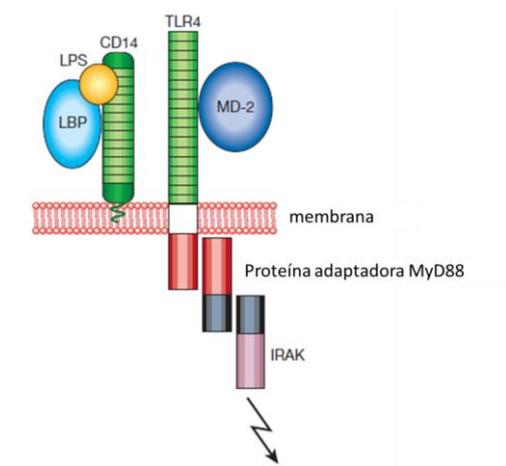


Figura 3. Mecanismo de ativação de fagócitos pelo LPS através da interação com a LBP e associação com CD-14 e TLR-4/MD-2. Fonte: Aderem, 2000.

Caso a infecção seja produzida por bactérias Gram positivas, a estimulação não é produzida por LPS e sim por exotoxinas que atuam como superantígenos e também por outras moléculas provenientes da membrana celular, liberadas sob a forma de fragmentos, como peptidoglicanos, ácidos teicoicos e ácidos lipoteicoicos (TSIOTOU, 2005).

3.4.2 Mediação celular na sepse

3.4.2.1 O macrófago

Pela sua ação fagocítica, o macrófago é uma célula de grande importância para o sistema imunológico, pois está sempre disponível para combater uma ampla variedade de patógenos sem requerer uma exposição prévia, sendo portanto um componente essencial do sistema imune inato. É esta célula que faz o reconhecimento de antígenos, no organismo do hospedeiro, regulando inicialmente o processo inflamatório através da produção e liberação de citocinas e também pelo efeito que exerce em outras células, como, por exemplo, linfócitos T através da sua atuação como células apresentadoras de antígeno (TSIOTOU, 2005).

Os monócitos são a principal fonte dos macrófagos teciduais tanto em processos infecciosos quanto em outras patologias imunomediadas. A diferenciação e a ativação destas células dependem do seu local do crescimento e dos fatores de diferenciação presentes, dos receptores expressos, das vias de sinalização e também dos fatores de transcrição ativados. A migração destas células para o local da infecção contribui para uma resposta à inflamação aguda e crônica tanto em termos locais quanto sistêmicos. Assim, os macrófagos participam tanto na resposta inata do organismo quanto na resposta adaptativa. Essas células são capazes de potencializar a atividade citotóxica e antimicrobiana, promover o remodelamento tissular além de debelar inflamações e iniciar processos de reparo tecidual.

Há diferenças morfológicas e fenotípicas nos macrófagos, a depender do órgão em que se encontram e também da interação com a matriz e com outras células. São células que biossintetizam e expressam grande quantidade de receptores além de reconhecerem antígenos como próprios e não próprios. Além de funções como endocitose, fagocitose e secreção de diversas substâncias (citocinas, fatores de crescimento e outros metabólitos), os macrófagos desenvolvem funções tóxicas e benéficas ao organismo, enquanto células mononucleares independente da sua fase de desenvolvimento. Na superfície destas células são expressadas muitas moléculas de receptores (TLR, RIG-I-like e Nod-like) e também do sistema complemento, além de lectinas.

Dentre as substâncias secretadas pelos macrófagos estão enzimas antibacterianas e proteolíticas, quimiocinas, citocinas antiinflamatórias (IL-10 e TGF- β), próinflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e metabólitos do ácido araquidônico (GORDON, 2010). Além de efeitos locais, as citocinas secretadas pelos macrófagos também produzem efeitos sistêmicos, contribuindo para a defesa do hospedeiro contra o patógeno. Um dos efeitos é a elevação da temperatura corporal, mediada pelo TNF- α , IL-1 e IL-6 além de outras citocinas, os denominados pirógenos endógenos, já que produzem febre e não são derivados de fontes bacterianas. A elevação da temperatura corporal é benéfica para o hospedeiro já que a maioria dos patógenos desenvolve-se melhor em baixas temperaturas além das respostas imunes adaptativas serem melhores a temperaturas mais elevadas.

O TNF- α , a IL-1 e a IL-6 juntos desencadeiam uma reação conhecida como resposta de fase aguda. Nesta, algumas proteínas produzidas pelos hepatócitos (proteína C reativa e lectina ligadora de manose além das proteínas surfactantes A e D) são liberadas no plasma. A proteína C reativa é componente da família das pentraxinas (cinco subunidades idênticas) e liga-se à porção fosforilcolina de certos polissacarídeos da parede celular de alguns fungos e

bactérias. Apesar de presente em polissacarídeos de células de mamíferos, a fosforilcolina nesta condição encontra-se de uma forma que não pode se ligar à proteína C reativa. Quando a proteína C reativa liga-se a uma bactéria, ela é capaz não só de opsonizá-la, mas também de ativar a cascata do sistema complemento a partir da interação com o primeiro componente da via clássica, o C1q. A proteína ligadora de manose (MBP) é encontrada em baixos níveis no soro normal e tem sua produção aumentada durante a resposta de fase aguda. Esta proteína age como opsonina para os monócitos que, ao contrário dos macrófagos teciduais, não expressam o receptor de manose (TSIOTOU, 2005; WARD, 2004; NETEA, 2003; JANEWAY, 2002; BLACKWELL, 1996).

As proteínas surfactantes A e D pertencem à classe das colectinas, capazes de se ligar à superfície dos patógenos através dos domínios globulares ligados a uma haste semelhante ao colágeno. Em um período de um a dois dias, através da resposta de fase aguda, o organismo tem disponibilizado duas proteínas com propriedade funcional de anticorpos, mas sem diversidade estrutural e que podem se ligar a diversos patógenos. Estas moléculas produzidas não têm diversidade estrutural nem especificidade, sendo produzidas em resposta à estimulação produzida pelo TNF- α , IL-1 e IL-6. A longo prazo, as citocinas produzidas induzirão uma leucocitose, com aumento de neutrófilos circulantes (JANEWAY, 2002).

A estimulação excessiva, prolongada e desregulada de macrófagos, em adição ao efeito de outras células ativas (leucócitos e células do endotélio microvascular) libera uma série de mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-1 e IL-6, que apresentam ação sinérgica, potencializando o processo inflamatório, incluindo a sepsé (TSIOTOU, 2005). Estas células são ativadas em um primeiro estágio, de diferenciação, por fatores como o GM-CSF e M-CSF; em um segundo estágio pelo IFN- γ (ativação clássica de macrófagos) ou IL-4 e IL-13 (ativação alternativa de macrófagos) e ainda em um terceiro estágio pela via TLR, através de estímulo apresentado, que promove a indução da via clássica ou alternativa do sistema complemento (GORDON, 2010).

3.4.2.2 Neutrófilos

Os neutrófilos pertencem à classe dos leucócitos, células da linhagem branca que são originadas da medula óssea e que migram da corrente sanguínea para os tecidos através da adesão às células endoteliais (JANEWAY, 2002). Os neutrófilos ocupam um papel de grande importância enquanto células mediadoras da resposta imunológica e além de produzirem e secretarem citocinas, proteases e espécies reativas derivadas do oxigênio, são capazes de

atuar contra outras células, produzindo danos a essas. Em condições normais, neutrófilos interagem com células endoteliais da microvasculatura, porém quando ativados ou se as células endoteliais microvasculares estão sob influência de citocinas, neutrófilos funcionam como potentes mediadores de danos causados à microvasculatura. Há diferentes fases da interação dessas células, podendo ser divididas em: fase de rolamento, adesão ao endotélio venular, ativação, agregação e transmigração através das junções celulares endoteliais, em direção ao local em que se encontra o patógeno. Estas alterações resultam na oclusão venular, causando isquemia tissular. Proteases secretadas por neutrófilos e espécies reativas do oxigênio agem sinergicamente sobre o endotélio venular causando danos, promovendo a formação de espaços intercelulares e aumentando assim a permeabilidade vascular. Tem sido descrito na literatura que, em pacientes sépticos, os neutrófilos apresentam uma disfunção caracterizada por diminuição quimiotática e metabolismo celular alterado (produção de radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio e alteração do conteúdo enzimático e da atividade microbicida). Essas alterações funcionais das características dos neutrófilos tornam-os incapazes de defender o hospedeiro contra microorganismos invasores, o que caracteriza uma imunossupressão (sobretudo no último estágio da sepse, o que complica o prognóstico do paciente), enquanto estas mesmas células continuam com atividade antiinflamatória potente e produzindo uma inflamação excessiva, descontrolada e sistêmica, que produzirá danos teciduais e disfunção de órgãos (TSIOTOU, 2005).

3.4.2.3 Células do endotélio microvascular

Em estado normal, as células do endotélio microvascular apresentam funções de grande importância para a homeostase. Sob disfunções, apresentam papel fundamental, sobretudo no desenvolvimento da sepse. Nessa condição, os danos a essas células são resultantes da produção de diversas substâncias tóxicas (radicais livres do oxigênio, derivados do ácido araquidônico e produtos do metabolismo anaeróbico e da acidose láctica), da ativação do sistema complemento, da agregação plaquetária, da ativação de neutrófilos e da produção de citocinas por monócitos. Como resultado, as células endoteliais podem produzir mediadores inflamatórios, em um processo denominado como ativação de células endoteliais ou inflamação intravascular maligna, com alteração e produção de substâncias vasoativas, expressão de moléculas de adesão e de mediadores químicos inflamatórios, o que terá efeito pró-coagulante. Todas essas alterações acabarão por produzir um aumento na permeabilidade vascular, resultando na formação de edema e consequente hipotensão por perda de líquidos

para os espaços intersticiais. Hipotensão e complicações na perfusão são potencializadas pela vasodilatação periférica, produzida pela liberação de cininas, histamina e outros peptídeos vasoativos durante a ativação da cascata inflamatória. As interações entre macrófagos, neutrófilos e células endoteliais potencializam o processo inflamatório (TSIOTOU, 2005).

3.4.3 Mediadores solúveis da sepse

3.4.3.1 Sistema complemento

Várias proteínas plasmáticas compõem o sistema complemento, componente do sistema imune inato, e reagem conjuntamente opsonizando agentes patogênicos que serão posteriormente ingeridos por fagócitos. A opsonização é o processo de marcação da superfície de patógenos através da fixação de opsoninas ou fragmentos do complemento, permitindo a fagocitose e facilitando a ação do sistema imune. No caso de bactérias, após opsonizadas, são destruídas por macrófagos e neutrófilos. Após opsonização, uma série de respostas inflamatórias é produzida, o que auxiliará no combate à infecção (JANEWAY, 2002).

Muitas dessas proteínas do sistema complemento são denominadas zimógenos, foram inicialmente identificadas no estômago e estão amplamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais sem efeitos prejudiciais. São ativados através de cascata enzimática nos sítios de infecção, produzindo potente efeito inflamatório. Nessa cascata, uma enzima ativa do complemento é produzida a partir da clivagem do seu precursor zimógeno que cliva seu substrato, outro zimógeno do complemento, em sua forma enzimaticamente ativa (WARD, 2004).

Existem três formas, dependentes de diferentes fatores, e produtoras do mesmo grupo de moléculas efetoras, a partir das quais o sistema complemento pode ser ativado na superfície de patógenos. A primeira delas é a via clássica, em que grande quantidade de moléculas do complemento é ativada, ligando-se através de ligações covalentes à superfície do patógeno, opsonizando-o e ativando a fagocitose destes. A segunda forma, denominada via da lectina ligadora de manose (MB-Lectina), uma lectina sérica ou ficolina (similares às lectinas ligadoras de manose) liga-se a carboidratos de bactérias ou vírus, que contêm manose, resultando na ativação das MASP's (serina proteases) com consequente interação com outras proteínas no sistema complemento. A terceira via, denominada alternativa, é ativada quando

proteínas componentes do complemento, ativadas espontaneamente, ligam-se à superfície de patógenos (bactérias ou fungos), formando poros (JANEWAY, 2002).

Todas as três vias levam à formação do C3 e a partir da clivagem originam C3a, C3b, C5a, C5b e C5b-9. Este último, denominado complexo terminal de ataque à membrana, é ativo contra bactérias Gram negativas. A sepse é um exemplo de reação exacerbada do complemento e do sistema inflamatório. Há fortes indícios de que a ativação do complemento em humanos e animais com sepse seja reflexo dos níveis plasmáticos elevados de C3a, C4a e C5a. Na sepse, acredita-se que a associação da via clássica e da alternativa seja responsável pela ativação do sistema complemento. Trabalhos recentes têm mostrado que a região do antígeno-O da molécula do LPS pode ativar a via MB-Lectina do sistema complemento, sugerindo que na sepse diversas vias parecem participar da ativação do sistema complemento. A ativação excessiva do complemento pode responder pelo dano a órgãos e comprometer o sistema imune inato e resposta inflamatória (GUO, 2004; WARD, 2004).

3.4.3.2. Espécies reativas do oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) na sepse

Há derivados do oxigênio que são extremamente instáveis eletronicamente e, portanto, apresentam características de extrema reatividade química. Estes podem produzir danos a estruturas fundamentais à célula, o que inclusive pode levar à perda de função de algumas estruturas como a membrana celular, originando necrose. Dentre estas espécies ditas reativas estão: o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila e o peroxinitrito. Diversos processos enzimáticos em neutrófilos podem produzir estes derivados como defesa do hospedeiro contra invasores. Espécies reativas do oxigênio (ROS) são importantes sistemicamente, pois podem estar envolvidos na patogênese de síndrome isquêmica/reperfusiva, síndrome de angústia respiratória aguda, sepse além da síndrome da disfunção múltipla de órgãos (BARRETO, 2005; DUSSE, 2003).

O óxido nítrico (NO) constitui um importante mediador de processos intra e extracelulares. O NO é um radical livre gasoso, produzido por uma família de enzimas, incluindo a óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a partir da L-arginina. A função do óxido nítrico no organismo é dúbia, podendo ser benéfica ou maléfica. Sua importância fisiológica decorre do fato deste poder atuar como importante segundo mensageiro, ativando ou inibindo uma série de moléculas-alvo que participam dos diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, controle imunológico da relação patógeno-hospedeiro além de eventos relacionados à neurotransmissão. O NO atua de

maneira diferente de outros mensageiros, não dependendo da topologia molecular para se ligar a receptor ou enzima e sim da sua reatividade redox. Além disso, o NO não é armazenado *in vivo* como outras moléculas mas produzido diante de necessidade do organismo, difundindo-se rapidamente até seu sítio de ação (BARRETO, 2005). Enquanto funções que apresenta, é capaz de promover o relaxamento vascular, o que confere proteção dos vasos sanguíneos. Ainda apresenta funções de proteção do organismo já que é um importante mediador citotóxico de células do sistema imunológico ativadas, com capacidade de destruir patógenos e células tumorais além de possuir importante função enquanto mensageiro de diversos processos biológicos (DUSSE, 2003).

Muitos autores descreveram na literatura a relação do NO com a sepse. Por haver um aumento da produção de derivados do NO na sepse e ainda que a administração de inibidor da enzima NOS pode reverter as manifestações hemodinâmicas do choque séptico, fortaleceu-se a hipótese de que o NO é uma importante molécula na disfunção de órgãos no processo de sepse. Mesmo assim, os efeitos maléficos do NO, nessas condições, ainda precisam ser melhores esclarecidos. A função de controle do tônus vascular e consequente regulação do fluxo sanguíneo exercida pelo NO sustenta a ideia de um potencial terapêutico para a molécula, na sepse. Nessas condições, ainda há controvérsias à ideia de inibição da NOS ou à administração de doadores de NO. Estudos clínicos têm mostrado que a inibição de NOS parece aumentar a resistência vascular e diminuir a dose de agentes catecolaminérgicos necessária para manter a pressão arterial em níveis desejáveis, o que ainda requer estudos com inibidor específico, considerando que avaliações em pacientes usando inibidores inespecíficos não mostraram resultados satisfatórios, tendo os mesmos elevada taxa de mortalidade (LAMONTAGNE,2008).

3.4.3.3. Citocinas

Citocinas são peptídeos com importante função enquanto imunomediadores. Têm grande relevância em casos de sepse já que algumas delas apresentam potente atividade inflamatória além de mediar a resposta metabólica e imunológica ao estímulo que desencadeou a patologia, evoluindo então para um quadro de choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e consequente falha. As interações entre as diferentes moléculas de citocinas podem causar desde uma redução no dano ao tecido/órgão até potencialização/aumento deste. De forma geral, as citocinas podem ser classificadas como pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-8) e anti-inflamatórias (IL-10). Endotoxinas são capazes de estimular os macrófagos a produzirem

algumas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α . Este último é uma das mais importantes citocinas na sepse e é rapidamente liberado, induzindo dano tecidual que neste caso específico será mediado por neutrófilos. Como resposta, estas células secretarão fator de agregação plaquetária (PAF), elastase, peróxido de hidrogênio, íons superóxidos, leucotrieno B4, tromboxano A2 e fosfolipases secretoras (sPLA2) (TSIOTOU, 2005).

O TNF- α é um mediador inflamatório inicial e está envolvido em uma série de processos inflamatórios, independente da origem. É uma molécula produzida inicialmente por fagócitos mononucleares, inclusive em endotemia experimental, após estimulação via LPS, podendo ser detectada no soro dos animais (BLACKWELL, 1996). O TNF- α junto com a IL-1 são citocinas proinflamatórias importantes na mediação da sepse. A administração do TNF- α reproduz muitas das alterações fisiológicas associadas a esta patologia (FISHER, 1996). Juntamente com a IL-6, o TNF- α e a IL-1 além de outras citocinas, estimulam a elevação da temperatura corporal e desencadeiam a produção de proteínas da resposta da fase aguda, dentre as quais está a proteína C reativa. Essas três citocinas produzirão uma série de efeitos adicionais como o efeito sobre o endotélio da medula óssea, promovendo a mobilização de neutrófilos como também efeito sobre células dendríticas, estimulando a migração destas para os linfonodos, onde ocorrerá o processo de maturação (JANEWAY, 2002).

A IL-1 estimula a síntese e secreção de prostaglandinas, elastases, collagenases, promove a migração de leucócitos para os tecidos e ativa células da microvasculatura endotelial que respondem com a produção de PAF e IL-8. Em conjunto com o TNF- α , a IL-1 exerce diversos efeitos biológicos na sepse. Sua inibição tem como consequência a redução dos danos causados aos órgãos além do aumento da sobrevivência, em modelos experimentais. A formação de IL-6 é diminuída pela produção de TNF- α ou IL-1 e é possível que esta citocina seja tóxica somente quando produzida em associação a outras citocinas, dentro do que se intitula de efeito sinérgico de citocinas. A IL-8 é uma citocina quimiotática com função relacionada ao processo inflamatório e conjuntamente com quimiocinas produzidas por neutrófilos direcionam o processo de migração destas células além da expressão de moléculas de adesão. Há uma série de outras funções de citocinas relacionadas à sepse que ainda precisa ser melhor definida.

A IL-6 é uma citocina de efeito pleiotrópico, cuja ação depende tanto da concentração local como também do alvo celular. Sob diferentes circunstâncias, a IL-6 pode exercer efeitos pró e antiinflamatórios. Sobre o sistema imune, por exemplo, a IL-6 pode induzir a diferenciação e maturação de linfócitos B além de estimulá-los a produzirem imunoglobulinas. Além destes

efeitos, também pode estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos T (PRITTS, 2002).

As principais citocinas antiinflamatórias são a IL-10, IL-4 e IL-13, que inibem a secreção de TNF- α , IL-1 e IL-8 por monócitos e macrófagos, sendo produzidas no início do processo (TSIOTOU, 2005, SORIANO, 2006). A produção de IL-4 e IL-10 é estimulada, sendo a secreção desta última ainda aumentada pela prostaglandina E₂ (PGE₂), um eicosanoide da via do ácido araquidônico (TSIOTOU, 2005). A IL-10 foi inicialmente descrita como produto de linfócitos TH₂ que inibia a produção de citocinas por macrófagos ativados. Sabe-se hoje que monócitos e células epiteliais também produzem esta citocina. Há um grande número de trabalhos na literatura científica relatando a capacidade desta citocina em inibir a expressão de alguns genes e a síntese de citocinas próinflamatórias. Assim, já é demonstrado, em modelo experimental de endotoxemia, que esta citocina inibe a liberação de TNF- α no plasma, diminuindo a mortalidade dos animais (Blackwell, 1996). Além disso, tem se tornado evidente a influência do sexo sobre as consequências imunológicas durante a sepse, sobretudo se relacionada a esta citocina. É demonstrado na literatura que a IL-10 protege animais machos sépticos tratados previamente com a citocina. É provável que haja interferências da regulação hormonal na produção de citocinas, como a IL-10, em animais fêmeas (KAHLKE, 2002; OBERHOLZER, 2002).

3.4.3.4 Mediadores inflamatórios lipídicos

Mediadores inflamatórios de natureza lipídica são produtos do metabolismo de membranas fosfolipídicas produzidas a partir de uma série de estímulos como resultado da ativação da cascata enzimática inflamatória. A enzima fosfolipase A (PLA₂) metaboliza fosfolipídeos da membrana celular de células inflamatórias produzindo o fator de agregação plaquetária (PAF) e ácido araquidônico, o que será seguido pela liberação de eicosanóides (TSIOTOU, 2005). Quando ativado por estímulos inflamatórios, o macrófago é capaz de mobilizar até 40% do conteúdo da sua membrana lipídica para produzir ácido araquidônico (AA). Este é metabolizado pela ciclooxigenase (COX) ou 5'lipoxigenase e produzirá as prostaglandinas e leucotrienos, moléculas com potente efeito inflamatório. A partir da peroxidação efetuada por radicais livres, o ácido araquidônico e também outros ácidos graxos poli-insaturados podem ser convertidos em isoprostanos, moléculas que podem ser utilizadas para a mensuração do estresse oxidativo (ABDALLA, 2008; TSIOTOU, 2005, LIMA, 2001).

O fator de agregação plaquetária (PAF) é produzido por diversas células inflamatórias incluindo neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais, além de plaquetas e todas essas apresentam o receptor (rPAF), com função autócrina e parácrina. O PAF também interage com uma séria de citocinas inflamatórias além de produzir efeito direto sobre células endoteliais, estimulando a ativação e adesão de neutrófilos. As células endoteliais expressam receptor específico para o PAF e sua ligação a este direciona a alteração no citoesqueleto e consequentemente na sua forma. Isto resultará na perda do contato entre as células, além de contribuir para o aumento do dano à microvasculatura e também aumento da permeabilidade vascular, observado durante a sepse (TSIOTOU, 2005).

3.5 O MODELO DE ENDOTOXEMIA

Um modelo ideal para o estudo da sepse deve possibilitar a extrapolação das informações produzidas em modelos experimentais para condições humanas com reprodução das condições fisiopatológicas da sepse incluindo parâmetros cardiovasculares e também os padrões inflamatórios. Além disso, deve ser de baixo custo e não causar estresse aos animais envolvidos. A grande maioria dos modelos para o estudo da sepse envolve mamíferos roedores, principalmente camundongos, que são de baixo custo e de fácil manipulação (ESMON, 2004). Outro fator que facilita a utilização destes animais é disponibilidade de linhagens isogênicas, knock-out e transgênicas (DEITCH, 1998).

O modelo de endotoxemia é frequentemente usado para o estudo da biologia básica da sepse e existem diversas substâncias indutoras da sepse. Uma destas é o lipopolissacarídeo (LPS), isolado da membrana externa de bactérias Gram-negativas e administrado em dose única, enquanto modelo mais comum de endotoxemia (FINK, 1990; COPELAND, 2005). Este modelo exige uma dose de LPS bastante elevada em comparação com o que se necessita de LPS em humanos para produzir um quadro caracterizado como sepse. A depender da linhagem do animal utilizado e da origem do LPS, pode haver alteração na quantidade necessária para a indução de sepse murina (BURAS, 2005).

Após a administração do LPS, os animais iniciam a manifestação dos sintomas clínicos incluindo uma redução da atividade motora, letargia, apresentação de tremores além de piloereção. Febre tem sido relatada para casos de indução do quadro com LPS de algumas cepas bacterianas. Além desses efeitos físicos, elevadas doses de LPS tem ainda desencadeado um quadro de comprometimento cardiovascular, caracterizado por diminuição

da fração de ejeção além do aumento da resistência vascular periférica (BRACKETT, 1985; D'ORIO, 1987).

Os hemogramas revelam diminuição do número de leucócitos, com redução de linfócitos e neutrófilos. Os níveis de citocinas são elevados em comparação com níveis em humanos, podendo ser quantificados e o modelo é bastante utilizado inclusive pela reprodutibilidade (BURAS, 2005; DEITCH, 1998; FINK, 1990). Estes fatores justificam a utilização do modelo murino de endotoxemia enquanto forma inicial de avaliar possíveis substâncias imunossupressoras.

4 JUSTIFICATIVA

Apesar dos progressos com as terapias intensivas e da descoberta de antibióticos potentes, os casos de sepse estão associados a uma alta taxa de mortalidade, chegando a 40-50 % o que classifica a sepse como principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (TSIOTOU, 2005). Os recursos financeiros necessários ao cuidado a pacientes sépticos em estado crítico são elevados e causam grande impacto aos sistemas de saúde. Estimativas apontam que nos Estados Unidos são gastos mais de 16 bilhões de dólares anualmente com o tratamento de pacientes portadores de sepse.

Considerando o impacto que esta doença causa em todo o mundo, é evidente que são necessários esforços para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento. Há grandes avanços nas últimas décadas acerca da compreensão dos mecanismos da sepse grave e do choque séptico. Mesmo assim, esses avanços não significam novas terapias que sejam efetivas para o tratamento. Apesar dos muitos trabalhos publicados em pesquisa básica e clínica, apenas uma droga, a proteína C ativada (drotrecogina alfa) foi liberada para uso em sepse. Esta droga tem ação anti-trombótica prevenindo trombose microvascular, congestão vascular e falência de órgãos. Além disso, também tem ação antiinflamatória, através da inibição da geração do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), diminui a adesão dos neutrófilos mediada pela seletina ao endotélio vascular lesado e diminui a produção de citocinas proinflamatórias (ZANOTTI-CAVAZZONI, 2009; McLEAY, 2004).

Mesmo assim, a mortalidade por sepse grave e choque séptico continua elevada em todo o mundo. Obviamente é necessário aumentar tanto a compreensão da doença quanto desenvolver novas terapias mais eficazes. Estas duas questões apresentam-se como prioritárias dentro de um contexto de saúde pública. Enquanto agentes que dificultam a descoberta de novas moléculas para o tratamento da sepse estão a complexidade da doença, já que envolve diversos fatores e células do sistema imunológico, a heterogeneidade genética da população, a falta de biomarcadores precisos e definidos para o diagnóstico, além de outras questões relacionadas à pesquisa clínica. Com essas dificuldades, modelos animais têm sido bem utilizados para os estudos envolvendo sepse (ZANOTTI-CAVAZZONI, 2009).

Em virtude dos inúmeros efeitos colaterais decorrentes do uso dessas drogas, há uma grande necessidade da descoberta de moléculas seguras e mais efetivas para o tratamento da sepse (PIAZZA, 2009).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MOLÉCULAS ESTUDADAS

As substâncias puras utilizadas neste trabalho foram isoladas de vegetais do semi-árido brasileiro ou obtidas por processo de síntese química, como no caso dos derivados do lapachol. A benzopirona, hidroxicumarina, solidagenona, lapachol e ácido betulínico foram isoladas respectivamente de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A.C. Smith, *Typha domingensis* Pers, *Solidago chilensis* Meyen, *Tabebuia aurea* (Manso) S. Moore e *Ziziphus joazeiro* Martius. Todas as substâncias isoladas de espécies vegetais foram randomicamente selecionadas e recebidas através de cooperações mantidas entre o Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI/CPqGM/FIOCRUZ) e demais pesquisadores de laboratórios parceiros, de instituições de ensino e pesquisa (Dra. Terezinha C.B. Tomassini, LQPN (PN2) FarManguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil e Dr. José Maria Barbosa-Filho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, UFPB, Paraíba, PB, Brasil).

5.2 ANIMAIS

Os camundongos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Preferencialmente utilizou-se camundongos machos, com peso entre 12-16 g e com idade aproximada de oito semanas, da linhagem BALB/c, sendo as linhagens C57BL/6 e C57BL/6 IL-10^{-/-} também utilizadas. O uso de animais atendeu aos aspectos éticos exigidos pela instituição, tendo o projeto sido aprovado pelo CEUA/CPqGM/FIOCRUZ. Os camundongos foram submetidos a eutanásia, de acordo com as normas institucionais para manipulação de animais.

5.3 DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A determinação da citotoxicidade das substâncias foi feita através de ensaio usando esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c (5×10^6 células/poço), cultivados em placas de 96 poços e cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil). Cada substância foi avaliada a 100; 33,3 ; 11,1 ; 3,7 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. Um controle do experimento foi feito com células tratadas com solução de saponina a 1 %. As culturas foram incubadas em presença de 1 $\mu\text{Ci/poço}$ [metil- ^3H] timidina (Amersham, Little Chalfont, Inglaterra) durante 24 h a 37° C em ambiente contendo 5 % CO_2 . Após esse período as culturas foram coletadas usando um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Groningen, Holanda) para determinar a incorporação de ^3H -timidina e usando contador de radiação gama (β -matrix 9600, Packard). A viabilidade das células foi determinada pela incorporação de timidina às culturas e a citotoxicidade foi calculada em relação aos valores de incorporação das culturas não tratadas.

Em alguns estudos a citotoxicidade foi também avaliada usando a técnica que mede o metabolismo do MTT (3-(4,5-Dimetil-tiazol-2yl)-2,5-brometo difenil-tetrazolio) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) por células da linhagem J774 (10^5 células/poço em 200 μL) incubadas em meio DMEM durante 4 e 24 h, sob condições descritas acima. Assim, as culturas receberam 25 μL de MTT em salina (5 mg/mL) e foram incubadas por um período de 2 h. As placas foram centrifugadas a 1500 rpm, durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. O formazan foi diluído após a adição de 200 μL de HCl 0,1 N em isopropanol. A absorbância foi determinada através de leitura a 570 nm, em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O percentual de citotoxicidade das

moléculas avaliadas foi determinado em relação ao metabolismo do MTT pelas culturas de células em meio DMEM.

5.4 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) *IN VITRO*

Macrófagos imortalizados da linhagem J774 (10^5 células/poço) foram incubados em placas de 96 poços, em triplicatas e estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma) e interferon- γ (5 ng/mL , PharMingem, S. Diego, CA) além de tratados ou não com diversas concentrações das substâncias avaliadas e descritas na Tabela 2. As células foram mantidas em estufa a 37° C e 5% CO_2 , durante 24 h. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a determinação indireta da concentração de NO, através da adição do reagente de Griess e posterior leitura a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190), conforme descrito na literatura (DING *et al.*, 1988).

5.5 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

Esplenócitos de camundongos BALB/c (4×10^5 células/poço, em 200 μL) foram cultivados em meio DMEM e em placa de 96 poços, em triplicatas, na presença ou não de concanavalina A (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e também em presença ou ausência das substâncias analisadas. Após 48 h de incubação em estufa a 37° C e 5 % de CO_2 , foi adicionado às culturas 1 μCi de [metil- ^3H] timidina dando início a um novo período de 12 h de incubação em estufa. Após esse período, as células foram coletadas para quantificação da proliferação, através da determinação da incorporação de timidina, conforme já descrito acima. O percentual de inibição foi

determinado relacionando a incorporação de timidina das culturas tratadas com as substâncias avaliadas e a incorporação das culturas somente estimuladas.

5.6 REAÇÃO MISTA LINFOCITÁRIA

Camundongos da linhagem BALB/c (H-2^d) foram imunizados semanalmente com uma suspensão em salina de esplenócitos de animais da linhagem C57BL/6 (H-2^b), via intraperitoneal (10^7 células/camundongo). Após quatro semanas de imunização, os camundongos foram eutanasiados para a retirada do baço e obtenção dos esplenócitos. Estas células foram cultivadas em placa de 96 poços (5×10^5 células/poço), em triplicatas, utilizando meio DMEM suplementado conforme descrito acima, em presença ou não de esplenócitos irradiados (dose de 3000 rads, fonte irradiadora ¹³⁵Cs, CisBio International, França) de animais C57BL/6 (10^6 células/poço) e em presença ou ausência das substâncias avaliadas. Após 72 h em incubadora a 37° C e 5% de CO₂, foi adicionado às culturas 1 µCi de [metil-³H] timidina e estas foram novamente incubadas por um período de 12 h. Após esse período as células foram coletadas para determinação da proliferação, através da quantificação da timidina incorporada, conforme descrito acima. Os valores percentuais foram calculados relacionando a incorporação de timidina das culturas contendo as drogas avaliadas e os valores das culturas contendo somente as células das duas linhagens murinas.

5.7 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA

Animais machos da linhagem BALB/c, C57BL/6 e C57BL/6 IL-10^{-/-}, pesando entre 12-16 g foram tratados, via intraperitoneal, com as substâncias avaliadas em suas respectivas doses. Após 1,5 h foram desafiados com LPS (lipopolissacarídeo, 600 µg/animal, *Escherichia coli*

sorotipo 0111:B4, Sigma), também via intraperitoneal, e mantidos em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) além de renovação contínua do ar. Os animais permaneceram em ciclos de 12 h em claro/12 h em escuro (18 - 06 h), com dieta para roedores e água *ad libitum*. A sobrevivência foi avaliada até 96 h. Após 1,5 h, quando necessária a dosagem de citocinas, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) em salina, para coleta de sangue, processamento do material e obtenção do soro para a realização da dosagem através de ELISA..

5.8 DOSAGEM DE TNF- α EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS

Macrófagos imortalizados da linhagem J774 (10^5 células/poço) foram incubados em placas de 96 poços, em meio DMEM, em triplicatas e estimulados ou não com lipopolissacarídeo (LPS, 500 ng/mL, *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma) além de tratados ou não com as substâncias avaliadas. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 , durante 4 h. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados para dosagem da citocina, através de ELISA.

5.9 DOSAGEM DE TNF- α EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS RESIDENTES

Animais machos da linhagem BALB/c foram tratados via intraperitoneal com ácido betulínico (67 mg/kg), benzopirona, hidroxycumarina (71,4 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou salina e após duas horas foram eutanasiados para coleta de macrófagos residentes através de lavagem peritoneal. As células obtidas foram incubadas (10^5 células/poço), em meio DMEM e em placa de 96 poços. As culturas foram mantidas durante 4 h em estufa a

37°C e 5% CO₂ e estimuladas ou não com LPS (500 ng/mL, *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4, Sigma). O sobrenadante foi coletado para a dosagem da citocina, através de ELISA.

5.10 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

As citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram dosadas a partir de amostras de soro ou sobrenadantes de culturas de macrófagos através do método ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), usando o kit DuoSet da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), seguido da adição do conjugado streptavidina-peroxidase. A reação foi continuada usando o substrato da peroxidase, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma), e a absorvância registrada em espectrofotômetro (Spectra Max 190), a 450nm, de acordo com instruções do fabricante.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi feita usando o teste Logrank, que avalia a curva de sobrevivência, e os demais parâmetros foram analisados usando o one-way ANOVA com pós-teste Newman-Keuls, usando a versão 4.0 do Graph Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi <0,05.

6 RESULTADOS

6.1 TRIAGEM DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL AÇÃO IMUNOMODULADORA

Inicialmente foi realizada a triagem de 215 moléculas de uma biblioteca de extratos e substâncias puras de origem vegetal e sintéticas disponível no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI/CPqGM/FIOCRUZ), quanto à atividade biológica em ensaios *in vitro*. Estas moléculas tiveram sua citotoxicidade previamente estudada e posteriormente foram avaliadas quanto ao seu potencial imunomodulador sobre macrófagos estimulados (LPS e IFN- γ), avaliando-se a produção de óxido nítrico (NO), e também em culturas de linfócitos, avaliando-se a proliferação celular após estimulação pela concanavalina A (Con A) ou em ensaio de reação mista linfocitária.

A figura 4 representa os dados percentuais de inibição da produção de NO por macrófagos ativados tratados com as moléculas avaliadas, em suas respectivas faixas de atividade. Assim, para esse parâmetro, 145 moléculas (68 % das testadas) apresentaram atividade entre 0-50, 9 %, 33 moléculas (15 % das testadas) apresentaram atividade entre 51-69 % e 37 moléculas (17 %) apresentaram entre 70-100 % de inibição da produção de NO.

Figura 4

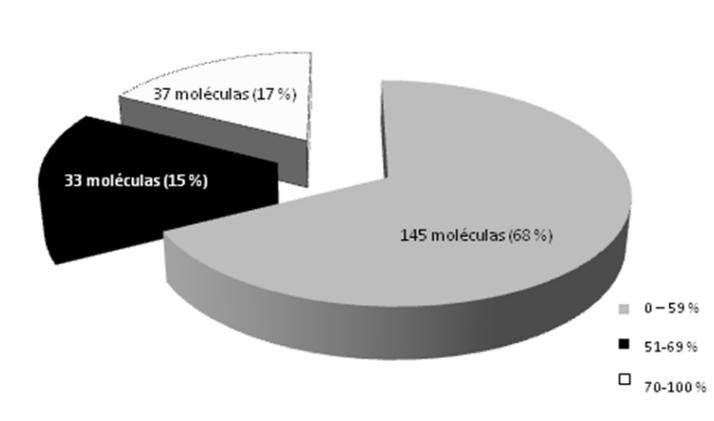


Figura 4. Atividade inibitória das moléculas testadas na produção de NO por macrófagos ativados. As moléculas foram testadas em macrófagos da linhagem J774, em triplicatas e em três concentrações (1, 10 e 100 µg/mL) para observação da atividade inibitória sobre a produção de NO.

A figura 5 ilustra os resultados de inibição da proliferação de linfócitos ativados por concanavalina A, apresentados pelas moléculas avaliadas, em suas respectivas faixas de atividade. Assim, quanto a esse parâmetro, 74 moléculas (34 % das testadas) apresentaram inibição entre 0-50,9 %, 30 moléculas (14 % das testadas) apresentaram atividade entre 51-69 % e 111 moléculas (52 %) apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação entre 70-100 %. Já a figura 6 apresenta as substâncias avaliadas e que apresentaram atividade imunossupressora sobre macrófagos e linfócitos. Dessa maneira, a observação da figura permite concluir que das 215 moléculas testadas, 187 substâncias foram ativas sobre macrófagos ou linfócitos ou ainda não apresentaram atividade sobre estas células. Ainda, 28 moléculas (equivalente a 13 %) apresentaram atividade imunossupressora ($\geq 70\%$) sobre macrófagos e linfócitos.

Figura 5

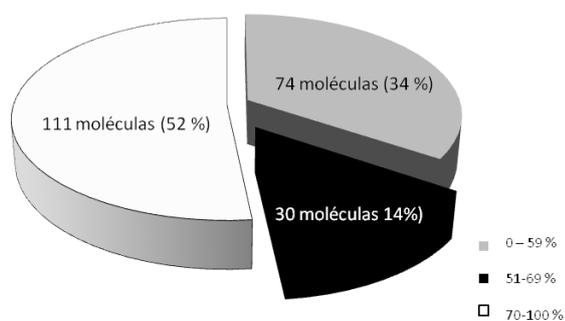


Figura 5. Atividade inibitória das moléculas testadas em ensaio de linfoproliferação. As moléculas foram testadas quanto ao seu potencial de inibição da proliferação de linfócitos ativados pela concanavalina A, em três concentrações (1, 10 e 100 µg/mL) e em triplicatas.

Figura 6

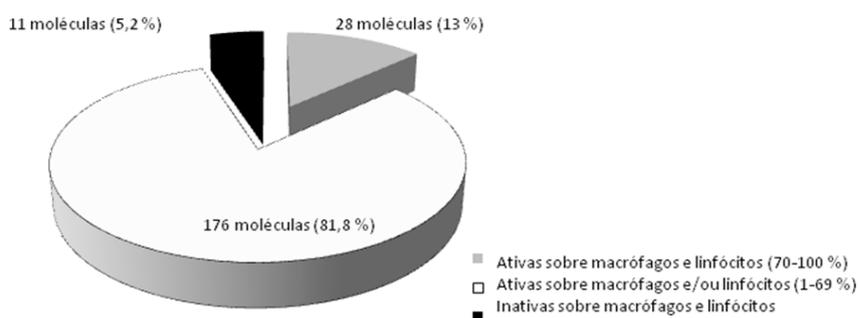


Figura 6. Substâncias avaliadas com atividade imunossupressora sobre macrófagos e linfócitos. Foram selecionadas as moléculas que apresentaram elevada atividade imunossupressora sobre a produção de NO e proliferação de linfócitos ativados. Dentre moléculas testadas (215), 187 substâncias foram ativas para um dos parâmetros ou nenhum destes (atividade < 70 %) e 28 moléculas (13 %) apresentaram atividade imunossupressora (≥ 70 %) sobre macrófagos e linfócitos.

Das 215 moléculas testadas em experimentos *in vitro*, 10 foram selecionadas com base nos resultados apresentados e também nas quantidades disponíveis no laboratório para estudos *in vivo*, em modelo de endotoxemia, avaliando a sobrevivência e o perfil de produção de citocinas em camundongos. Dessas 10 moléculas selecionadas para estudos *in vivo*, 2 pertencem à classe das cumarinas, 2 pertencem à classe dos terpenos e 6 às quinonas (Tabela 2).

6.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA *IN VITRO*

Após a triagem inicial, 10 moléculas foram selecionadas para estudos *in vivo* no modelo de endotoxemia. A tabela 2 apresenta as atividades biológicas *in vitro* das 10 moléculas selecionadas e suas estruturas químicas.

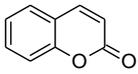
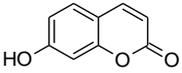
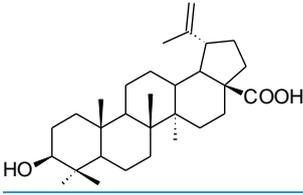
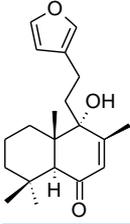
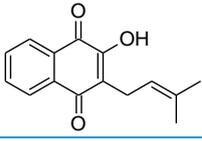
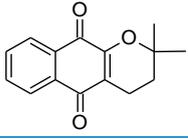
Da classe das cumarinas, a benzopirona e a hidroxycumarina foram testadas *in vitro* na concentração de 100 µg/mL, não apresentando citotoxicidade. A benzopirona não inibiu significativamente a produção de NO, porém inibiu a proliferação de linfócitos ativados por Con A em 60,3 % e em 98,1 % a reação mista linfocitária (RML). Já a hidroxycumarina apresentou uma inibição da produção de NO de 32,3 % e 81,5 % de atividade inibidora da linfoproliferação estimulada por Con A (Tabela 2).

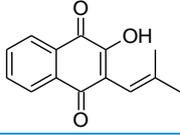
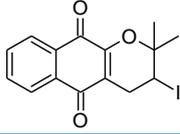
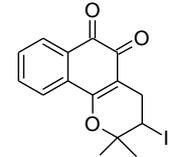
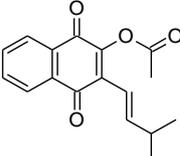
O ácido betulínico, uma molécula da classe dos terpenos, foi avaliado na concentração de 3,7 µg/mL, apresentando um percentual de inibição de NO de 16,5 % e também baixa inibição da proliferação de linfócitos ativados pela Con A (22,5 %). Também da classe dos terpenos, a solidagenona, molécula classificada como diterpeno labdano, foi testada a 11,1 µg/mL, não apresentando atividade expressiva quanto à inibição da produção de NO, mas uma inibição de 61,8 % da linfoproliferação. Nesta concentração, a solidagenona não inibiu a produção de NO e inibiu em 61,8 % a proliferação de linfócitos estimulados pela Con A (Tabela 2). Além disso, a solidagenona inibiu em 98,1 % a RML.

O lapachol, molécula da classe das quinonas, e mais 5 derivados sintéticos foram avaliados nos ensaios *in vitro*. O lapachol foi avaliado a uma concentração de 33,3 µg/mL (atóxica), sem inibição da produção de NO e 93,6 % de inibição da linfoproliferação. Em ensaio de RML, essa molécula inibiu 98,2 %. A á-lapachona foi avaliada a 11,1 µg/mL e nessa

concentração não apresentou citotoxicidade, 65,2 % de inibição da produção de NO, 98,1 % de inibição da linfoproliferação e 97,4 % de inibição da RML. A α -lapachona ensaiada a 1,2 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou citotoxicidade, não inibiu a linfoproliferação e inibiu a produção de NO em 17,5 %. A molécula inibiu a RML em 45,3 %. O resultado dos ensaios com a substância nor-lapachol, atóxica a 33,3 $\mu\text{g/mL}$, foram de 32,1, 89,1 e 97,9 %, para a inibição da produção de NO, da inibição da linfoproliferação e da inibição da RML. Outras duas drogas derivadas do lapachol foram analisadas, sendo uma delas a α -iodo-lapachona e a β -iodo-lapachona. Essas moléculas foram ensaiadas a 3,7 e 11,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo que a primeira apresentou 6,3 % de citotoxicidade e a segunda, 17,8 %, nestas concentrações. A inibição da produção de NO pela α -iodo-lapachona foi 42,4 %, enquanto que a da β -iodo-lapachona foi 68,7 %. A proliferação de linfócitos ativados por Con A foi inibida em 79,0 % pela α -iodo-lapachona. Já a RML foi inibida pela α -iodo-lapachona em 97,3 % e em 77,2 % pela β -iodo-lapachona. O isolapachol acetilado foi uma das sete moléculas derivadas do lapachol avaliadas nesse trabalho e foi ensaiada a 10 $\mu\text{g/mL}$. Apresentou 20,6 % de citotoxicidade, inibiu a produção de óxido nítrico em 67,9 % e também inibiu em 78,1 % a proliferação de linfócitos ativados.

Tabela 2. Estrutura e atividades biológicas das moléculas selecionadas

Molécula	Estrutura	[$\mu\text{g/mL}$]	Citotoxicidade (%)	Produção NO (% inibição)	Linfoproliferação (% inibição)
Benzopirona		100	NA	23,2 \pm 7,3	60,3 \pm 3,6
Hidroxicumarina		100	NA	32,3 \pm 3,0	81,5 \pm 2,3
Ácido betulínico		3,7	16,5 \pm 2,2	20,7 \pm 1,4	22,5 \pm 9,5
Solidagenona		11,1	NA	0,7 \pm 0,4	61,8 \pm 8,2
Lapachol		33,3	NA	NA	93,6 \pm 0,7
á-Lapachona		11,1	NA	65,2 \pm 1,1	98,1 \pm 0,4

Nor-lapachol		33,3	NA	32,1±15,5	89,1±12,2
â-Iodo-lapachona		3,7	6,3±0,6	42,4±4,4	79,0±1,0
â-Iodo-lapachona		11,1	17,8±14,0	68,7±0,4	NA
Isolapachol acetilado		10	20,6±0,2	67,9±2,0	78,1±0,4

NA = não apresenta (na concentração testada).

6.3 ENSAIOS *IN VIVO* EM MODELO DE ENDOTOXEMIA

As 10 moléculas listadas na tabela 2 foram avaliadas *in vivo* no modelo de endotoxemia. Estas moléculas foram selecionadas por apresentarem uma ou mais atividades nos experimentos *in vitro* e pela quantidade disponível para testes *in vivo* no laboratório. Camundongos da linhagem BALB/c foram submetidos a tratamento prévio com cada substância e desafiados com uma injeção intraperitoneal de LPS em dose letal (DL₉₀₋₁₀₀). A mortalidade foi observada por um período de quatro dias pós-desafio. A dexametasona, um glicocorticoide sintético, foi utilizada como droga padrão. A administração de dexametasona protegeu em 83 % em relação ao grupo tratado com salina.

Figura 7

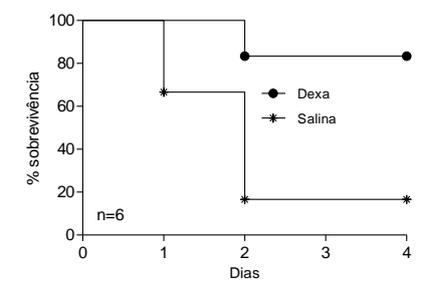


Figura 7. Avaliação da atividade *in vivo* da dexametasona em modelo de endotoxemia. Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 12-16 g, foram tratados com a dexametasona (0,5 mg/kg), administrada via intraperitoneal. Após 1,5 h os camundongos foram desafiados com uma dose de 600 µg/mL de LPS (DL₉₀₋₁₀₀), também por via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi observada por quatro dias. A análise estatística feita usando o teste Log-rank (Mantel-Cox) demonstra que a curva é significativamente diferente ($p < 0,05$).

O lapachol e mais cinco moléculas derivadas sintéticas foram avaliados nesse modelo de endotoxemia. O tratamento com 67 mg/kg de lapachol resultou em 70 % de proteção ($p < 0,05$) ao final do tempo observado, sendo que os três óbitos do grupo ocorreram no segundo dia após o desafio com o LPS (Figura 8A). Já os tratamentos com o isolacet, com a á-lapachona e com a á-3-I-lapachona na dose de 67 mg/kg (Figura 8B, C e E) não tiveram atividade protetora no modelo avaliado, em relação ao grupo tratado com salina e submetido à endotoxemia. Já o nor-lapachol (Figura 8 D), testado em duas concentrações, demonstrou atividade protetora na dose de 67 mg/kg (67 % de redução de mortalidade). Na dose de 33 mg/kg, a administração de nor-lapachol protegeu 50 % dos animais do grupo tratado em relação ao grupo controle com salina. A administração de â-lapachona (Figura 8F) na dose de 67 mg/kg protegeu 50 % dos animais ($p > 0,05$) do grupo tratado em relação aos controles.

Figura 8

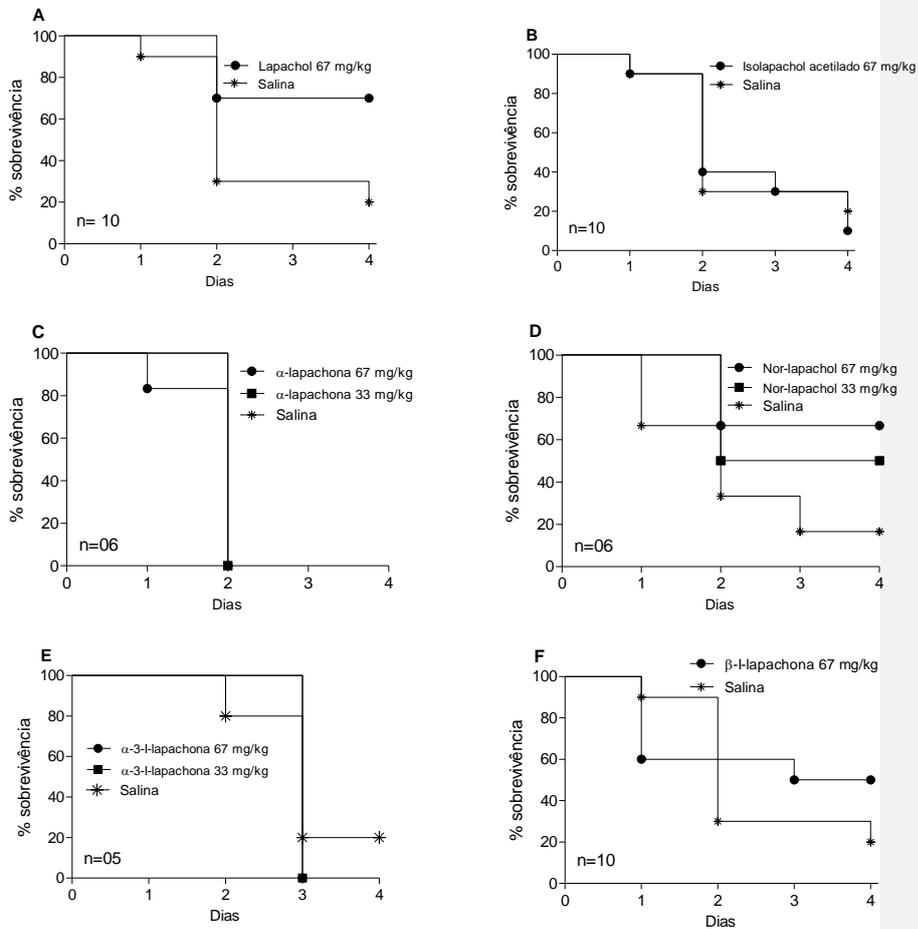


Figura 8. Avaliação da atividade *in vivo* do lapachol e derivados sintéticos em modelo de endotoxemia.

Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 12-16 g, foram tratados com o lapachol ou com os derivados sintéticos, administrados via intraperitoneal. Após 1,5 h, os camundongos foram desafiados com uma dose de 600 μ g/mL de LPS (DL₉₀₋₁₀₀), também por via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi observada por quatro dias. A análise estatística feita usando o teste Log-rank (Mantel-Cox) demonstra que curva (em A) foi significativamente diferente ($p < 0,05$).

A solidagenona foi outra molécula também avaliada em modelo de endotoxemia, em uma dose de 71,4 mg/kg, mostrando ao final dos quatro dias observados, uma proteção de 67 % dos animais do grupo. Metade desta dose (35,7 mg/kg) não produziu proteção, uma vez que o número de animais sobreviventes (17 %) foi menor do que os animais tratados com salina (33 %) e submetidos ao desafio (Figura 9).

Figura 9

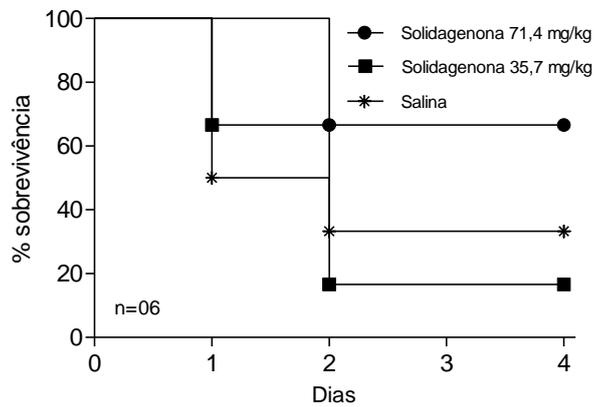


Figura 9. Avaliação da atividade *in vivo* da solidagenona em modelo de endotoxemia. Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 12-16 g, foram tratados com a solidagenona, administrada via intraperitoneal. Após 1,5 h, os camundongos foram desafiados com uma dose de 600 µg/mL de LPS (DL₉₀₋₁₀₀), também por via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi observada por quatro dias. A análise estatística feita usando o teste Log-rank (Mantel-Cox) não mostra curvas significativamente diferentes ($p > 0,05$).

A administração de benzopirona protegeu os animais na dose de 71,4 mg/kg em 70 %, enquanto que a dose de 35,7 mg/kg protegeu apenas 30 % dos animais (Figura 10A). A hidroxycumarina foi avaliada no modelo *in vivo* e não mostrou atividade protetora dos animais (Figura 10B).

Figura 10

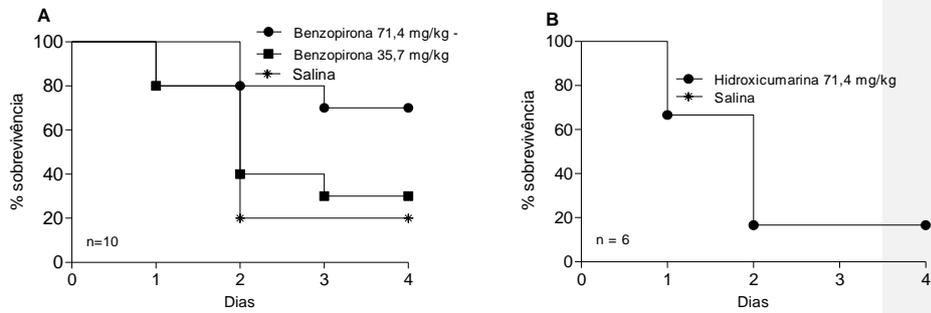


Figura 10. Avaliação da atividade *in vivo* da benzopirona e hidroxicumarina em modelo de endotoxemia.

Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 12-16 g, foram tratados com a benzopirona (A) e hidroxicumarina (B), administrada via intraperitoneal. Após 1,5 h os camundongos foram desafiados com uma dose de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (DL90-100), também por via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi observada por quatro dias. A análise estatística feita usando o teste Log-rank (Mantel-Cox) não mostra curvas significativamente diferentes.

O ácido betulínico foi também analisado no modelo experimental de endotoxemia em duas doses (67 e 33 mg/kg), sendo que na maior delas, apresentou 100 % de proteção aos animais desafiados com LPS. A dose de 33 mg/kg não protegeu os animais do óbito, tendo sido os valores de mortalidade iguais aos do grupo de animais tratados com salina, ao final dos quatro dias observados.

Figura 11

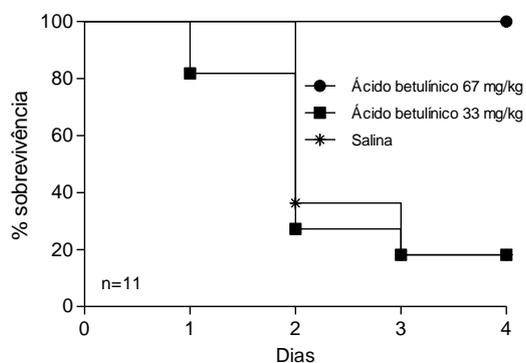


Figura 11. Avaliação da atividade *in vivo* do ácido betulínico no modelo de endotoxemia. Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 12-16 g, foram tratados com o ácido betulínico por via intraperitoneal. Após 1,5 h, os camundongos foram desafiados com uma dose de 600 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (DL₉₀₋₁₀₀), também por via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais foi observada durante quatro dias. A análise estatística feita usando o teste Log-rank (Mantel-Cox) mostra curvas significativamente diferentes na dose de 67 mg/kg em relação ao grupo salina ($p<0,05$).

6.4 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA BENZOPIRONA E DO ÁCIDO BETULÍNICO

Dentre as moléculas que tiveram atividade significativa *in vivo* no modelo de endotoxemia, selecionamos a benzopirona e o ácido betulínico para estudos de avaliação dos seus mecanismos de ação.

6.4.1 Benzopirona

Para analisar o possível mecanismo de ação da benzopirona, investigamos os efeitos do tratamento com esta droga na produção de citocinas estimuladas pela administração de LPS. O tratamento com a benzopirona (BZP) inibiu a produção de TNF- α , conforme pode ser observado na figura 12A. Nas três doses de BZP testadas, houve uma redução significativa

dos níveis de TNF- α em relação ao grupo tratado com salina, embora os níveis desta citocina nos soros de animais tratados com BZP tenham sido significativamente mais elevados do que os do grupo controle não tratado com LPS. A BZP na dose de 71,4 mg/kg teve um efeito inibitório na produção de TNF- α semelhante ao da dexametasona na dose de 0,5 mg/kg (Figura 12B).

Figura 12

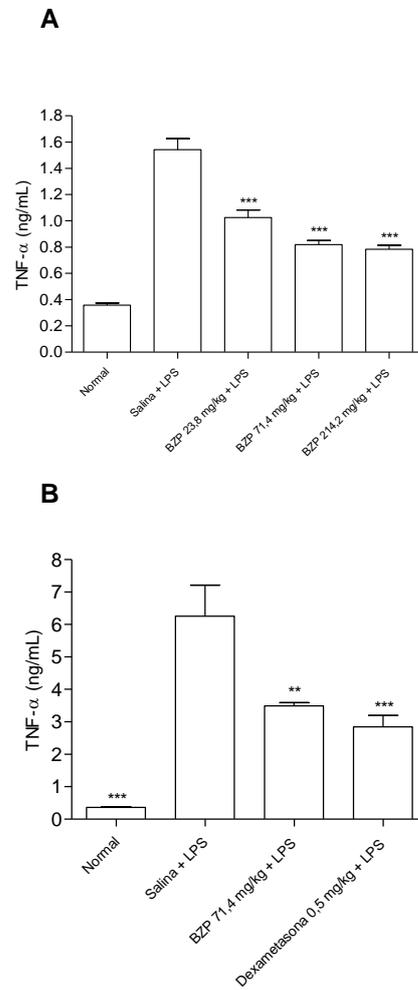


Figura 12. Dosagem de TNF- α no soro de camundongos tratados com benzopirona e submetidos à endotoxemia. Camundongos machos da linhagem BALB/c foram tratados com benzopirona em três doses, dexametasona (0.5 mg/kg) ou salina, por via intraperitoneal, e desafiados com LPS (600 μ g/animal) 90 minutos depois, pela mesma via. Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos eutanasiados 90 minutos depois para coleta do sangue e dosagem de TNF- α no soro, por ELISA. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

Outras duas citocinas dosadas no soro de animais foram a IL-10 e a IL-6 (Figura 13). A administração de BZP eleva a produção de IL-10 em animais desafiados com o LPS de modo dose-dependente. Os níveis de IL-10 no soro de animais desafiados com LPS e tratados com a dose de 71,4 mg/kg foram significativamente mais altos do que os dos animais tratados com dexametasona ou benzopirona a 35,7 mg/kg e normais (Figura 13A). Os níveis de IL-6 em animais tratados com BZP em ambas as doses (35,7 e 71,4 mg/kg) foram significativamente mais elevados, quando comparados com animais tratados com salina ou com dexametasona. O soro de animais normais não apresentou níveis detectáveis desta citocina. O tratamento com dexametasona produziu uma pequena redução nos níveis de IL-6 quando comparados ao grupo tratado com salina (Figura 13B).

Figura 13

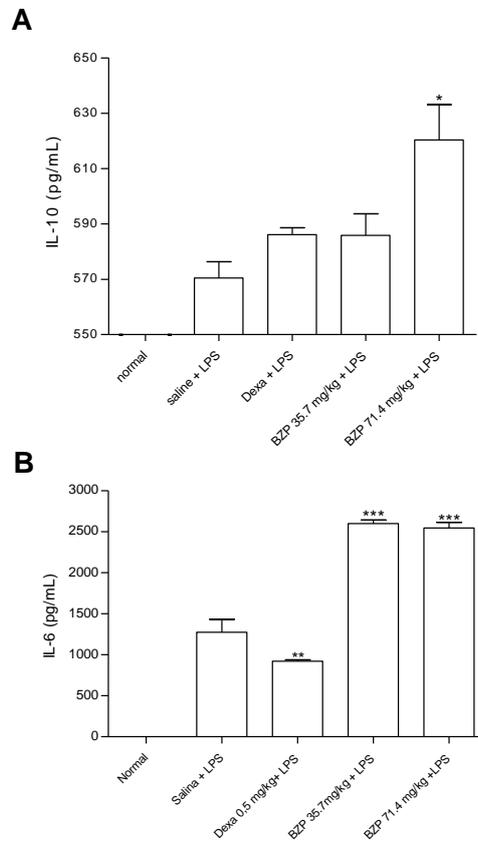


Figura 13. Dosagem de IL-10 e IL-6 no soro de camundongos tratados com benzopirona e submetidos à endotoxemia. Camundongos machos da linhagem BALB/c foram tratados com benzopirona (35,7 e 71,4 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou salina, por via intraperitoneal, e desafiados com LPS (600 µg/animal) 90 minutos depois, pela mesma via. Os animais foram anestesiados e eutanasiados 90 minutos depois para coleta do sangue para a dosagem de IL-10 (A) e IL-6 (B) no soro, por ELISA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

Por ser o macrófago a principal fonte de produção de TNF- α na endotoxemia, investigamos os efeitos do tratamento com BZP e com a hidroxycumarina (OHC), que é o principal metabólito da BZP, na produção de TNF- α *in vitro* por macrófagos ativados. Culturas de

macrófagos imortalizados da linhagem J774 foram estimuladas ou não por LPS e tratadas com BZP e OHC

Na figura 14 pode-se observar que a BZP, nas duas concentrações testadas, não inibiu a produção TNF- α . A adição de OHC nas culturas de macrófagos ativadas também não inibiu a produção desta citocina, enquanto que a dexametasona inibiu em 65 % a produção de TNF- α (Figura 14). Nas duas concentrações ensaiadas, a BZP e a OHC foram atóxicas, em experimento usando o metabolismo do MTT, com células da linhagem J774.

Figura 14

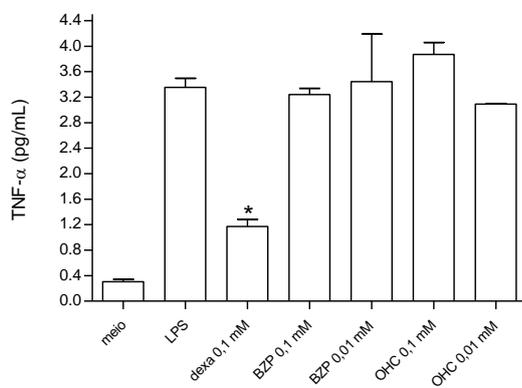


Figura 14. Produção de TNF- α em culturas de macrófagos ativados. Macrófagos da linhagem J774 foram estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) e incubados na presença ou ausência de dexametasona, benzopirona e hidroxycumarina, durante 4 h. Os sobrenadantes foram então coletados e os níveis de TNF- α foram então determinados pelo método de ELISA. A análise estatística foi feita usando ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. * $p < 0,05$.

Para investigar um possível efeito de metabólitos dessas moléculas nos macrófagos, foi avaliada a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais residentes coletados de animais previamente tratados com BZP e OHC, após estimulação com LPS in vitro. A figura 15 apresenta os resultados desta análise. Pode-se observar que macrófagos residentes de animais tratados com a droga padrão (dexametasona) e com a BZP (na dose de 71,4 mg/kg, protetora

contra a endotoxemia) produziram níveis de TNF- α significativamente menores do que os do controle não-tratados. O tratamento *in vivo* com a OHC também causou uma redução na produção de TNF- α , porém não tão acentuada quanto a BZP. Os níveis de TNF- α nas culturas não-estimuladas com LPS demonstram ainda uma pequena redução em relação aos macrófagos peritoneais obtidos de animais controle (injeção contendo salina) em relação aos tratados com as drogas (Figura 15).

Figura 15

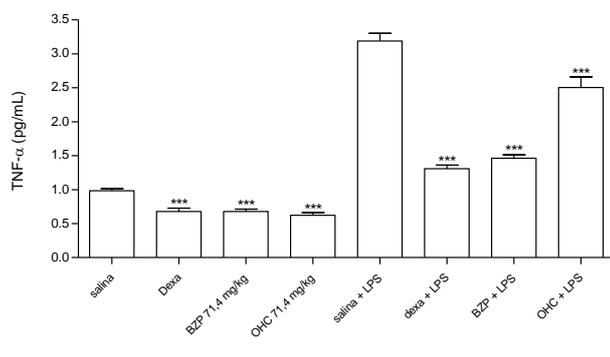


Figura 15. Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos residentes coletados de camundongos após tratamento *in vivo*. Animais da linhagem BALB/c foram tratados com salina, dexametasona (0,5 mg/kg), benzopirona (BZP, 71,4 mg/kg) ou hidroxicumarina (OHC, 71,4 mg/kg) e após duas horas foram eutanasiados para coleta de macrófagos residentes através de lavagem peritoneal. As células foram incubadas durante 4 h e estimuladas ou não com LPS (500 ng/mL). Os sobrenadantes foram então coletados e os níveis de TNF- α determinados pelo método ELISA. A análise estatística foi feita usando ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$.

6.4.2 Ácido betulínico

O ácido betulínico (AB) foi a molécula testada que apresentou maior proteção (100 %) em modelo de endotoxemia, conforme já relatado anteriormente (Figura 11). Assim, para avaliar o possível mecanismo de ação dessa substância, algumas citocinas foram dosadas no soro de

animais tratados com o AB e submetidos à endotoxemia e em sobrenadante de cultura de macrófagos (estimuladas ou não com o LPS).

A análise da produção de TNF- α , IL-10 e IL-6 no soro de animais tratados está apresentada na figura 16. Como era esperado, o desafio com LPS eleva os níveis de TNF- α . A produção desta citocina em animais tratados com AB e desafiados com LPS foi significativamente reduzida quando comparada com a de animais desafiados com LPS tratados com salina. Os níveis de TNF- α no soro de animais desafiados com LPS e tratados com dexametasona também foram reduzidos significativamente (Figura 16A). Na figura 16B pode-se verificar que os níveis séricos de IL-10 são elevados após o tratamento com LPS, mas não se alteram com o tratamento com dexametasona. Já o tratamento com o AB estimula uma produção de IL-10 significativamente maior do que a dos animais tratados com salina ou dexametasona e desafiados com LPS. Os níveis de IL-6 podem ser observados na figura 16C, na qual pode-se visualizar que os valores médios da citocina são próximos entre os grupos tratados com salina, dexametasona ($p < 0,05$, em relação ao grupo tratado com salina) ou AB e desafiados com LPS. Esta citocina não foi detectada no soro de animais normais.

Figura 16

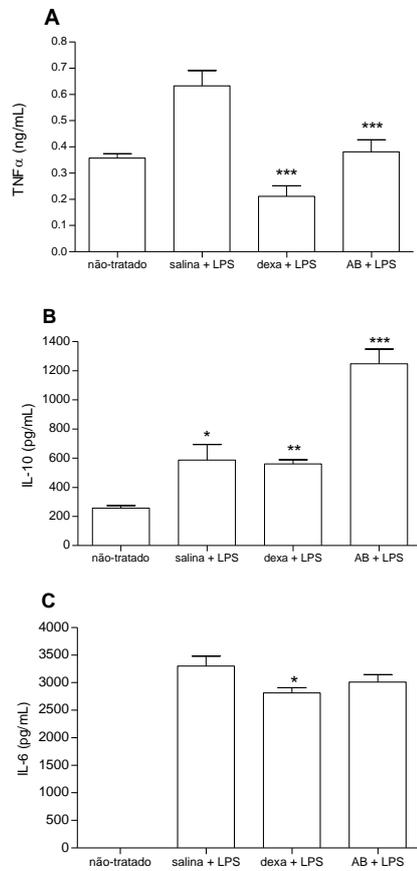


Figura 16. Dosagem de TNF- α , IL-10 e IL-6 no soro de camundongos submetidos à endotoxemia. Camundongos da linhagem BALB/c foram tratados com ácido betulínico (AB, 67 mg/kg), dexametasona (Dexa, 0,5 mg/kg) ou salina, por via intraperitoneal. Após 90 minutos, os animais foram desafiados com LPS (600 μ g/animal) pela mesma via. Após um novo intervalo de 90 minutos, os animais foram anestesiados e o sangue coletado e processado para a dosagem das citocinas pela técnica de ELISA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. A análise estatística foi feita usando ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Para avaliar o papel da IL-10 na proteção induzida pelo AB, utilizou-se animais da linhagem C57BL/6 selvagens (IL-10^{+/+}) e deficientes para a produção desta citocina (IL-10^{-/-}). Camundongos de ambas as linhagens foram submetidos ou não a tratamento com o AB e desafiados com LPS. Os resultados da análise de sobrevivência podem ser observados na

figura 17. Animais IL-10^{-/-}, tratados ou não com o AB, tiveram elevada taxa de mortalidade, (16 e 8 %, respectivamente). Já os animais IL-10^{+/+} tratados com o AB e desafiados com o LPS apresentaram 83 % de sobrevivência enquanto os não tratados com a droga apresentaram um percentual de sobrevivência bastante reduzido (33 %) após o desafio com LPS.

Figura 17

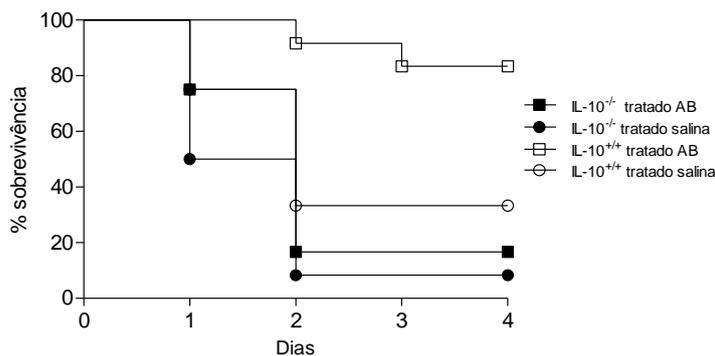


Figura 17. Sobrevivência de animais C57BL/6 IL-10^{-/-} e IL-10^{+/+} tratados ou não com ácido betulínico e desafiados com LPS. Animais machos da linhagem C57BL/6 IL-10^{+/+} e IL-10^{-/-} foram tratados ou não com ácido betulínico (AB, 66,7 mg/kg) e após 90 minutos receberam administração de uma dose de 600 µg de LPS. Ambas as substâncias foram administradas via intraperitoneal. A sobrevivência dos animais (n=11) foi observada durante 4 dias. Diferenças entre as curvas de sobrevivência dos camundongos IL-10^{+/+} tratados com AB e demais foram estatisticamente significativas (teste Logrank, p<0.05).

A avaliação da atividade *in vitro* sobre a produção de TNF- α usando macrófagos da linhagem J774 mostra que, nas duas concentrações da droga avaliadas (10 e 1 µM), não houve inibição de TNF- α em relação ao controle estimulado com LPS (Figura 18), ao contrário da dexametasona. A citotoxicidade nas concentrações testadas foi 14,7% (10 µM) e 4,8 % (1 µM).

Figura 18

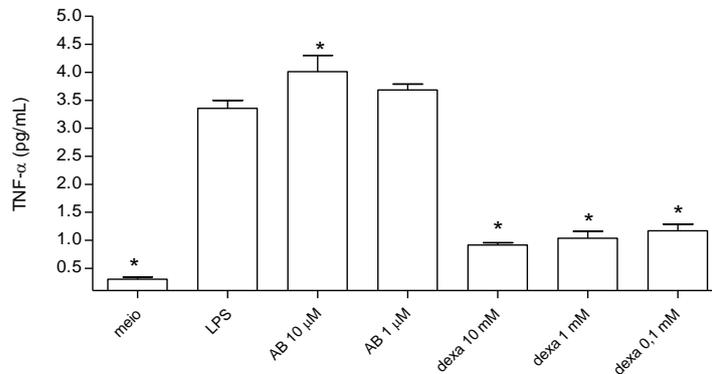


Figura 18. Produção de TNF- α em culturas de macrófagos ativadas com LPS em presença do ácido betulínico. Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados, estimulados ou não com LPS (500 ng/mL) e incubados na presença ou ausência de dexametasona e ácido betulínico, durante 4 h. Os sobrenadantes foram então coletados e os níveis de TNF- α determinados pelo método de ELISA. A análise estatística foi feita usando o teste ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. * $p < 0,05$.

Para avaliar se um possível metabólito do AB exerce efeitos sobre os macrófagos, foram dosados os níveis de TNF- α por macrófagos peritoneais residentes de animais previamente tratados com a droga. Na figura 19 pode-se observar que os macrófagos não estimulados coletados de animais tratados com dexametasona e AB (67 mg/kg) apresentam uma pequena redução nos níveis basais de TNF- α em relação aos controles tratados com salina. Já os valores de TNF- α por macrófagos peritoneais residentes de camundongos previamente tratados com dexametasona ou AB foram significativamente reduzidos após a estimulação por LPS em comparação com os de animais tratados com salina (Figura 19).

Figura 19

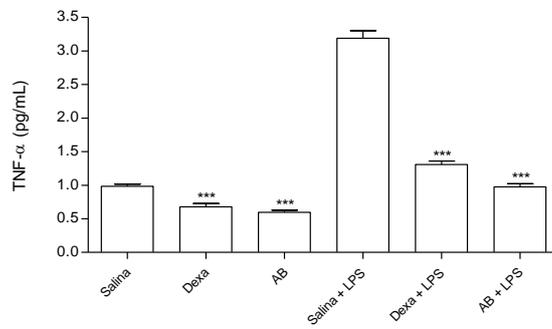


Figura 19. Dosagem de TNF- α no sobrenadante de macrófagos residentes coletados de camundongos após tratamento *in vivo*. Animais da linhagem BALB/c foram tratados com salina, dexametasona (Dexa, 0,5 mg/kg) ou ácido betulínico (AB, 67 mg/kg) e após duas horas foram eutanasiados para coleta de macrófagos residentes através de lavagem peritoneal. As células foram incubadas durante 4 h e estimuladas ou não com LPS (500 ng/mL). Os sobrenadantes foram então coletados e os níveis de TNF- α determinados pelo método de ELISA. A análise estatística foi feita usando o teste ANOVA seguida do teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada a avaliação da atividade imunomoduladora de uma biblioteca de substâncias isoladas principalmente de vegetais da região do semi-árido brasileiro e moléculas derivadas de algumas destas, obtidas por síntese química. A avaliação realizada da atividade farmacológica de entidades químicas obtidas de vegetais de uma região ainda muito pouco explorada sob este aspecto indica um elevado potencial farmacológico de moléculas isoladas de vegetais desse bioma em relação os parâmetros analisados.

Das 215 moléculas que tiveram suas atividades avaliadas, foram selecionadas 10 para análise em modelo de endotoxemia. Outras moléculas, também promissoras em ensaios *in vitro* não foram analisadas *in vivo* pelo fato de não se dispor das mesmas em quantidades suficientes para tais experimentos. Com isso, as 10 moléculas com resultados apresentados neste trabalho não são as únicas que figuram entre aquelas com resultados promissores em imunossupressão. Trinta e sete (17%) moléculas que apresentaram elevado percentual de inibição da produção de NO, enquanto que o número de moléculas com atividade inibidora da proliferação de linfócitos ativados é bastante superior, alcançando o valor de 52 % de estruturas analisadas com atividade entre 70-100 % de inibição. Vinte e oito moléculas (13 %) apresentaram elevado percentual de atividade sobre macrófagos e linfócitos enquanto onze (5,2 %) não tiveram nenhuma atividade sobre estas células, nos modelos avaliados.

As classes químicas às quais pertencem as substâncias avaliadas em modelos *in vivo*, neste trabalho, apresentam diversos relatos na literatura científica de atividades biológicas apresentadas por moléculas a elas pertencentes (GONZÁLES-COLOMA, 2010) tais como atividade anti-HIV e quimioprotetora contra carcinogênese para as quinonas (FALKENBERG, 2007), atividade vasodilatadora coronariana, anticoagulante e broncodilatadora para as cumarinas (KUSTER, 2007) e ainda atividade anti-mitótica, anti-Plasmodium e inibidora da topoisomerase (REDDY, 2009).

O modelo de endotoxemia, apesar de não reproduzir todas as características fisiopatológicas da sepse em humanos, permite o estudo da biologia básica da doença, utilizando animais (camundongos) de fácil manipulação. Assim, parâmetros imunológicos podem ser analisados a partir desse modelo, como a dosagem de citocinas, e a taxa sobrevivência dos animais pode ser avaliada. Este modelo permite ainda a utilização de linhagens de camundongos transgênicos para a investigação de mecanismos de ação das moléculas estudadas, como, por exemplo, os animais IL-10^{-/-} aqui utilizados.

Produtos naturais têm sido amplamente estudados quanto às potenciais atividades biológicas e muitos deles tem se mostrado ativos em modelos experimentais de endotoxemia induzida por LPS. Diversas moléculas isoladas de vegetais e estudadas nesse modelo têm suas atividades relatadas como é o caso das fisalinas B, F e G, substâncias da classe dos seco-esteróides, produzidas pela espécie *Physalis angulata*, e que apresentam elevado potencial imunossupressor, protegendo animais desafiados com dose letal de LPS (SOARES, 2003). Também ativo é o galato de epigalocatequina, componente fenólico majoritário da espécie *Camellia sinensis*, molécula que oferece proteção no mesmo modelo. Não somente substâncias puras, mas também extratos de vegetais como os das espécies *Angelica sinensis* (WANG, 2006) e *Ruta chalepensis* (IAUK, 2004) têm demonstrado atividade neste modelo, principalmente a partir da modulação de citocinas proinflamatórias. Moléculas isoladas de vegetais e derivados sintéticos com resultados de estudos aqui apresentados, a exemplo das substâncias citadas acima, também apresentam potencial imunossupressor em modelo de endotoxemia.

O lapachol é uma naftoquinona isolada do lenho de várias espécies da família Bignoniaceae. Cascas de espécies dessa família são usadas em medicina popular com várias finalidades, sobretudo como adstringente, febrífugo e anti-reumático. Na década de 70 o uso indiscriminado de extratos à base de *Tabebuia* spp. contra diversos tipos de câncer quase colocou essa planta em risco de extinção. O lapachol apresentou atividade antitumoral *in vitro* e estudos clínicos foram desenvolvidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, EUA). As investigações foram suspensas devido à baixa biodisponibilidade da substância, que tornava necessário o uso de altas doses para atingir concentrações terapêuticas. Essas doses implicavam efeitos tóxicos, entre os quais o prolongamento do tempo de protrombina, sendo esse efeito anticoagulante devido possivelmente à similaridade estrutural do lapachol com a vitamina K. O lapachol e outras quinonas isoladas de espécies da família Bignoniaceae continuam, entretanto, sendo objeto de interesse científico e tema de muitas investigações (FALKENBERG, 2007).

O lapachol e as cinco moléculas derivadas (moléculas da classe das quinonas) selecionados para avaliação *in vitro* apresentaram resultados promissores nos ensaios de imunossupressão *in vitro*. Destas seis moléculas, o lapachol e cinco dos derivados foram avaliados em modelo de endotoxemia, confirmando alguns dos resultados obtidos *in vitro*. O lapachol foi ativo nos dois ensaios *in vitro* utilizados, como também no modelo *in vivo*, protegendo os animais submetidos ao desafio com LPS em 70 %, ao final de quatro dias de observação. O nor-lapachol, droga que inibe tanto a produção de NO quanto a linfoproliferação *in vitro*, em

modelo *in vivo* apresentou proteção aos animais nas duas doses testadas. A α -lapachona, α -3-I-lapachona e o isolapachol acetilado, apesar de apresentar algum potencial imunossupressor *in vitro*, não apresentaram atividade imunossupressora *in vivo*. Já a β -I-lapachona, molécula que não apresentou atividade imunossupressora *in vitro*, apresentou uma capacidade de proteção *in vivo* existindo 50 % de sobrevivência dos animais desafiados com LPS. O lapachol e seus derivados, sobretudo os aqui testados, são moléculas que apresentam potencial imunossupressor e que devem ser mais avaliados enquanto potenciais candidatos a medicamentos. Mesmo tendo sido descartado o uso do lapachol para o tratamento de neoplasias, a molécula e dois dos derivados, diante dos resultados aqui apresentados, são moléculas que potencialmente podem ser utilizadas enquanto imunossupressores e que para tal finalidade outras investigações devem ser feitas. Em comparação com os resultados obtidos para a dexametasona, droga imunossupressora padrão, o lapachol protege os animais de forma semelhante à dexametasona. Essa comparação destaca o potencial imunossupressor do lapachol e é de grande importância se considerado que a dexametasona, droga da classe dos corticoides, apresenta utilização limitada pelos efeitos colaterais apresentados, principalmente durante tratamentos prolongados (SOARES, 2003).

Outra substância analisada foi a solidagenona, molécula classificada como diterpeno labdano (terpenoide) com atividade gastroprotetora comprovada experimentalmente (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2002) e que de acordo com os resultados dessa investigação apresentou elevado potencial imunossupressor *in vitro*. *In vivo*, na mais elevada dose utilizada, apresentou proteção a 67 % dos animais submetidos à endotoxemia. Na menor dose testada, não houve proteção em relação ao grupo tratado com salina. A solidagenona não foi isolada de vegetal do semi-árido brasileiro, mas sim de espécie vegetal nativa da América do Sul (*Solidago chilensis* Meyen) e encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Os rizomas secos da planta são amplamente utilizados em medicina popular por conta das suas atividades diurética, estimulante do apetite e anti-helmíntica além da atividade antiinflamatória, também em medicina popular atribuída às partes aéreas da planta (VALVERDE-SOARES, 2009).

Cumarinas são substâncias que possuem diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade antiinflamatória (LUCHINI, 2008; FALKENBERG, 2007). A benzopirona e a hidroxycumarina são moléculas que pertencem à classe das cumarinas. A benzopirona quando utilizada *in vivo* é metabolizada, gerando derivados químicos dentre os quais está a hidroxycumarina. Ambas as moléculas apresentaram atividade imunossupressora *in vitro*, sendo ambas ativas sobre a inibição da proliferação de linfócitos ativados. A benzopirona tem sido investigada para o tratamento de processos inflamatórios (BECKLEY-KARTEY, 1997)

e do câncer, para a qual há relato na literatura de estudos clínicos de fase I para o tratamento de pacientes portadores de melanoma e carcinoma de células renais em estágio avançado. Também é descrita na literatura a segurança de uso clínico da benzopirona, mesmo em doses elevadas (BECKLEY-KARTEY, 1997; MARSHALL, 1991). Já em relação à hidroxycumarina, há relatos de modulação do sistema imune através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6 e TNF- α), em modelo usando células P388D1 infectadas pelo vírus influenza (KUROKAWA, 2010) e também em modelo usando as mesmas células estimuladas com LPS (KUROKAWA, 2003). Os resultados *in vivo* obtidos em animais tratados com a benzopirona mostram proteção contra a mortalidade induzida pela dose letal, enquanto que a hidroxycumarina, um dos metabólitos da benzopirona, não apresentou proteção aos animais submetidos à endotoxemia. A benzopirona é metabolizada, a depender da espécie animal, originando seis diferentes derivados, através de reação de hidroxilação e ainda pelo menos quatro outros produtos podem ser originados a partir da abertura do anel lactônico (LAKE, 1999; BORN, 2003; FELTER, 2006).

Foram feitos experimentos adicionais com estas duas moléculas, visando elucidar os seus mecanismos de ação protetora. Em experimentos *in vivo*, demonstrou-se que a benzopirona inibe a produção de TNF- α , uma citocina central para o desenvolvimento do processo fisiopatológico desencadeado pela administração de LPS (BLACKWELL, 1996). O fato de a produção de IL-10, uma citocina com ação anti-inflamatória conhecida (OBERHOLZER, 2002), estar aumentada nos animais tratados com BZP apenas na dose protetora (71,4 mg/kg) ao desafio com LPS sugere um papel desta citocina na proteção e diminuição dos níveis de TNF- α . A IL-6 foi outra citocina que teve seus níveis de produção aumentados em relação aos grupos tratados com salina ou dexametasona. Embora não tenha havido correlação entre os níveis de IL-6 e a proteção contra a mortalidade, não podemos descartar um papel desta citocina na proteção induzida pela BZP na endotoxemia. É relatada na literatura uma tendência ao aumento da secreção de IL-6, *in vitro*, em culturas estimuladas com LPS e cultivadas em presença da benzopirona (STUHLMEIER, 1991). Também há referências que apontam o efeito pleiotrópico desta citocina (PRITTS, 2002), conforme já mencionado neste trabalho. Assim, pode ser a combinação dos dois efeitos, aumentando a produção destas duas citocinas, o que oferece proteção aos animais considerando inclusive que a IL-6 pode apresentar efeito anti-inflamatório, a depender do ambiente em que se encontra (PRITTS, 2002).

Por ser o macrófago a principal célula produtora de TNF- α após estimulação com LPS, foi avaliada a produção desta citocina por macrófagos ativados com LPS, *in vitro*. A adição de

benzopirona ou de seu metabólito, a hidroxycumarina, não foi capaz de inibir a produção de TNF- α *in vitro* após estimulação com LPS. Estes resultados sugeriram que a atividade inibitória do TNF *in vivo* e seu efeito protetor na endotoxemia é causado por um metabólito da BZP ou devido à sua ação em outros tipos células que, indiretamente levariam à redução da produção de TNF- α por macrófagos. Realizou-se então um experimento utilizando macrófagos peritoneais de animais tratados previamente com essas duas substâncias. Os macrófagos peritoneais de animais previamente tratados com a BZP apresentaram uma redução nos níveis de TNF- α , demonstrando que *in vivo* essas células são de fato moduladas pela ação das duas substâncias. Observou-se ainda uma menor inibição dos níveis de TNF- α por macrófagos peritoneais obtidos de animais previamente tratados com hidroxycumarina. Em conjunto, estes dados sugerem que a ação protetora da BZP é causada por outro metabólito que não a hidroxycumarina (LAKE, 1999).

O ácido betulínico foi outra molécula da classe dos terpenos (triterpeno pentacíclico) que foi avaliada. Conforme já descrito acima, a classe dos terpenos apresenta os mais diversos efeitos biológicos, relatados na literatura. Em especial para o ácido betulínico, molécula já bastante estudada em outros modelos, há relatos de atividade indutora de apoptose em células neoplásicas (DRAG-ZALESINSKA, 2009; FULDA, 2009), atividade anti-HIV (DANG, 2009; SMITH, 2007), anti-VHB (YAO, 2009), anti-micobacteriana (TANACHATCHAIRATANA, 2009), antiinflamatória (AGUIRRE, 2006), anti-*T. cruzi* (CAMPOS, 2005), anti-helmíntica (ENWEREM, 2001), além da atividade imunomoduladora *in vitro* (YUN, 2003). Diante dessas atividades relatadas, há um grande potencial para o estudo do AB considerando que a droga é segura mesmo em doses superiores a 500 mg/kg, conforme relatado na literatura para estudos como agente antitumoral (NAKAGAWA-GOTO, 2009; YOGESWARI, 2005; CICHEWICZ e KOUZI, 1993). Em nossos experimentos *in vitro* de avaliação de atividade imunomoduladora, observamos um baixo potencial imunossupressor para esta molécula tanto em cultura de macrófagos quanto de linfócitos ativados, em concentrações atóxicas para as células. Vale ainda ressaltar que há relatos na literatura para o baixo potencial imunossupressor do AB quanto à produção de NO por macrófagos ativados (HONDA, 2006; STEINKAMP-FENSKE, 2007), dado coincidente com os achados deste trabalho.

Experimentos no modelo de endotoxemia com esta molécula demonstraram que a administração de ácido betulínico protege 100 % dos animais, demonstrando uma potente atividade imunossupressora desta molécula *in vivo*. Visando ao esclarecimento do mecanismo de ação protetora para esta substância, os níveis das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6 foram

determinados no soro de animais tratados ou não com esta droga. Observamos uma redução de TNF- α , correlacionado ao efeito protetor contra a mortalidade. Já a produção de IL-10 foi aumentada pelo tratamento com ácido betulínico, sugerindo um papel desta citocina antiinflamatória na proteção induzida pelo AB (BLACKWELL, 1996).

Com o objetivo de observar a importância do aumento da produção de IL-10 para a sobrevivência de animais tratados com o ácido betulínico e desafiados com LPS, utilizamos animais da linhagem C57BL/6 selvagens e IL-10^{-/-}. A dose utilizada para o tratamento foi a mesma que ofereceu 100 % de proteção aos animais BALB/c também desafiados com LPS. Mesmo tratados com o ácido betulínico, camundongos IL-10^{-/-} desafiados com o LPS apresentaram elevada taxa de mortalidade. Já nos animais selvagens, o tratamento com o ácido betulínico resultou em uma proteção de 83 %, enquanto os não-tratados com a droga apresentaram somente 33 % de sobrevivência. Este dado reforça a ideia de que a ação do ácido betulínico protege os animais endotoxêmicos através de mecanismo dependente da produção de IL-10.

Experimentos *in vitro* foram realizados visando observar os efeitos do tratamento com AB na produção de TNF- α por macrófagos ativado por LPS. Assim como a BZP, o AB não foi capaz de inibir a produção desta citocina *in vitro*, sugerindo que esta molécula pode também exercer seu efeito protetor indiretamente. O experimento com macrófagos residentes de animais previamente tratados com AB confirmou que esta molécula produz a inibição da produção de TNF- α por macrófagos ativado por LPS, e sugere a ação através de algum metabólito ativo do ácido betulínico, obtido a partir do metabolismo *in vivo* da droga.

É de grande importância, sempre que possível, a proposição de novas metodologias de análise da atividade biológica de moléculas até então não estudadas, em substituição à utilização de animais. Experimentos utilizando células de linhagens imortalizadas apresentam-se como boa alternativa desde que a linhagem adeque-se às necessidades do experimento. Contudo, a partir da avaliação dos resultados dos experimentos *in vitro* aqui apresentados e da comparação com os dados de experimentos *in vivo* pode-se verificar que resultados *in vitro* nem sempre são preditivos das atividades apresentadas pelas moléculas quando avaliadas *in vivo*. Isso não significa que os ensaios *in vitro* não sejam importantes e sim que podem existir variações entre os resultados de experimentos nas duas condições. Para ilustrar esta informação, pode-se destacar, sobretudo em relação ao AB, resultados promissores *in vivo* mas não boa atividade *in vitro*. Este fato pode ser atribuído aos efeitos do metabolismo do organismo sobre a droga, gerando derivados químicos mais ativos. Outra possibilidade é a de que esta modulação observada *in vivo* pode não ter sido observada em

experimentos *in vitro* em culturas isoladas de macrófagos ou linfócitos por uma ação direta das moléculas em outro tipo celular, presente no animal.

O ácido betulínico é uma droga já bastante estudada, deu origem à nova classe de antirretrovirais denominada “inibidora de maturação” e encontra-se em avaliação clínica, fase II (ADAMSON, 2010). A benzopirona também é uma substância que apresenta características farmacológicas já bem descritas na literatura e, apesar de já existirem alguns estudos descrevendo características farmacocinéticas e farmacodinâmicas para essas duas moléculas, estudos posteriores envolvendo estas substâncias são imprescindíveis, tendo como finalidade a observação de outros parâmetros envolvidos na regulação do sistema imune, ainda não avaliados. Estas condições apresentadas são bastante favoráveis ao desenvolvimento de novos medicamentos a partir das duas substâncias. Ainda deve-se considerar a atividade farmacológica imunossupressora, descrita neste trabalho para o AB e BZP e a segurança de uso para ambas, uma vez que medicamento derivado do AB é utilizado para tratamento de patologia crônica (HIV/AIDS) e medicamento à base da BZP (VENALOT®) é utilizado para tratamento da insuficiência venosa crônica e que por isso têm implícito a segurança de uso por tempo prolongado conforme relatado na literatura (SMITH, 2007; HOULT, 1996). Para as demais moléculas, ainda não estudadas quanto à modulação do sistema imune, os estudos devem ser realizados visando elucidar os mecanismos produtores da atividade imunossupressora considerando que também são potenciais candidatas ao desenvolvimento de novos medicamentos.

8 CONCLUSÕES

- Identificamos um elevado percentual de moléculas com atividade imunossupressora de moléculas obtidas de vegetais bem como seus derivados sintéticos, em ensaios *in vitro*, sobre macrófagos e linfócitos ativados.
- O resultado de 10 das moléculas testadas *in vitro* e no modelo de endotoxemia demonstra não haver uma correlação direta entre os resultados nos ensaios *in vitro* e atividade protetora no modelo de endotoxemia.
- Os resultados *in vivo* do tratamento com a benzopirona e o ácido betulínico confirmam um papel crucial da IL-10 na proteção contra a endotoxemia através da redução da produção de TNF- α .
- Resultados obtidos para a benzopirona e ácido betulínico reforçam a importância da continuação dos estudos pré-clínicos com essas moléculas, potenciais candidatas a novos fármacos imunossupressores.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra; SENA, Karine Cavalcante Maurício de. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. *Rev. Nutr.*, Campinas, 21, 6, 749-756, nov. 2008.

ADAMSON, Catherine S. et al. Polymorphisms in Gag spacer peptide 1 conferring varying levels of resistance to the HIV-1 maturation inhibitor bevirimat. *Retrovirology*, 7, 36, abr. 2010.

ADEREM, Alan; ULEVITCH, Richard J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782-787, ago. 2000.

AGUIRRE, Maria C. et al. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxypentacyclitriterpene acids from the leaves of *Ugnimolinae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 5673-5677. 2006.

ATABEK, Arzu et al. Importance of LPS structure on protein interactions with *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids Surf. B*, 67, 115-121, ago. 2008.

BARRETO, Ricardo de L.; CORREIA, Carlos Roque D.; MUSCARÁ, Marcelo N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Quim. Nova*, 28, 6, 1046-1054, ago. 2005.

BECKLEY-KARTEY, Senam A. J.; HOTCHKISS, Sharon A. M.; CAPEL, Margred. Comparative in vitro skin absorption and metabolism of coumarin (1,2-Benzopyrone) in human, rat, and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 145, 34-42. 1997.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: current status. *Br. J. Anaesth.*, 77, 110-117. 1996.

BORN, S.L. et al. Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. *Food and Chemical Toxicology* 41, 247–258. 2003.

BRACKETT, D. J. et al. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. *Circ Shock*, 17, 273–284. 1985.

BURAS, Jon A.; HOLZMANN, Bernhard; SITKOVSKY, Michail. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 854-865. 2005.

CAMPOS, Francinete R. et al. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. *Fitoterapia*, 76, 26-29. 2005.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

CICHEWICZ, Robert. H.; KOUZI, Samir A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* 24,1, 90-114, jan. 2004.

COATS, Stephen R. et al. MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR-4 signaling complex. *J. Immunol.*, 175, 4490-4498, ago. 2005.

COPELAND, S. et al. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 60–67. 2005.

COSTA, José Fernando Oliveira Costa. Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora em extratos de plantas do semi-árido brasileiro. 2004. 1 v. 80f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, UFBA/FIOCRUZ, Salvador.

DANG, Zhag et al. Betulinic acid derivatives as human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 52, 7887-7891. 2009.

D'ORIO, Vincent. *et al.* A comparison of *Escherichia coli* endotoxin single bolus injection with low-dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes. *Circ Shock*, 21, 3, 207–216. 1987.

DEITCH, Edwin A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*, 9, 1, 1-11, jan. 1998.

DEITCH, Edwin A. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann. Surg.*, 216, 2, 117-134, Ago. 1992.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, 141, 2407-2412. 1988.

D'ORIO V. *et al.* A comparison of *Escherichia coli* endotoxin single bolus injection with low-dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes. *Circulatory shock* 21, 3, 207-16. 1987.

DRAG-ZALESINSKA, Malgorzata *et al.* Esters of betulin and betulinic acid with amino acids have improved water solubility and are selectively cytotoxic toward cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 4814–4817. 2009.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39, 4, 343-350. 2003.

ENWEREM, N. M. *et al.* Anthelmintic activity of the stem bark extracts of *Berlina grandiflora* and one of its active principles, betulinic acid. *Phytomedicine*, 8, 2, 112–114. 2001.

ESMON, Charles. T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit. Care Med.*, 32, 5, S219–S222. 2004.

FALKENBERG, Míriam de Barcelos. Quinonas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira Simões *et al.* (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2007. p. 657-683.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

FELTER, S. P. et al. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 462–475. 2006.

FINK, Mitchell P.; HEARD, Stephen. O. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J. Surg. Res.*, 49, 2, 186–196, ago. 1990.

FISHER, Charles J. et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. *N. Engl. J. Med.*, 334, 26, 1697-1702. 1996.

FULDA, Simone; KROEMER, Guido Kroemer. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discov. Today*, 14, 17-18, 885-890. 2009.

GORDON, Siamon; MARTINEZ, Fernando O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity Review*, 32, 593-604, mai. 2010.

GONZÁLEZ-COLOMA, Azucena et al. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.*, jun. 2010. DOI 10.1007/s11101-010-9187-8.

GUARATINI, Maria Teresa Grombone et al. Biodiversidade. *Cadernos de Educação Ambiental*. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB, 2010. p. 12-30.

GUO, Ren-Feng; RIEDMANN, Niels C.; WARD, Peter A. Role of C5a–C5aR interaction in sepsis. *Shock*, 21, 1, 1-7. 2004.

HONDA, Tadashi et al. Design, synthesis, and anti-inflammatory activity both *in vitro* and *in vivo* of new betulinic acid analogues having an enone functionality in ring A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16,6306-6309. 2006.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, Miguel. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmac.*, 27, 4, 713-722. 1996.

IAUK, Liliana et al. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L., a plant with anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 267-272. 2004.

JANEWAY, Charles A.; MEDZHITOV, Ruslan. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 197–216. 2002.

KAHLKE, Volker *et al.* Early interleukin-10 treatment improves survival and enhances immune function only in males after hemorrhage and subsequent sepsis. *Shock*, 18, 1, 24-28, jul. 2002.

KRENSKY, Alan M.; VINCENTI, Flavio; BENNET, William M. Immunosuppressants, tolerogens and immunostimulants. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*. 11^a Ed. 2006.

KUROKAWA, Masahiko *et al.* Cytokine-regulatory activity and therapeutic efficacy of cinnamyl derivatives in endotoxin shock. *Eur. J. Pharm.* 474, 283-293.2003.

KUROKAWA, Masahiko *et al.* Modulation of cytokine production by 7-hydroxycoumarin *in vitro* and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral Research*, 85, 373-380. 2010.

KUSTER, Ricardo Machado; ROCHA, Leandro Machado. Cumarinas, cromona e xantonas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira Simões *et al.* (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6^a ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2007. p. 537-556.

LAKE, B.G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: relevance for human Risk Assessment. *Food Chem Toxicol.*, 137, 423-453. 1999.

LAMONTAGNE, Francois *et al.* Nitric oxide donors in sepsis: a systematic review of clinical and *in vivo* preclinical data. *Shock*, 30, 6, 652-659. 2008.

LEE, Kuo-Hsiung. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads. *J. Nat. Prod.*, 67, 273-283, mar. 2004.

LI, Wei *et al.* A major ingredient of green tea rescues mice from lethal sepsis partly by inhibiting HMGB1. *PLoS ONE*, 2, 11, e1153. 2007.

LIMA, Émerson Silva; ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37, 3, 292-303, set. 2001.

LUCHINI, Ana Carolina *et al.* Intestinal anti-inflammatory activity of coumarin and 4-hydroxycoumarin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 7, 1343-1350, abr. 2008.

MARINHO, Vera Maria Costa; SEIDL, Peter Rudolf; LONGO, Waldimir Pirró e. O papel governamental como ator essencial para a P&D de medicamentos – um estudo de caso. *Quim. Nova*, 31, 7, 1912-1917, out. 2008.

MARSHALL, M. E.; BUTLER, K. Fried A. Phase I evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine in patients with advanced malignancies. *Mol. Biother.*, 3, 3, 170-178, set. 1991.

McLEAY, A. M. Drotrecogin alfa: a role in emergency department treatment of severe sepsis? *Emerg. Med. Australas.* 16, 4, 324-335, ago. 2004.

MILLER, Samuel I.; ERNST, Robert K.; BADER, Martin W. LPS, TLR-4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 36-46. 2005.

MUNFORD, Robert S. Sepsis e choque séptico. In: BRAUNWALD, Eugene *et al.* *Medicina Interna*. 15a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2002. p. 848-854.

NAKAGAWA-GOTO, Kyoko *et al.* Cancer preventive agents 9. Betulinic acid derivatives as potent cancer chemopreventive agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 3378-3381. 2009.

NEMZEK, Jean A.; HUGUNIN, Kelly M. S.; OPP, Mark R. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comparative Medicine*, 58, 2, 120-128, apr. 2008.

NETEA, Mihai G. *et al.* Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of good thing? *Trends in Immunology*, 24, 5, 254-258, maio. 2003.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 Years. *J. Nat. Prod.*, 70, 461-477, feb. 2007.

OBERHOLZER, Andreas; OBERRHOLZER, Caroline; MOLDAWER, Lyle L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit. Care Med.*, 30, 1 (Suppl.), S58-S63. 2002.

PIAZZA, Matteo *et al.* Glycolipids and benzylammonium lipids as novel antisepsis agents: synthesis and biological characterization. *J. Med. Chem.*, 52, 4, 1209–1213. 2009.

PRITTS, Timothy *et al.* Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia - role of transcription factors and regulation by the stress response. *The American Journal of Surgery*, 183, 372-383. 2002.

REDDY, L. Harivardhan; COUVREUR, Patrick. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 1412–1426. 2009.

SAITOH, Shin-ichiroh *et al.* Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR-4 oligomerization. *Int. Immunol.*, 16, 7, 961-969, jun. 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, Guillermo; RODRIGUEZ, Jaime; ASTUDILLO, Luis. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 111-115. 2002.

SMITH, Patrick F. *et al.* Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-O-(3',3'-Dimethylsuccinyl) betulinic acid (Bevirimat) against Human Immunodeficiency Virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 10, 3574–3581, out. 2007.

SOARES, Milena Botelho Pereira *et al.* Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, 459, 107-112. 2003.

SORIANO, Francisco Garcia. Sepsis: estudos das alterações celulares, teciduais e orgânicas produzidas por modelos de sepsis experimental. Análise da participação de citocinas e

expressão gênica. 2006. 1v. 175 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

STEINKAMP-FENSKE, Katja *et al.* Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase and NADPH oxidase by betulinic acid in human endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322, 2, 836-842, 2007.

STUHLMEIER, K. *et al.* Synergistic effect of coumarin (1,2-benzopyrone) and endotoxin in the induction of human interleukin-1. *Clin. exp. Immunol.*, 84, 317-323. 1991.

TANACHATCHAIRATANA, Tanud *et al.* Antimycobacterial activity of cinnamate-based esters of the triterpenes betulinic, oleanolic and ursolic acids. *Chem. Pharm. Bull.* 56, 2, 194-198. 2008.

TEGHANEMT, Athmane *et al.* Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J. Immunol.*, 175, 4669-4676, ago. 2005.

TSIOTOU, Adelais G. *et al.* Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Monit.*, 11, 3, RA76-85. 2005.

VALVERDE-SOARES, S. S.; AZEVEDO-SILVA, R. C.; TOMASSINI, T. C. B. Utilização de CLAE como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). *Rev. Bras. Farm.* 90, 3, 196-199. 2009.

VINCENT, Jean-Louis. Clinical sepsis and septic shock – definition diagnosis and management principles. *Langenbecks Arch Surg.*, 393, 817–824, jun. 2008.

VISINTIN, Alberto *et al.* Pharmacological inhibition of endotoxin responses is achieved by targeting the TLR-4 coreceptor, MD-2. *J. Immunol.*, 175, 6465-6472, ago. 2005.

WANG, Haichao *et al.* The aqueous extract of a popular herbal nutrient supplement, *Angelica sinensis*, protects mice against lethal endotoxemia and sepsis. *J. Nutr.*, 136, 2, 360-365. 2006.

WARD, Peter A. The dark side of C5A in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 133-142, fev. 2004.

YAO, Dachun *et al.* Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. *FEBS Journal*, 276, 2599–2614. 2009.

YOGEE SWARI, Perumal; SRIRAM, Dharmarajan. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 657-666. 2005.

YUN, Yunha *et al.* Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 12, 1087-1095. 2003.

ZANOTTI-CAVAZZONI, Sergio L.; GOLDFARB, Roy D. Animal models of sepsis. *Crit. Care Clin.*, 25, 703–719. 2009.

Endereços eletrônicos:

GONZÁLES-COLOMA, Azucena *et al.* Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.*, DOI 10.1007/s11101-010-9187-8

LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE (<http://www.sepsisnet.org/>)

ANEXOS

Os artigos publicados no período de realização do curso de doutorado estão aqui anexados.