



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBiotec**

KEROLAYNE DE MELO NOGUEIRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTIOXIDANTE E ANTIPIRÉTICO, DO
VANILATO DE ISOPROPILA, UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DO ÁCIDO
VANÍLICO**

**PARNAÍBA
2019**

KEROLAYNE DE MELO NOGUEIRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTIOXIDANTE E ANTIPIRÉTICO, DO
VANILATO DE ISOPROPILA, UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DO ÁCIDO
VANÍLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Farmacologia Molecular aplicada a Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros.

PARNAÍBA-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

N778e Nogueira, Kerolayne de Melo.
Efeito anti-inflamatório, antioxidante e antipirético, do vanilato de isopropila, um derivado semissintético do ácido vanílico em camundongos [manuscrito] / Kerolayne de Melo Nogueira. – 2018.
123 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2018.
Orientação: Prof. Dr. JandVenes Rolim Medeiros.

1. Biotecnologia. 2. Inflamação. 3. Ácido Vanílico. 4. Vanilato de Isopropila. I. Título.

CDD: 660

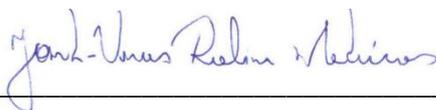
KEROLAYNE DE MELO NOGUEIRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTIOXIDANTE E ANTIPIRÉTICO, DO
VANILATO DE ISOPROPILA, UM DERIVADO SEMISSINTÉTICO DO ÁCIDO
VANÍLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, CMRV como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Aprovada em : 08/02/2019

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros

Universidade Federal do Piauí - UFPI

(Orientador)



Prof Dra. Ana Jérsia Araújo (Examinador interno)

Universidade Federal do Piauí - UFPI



Prof Dr. Renan Oliveira Silva (Examinador externo)

Centro Universitário INTA - UNINTA

*“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.
Eles se encontram um no corpo do outro.
Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando.
Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago.
Pesquiso para constatar, constatando intervenho, intervindo educo e me educo.
Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a verdade.”*

Paulo Freire

*Dedico,
À Deus, por ser o detentor da vida,
por me guiar nessa longa trajetória,
por me dar forças nos momentos de aflições,
e aos meus familiares pelo apoio incessante.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela minha vida, saúde amigos e familiares, que em todos os momentos me deu força e fé para superar todas as adversidades. Sem ele eu nada seria.

À **Universidade Federal do Piauí, ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** pela enorme contribuição na minha vida acadêmica, profissional e científica.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Jand Venes Rolim Medeiros**, pela oportunidade de participar do seu laboratório, pela confiança a mim depositada, por todos os conhecimentos repassados, sempre o admirei muito como professor e como pessoa. Agradeço por acreditar no meu potencial e me dar todo o aparato necessário para meu crescimento profissional, muito obrigada por me dar uma chance de buscar um futuro melhor.

À **minha família, em especial a minha mãe Lucia Maria**, heroína que me deu apoio e incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço, e que sempre confiou em mim.

A **meus irmãos: Wilker Koppes e Irwing Koppes**, em especial a **William Koppes** pelo amor, incentivo e apoio incondicional ao longo de todos esses anos de dedicação aos estudos. A todos da minha família que tiveram um cuidado e carinho especial e que contribuíram ao longo da minha caminhada.

Ao **Luan Kelves**, meu noivo, pelo amor, cuidado, carinho, muita paciência e dedicação. Pelo apoio desde a época em que fui a sua IC, até nos últimos experimentos do mestrado, pelas cobranças que sempre me fizeram ir além, para meu crescimento pessoal e profissional, e que contribuíram para que eu conseguisse realizar meus objetivos com sucesso. Obrigada por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial. Você sempre será imensamente especial na minha vida.

Aos meus padrinhos Padre **Ézio Rodrigues** e **Frei Ribamar**, que sempre me apoiaram e me ajudaram ao longo da minha caminhada.

A **todos os meus amigos**, em especial a, **Mayara** pela amizade incomparável que construímos, obrigada por ser a minha pessoa, em meio a momentos de alegria e dificuldades, você sempre me apoiou e me incentivou.

Aos demais: **Jessíca Araujo, Geise Castro, Ana Patrícia, Nayara Alves, Weslany Fontenele, Isabela Braúna, Rodrigo Lopes**, agradeço pelos momentos de força, alegria e descontração; amo todos vocês.

Aos **membros do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Doenças Gastrointestinais (LAFIDG)** em especial àqueles que no início me receberam com amor e

tanto me ensinaram: Luan Kelves, por me receber tão inexperiente como sua aluna de iniciação científica e ter me apoiado sempre, a Beatriz Melo o pela amizade e conhecimentos repassados, a Nathália Carvalho, Nayara Alves, Thiago Sousa e Douglas Soares pelos ensinamentos e conselhos repassados. A Simone Araújo, Ana Patrícia e Dvison Pacífico por me acolherem tão bem como voluntária ao entrar no laboratório. Aos demais membros pela ajuda nos experimentos, pela troca de conhecimentos, amizade e momentos de alegria: Ana Léodido; Elenice Alvarenga; Gabriella Pacheco, Isabela Noletto, Bruno Iles, Matheus Sombra, André Lopes, Esley Santos, Priscila Costa, Jelson Lina e Letícia Chaves, Andreza Kattelin, Bruna Brito.

Ao Professor Damião Perguentino

Aos membros da banca, Prof.ª Dra. Ana Jérсия Araújo e Dr. Renan Oliveira Sousa, por aceitarem o convite para participar da banca examinadora, disponibilizando seu tempo para avaliar meu trabalho.

A CAPES/CNPq pelo consentimento da bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte deste caminho de crescimento pessoal e profissional.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Inflamação é um mecanismo de defesa do corpo à lesão tecidual e ocorre como uma resposta defensiva, que desencadeia profundas adaptações fisiológicas numa tentativa de limitar os danos no tecido e remover o agente patogênico. Os fármacos comumente utilizados no tratamento de condições inflamatórias estão associados ao aparecimento de efeitos adversos graves como úlceras gastrointestinais, hemorragias e distúrbios renais, efeitos cardiovasculares e trombose. Os produtos naturais e seus derivados são muito utilizados para o tratamento de diversas patologias, dentre elas para o alívio da dor e inflamação, um desses derivados naturais, o ácido vanílico, demonstrou possuir efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes onde atua diminuindo o recrutamento neutrofílico e o estresse oxidativo. Diante disso, o composto vanilato de Isopropila (ISP-VT) foi formulado a partir da estrutura química do ácido vanílico. O objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e antipirética e potencial tóxico do ISP-VT. A atividade anti-inflamatória do ISP-VT foi avaliada pela medição de edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios, análise de imunohistoquímica e ensaio de inibição de Ciclooxygenases-1 e Ciclooxygenase-2 (COXs), além de avaliação da atividade antipirética no modelo de febre por levedura. No modelo de peritonite, foi analisada a permeabilidade, contagem total e diferencial de leucócitos, a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a migração celular com o uso de microscopia intra-vital, os níveis de citocinas fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), os níveis de interleucina-6 (IL-6), A atividade antioxidante foi realizada com testes *in vitro*, e *ex vivo* por análise de concentrações de malondialdeído (MDA), as concentrações de nitrito (NO), os níveis da glutathiona (GSH) e superóxido dismutase (SOD). Além disso, também foram avaliadas a toxicidade gástrica e toxicidade aguda do ISP-VT. Como resultados, o pré-tratamento com ISP-VT reduziu significativamente ($P < 0,05$) o edema da pata induzido pela carragenina, sulfato de dextrana (DEX), composto 48/80, serotonina (5-HT), histamina (HIST), bradicinina (BK), e prostaglandina E2 (PGE2). Além disso, também inibiu o recrutamento de leucócitos e neutrófilos; diminuindo sua adesão e rolamento, reduziu a atividade da enzima MPO, reduziu os níveis de TNF- α e IL-6, a permeabilidade vascular. ISP-VT, também foi efetivo em reduzir a imunomarcagem de células para a COX-2 no tecido da pata, e exibiu uma maior inibição para isoforma da enzima COX-2. Além disso foi efetivo em diminuir as concentrações de MDA e de nitrito, e manteve os níveis de GSH e SOD no exsudado peritoneal, além da atividade no sequestro de radicais *in vitro*. ISP-VT foi efetivo ao reduzir a febre causada por levedura. ISP-VT (100 mg/kg), diminuiu a lesão gástrica e atividade de MPO quando comparado ao grupo tratado com Indometacina (20 mg/kg). Nos testes de toxicidade o ISP-VT não apresentou toxicidade em camundongos na dose mais alta testada e nenhuma alteração comportamental ou clínica foi observada. Em conclusão, estes dados mostram que ISP-VT reduz a resposta inflamatória através da inibição de eventos vasculares e celulares, por modular a migração de neutrófilos, pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, redução da febre e por reduzir o estresse oxidativo, e que seu mecanismo principal é por atuar inibindo principalmente a COX-2.

Palavras-chave: inflamação, estresse oxidativo, febre, ácido vanílico, vanilato de isopropila.

ABSTRACT

Inflammation is a defense mechanism of the body to tissue injury and occurs as a defensive response, which triggers profound physiological adaptations in an attempt to limit tissue damage and remove the pathogen. Drugs commonly used in the treatment of inflammatory conditions are associated with the appearance of serious adverse effects such as gastrointestinal ulcers, bleeding and renal disorders, cardiovascular effects and thrombosis. Natural products and their derivatives are widely used for the treatment of several pathologies, among them for the relief of pain and inflammation, one of these natural derivatives, vanillic acid, has been shown to have anti-inflammatory and antioxidant effects where it works by reducing neutrophil recruitment and the oxidative stress. In view of this, the isopropyl vanillate compound (ISP-VT) was synthesized from the chemical structure of vanillic acid. The objective of the present work was to investigate the anti-inflammatory, antioxidant and antipyretic activity of ISP-VT in mice and to evaluate their toxicity. The anti-inflammatory activity of the ISP-VT was evaluated by the measurement of paw edema induced by different inflammatory agents, immunohistochemical analysis and inhibition test of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 (COXs), as well as evaluation of antipyretic activity in the yeast fever model. In the peritonitis model, was analyzed total and differential leukocyte count, myeloperoxidase enzyme activity (MPO), cell migration with the use of intra-vital microscopy, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) cytokines, interleukin-6 (IL-6) levels, malondialdehyde (MDA) concentrations, concentrations levels of glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD). In addition, vascular permeability and gastric toxicity and acute toxicity of ISP-VT were also evaluated. All in vivo tests were performed on Swiss mice. As a result, pre-treatment with ISP-VT significantly reduced ($p < 0.05$) carrageenan-induced paw edema, dextran sulfate (DEX), compound 48/80, serotonin (5-HT), histamine (HIST), bradykinin (BK), and prostaglandin E2 (PGE2). In addition, it also inhibited the recruitment of leukocytes and neutrophils; decreasing adhesion and rolling, reduced MPO enzyme activity, reduced TNF- α and IL-6 levels, vascular permeability, MDA and nitrite concentrations, and maintained GSH and SOD levels in the peritoneal exudate, in addition to in vitro radical sequestration activity. ISP-VT, was also effective in reducing COX-2 cell immunostaining in paw tissue, and exhibited a greater inhibition for the COX-2 enzyme isoform. ISP-VT was effective in reducing fever caused by brewer's yeast. ISP-VT (100 mg / kg), decreased gastric injury and MPO activity when compared to the indomethacin-treated group (20 mg / kg). In the toxicity tests the ISP-VT showed no toxicity in mice at the highest dose tested and no behavioral or clinical changes were observed. In conclusion, these data show that ISP-VT reduces the inflammatory response by inhibiting vascular and cellular events, by modulating neutrophil migration, by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines, reducing fever and by reducing oxidative stress, and that its main mechanism is by acting primarily by inhibiting COX-2.

Keywords: inflammation, oxidative stress, fever, vanillic acid, isopropyl vanillate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-HT** – Serotonina
- AA**- Ácido araquidônico
- AINEs** – Anti-inflamatórios não esteróides
- ANOVA** – Análise de Variância
- AP1** – Fator de transcrição AP-1 (factivator protein-1)
- APOHA** - Área pré-óptica anterior do hipotálamo anterior
- BHA** - Butil-hidroxianisol
- BHT** - Butil- hidroxitolueno
- BK** – Bradicinina
- BPI** - Proteína de aumento da permeabilidade/bactericida
- BS** – Tampão Fosfato salino
- CCL2** - proteína quimiotática de monócitos 1
- CCL2** – Quimiocina CCL2
- Cg** – Carragenina
- COX** – Ciclooxigenase
- cPGES** - Prostaglandina E sintase citosólica
- DEX** – Sulfato de Dextran
- DTNB** – Ácido Ditio-Nitrobenzóico
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- ELISA** – Ensaio de Imunoabsorbância Ligado a Enzima
- ERN** – Espécies reativas de nitrogênio
- EROS** – Espécies Reativas do Oxigênio
- ERS** - Espécies reativas de enxofre
- GC** – Glicocorticóides
- GPXS** - Glutationa peroxidases
- GSH** – Glutationa
- GST** - Glutationa S-transferases
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogênio
- HIST** – Histamina
- HOCl**- Ácido hipocloroso
- HOO•** - Radical hidroperoxila
- HTAB** – Hexa-Decil-Trimetil-Amônio

i.p. – Intraperitoneal

ICAM 1 e 2 – Intercellular Adhesion Molecule 1 and 2

IFN – Interferon

IgG – Imunoglobulina G

IGM – Imunoglobulina M

INDO – Indometacina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida

JAK-STAT – Janus kinase/signal transducers

JAK-STAT- Janus quinase

LPS – Lipopolissacarídeo

LTB4 – Leucotrieno B4

MAC – Complexo de ataque a membrana

M-CSF – Macrophage colony-stimulating factor

MDA – Malondialdeído

mPGES -1 e 2 - Prostaglandina E microsomal sintase 1 e 2

MPO – Mieloperoxidase

NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato oxidase

NF-kB – Factor nuclear kappa B

NK – Natural Killer Cell

NLR – NOD-like receptors

NLRs – Receptores do tipo Nod like

NO – Óxido nítrico

O₂• – Ânion superóxido

OH• – Radical hidroxila

ONOO – Peroxinitrito

PAF – Fator de ativação de plaquetas

PG – Prostaglandinas

PGE2 – Prostaglandina E2

PGE2 - Prostaglandinas E2

PGI2 – Prostaciclina

PGI2 Prostaciclina

s.c. – Subcutânea

SOD – Superóxido dismutase (SOD),

TBHQ - Terc- butilhidroquinona)

TCA – Ácido Tricloroacético

TLRs – Toll-like receptors

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TNF- β – Fator de necrose tumoral beta

TXB2 – Tromboxano B2

v.o – Via Oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Causas e fatores fisiológicos e patológicos da inflamação.....	19
Figura 2: Representação esquemática do recrutamento de neutrófilos.....	24
Figura 3: Envolvimento da MPO na função de neutrófilos.....	26
Figura 4: Processo de indução da febre.....	34
Figura 5: Sistema antioxidante enzimático: Enzimas envolvidas na geração e na inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as consequências do desequilíbrio das EROs.....	36
Figura 6: Representação esquemática dos metabólitos do ácido araquidônico.....	39
Figura 7: Estruturas químicas do ácido vanílico e do vanilato de isopropila (ISP-VT).....	46
Figura 8: Efeito antioxidante do ISP-VT (A) no sequestro de radicais livres de DPPH, (B) quelação de íons ferrosos e (C) atividade antioxidante total.....	60
Figura 9: Edema de pata induzido por carragenina em camundongos swiss	62
Figura 10: Imuno-histoquímica para COX-2 em tecidos de pata 4 h após a administração de carragenina.....	63
Figura 11: Efeito do ISP-VT (1mg/kg), administrado por via intraperitoneal na formação de edema induzido por vários estímulos inflamatórios.....	65
Figura 12: ISP-VT reduz a migração celular e diminui o rolamento e a adesão de neutrófilos através de microscopia intravital na microcirculação mesentérica de camundongos.....	67
Figura 13: Efeito do ISP-VT na produção de citocinas e na atividade de mpo.....	69
Figura 14: O ISP-VT reduziu a permeabilidade vascular, conforme determinado pelo teste de Evans blue.	70
Figura 15: Efeito do ISP-VT nos níveis de malondialdeído (MDA), nitrito (NO ₂ -), glutatona (GSH) e superóxido dismutase (SOD) no exsudato peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina.....	72

Figura 16: Efeito do ISP-VT na inibição de COX-1 e COX-2 <i>in vitro</i>	73
Figura 17: O ISP-VT diminuiu a toxicidade na mucosa gástrica com e reduziu os níveis de MPO em comparação com a indometacina.....	74
Figura 18: Efeito de ISP-VT e Paracetamol na pirexia induzida por levedura em camundongos.....	75
Figura 19: Análise histopatológica dos órgãos dos animais analisados para o teste de toxicidade aguda.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros relacionados ao <i>screening</i> hipocrático da avaliação da toxicidade aguda do ISP-VT.....	77
Tabela 2. Efeito do ISP-VT (2.000 mg/kg, <i>v.o.</i>) no ganho de Massa Corporal (g) e na Massa relativa dos órgãos (%) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos.....	78
Tabela 3. Análises hematológicas e bioquímicas de sangue e plasma (respectivamente) após administração oral em dose única do ISP-VT (2.000 mg/kg) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos.....	79

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 INFLAMAÇÃO.....	19
2.7 FEBRE E EFEITO ANTIPIRÉTICO	30
2.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	32
2.9 TERAPIA MEDICAMENTOSA	38
2.10 PRODUTOS NATURAIS E SEMISSINTÉTICOS	41
2.11 ÁCIDOS FENÓLICOS	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. METODOLOGIA	45
4.1 DROGAS E REAGENTES	45
4.2 OBTENÇÃO DO COMPOSTO SEMISSÍNTÉTICO VANILATO DE ISOPROPILA.	45
4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	48
4.4 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS SWISS	48
4.5 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	48
4.6 PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	49
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	49
4.8 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR	50
4.9 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α e IL-6	50
4.10 MICROSCOPIA INTRAVITAL	51
4.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA COX-2.....	51
4.12 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CICLOOXIGENASES	52
4.13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
4.14 ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA (HIPERtermia INDUZIDA POR LEVEDURA EM CAMUNDONGOS)	55
4.15 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GÁSTRICA	56
4.16 TOXICIDADE AGUDA DE ISP-VT	56
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57

5.RESULTADOS	59
5.1 EFEITO DO ISP-VT NO SEQUESTRO DE RADICAL DPPH.....	59
5.2 ISP-VT E QUELAÇÃO DE ÍONS FERROSOS	59
5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE ISP-VT	59
5.4 EFEITOS ISP-VT NO EDEMA DA PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	61
5.5 EFEITO DO ISP-VT NA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA COX-2 EM EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	61
5.6 EFEITO DO ISP-VT NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR VÁRIOS AGENTES	64
5.7 EFEITO DO ISP-VT NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	66
5.8 EFEITO DO ISP-VT NO ROLAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS INDUZIDOS POR CARRAGENINA.....	66
5.9 EFEITO DO ISP-VT NOS NÍVEIS DE TNF- α e IL-6.....	68
5.10 EFEITO DO ISP-VT NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	68
5.9 ISP-VT REDUZIU A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (CONCENTRAÇÃO DE MDA).....	71
5.10 ISP-VT REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO.....	71
5.11 ISP-VT AUMENTA OS NÍVEIS DE GSH.....	71
5. 12 EFEITO DO ISP-VT NO ENSAIO DE INIBIÇÃO DA COX <i>IN VITRO</i>	73
5.13 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GÁSTRICA	74
5.14 EFEITO DO ISP-VT NA HIPERTERMIA INDUZIDA POR LEVEDURA EM CAMUNDONGOS	75
5. 17 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ISP-VT NA TOXICIDADE AGUDA.....	76
6 DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÃO	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	93

1. INTRODUÇÃO

Inflamação é a resposta do corpo a estímulos nocivos tais como: infecções, traumas ou lesões. Consiste em um mecanismo defensivo, que induz profundas adaptações fisiológicas que envolvem a ativação de uma série complexa de eventos desencadeados numa tentativa de limitar os danos no tecido e remover o agente patogênico. Embora o processo inflamatório seja um mecanismo de defesa do organismo, os eventos complexos a ação de mediadores envolvidos nessa reação podem se perpetuar e agravar muitas doenças (GABAY; KUSHNER, 1999; LALRINZUALI; VABEIRYUREILAI; JAGETIA, 2016).

Foi estimado, recentemente, que processos infecciosos e reações inflamatórias estão relacionados com 25% de todas as mortes por câncer. Além disso, tem sido demonstrado que o processo inflamatório crônico pode estar relacionado diretamente ao dano do DNA cromossômico levando a mutações potencialmente cancerígenas, pois proporciona um microambiente que facilita a transformação, angiogênese e metástase de células. Esse processo ocorre devido às quantidades excessivas de radicais livres e diminuição dos mecanismos antioxidantes do organismo, levando ao estresse oxidativo, o qual tem sido associado a diversos passos envolvidos na formação de tumores (VAN ESCH; KOOL; VAN, 2013; LAI et al., 2011; TANIGUCHI; KARIN, 2018; MANTOVANI, 2018).

Por isso, apesar do processo inflamatório ser indispensável para a homeostase do indivíduo, os efeitos deletérios causados por essa resposta exigem, em determinados casos, a intervenção farmacoterapêutica. Os fármacos geralmente prescritos e que são capazes de interferir neste processo reacional do organismo são: glicocorticóides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). No entanto, a utilização desses medicamentos geralmente está associada a diversos efeitos secundários graves. Nesse sentido, cita-se, por exemplo, o uso dos corticosteróides que estão associados ao surgimento da síndrome de Cushing, além de outros efeitos adversos, tais como: hiperglicemia, aumento da susceptibilidade à infecção e perturbações psiquiátricas (KUMAR et al., 2016).

A lesão gástrica causada por AINEs tem sido geralmente associada com a inibição não específica de isoformas da cicloxigenase (COX), bloqueando assim a produção de substâncias endógenas responsáveis pela reepitelização gástrica como, por exemplo, a inibição de prostaglandinas (PGs), em especial a PGE₂ (RAINSFORD, 1987). No entanto, outros mecanismos têm sido propostos para contribuir para a toxicidade gastrointestinal induzida por esse grupo de fármacos, que incluem alterações da microbiota intestinal, interferência no

recrutamento de neutrófilos, desacoplamento da cascata de fosforilação oxidativa e despolarização do potencial de membrana (RAVEENDRAN et al, 2008; MIRAGLIA et al., 2018).

Diante disso é de suma importância a busca por alternativas terapêuticas que possuam atividade anti-inflamatória sem causar tantos efeitos deletérios como os dos atuais fármacos. Desde os primórdios da sociedade o reino vegetal tem sido uma fonte imprescindível para a descoberta de novas drogas, e os produtos naturais representam uma fonte importante para a investigação destinada a descoberta de novas substâncias com atividades farmacológicas. Muitas pesquisas com produtos naturais têm guiado o desenvolvimento da química orgânica levando a avanços em metodologias sintéticas, possibilitando a síntese de compostos com estruturas químicas análogas aos produtos naturais, com isolamento da molécula biotiva proporcionando menor toxicidade dessas moléculas (PATERSON; ANDERSON, 2005; NEWMAN, 2008; GANESAN, 2008; CRAGG; NEWMAN, 2013; DAVID; WOLFENDER, 2015).

Dentre os produtos naturais os ácido fenólicos vem se destacando pelos seus efeitos plurifarmacológicos e possuem uma gama de atividades tais como: bactericida, antiviral, antialérgico, antitrombótico, anticarcinogênico, hepatoprotetor, vasodilatador e anti-inflamatório. (RUIZ-BARBA et al, 1990; KUJUMGIEV et al, 1999; NIJVELDT et al, 2001; KRIS-ETHERTON et al, 2002; CAMPOS, 2015). Uma desses compostos que vem se destacando é o ácido vanílico onde estudos experimentais forneceram evidências de sua eficácia em doenças cardiovasculares, gastrointestinais, doenças do fígado e anti-inflamatória em processos agudos. Onde ele atua inibindo a síntese de inúmeros mediadores que se elevam durante os processos inflamatórios e também pode atuar diretamente na peroxidação lipídica (ITOHE et al., 2009; KIM et al., 2010; KIM et al., 2011; LEAL et al., 2011; PRINCE; RAJAKUMAR; DHANASEKAR, 2011; SEVGI, TEPE, SARIKURKCU, 2015; CALIXTO-CAMPOS et al., 2015; DIANAT et al., 2016; VINOTHIYA E ASHOKKUMAR, 2017).

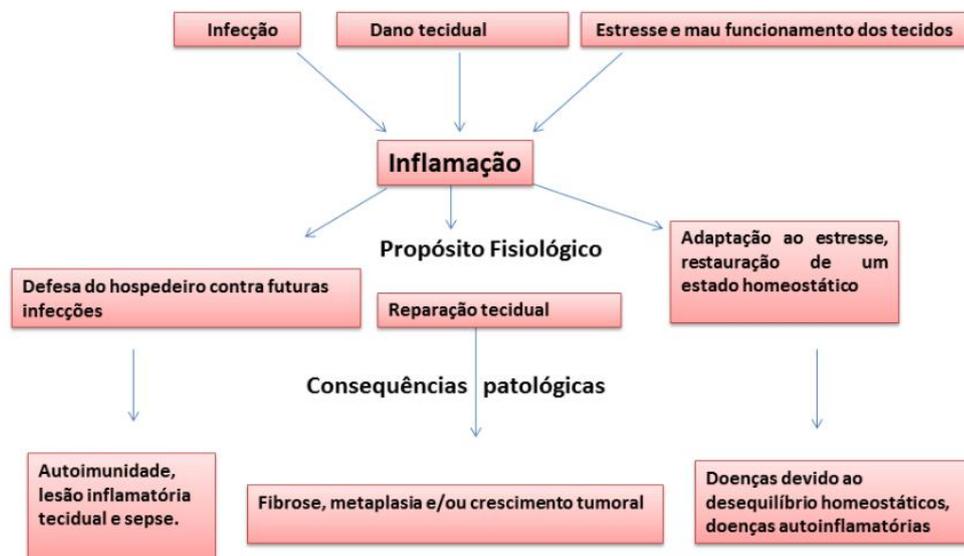
Diante de tais atividades do ácido vanílico o vanilato de isopropila (ISP-VT), foi formulado visando a sua atuação em de novos alvos farmacológicos. Para isso, a síntese foi realizada promovendo modificações químicas em sua estrutura, como a adição de um grupamento metil e um radical éster com a finalidade de melhorar sua atividade farmacológica. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial anti-inflamatório antioxidante e antipirético de um derivado semissintético do ácido vanílico o vanilato de isopropila (ISP-VT).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é uma resposta protetora do organismo frente a estímulos nocivos, é uma resposta defensiva, que desencadeia profundas adaptações fisiológicas numa tentativa de limitar os danos no tecido e remover o agente patogênico (Figura 1). Tais mecanismos envolvem uma série complexa de eventos, incluindo a dilatação de arteríolas, vênulas e capilares com aumento da permeabilidade vascular, exsudação de fluidos, incluindo as proteínas do plasma e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório, originando as características macroscópicas da inflamação conhecidos como sinais cardinais que são: dor, rubor, calor, edema e perda de função (MENKIN, 1956; LALRINZUALI; VABEIRYUREILAI; JAGETIA, 2016).

Figura 1. Causas e fatores fisiológicos e patológicos da inflamação.



Causas e fatores fisiológicos e patológicos da inflamação. Dependendo do agente causador a resposta inflamatória tem um propósito fisiológico e consequências patológicas diferente. (Adaptado e modificado de MEDZHITOV, 2008).

Dessa forma, a resposta inflamatória pode ser desencadeada por diversos estímulos, tais como: de origem endógena (tecidos em necrose, estadiamento tumoral), exógena oriunda de infecções causadas por microrganismos, por traumas (contuso ou penetrante), agentes físicos

(queimaduras ou congelamento) e químicos (radiação e substâncias químicas ambientais) (RAINSFORD, 2007; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012).

Com isso, na tentativa de promover reparo tecidual e frear a disseminação de uma infecção, a resposta inflamatória aguda se configura como um dos principais mecanismos associados ao sistema imune inato. Além disso, vale a pena ressaltar a importância da ativação do Sistema Complemento. Sabe-se que, esse sistema é composto por três vias compostas por cascatas proteolíticas que culminam na formação de um Complexo de Ataque a Membrana (MAC), bem como a perpetuação de cascatas inflamatórias. Duas vias do Complemento estão associadas a imunidade inata, uma via alternativa, a via das lectinas; e a via associada a imunidade adquirida humoral, denominada de via Clássica. Esta última, é iniciada pela interação de Imunoglobulinas M e G (IgM e IgG, respectivamente) com antígenos. (HORADAGODA, 1999; KHAN, F.A.; KHAN, 2010).

Entretanto, para a ativação e perpetuação da inflamação é necessário que ocorra o reconhecimento do agente agressor por componentes celulares, assim os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores Toll-Like (TLRs) e receptores do tipo NOD-like (NLRs), são as moléculas responsáveis pela identificação tanto de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (ácidos nucleicos, LPS, ácido lipoteicoico) de origem infecciosa, como também de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são endógenos e geralmente são liberados no sítio da lesão como proteínas do choque térmico (HSP) e espécies reativas de oxigênio (EROS). (ZHANG et al., 2007; ROCK; KONO, 2008; RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2008; FANG et al., 2015).

Além disso, pode-se inferir que, existem vários mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório. Tais moléculas podem ser oriundas de proteínas plasmáticas liberadas imediatamente no sítio inflamatório, ou podem ser de origem tissular como as aminas vasoativas, Fator de Ativação Plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas. Essas substâncias se ligam a receptores específicos nas células, aumentando a permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia de neutrófilos e estimulando a contração da musculatura lisa. Como consequência de tais eventos, pode-se ter elevação da atividade enzimática, indução da dor e aumento do estresse oxidativo (SHAILASREE et al., 2012). Esses mediadores, dependendo da sua duração no local da injúria, funcionam como gatilho para determinar a severidade do processo. Desse modo, a remoção bem sucedida do estímulo desencadeante leva a resolução aguda e reparação tecidual completa. (SERHAN et al., 2008; CRUVINEL et al., 2010).

No entanto, apesar da inflamação ser um mecanismo de defesa do organismo contra estímulos nocivos e também ter uma papel essencial no processo de cicatrização e reparo tecidual, os eventos complexos e ação de mediadores envolvidos nessa reação podem se perpetuar levando a efeitos deletérios e atuando de forma agravante em muitas doenças incluindo a artrite reumatoide, osteoartrite, aterosclerose, diabetes mellitus, processos de neurodegeneração e câncer (MEDZHITOV, 2008; HEADLAND; NORLING, 2015).

De forma mais conceitual, o processo inflamatório pode ser dividido em duas fases: aguda e crônica. A forma aguda tem curta duração (minutos, horas ou poucos dias) é caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido ou exsudato rico em proteínas, com formação de edema, migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado, e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; RAVEENDRAN et al., 2008; MEDZHITOV, 2008; SOSTRES; GARGALLO; LANAS, 2010).

Se essa fase falhar em eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características, um estado inflamatório crônico se segue, envolvendo a formação de granulomas estando associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual, além da deposição excessiva de espécies reativas de oxigênio (DRAY et al., 1995; SERHAN; SAVILL, 2005; SERHAN et al., 2007; ROCK; KONO, 2008. FRANCESCHI; CAMPISI, 2014; SERHAN; CHIANG; DALLI, 2001).

2.2 EVENTOS VASCULARES

A evolução da inflamação tem início imediato após o dano. Em condições normais as células e proteínas plasmáticas migram de forma livre no sentido do fluxo sanguíneo, porém ao sofrer algum estímulo lesivo esses vasos alteram sua permeabilidade para facilitar a passagem de leucócitos para o local da inflamação. Com isso, observa-se uma vasodilatação das arteríolas pré-capilares que aumenta o fluxo sanguíneo para o tecido lesado, uma condição conhecida como hiperemia. Com o reconhecimento do indutor da inflamação, a resposta imediata é mediada por células sentinelas, tais como macrófagos residentes nos tecidos e mastócitos (MITCHELL et al., 1995; KHAN; KHAN, 2010).

As células residentes levam a produção de mediadores inflamatórios como quimiocinas A interleucina-8 (CXCL8), proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2), citocinas pró-inflamatórias Interleucina 1 (IL-1), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), aminas vasoativas (histamina e serotonina), eicosanoides prostaglandinas E2 (PGE2), prostaciclina (PGI2) e produtos de cascatas proteolíticas. Tais mediadores vão atuar sobre o endotélio vascular nas

vénulas pós-capilares, levando ao aumento da vasodilatação, expressão de moléculas de adesão (P-selectina e E-selectina), elevação do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular seguida de exsudação de líquidos (CRUVINEL et al., 2010; FERNANDES et al., 2015; LIU; CAO, 2016).

Adicionalmente, os macrófagos residentes liberam citocinas inflamatórias, como a IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas. Tanto a IL-1 como TNF- α induzem vias de sinalização que levam a ativação de fator nuclear kappa B (NF κ B) o qual desempenha um papel chave na indução das respostas inflamatórias e imunes. Ainda, em consequência ao extravasamento plasmático, ocorre o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea, marginação leucocitária e migração destas células para o tecido extravascular (SHAKHOV et al., 1990; MULLER, YOSHIDA, 1995; SERHA.; SAVILL, 2005; KUMAR et al., 2012; MCMASTER et al., 2015).

Outra característica relevante da inflamação aguda é o edema, causado principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular, que conduz ao extravasamento transvascular de fluido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício. A sua formação se deve ao grande acúmulo de fluido na matriz extracelular no espaço intersticial que em conjunto com a vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios, que aumentam o fluxo de plasma e levam ao acúmulo de exsudato no tecido. (MACKOW; GORBUNOVA; GAVRILOVSKAYA, 2014).

A primeira fase da resposta envolve mudanças hemodinâmicas, logo em seguida os mediadores inflamatórios atuam de forma indireta, através da estimulação de células endoteliais para a liberação de mediadores que, então, irão relaxar o músculo liso vascular. Assim logo após a lesão ou trauma se observa também o rubor e o calor local resultantes da vasodilatação, que por sua vez é causada pela liberação de mediadores como prostaglandinas (PGs), PGI₂, histamina, serotonina (5-HT), bradicinina e NO que juntos promovem a vasodilatação. Outros mediadores também contribuem no aumento da permeabilidade vascular como constituintes do sistema complemento (proteína C5a), os leucotrienos e citocinas como IL-1 β e TNF- α , particularmente por induzirem a síntese de receptores B1 de bradicinina, potencializando assim o edema inflamatório (DE OLIVEIRA et al., 2011; MACKOW; GORBUNOVA, 2014; DE TONI, 2015; KIMURA et al., 2015; SHAJIB; KHAN, 2015; PANDEY; KUMAR, 2016).

2. 4 EVENTOS CELULARES

De forma majoritária nos tecidos, a cascata de recrutamento de leucócitos envolve essencialmente as seguintes etapas que é a marginalização, rolamento, adesão, seguido pela transmigração e migração para os tecidos. O recrutamento de células para o sítio inflamatório é um fenômeno fundamental na resposta inflamatória que requer a interação específica e a consequente sinalização entre as células endoteliais e leucócitos que são resultantes da estimulação por mediadores inflamatórios (aminas vasoativas, leucotrienos e citocinas) que são oriundos de leucócitos residentes que os liberam imediatamente ao entrarem em contato com patógenos (VAN MIERT, 2002; SHERWOOD; OLIVERKINSKY, 2004; PHILLIPSON ; KUBES, 2011; SADIK; KIM; LUSTER, 2011; COLGAN, 2015).

Tais mediadores como citocinas (TNF- α e IL-1 β) e quimiocinas (CXCL8), originários da infecção ou liberados por leucócitos teciduais, são responsáveis em formar gradientes que guiam os leucócitos ao sítio inflamatório, por outro lado estes podem ser liberados em resposta a estimulação por PAMPs ou DAMPs, uma vez ativados eles, acionam às células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares do local da agressão, levando assim, a um aumento da expressão de moléculas de adesão em sua superfície (E-selectina, P-selectina) que interagem com ligantes nos leucócitos (L-selectina) fazendo com que essas células trafeguem de forma mais lenta e rolem sobre o endotélio (LANGER et al., 2009; KRYSKO et al., 2012; ORTMANN et al., 2017).

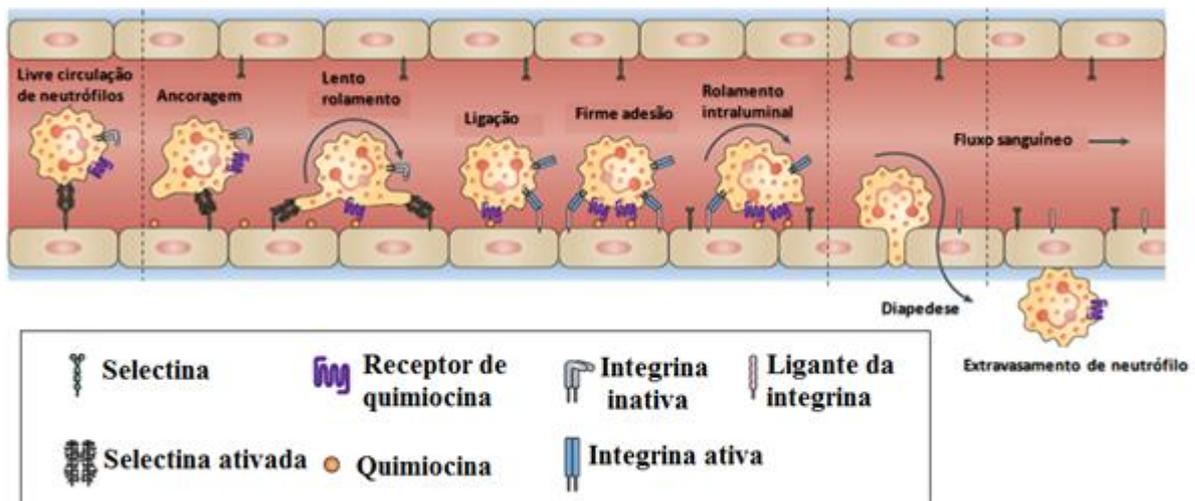
Em decorrência das alterações vasculares, redução do fluxo sanguíneo e expressão de ligantes de selectinas nos leucócitos, as células sanguíneas deixam a posição axial no interior dos vasos e assumem uma posição marginal, isto é, passam a circular mais próximas do endotélio vascular, permitindo assim, uma maior interação e consequente ligação as superfície, entretanto essa interação ainda é de baixa afinidade sendo rapidamente rompida pela força de cisalhamento do fluxo sanguíneo, ou seja, os leucócitos se fixam no endotélio, mas não de forma efetiva e se desprendem, para logo em seguida ligar-se novamente sobre o endotélio vascular (PHILLIPSON; KUBES, 2011; MULLER, 2013; PANDEY; KUMAR, 2016).

Adicionalmente esse rolamento faz com que os leucócitos interajam com as quimiocinas já liberadas e ancoradas na superfície endotelial e levem a uma mudança conformacional das integrinas ICAM 1 e 2 (moléculas de adesão intercelular 1 e 2) e VCAM-1 (molécula de adesão vascular 1) fazendo com que assim seja possível uma interação com maior afinidade com seus respectivos ligantes presentes nos leucócitos, que resultará na firme fixação e captação dessas células ao endotélio (SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008; LANGER; CHAVAKIS, 2009).

Por último, o estágio final da cascata de adesão dos leucócitos se dá com o processo de transmigração paracelular, os leucócitos rolam sobre a superfície endotelial e finalmente

deixam os vasos através de interações com moléculas das imunoglobulinas como PECAM-1 e JAM-A para que ocorra a ruptura transitória e reversível das proteínas, que mantêm unidas entre si as células endoteliais. Contudo, antes de atravessar o endotélio, neutrófilos e monócitos rolam na superfície dos vasos sanguíneos de uma forma dependente de MAC1 e ICAM1, buscando locais preferenciais de transmigração (Figura 2), (COUSSENS; WERB, 2002; LUSTER; ALON; ANDRIAN, 2005).

Figura 2: Representação esquemática do recrutamento de neutrófilos.



Na figura são mostrados os passos sequenciais do recrutamento de neutrófilos da vasculatura para o tecido e os principais grupos de moléculas de adesão. (Adaptado e modificado de KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

2.5 NEUTRÓFILOS

Ao longo de milhões de anos de processo evolutivo, os animais vertebrados foram capazes de desenvolver um complexo sistema de defesa contra a presença de patógenos, onde a fagocitose representa um antigo mecanismo de adaptação celular. Em organismos primitivos, ela é utilizada inicialmente para a aquisição de nutrientes, por outro lado, em organismos superiores, ela é desempenhada por células especializadas tornando-se indispensável na realização de uma grande variedade de eventos biológicos especializados como a imunidade. (ZEMAN, 1999; ADEREM, 2003; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014)

Dessa forma, os neutrófilos, eosinófilos e monócitos, que são células fagocitárias, desempenham um papel fundamental para a sobrevivência do organismo. Estas células sanguíneas da série branca conseguem reconhecer, fagocitar, matar e eliminar grande parte dos

agentes patogênicos que invadem o corpo do hospedeiro. Estas células são constituídas a partir de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes oriundas da medula óssea. (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003; MAYERSCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Nos mamíferos, os grânulos podem ser classificados de azurófilos (primários), específicos (secundários) e gelatinase (terciários) eles estão localizados em lisossomas e vesículas secretoras variando em suas proporções de acordo com a sua finalidade. Após a degranulação, o conteúdo dos grânulos pode ser libertado diretamente no fagossoma ou no exterior da célula. Os grânulos classificados como azurófilos ou grânulos de peroxidase positiva são os primeiros a ser produzidos durante a maturação dos neutrófilos, são assim chamados por sua capacidade de assumir a cor azul em corante básico e conter mieloperoxidase (MPO), uma enzima fundamental para a explosão oxidativa. (KRUGER et al., 2015; ODOBASIC; KITCHING, 2016).

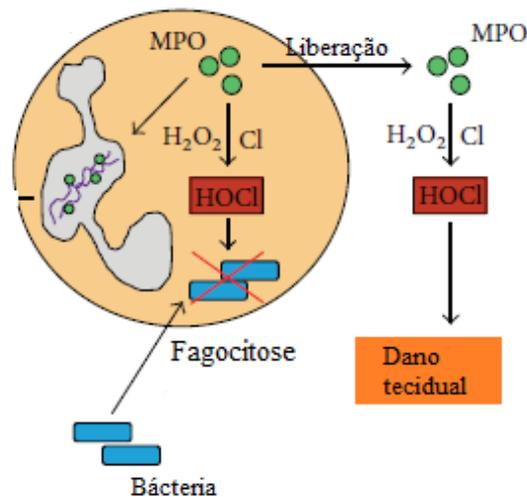
Inicialmente tem-se a adesão de células de endotélio vascular ativado, logo após tem-se o extravasamento da circulação, migração para sítios inflamatórios, e, por último, destruição *in situ* de patógenos (KAPLAN, 2011). Ao alcançar o patógeno, o neutrófilo o engloba em um fagossoma, assim, ocorre a integração do fagossoma com grânulos citoplasmáticos, logo depois a degranulação, formando o fagolisossoma. Os microrganismos são eliminados por peptídeos antimicrobianos e ocorre a estimulação das vias metabólicas que levam a um aumento do consumo de oxigênio, via *burst* respiratório, produzindo intermediários reativos de oxigênio e de azoto que lesionam não só os organismos patogênicos como também as células e os tecidos do organismo (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004 EL-BENNA et al., 2016).

Essa ativação de neutrófilos via do *burst* respiratório se dá pela montagem do complexo conhecido como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidase) na membrana plasmática do fagossomo, lugar em que começa a cascata das espécies reativas de oxigênio, pela redução do oxigênio molecular a superóxido (O_2^-). O superóxido, ainda que não seja um oxidante forte, imediatamente sofre dismutação, formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KLEBANOFF, 1980; WRIGHT, 2010).

Esse superóxido pode reagir ainda com NO, que é um mediador altamente produzido em sítios inflamatórios, para formar peroxinitrito (ONOO-), um oxidante forte e reativo. Logo após a degranulação no fagossomo, a MPO pode reagir com o H_2O_2 para produzir inúmeras espécies reativas, como por exemplo, haletos ácidos. Dentre eles o ácido hipocloroso (HOCl) que é o principal produto da mieloperoxidase (MPO) no fagossomo, portanto, a geração das

EROs e do ácido hipocloroso durante a fagocitose é considerado o mecanismo crítico na destruição da maioria dos patógenos invasores, por outro lado é responsável por causar o dano tecidual (HAMPTON,1999; ZHANG et al., 2002; WINTERBOURN, 2006; PARKER, 2013; WINTERBOURN; KETTLE; BJORNSDOTTIR et al., 2015; ORTMANN; KOLACZKOWSKA, 2018).

Figura 3: Envolvimento da MPO na função de neutrófilos.



A MPO pode reagir com o H_2O_2 para produzir inúmeras espécies reativas, como por exemplo, haletos ácidos. (Fonte: ODOBASIC et al., 2016 Adaptado).

2.6 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Os mediadores podem ser produzidos pelas células ou então possuem a capacidade de circular no plasma como precursores inativos, que serão ativados no local da inflamação. São classificados de acordo com sua origem, que pode ser plasmática, advindo das cascatas das cininas, coagulação, fibrinólise, do sistema complemento, ou de origem tecidual, como as aminas vasoativas, eicosanoides, enzimas lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas, óxido nítrico, citocinas e neuropeptídeos (LARSEN; HENSON, 1983; SACCA; CUFF; RUDDLE, 1997; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; FERNANDES et al., 2015; PARK et al., 2015; WEST, SHADEL, 2017).

O sistema de cininas é responsável por gerar peptídeos vasoativos, através da ação de proteases específicas, as calicreínas, sobre proteínas plasmáticas chamadas cininogênios. A cascata que produz as cininas, cujo principal representante é o nonapeptídeo bradicinina, é desencadeada pela ativação do fator XII da via intrínseca da coagulação (chamado fator de

Hageman) (SACCA; CUFF; RUDDLE, 1997; CAMPBELL, 2001; ALLER et al., 2007; CRUVINEL, 2010.).

Dentre as cininas a bradicinina é um peptídeo vasoativo que contém nove aminoácidos (nonapeptídeo) e gerada a partir da clivagem proteolítica do cininogênio (precursor inativo) por ação da enzima calicreína, com envolvimento do fator de Hageman (fator XII da via intrínseca da coagulação), que por sua vez, é ativado pelo contato com colágeno e membrana basal. Bradicinina tem a capacidade de modular inúmeros eventos inflamatórios dentre eles a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, o extravasamento de plasma, a migração celular, bem como a dor e hiperalgesia, e também atua na produção secundária de outros mediadores como a PGE₂, citocinas, produtos derivados de mastócitos e NO e tem efeito quimiotático, participando na migração dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos) e monócitos durante a inflamação (REGOLI; BARABE, 1980; COSTELLO; HARGREAVES, 1989; EDDLESTON et al., 2003; KRÄNKEL et al., 2008; KUHR et al., 2010; IOVINO et al., 2014; HOFMAN et al., 2016; QADRI; BADER, 2018).

Outros mediadores são as aminas vasoativas (histamina e serotonina), possuem ação sobre a vasculatura. Estes mediadores são armazenados em grânulos celulares, tem ação rápida, e são liberados de forma imediata logo após o dano ou estímulo agressor. Atuam principalmente sobre os vasos sanguíneos e são mediadores que causam a sensação de dor na inflamação, através de sua ação sobre os neurônios sensoriais (SPECTOR; WILLOUGHBY, 1964; KUPRASH; NEDOSPASOV, 20016).

A Histamina [2- (4-imidazole) etilamina] é sintetizada do aminoácido histidina, sob ação da L-histidina decarboxilase, ela atua como um neurotransmissor no sistema nervoso central (FAUSTINO-ROCHA, 2016). Sua liberação ocorre pelo processo de exocitose de mastócitos, durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com imunoglobulina E fixados nos mastócitos. A histamina exerce seus efeitos mediante a ligação e ativação de seus receptores específicos :H₁, H₂, H₃ e H₄. Todos estes receptores pertencem à família de receptores acoplados a proteína G e são expressos por várias células e tecidos e estão relacionadas a processos inflamatórios e alérgicos, tais como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco e broncoconstrição (RILEY; WEST, 1953; HUANG; THURMOND, 2008; RIBATTI, 2016).

A serotonina (5-HT), também conhecida como 5-hidroxitriptamina é uma monoamina, gerada a partir de triptofano e serve como substrato para a síntese de diversas moléculas. É uma molécula sinalizadora que afeta os sistemas imune, gastrointestinal e nervoso de forma

parácrina, endócrina e de sinalização dependente de contato. Ela atua com um poderoso agente estimulante das terminações nervosas sensitivas para a dor e prurido, sendo também responsável por produzir rubor. A 5-HT possui ações semelhantes às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SJOERDSMA; WAALKES; WEISSBACH, 1957; KUSHNIR-SUKHOV et al., 2007; SIKANDER; RANA; PRASAD, 2009; STEINER, 2011; ARREOLA et al., 2015).

2.6.3 NFκB

A ativação da família de transcrição NF-κB, por translocação nuclear de complexos citoplasmáticos, desempenha um papel central na inflamação através da sua capacidade de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios. A via clássica do NF-κB é a maior via envolvida na sinalização pró-inflamatória. Após a sua estimulação por várias substâncias como sinais de estresse, patógenos, radicais livres, citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacáridos bacterianos, promotores tumorais, irradiação ultra violeta (UV), infecções virais, dentre outros (SCHRECK; BAEUERLE, 1991; SCHRECK; ALBERMANN; BAEUERLE, 1992; VILE ; TANEW-ILIITSCHIEW; YRRELL, 1995; LAWRENCE, 2009).

A ativação de NF-κB pode induzir a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8), quimiocinas, moléculas de adesão tais como selectina E, ICAM-1 e VCAM-1, COX-2 e iNOS. A ativação constitutiva de NF-κB é observada nos principais locais de inflamação em muitas doenças, tais como esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e asma (SCHMIDT, et al., 1995; WANG; MAYO; BALDWIN, 1996; SMITH et al., 1997; BAEUERLE; BAICHWAL, 1997; DIDONATO et al., 1997; LAWRENCE, 2009; BAGCHI, 2016).

2.6.4 Citocinas

As citocinas são pequenos peptídeos ou glicoproteínas que variam de tamanho de 8 a 30 kDa, podem ser produzidas por diferentes tipos celulares, e desempenham funções efetoras sobre processos imuno-inflamatórios, assim como, atuam sobre a regulação das respostas imunológicas, tidas, portanto, vitais para a defesa do hospedeiro. Essas moléculas, também são responsáveis na manutenção de processos fisiológicos e metabólicos normais como diferenciação, sobrevivência, crescimento e metabolismo celular. As citocinas não são

armazenadas como moléculas pré-formadas, e possuem inúmeros papéis, uma vez que, podem atuar de forma autócrina (sobre as células que as produzem) de forma parácrina (em células vizinhas) ou, em alguns casos ter uma ação endócrina (em células distantes) (CAVAILLON, 1995; DINARELLO, 1997; ZHANG; AN, 2007; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010; DE OLIVEIRA et al., 2011).

Essas moléculas podem ser classificadas em interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN), fator estimulador de colônias, fator de crescimento transformador e quimiocinas, ou podem ser classificadas conforme sua atividade biológica as que possuem geralmente atividade pró-inflamatória (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e TNF- β) e/ou anti-inflamatória (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β). A ativação de seus efeitos ocorre por meio de duas vias principais de sinalização, pela ativação de receptores tirosina quinase que ativam a via Janus quinase (JAK-STAT) ou pela ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF- κ B. (OPAL; DEPALO, 2000; HIRANO; ISHIHARA; HIBI, 2000; LEONARD; LIN, 2000; DINARELLO, 2007; BAKE; HAYDEN; GHOSH, 2011; FLOEGE; LUSCHER; MULLER-NEWEN, 2012).

A IL-1 (α e β) e o TNF- α dentre as citocinas mediadoras da inflamação aguda, merecem destaque por possuírem potentes ações pró-inflamatórias e mediar a atividade de muitas outras células. A IL-1 β , ela é encontrada em macrófagos, monócitos e células endoteliais, quando ativadas durante uma infecção. A IL-1 β , em pequenas concentrações promove a inflamação local por atuar diretamente no endotélio, promovendo o aumento de moléculas de adesão, ativando os leucócitos e recrutando-os para o sítio inflamatório. Por outro lado, em altas concentrações, a IL-1 β promove a ativação do NF- κ B e induz ao quadro de febre por promover aumento na síntese de COX-2, portanto aumentando os níveis de PGE2 no centro termorregulador do hipotálamo (JOVANOVIC et al., 1998; DINARELLO, 2005; ZHANG et al., 2008; SADIK.; KIM; LUSTER, 2011; SCHETT et al., 2013; PALOMO et al., 2015; WYNN, 2015).

As citocinas TNF- α e IL-6 também tem papel importante no início da resposta inflamatória. O TNF- α é produzido por diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, monócitos, células T, células musculares lisas, adipócitos, e fibroblastos, suas respostas biológicas são mediadas através de dois receptores estruturalmente distintos: receptor do fator de necrose tumoral tipo I (TNF-RI) e tipo II (TNF-RII), que estão presentes na membrana de todos os tipos celulares com exceção dos eritrócitos. Uma vez ativados, esses receptores podem recrutar proteínas adaptadoras que levam a ativação das vias NF- κ B e JNK e conseqüentemente a sobrevivência da célula. Por outro lado, a sua ativação pode recrutar outras proteínas

adaptadoras como FADD e procaspase-8, que é posteriormente ativada para iniciar o processo de apoptose. (HALE et al., 1995; LI; YANG; ASHWELL, 2002; GAUR; AGGARWAL, 2003; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH; 2003; LIU, 2005; BRENNER; BLASER; MAK; 2015).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, podendo ter ação pró ou anti-inflamatória, é produzida por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais de tecidos inflamados sendo induzida principalmente por LPS, IL-1 β , TNF- α e alguns interferons. Atua como um mediador importante no estímulo de proteínas de fase aguda e medeia também a transição do recrutamento de neutrófilos para macrófagos pelo estímulo da produção de CCL2 (MCP-1), um potente quimiotático de monócitos. A IL-6 é ativada ao ligar-se ao seu receptor IL-6R que pode ser expresso na membrana de diversos tipos celulares e também na forma solúvel e essa combinação IL-6/IL-6R solúvel é comumente encontrada em exsudatos inflamatórios ricos em neutrófilos (TILG; DINARELLO; MIER, 1997; ROMANO et al., 1997; DESHMANE et al., 2009; GABAY, 2006; MOLLER; VILLIGER, 2006; SCHETT et al., 2013).

2.6.5 PGE2

A PGE2 pode ser sintetizada por três PGE sintases: prostaglandina E microsomal sintase (mPGES) -1 e 2 e prostaglandina E sintase citosólica (cPGES). Isso está envolvido em uma ampla gama de processos fisiológicos incluindo a regulação de manutenção da integridade gastrointestinal, funções renais e reprodução. Além disso, a PGE2 é um modulador da inflamação e da imunidade. Este último, é predominantemente realizado através da expressão induzida de mPGES-1. Tal como a COX-2, a expressão de mPGES-1 é indutível em condições pró-inflamatórias e estas duas enzimas são predominantemente acopladas funcionalmente para gerar alta expressão de PGE2 Sob condições inflamatórias, além disso a PGE2 está envolvida no processo de febre associada a isoforma da COX hipotalâmica. (FERREIRA; MONCADA; TAKANISHI, 1973; HARRIS et al., 2002; RICCIOTTI; FITZGERAL, 2011; OBERMAJER, 2011; NAKANISHI; ROSENBERG, 2013; KAWAHARA, 2015).

2.7 FEBRE E EFEITO ANTIPIRÉTICO

A febre, é colocada como um dos componentes da resposta inflamatória de fase aguda mais facilmente observado é definida como uma elevação controlada da temperatura corporal em resposta do organismo a uma lesão, trauma ou invasão de agente infeccioso. Essa elevação regulada da temperatura interna do organismo para níveis acima dos basais ocorre por causa da

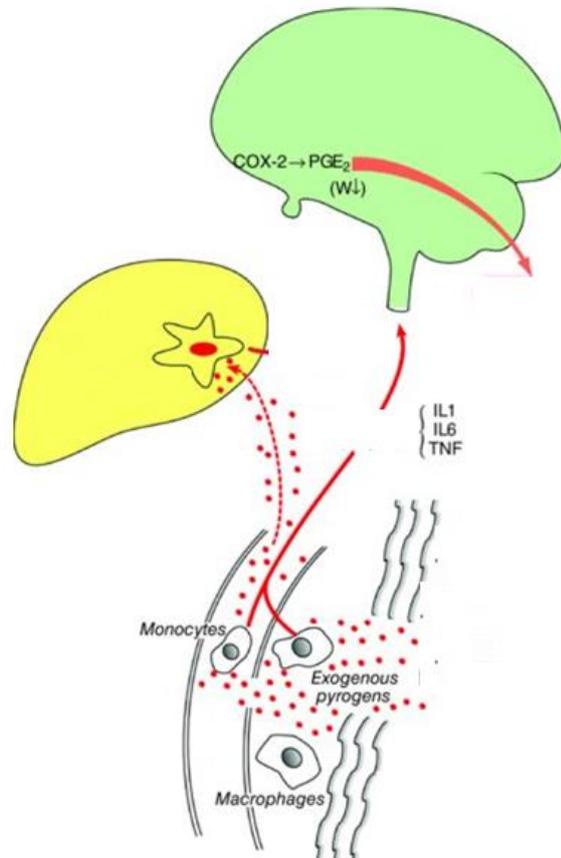
alteração do balanço térmico modulado pelo hipotálamo. O organismo tenta se adaptar elevando o ponto de ajuste a fim de manter a temperatura elevada através de mecanismos que garantam a produção e a conservação de calor (ROMANOVSKY; SZEKELY, 1998; ROMANOVSKY et al., 2005; HUBSCHLE, THOMAS et al., 2006; NARUMIYA; FURUYASHIKI, 2011)

Uma das teorias mais clássica de indução de febre mostra que esta é resultado de transmissões realizadas através da sinalização imunológica entre o sítio inflamatório e o Sistema Nervoso Central (SNC) Com base nessa teoria, as citocinas pró-inflamatórias excretadas pelos fagócitos na corrente sanguínea e no local do dano, como as interleucinas IL-1, IL-6, TNF- α e interferons, seriam levadas até à área pré-óptica anterior do hipotálamo anterior (APOHA) ou às suas proximidades, onde induziriam a expressão da COX-2 e da mPGES-1 que catalisam a síntese de PGE2 (BEESON, 1948; KLUGER, 1991; CAO et al., 1995; ZEISBERGER, 1999, LEON, 2002; ROTH et al., 2006).

Portanto o aumento da expressão de COX-2 pode representar o principal mecanismo responsável pela elevação da concentração de PGE2 no SNC e, como resultado tem-se a indução da resposta febril. Dessa forma, para que se inicie o processo de indução febril a PGE2 se liga a seu receptor PG, subtipo EP3 (USHIKUBI et al., 1998; OKA et al., 2003; MALVAR et al., 2011).

Dessa forma elevados níveis de PGE2, na APOHA, levam a indução de mudanças nos circuitos termorregulatórios do SNC e como efeito final a produção de febre. O uso de terapia antipirética é adequado em pacientes em que essa temperatura elevada, ultrapassa os benefícios de estimulação das defesas do hospedeiro com intuito de combater a infecção, e começa a causar danos ao organismo (ZEISBERGER, 1999; BLATTEIS, 2004, DINARELLO, 2006; BLATTEIS et al., 2005; BLATTEIS, 2006; CAVALCANTI et al., 2011; MALVAR et al., 2014).

Figura 4: Processo de indução da febre



Interação dos pirógenos endógenos na indução da febre e interação da PGE2

2.8 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Todos os organismos de vida aeróbica estão constantemente sujeitos ao efeito oxidante dos metabólitos reativos de oxigênio. O oxigênio molecular (O_2) é uma molécula essencial para a sobrevivência de organismos aeróbios, e de fundamental importância durante diversos processos vitais como: respiração celular, produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas. Ao mesmo tempo, é uma molécula capaz de gerar substâncias tóxicas a nível intracelular e extracelular. Nos sistemas biológicos os radicais livres são derivados de moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. (BENES et al.,1999; CIRCU; AW, 2010).

O termo radical livre é frequentemente usado para se referir a qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos, com número ímpar de elétrons em sua camada de valência. É a presença do(s) elétron(s) desemparelhado(s) que vai gerar a sua elevada reatividade e transformar as estruturas em compostos altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter

uma função oxidante ou redutora (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; DREHER; JUNOD, 1996; GROOTVELD; HALLIWELL, 1986).

Grande parte da geração das EROs, tem origem na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, especialmente a partir dos complexos I e III durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio. Ou podem ser geradas nas membranas celulares e no citoplasma das células no qual o seu mecanismo de formação tem interação com íons de ferro e cobre. As mitocôndrias desempenham um papel primordial no metabolismo celular aeróbio, sendo a principal fonte formadora de EROs. Outra fonte importante na geração de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases. Além delas, os peroxissomos, xantina oxidase e citocromo P-450 contribuem para a formação de radicais livres (AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1993; GOEPTAR, SCHEERENS; VERMEULEN; SKULACHEV, 1995; SKULACHEV, 1999; SKULACHEV, 2005; LUIS et al., 2006; HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015).

As EROs apresentam papel importante em várias funções fisiológicas, dentre elas a sinalização celular, expressão gênica e regulação da resposta imune. Por outro lado, seu papel nos sistemas biológicos é tanto benéfico quanto maléfico, uma vez que, em altas concentrações as EROs levam a muitos efeitos patológicos que culminam com disfunção celular, alterações na expressão gênica e proteica, oxidação de membranas celulares, podendo resultar em morte celular (RAJAGOPALAN et al., 1996; Adler et al., 1999; GRIENDLING et al., 2000; SIMON; HAJ-YEHIA; LEVI-SCHAFFER, 2000; HOIDAL, 2001; LUSHCHAK, 2014).

Pode-se mencionar que, os radicais livres derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando espécies reativas de oxigênio (EROS), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERS). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), é considerado ERO primária e como oxidante direto, é dito irrelevante. Ao interagir com outras moléculas, pode gerar EROs secundárias, por exemplo, no meio aquoso ocorre uma reação de dismutação, que vai gerar uma molécula de H_2O_2 e uma molécula O_2 . (ASADA, K.; KANEMATSU, 1976; CROSS et al., 1987; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; WINTERBOURN; METODIEWA, 1999; HALLIWELL, 2006; BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010).

O radical hidropoxila (HO_2) constitui a forma protonada do radical superóxido, esse radical é mais reativo pois tem uma maior capacidade de iniciar a destruição de membranas biológicas. Para a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é necessária a adição de um elétron e dois íons hidrogênio ao superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; GIROTTI et al., 1998; PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

O radical hidroxila (OH) é um dos radicais mais reativos, pois, tem um poder oxidante

elevado, sendo então considerado um dos radicais mais perigosos para o organismo. Esse radical ataca as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição de insaturações através da redução de quelatos de Fe (III), resultando na formação de Fe^{+2} através das reações de *Fenton* e de *Haber-Weiss*, que é quando há um excesso na produção do ânion superóxido e este reage com o peróxido de hidrogênio (WOLFF, 1986; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992 RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

Dentre as ERNs se destaca o óxido nítrico (NO), pode ser gerado no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintetase a partir da desagregação de L-arginina por óxido nítrico sintases para citrulina, do oxigênio, NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase) e dos fagócitos. Entretanto, o óxido nítrico não é muito reativo para atacar o DNA de forma direta, por outro lado ao reagir com O_2 que é produzido pelo fagócitos, gera o peronitrito, (ONOO-), conseqüentemente pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina levando a formação de nitrotirosina e causando dano nas bases do DNA, em particular a guanina, na qual o produto principal é a 8-nitroguanina (BECKMAN et al., 1990; PRYOR et al., 1995; PACHER; BECKMAN.; LIAUDET, 2007; Parker, 2013; RADI, 2018).

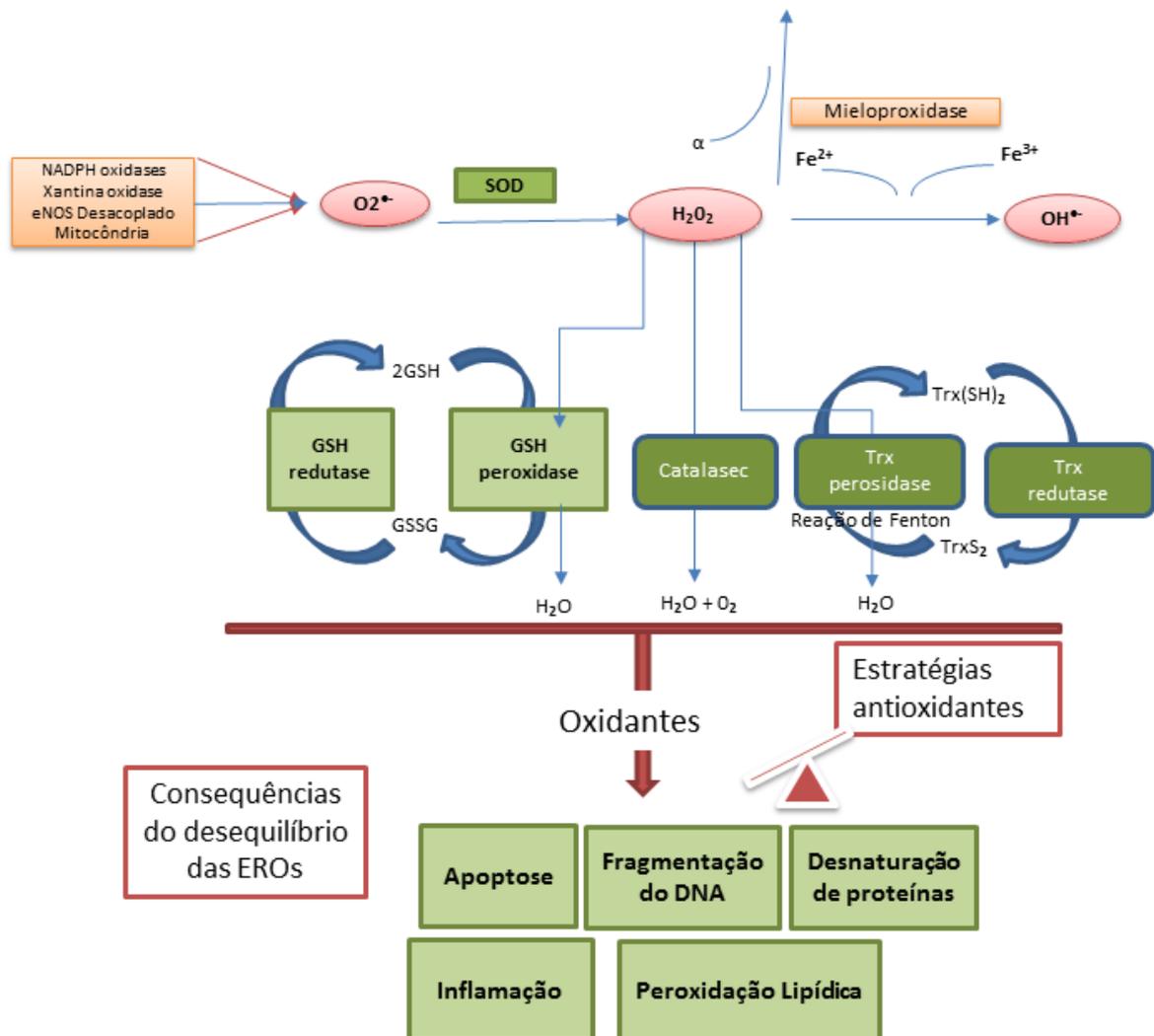
O estresse oxidativo pode ocorrer pela elevada produção de radicais livres, pela diminuição das defesas ou por ambos os processos simultaneamente. Ele ocorre quando há uma falta de equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, processo conhecido como peroxidação lipídica, que vai danificar biomoléculas essenciais na célula por oxidação dos lipídeos da membrana proteínas, hidratos de carbono, e de DNA. A peroxidação lipídica leva à perda da seletividade na troca iônica e à liberação do conteúdo de organelas (enzimas lisossômicas), além da formação de produtos citotóxicos, determinando a morte celular (MCCORD, 2000; VALKO et al., 2007. MUNNE- BOSCH; PINTO-MARIJUAN, 2016; PISOSCHI et al., 2015; ALOV, 2015).

Esse estresse oxidativo afeta diversas moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, e que está associado com a etiologia de uma grande variedade de doenças agudas e crônicas (KHANSARI et al., 2009), incluindo tumores malignos (KINNULA; CRAPO, 2000), doença de Parkinson (HWANG, 2013), doença de Alzheimer (SMITH et al., 2000; GUIDI et al., 2006), aterosclerose (SINGH e JIALAL, 2006), doenças cardiovasculares (HEITZER et al, 2001), além de estar associado com processos de morte celular, desordens imunes bem como processo de envelhecimento (RAMAKRISHNA et al., 1997; HYUN et al., 2006).

Além disso, a sinalização redox é importante nas vias de sinalização envolvido por várias condições inflamatórias. Pois a elevada produção de EROs pode regular a ativação de fatores de transcrição (NF- κ B e AP-1), e consequente produção de citocinas. Portanto o estresse oxidativo também pode ativa as próprias células inflamatórias e levar a produção de mediadores como citocinas e quimiocinas que induzem maior produção de EROs, levando a ativação de COX-2 e iNOs, TNF- α , IL-1, a IL-6 e outras quimiocinas, que também desempenham um papel chave na inflamação induzida por estresse oxidativo (DELERIVE et al., 1999; MORGAN; LIU, 2011; RAY; HUANG; TSUJI, 2012; ZHANG ; PARK et al., 2015; TSAO, 2016; YOUN et al., 2016).

De forma simplificada a interação das espécies reativas e do sistema de defesa antioxidante ocorre da seguinte forma o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser produzido pela da NADPH-oxidase, xantina oxidase, desacoplando a óxido nítrico sintase (eNOS), com a liberação de oxigênio ativado das mitocôndrias durante a respiração oxidativa. O O_2 pode ser convertido então, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode sofrer conversão espontânea em radical hidroxila (OH^{\bullet}) Através da reação de Fenton. O OH^{\bullet} é extremamente reativo a ataque aos componentes celulares. O H_2O_2 pode ser destoxificado através de glutathiona peroxidase (GSH), catalase ou tioredoxina peroxidase (Trx) para H_2O e O_2 (Figura 4). (DELERIVE et al., 1999; MORGAN; LIU, 2011; LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013; SHIRLEY; ORD; WORK, 2014).

Figura 5: Sistema antioxidante enzimático: Enzimas envolvidas na geração e na inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as consequências do desequilíbrio das EROs.



Consequências do desequilíbrio das EROs podem levar a apoptose, fragmentação do DNA, desnaturação de proteínas, além de exacerbação do processo inflamatório e a peroxidação lipídica, tais desequilíbrios podem levar ao desenvolvimento de inúmeras doenças. Fonte: adaptado DE LI; HORKE; FÖRSTERMANN, 2013; SHIRLEY; ORD;WORK 2014.

O termo antioxidante tem natureza multiconceitual e pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas naturais, presentes em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, podendo prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo de maneira eficaz. As células e tecidos do corpo são continuamente ameaçados pelos danos causados pelos radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que são produzidos durante o metabolismo normal do oxigênio ou podem ser induzidos por danos exógenos. Os organismos foram desenvolvendo diversos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis

intracelulares e impedir a indução de danos causados por esses radicais, esses sistemas incluem a quelação de minerais, atividade *scavenger* dos radicais livres e atividade enzimática para neutralizar estes radical depois de serem formados. (DE GROOT, 1994; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; SIES, 1993; HALLIWELL, 2005; ZHANG; TSAO, 2016)

Os antioxidantes são as moléculas responsáveis tanto por inibir quanto reduzir os radicais livres nas células, para ser um bom antioxidante algumas características são necessárias, algumas delas são: ter constituintes na molécula estrutural capazes de substituir os doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, por causa do seu potencial de redução; devem ser capazes de deslocar o radical formado em sua estrutura e a de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo além de ter acesso ao local de ação, dependendo de sua capacidade hidrofílica ou lipofílica e de seu coeficiente de partição (BIANCHI; ANTUNES, 1999; DIMITRIOS, 2006; LIOCHEV, 2013).

Gutteridge e Halliwell (2000) classificaram os antioxidantes como primários quando atuam prevenindo a formação de oxidantes, secundários quando atuam eliminando EROS e terciários quando atuam tanto removendo ou reparando moléculas modificadas oxidativamente. A defesa antioxidante pode ser dividida em dois grupos: o enzimático e o não enzimático. O primeiro inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), peroxidases como catalase e a glutaciona peroxidase, além de glutaredoxinas, tioredoxinas e glutaciona S-transferases (GST), elas representam as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores. O segundo consiste tipicamente em pequenas moléculas que são solúveis em um ambiente aquoso ou em um ambiente lipídico, que incluem glutaciona, ascorbato, tocoferóis, fitoquelatinas, poliaminas e metalotioneínas e outros produtos (MEISTER, 1995; ARUOMA, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; IRSHAD; CHAUDHURI, 2002; LOBO, 2010).

Uma molécula que está na primeiro na linha de degradação enzimática de EROs é a SOD, que foi descoberta em 1969 por McCord e Fridovich em sangue bovino. A atividade de SOD é encontrada em todos os organismos aeróbicos e em alguns organismos anaeróbicos, assim como em todos compartimentos subcelulares susceptíveis ao estresse oxidativo YASUI, BABA, 2006; LIOCHEV, 2013). Esta enzima catalisa a seguinte reação:



Os mamíferos possuem 3 isoformas da enzima SOD, de acordo com o metal em seu sítio ativo: a CuZn-SOD (Cobre e zinco; SOD1), a Mn-SOD (Manganês; SOD2) e a SOD extracelular ou EC-SOD (Ferro). Todos os SODs são transformações catalíticas de $\text{O}_2 \cdot -$ em H_2O_2 . A SOD é responsável por limitar a peroxidação lipídica e danos na membrana (HALLIWELL, 1987; MCCORD, 1985). Portanto, o aumento dessa enzima é importante na

manutenção do processo inflamatório, além da sua capacidade antioxidante a SOD também pode contribuir para indução da apoptose em neutrófilos (SCANDALIOS, 1993; MELOV et al., 1998; YASUI; BABA, 2006).

Além da SOD a glutathiona peroxidase (GPxs) representam um papel essencial na defesa enzimática contra o estresse oxidativo causado por hidroperóxidos. GPxs reduzem o H₂O₂ e os hidroperóxidos orgânicos, como os hidroperóxidos de ácidos graxos, ao álcool correspondente, usando o poder redutor fornecido pela GSH. Portanto, a GPx é geralmente considerado como representando a principal linha de defesa enzimática contra danos na membrana oxidativa. E a capacidade do sistema para reduzir a glutathiona a H₂O₂ depende da razão entre a GSH e a forma oxidada (GSSG), que por sua vez depende de dois procesos: transporte da GSSG para fora da célula e a capacidade de GSH redutase (CANTIN, 1987; ANTUNES; HAN; CADENAS, 1991; GUEMOURI, 1991; HERBETTE et al., 2007; SIES, 2017).

2.9 TERAPIA MEDICAMENTOSA

O ácido araquidônico (AA), apresenta papel regulador chave na fisiologia celular . É liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A, que pode ser ativada por diversos estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos e mitogênicos, que também ativam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1. O AA pode ser metabolizado pela via das cicloxigenases, dando origem a formação de PGs, prostaciclina (PI) e tromboxanos (TXs) ou pela via das lipoxigenases levando à síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (SAKAI et al., 2014; SACERDOTI et al., 2015).

A cicloxigenase (COX) é a enzima essencial na síntese de prostaglandinas a partir do seu precursor, o ácido araquidônico. São encontradas pelo menos duas isoformas de enzima cicloxigenase: a ciclooxigenase 1 (COX-1) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) que executam no organismo diferentes funções fisiológicas. A COX-1 está presente na maioria das células e sua expressão é constitutiva, sendo responsável pela síntese fisiológica de prostanóides. A COX-2 tem sua expressão induzida por estímulos inflamatórios como expressão de citocinas, fatores de crescimento, e estimulantes tumorais e apresenta cerca de 60% de homologia com a COX-1 (Figura 5) (SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011; SILVA et al, 2015).

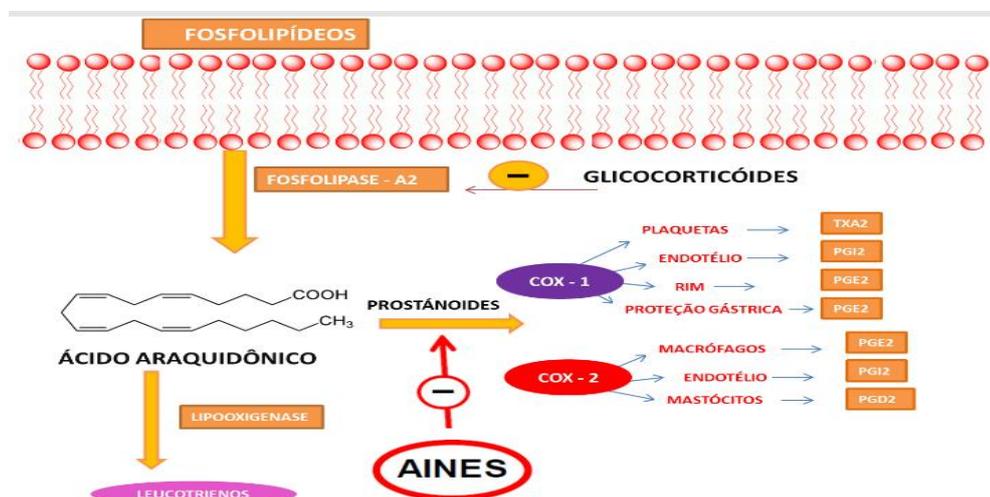
A COX-1 está expressa em quase todos os tipos de células, com exceção dos eritrócitos, levando a formação das prostaglandinas, especialmente, as relacionadas com ações fisiológicas como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Essa isoforma é encontrada na constituição do trato gastrointestinal, sendo

associada à produção de muco protetor e inibição da secreção ácida gástrica, enquanto que nas plaquetas está associada à síntese do tromboxano A_2 , um mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária (CROFFORD, 1997; VAN ESCH; KOOL; VAN, 2013).

Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico são chamados de eicosanoides. Eles constituem uma grande família de compostos formada pelas PGs, PIs, TXs e LTs, que possuem alta potência e garantem um amplo espectro de atividades biológicas. Os eicosanóides desempenham uma função imprescindível na indução e na facilitação de patologias, principalmente as doenças inflamatórias, de modo que, a supressão de suas ações é um dos principais alvos e objetivos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (SHAVETA et al., 2014; SAKAI et al., 2014).

Apesar do processo inflamatório ser indispensável para a homeostase do indivíduo os efeitos deletérios causados por essa resposta exigem, em determinados casos, a intervenção farmacoterapêutica. Os fármacos geralmente prescritos e que são capazes de interferir neste processo reacional do organismo são: glicocorticóides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (Figura 5). Os AINEs atuam interferindo com a síntese das prostaglandinas através da inibição inespecífica da síntese da COX-1 e/ou COX-2 bloqueando assim a produção de substâncias endógenas responsáveis pela reepitelização gástrica como, em especial a PGE_2 , além da microbiota intestinal, interferência no recrutamento de neutrófilos, desacoplamento da cascata de fosforilação oxidativa e despolarização do potencial de membrana (MORAND, 2007; RAVEENDRAN et al, 2008; LANAS, BOERS; NUEVO, 2015; GUNTER et al., 2017; CAIN, Derek; CIDLOWSKI, 2017).

Figura: 6 Representação esquemática dos metabólitos do ácido araquidônico.



Representação esquemática dos metabólitos do ácido araquidônico, a figura ilustra o mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroides também mostra a ação dos glicocorticoides (adaptado e modificado de Silva et al., 2016).

O mecanismo de ação dos glicocorticoides ocorre com a ligação a seus receptores presentes no citoplasma, que logo após se dimerizam e migram para o núcleo, onde vão se ligar a elementos de resposta a glicocorticoide (GRE) presentes no DNA, conseqüentemente leva a uma elevação da transcrição de genes responsivos a glicocorticoides (GR), aumentando a transcrição de genes que codificam proteínas anti-inflamatórias, incluindo a lipocortina-1 e a IL-10, e inibição dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1. No entanto, o uso a longo prazo de glicocorticoides está associado ao desenvolvimento de efeitos secundários graves, incluindo osteoporose, doenças metabólicas e risco aumentado de doenças cardiovasculares; síndrome de Cushing, e perturbações psiquiátricas (ZHOU; CIDLOWSKI, 2005; COUTINHO; CHAPMAN, 2011; VON SCHEVEN et al., 2014).

Além desses fármacos podem ser usados os Coxibes que são fármacos seletivos de COX-2 foram desenvolvidos com o intuito de diminuir os efeitos indesejáveis provocados pelos AINEs, especialmente os seus efeitos adversos na mucosa gástrica. Esses fármacos, assim como os AINEs, exibem efeitos adversos a nível renal, e cardiovasculares devido a expressão fisiológica da COX-2 no endotélio e também na da função renal (BRATER et al., 2001; MUKHERJEE; NISSEN; TOPOL, 2001; FITZGERALD, 2002; GAMBARO; PERAZELLA, 2003; ASGHAR, JAMALI, 2015; SREBRO et al., 2016)

Assim, os AINEs que são fármacos geralmente não seletivos podem inibir tanto a COX-1 como a COX-2, causando diversos distúrbios no trato digestivo e podem estar associadas ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal como efeito adverso. Além disso, já é bem relatado na literatura a sua associação com o surgimento de úlceras pépticas e distúrbios renais. Uma alternativa seria o uso de coxibes, mas, como discutidos acima também possuem efeitos adversos graves como risco de insuficiência cardíaca Tais efeitos colaterais refletem uma limitação crítica ao uso contínuo destes fármacos (MUKHERJEE; NISSEN, 2001; LANAS; BOERS; NUEVO, 2015; BALLY et al., 2017; VUILLEUMIER; SCHLISSBACH; CURATOLO, 2018).

Diante disso, pode-se mencionar que apesar da inflamação ser um mecanismo de defesa do organismo, os efeitos deletérios causados pela sua exacerbação requerem a intervenção farmacoterapêutica, entretanto como já exposto seu uso é limitado principalmente pelos efeitos colaterais que essas drogas causam. Portanto é de suma importância a busca de novas

alternativas terapêuticas que possam minimizar esses efeitos colaterais (KOEBERLE; WERZ, 2014; BRUNE; PATRIGNANI, 2015).

2.10 PRODUTOS NATURAIS E SEMISSINTÉTICOS

Os produtos naturais e seus derivados são muito utilizados popularmente para o tratamento de diversas patologias, dentre elas para o alívio da dor e inflamação. No Brasil, o uso de plantas medicinais tem um valoroso papel nos cuidados de saúde primários, principalmente em comunidades sem acesso fácil a medicamentos sintéticos (ATANASOV et al., 2015). Apesar da concorrência de outros métodos de descoberta de medicamentos, os produtos naturais ainda estão fornecendo sua parcela de novos candidatos a drogas e ainda representam uma fonte significativa de novos fármacos, especialmente anticancerígenos, anti-hipertensivos, anti-infecciosos e imunossupressores (LAHLOU, 2013).

Os produtos naturais detêm uma diversidade estrutural importante para formulação de novas drogas, entretanto nem todos os produtos naturais podem ser totalmente sintetizados, devido à alta complexidade estrutural, além de serem onerosos para fabricação em escala industrial. Procedimentos de formulação semissintéticos podem contornar esses problemas, com o isolamento de composto bioativos a partir da fonte natural, em que o intermediário pode então ser convertido no produto final através de síntese convencional. O procedimento tem vantagens, pois, o intermediário pode ser mais facilmente extraído, com um rendimento mais elevado do que o próprio composto completo (PATERSON; ANDERSON, 2005; GANESAN, 2008; CRAGG; NEWMAN, 2013; DAVID; WOLFENDER, 2015).

A fim de resolver essa problemática a seleção estratégica de produtos naturais, dos quais já são descritas as atividades biológicas, torna-se necessária para a formulação de novos fármacos. Novos relatos funcionais obtidos a partir do conhecimento tradicional e oriundos de bancos de dados experimentais podem auxiliar na redução de tempo, dinheiro e toxicidade, que são os três obstáculos específicos no desenvolvimento de medicamentos (GANESAN, 2008; ATANASOV et al., 2015; KATZ; BALTZ, 2016).

Embora produtos naturais inalterados continuem a desempenhar um papel importante na descoberta de drogas, eles foram amplamente superados por seus análogos, que são obtidos através de processos químicos baseados em design racional. Está ocorrendo um progresso recente na diversificação estrutural de produtos naturais por meio de abordagens de biologia sintética ou métodos em combinação com estratégias químicas, essa diversidade química com adição de grupamentos funcionais que raramente seria encontrado na natureza, além disso o

isolamento e a purificação adicional dos produtos ao final da reação fornecem uma ampla variedade de novos compostos semissintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2016; LI; LOU, 2018).

A partir disso, os compostos sintéticos são aprimorados através da síntese química e o que se observa, e que através desse melhoramento, eles conseguem ter uma maior atividade desejada em menores doses que os compostos naturais, além de não serem muitas vezes rapidamente metabolizados. Esse aprimoramento de moléculas inicialmente naturais tornando-se posteriores análogos é uma clássica evolução na produção e inovação biotecnológica de fármacos (NEWMAN, 2008; CRAGG; NEWMAN, 2013; DAVID; WOLFENDER, 2015).

2.11 ÁCIDOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias largamente distribuídas na natureza, sendo que já foram detectados pelo menos 8000 destes compostos em plantas (GARCIA-SALAS, 2010). Pertencem a uma classe de ampla diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Os compostos fenólicos possuem um mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, sendo que os principais podem ser classificados em dois grupos: os flavonóides (polifenóis) e os não flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (MORTON, 1962; DIMITRIOS, 2006; RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; RUBIO; MACIA; MOTILVA, 2014; ABBAS, 2017).

Os ácidos fenólicos atuam de diferentes formas podendo combater os radicais livres por meio da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática; ou ainda atuar quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+} ; ou ainda interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica. Dessa forma modificando o potencial redox do meio e reparando lesões de moléculas atacadas por radicais livres. A elevada capacidade antioxidante destes compostos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais (GROOTVELD; HALLIWELL, 1986; JOVANOVIC et al., 1994; ARUOMA, 1998; RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996; LUSHCHAK, 2014; SEVGI, TEPE, SARIKURKCU, 2015; ZHANG E TSAO, 2016)

Já é bem descrito na literatura os efeitos de compostos fenólico tais como: propriedades anti-inflamatórias e efeitos benéficos em doenças associadas ao envelhecimento, como as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e alguns tipos de câncer. Além da sua atuação no estresse oxidativo, seu efeito protetor pode estar associado à modelação de vias de sinalização intracelular, bem como à inibição de enzimas que são ativadas durante a inflamação

e que são fundamentais para a sobrevivência celular (ROBBINS, 2003; PANDEY; RIZVI, 2009; ABBAS et al., 2017).

Os ácidos fenólicos ainda são divididos em dois grupos, tem-se os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos e derivados dos ácidos hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos, que têm estrutura comum, C6-C1, são os mais simples encontrados na natureza e incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, siríngico e vanílico (SCHUSTER; HERRMANN, 1985; WINTER; HERRMANN, 1986; TATSUMI et al., 1994)

Particularmente, o ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico, figura 6), um ácido fenólico, exibiu um perfil farmacológico interessante. Estudos experimentais forneceram evidências de eficácia em doenças cardiovasculares (PRINCE; RAJAKUMAR; DHANASEKAR, 2011) gastrointestinais (KIM et al., 2010) e doenças do fígado (ITOH et al., 2009).

O ácido vanílico é utilizado como agente aromatizante, é uma forma oxidada de vanilina produzida durante a conversão de vanilina em ácido ferúlico. Estudos experimentais demonstraram que o ácido vanílico tem efeitos anti-inflamatórios, onde atua diminuindo o recrutamento neutrofílico, o estresse oxidativo e inibindo a produção de NFκB e citocinas pró-inflamatórias, possui também efeito antialérgico pela sua capacidade de controlar as vias de sinalização de caspase-1 / NF-κB / MAPKs (TAI, SAWANO, YAZAMA, 2011; SEVGI, TEPE, SARIKURKCU, 2015; DIANAT et al., 2016; VINOITHIYA E ASHOKKUMAR, 2017). Além disso o ácido vanílico possui uma alta capacidade antioxidantes, que incluem sequestro de radicais livres, alto potencial de redução e inibição da peroxidação lipídica (KIM et al, 2011a; Calixto-Campos et al., 2015; DIANAT et al., 2016).

Neste contexto, o vanilato de isopropila (ISP-VT), um composto semi-sintético derivado do ácido vanílico, foi sintetizado com algumas modificações químicas, incluindo a remoção de um radical hidroxila e a adição de um grupo isopropílico, para a produção de novos alvos farmacológicos afim de melhorar sua estabilidade potencializar seu efeito terapêutico, como a sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante, esperasse-se usar uma menor dose e conseqüente menor toxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade anti-inflamatória, antioxidante, antipirética e avaliar a toxicidade do vanilato de isopropila em camundongos Swiss.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a atividade anti-inflamatória do ISP-VT em modelo de edema de pata em camundongos induzido por carragenina, sulfato de dextrana, bradicinina, histamina, serotonina, composto 48/80 e PGE₂;
- ✓ Avaliar o efeito do ISP-VT na análise de imuno-histoquímica no edema de pata induzido por carragenina;
- ✓ Determinar o potencial do ISP-VT sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL-6, e sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO),
- ✓ Averiguar a ação ISP-VT sobre a permeabilidade vascular em camundongos;
- ✓ Averiguar a ação do ISP-VT sobre a migração de neutrófilos para o peritônio induzida por carragenina em camundongos;
- ✓ Avaliar a capacidade do ISP-VT na inibição de COX-1 e COX-2 *in vitro*;
- ✓ Avaliar o efeito antipirético do ISP-VT sobre a febre induzida por levedura de cerveja.
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do ISP-VT no sequestro de radical DPPH, quelação de íon ferroso e formação do complexo fosfomolibdênio
- ✓ Investigar o potencial do ISP-VT sobre os níveis de glutatona (GSH) e malondialdeído (MDA) e Nitrito e Superóxido desmutase (SOD) no líquido peritoneal.
- ✓ Avaliar o potencial do ISP-VT sobre a toxicidade gástrica em camundongos.
- ✓ Analisar a toxicidade aguda do ISP-VT em camudongos.

4. METODOLOGIA

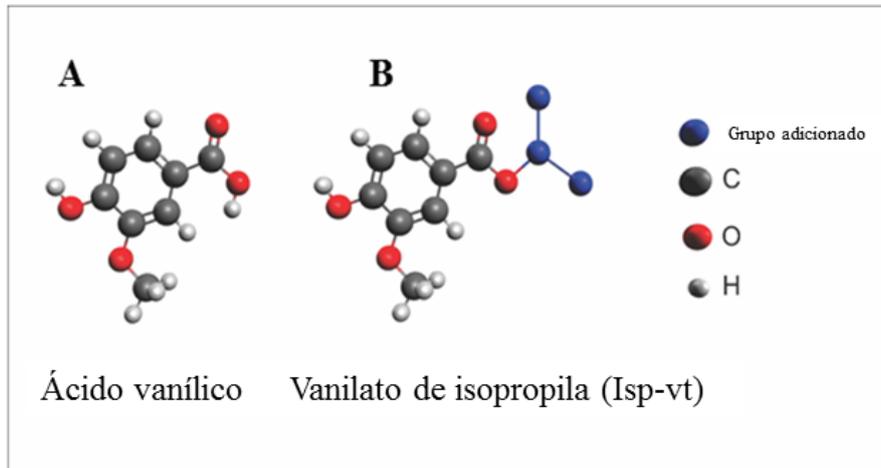
4.1 DROGAS E REAGENTES

λ -Carragenina, indometacina, bradicinina, serotonina, histamina e composto 48/80 foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais padrão. 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ácido dissulfônico 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p'-p'-dissulfônico, e 3,5-Di-terc-4-Hidroxitolueno Butilato (BHT) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA), a heparina foi adquirida da Merck (São Paulo, Brasil) e todas as drogas foram dissolvidas em 0,9% estéril (p / v NaCl (solução salina) Todos os outros produtos químicos eram de grau analítico e foram obtidos de fornecedores comerciais padrão.

4.2 OBTENÇÃO DO COMPOSTO SEMISSÍNTETICO VANILATO DE ISOPROPILA.

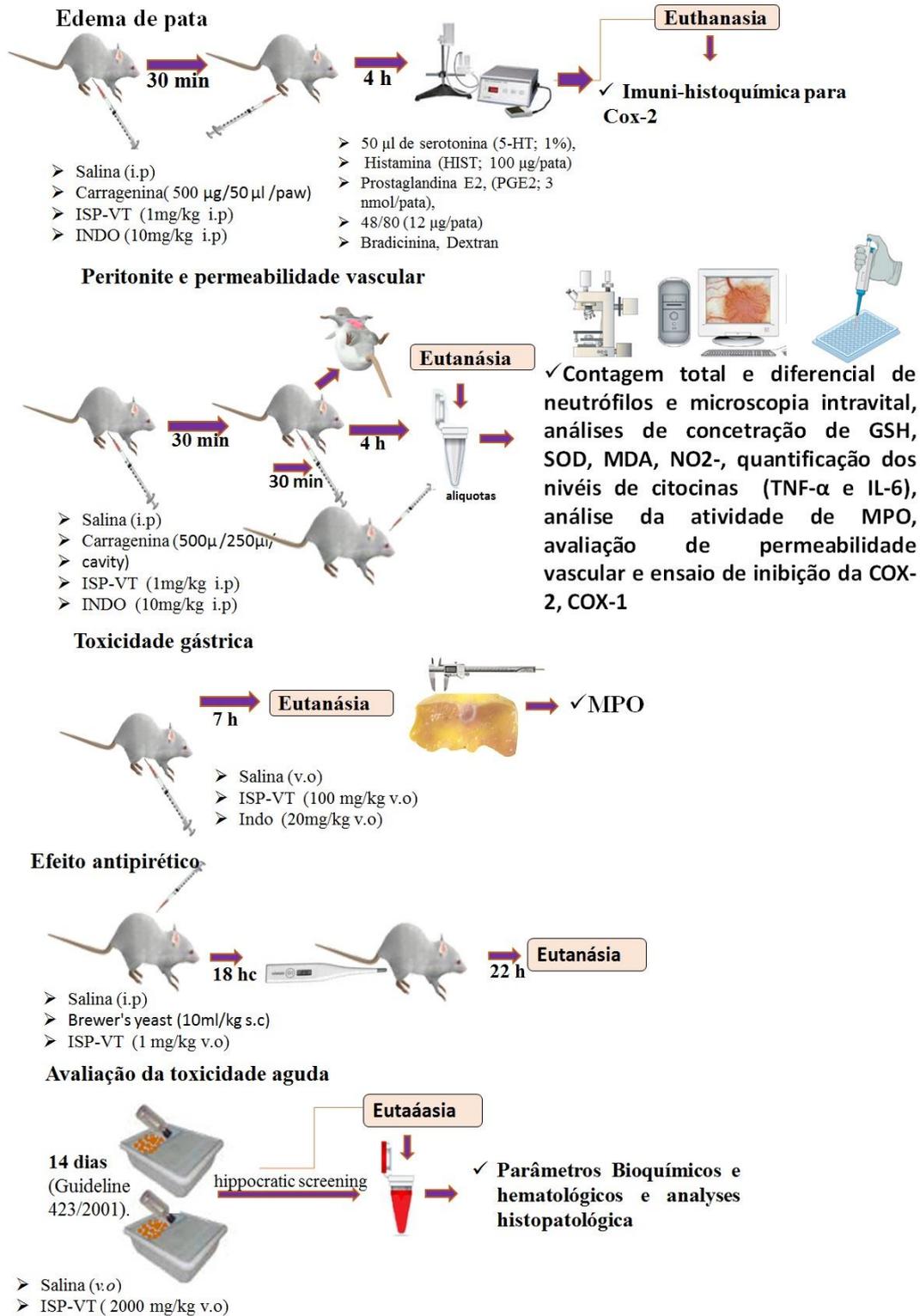
Para a síntese do vanilato de isopropila (ISP-VT) foi utilizada uma solução agitada de ácido vanílico (0,25g, 1,05 mmol) com 50 ml de isopropanol, na qual foi adicionado 0,4 ml de H₂SO₄ e a solução foi aquecida a 110 °C durante 4 horas. O Isopropanol foi removido sob pressão e a solução foi diluída com 20 ml H₂O. O produto foi extraído com acetato de etila, a fase orgânica foi lavada sucessivamente com NaHCO₃ a 5% e H₂O, depois secada em anidro Na₂SO₄, posteriormente filtrada e evaporada, com obtenção do rendimento de 67%. Os parâmetros da espectroscopia foram os seguintes: ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.65 – 7.46 (m, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 5.20 (dt, *J* = 12.4, 6.2 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.31 (s, 3H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 166.2, 150.0, 146.3, 124.0, 122.8, 114.2, 111.8, 68.2, 56.0, 21.9. IV ν_{\max} (KBr) 3358, 2980, 1688, 1610, 1595, 1519, 1496, 1431, 1292, 1228, 1161, 1103, 1028, 941, 893, 768, 658, 634 cm⁻¹ (PLOYPRADITH et al., 2007) (Composto foi obtido em parceria com o Prof^o Damiao Pergentino de Sousa do programa de de Mestrado e de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Universidade Federal da Paraíba).

Figura 7: Estruturas químicas do ácido vanílico e do vanilato de isopropila (ISP-VT).



A figura 7A mostra a estrutura química do ácido vanílico (CALLIXTO-CAMPOS et al, 2014).7B mostra a estrutura do vanilato de isopropila ao qual foram feitas modificações químicas como a remoção de um radical hidroxila e a adição de um grupamento isopropílico.

ESQUEMA GERAL PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, pesando entre 25-30g, de ambos os sexos (n=5 por grupo). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí, Teresina. Foram então armazenados, e mantidos em gaiolas com temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, com livre acesso a ração (dieta padrão) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos e cuidados foram conduzidos de acordo com as normas internacionais aceitas e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (COBEA) em consonância com a resolução normativa N° 38, 17 de abril de 2018 da lei n° 11.794. Esse projeto foi enviado para apreciação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPI e foi aprovado pelo (protocolo n°068/14) (anexo 1). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

4.4 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS SWISS

Inicialmente, os camundongos foram pré-tratados por via intraperitoneal (*i.p.*) com vanilato de isopropila em diferentes doses (0,3, 1, e 3 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg, *i.p.*). Após 30 minutos, o edema foi induzido pela administração de 50 μL de uma suspensão de carragenina (500 $\mu\text{g/pata}$) na pata traseira direita do animal. Enquanto que no grupo controle negativo foi administrado 50 $\mu\text{L/pata}$ de salina estéril (0,9 %). O volume da pata foi aferido em diferentes tempos, o inicial foi denominado de Tempo 0 (T_0), sendo este correspondente a leitura basal da pata traseira direita dos animais, o qual foi utilizado como parâmetro de comparação com as demais leituras seguintes. Os Tempos 1, 2, 3 e 4 (T_1 , T_2 , T_3 e T_4 , respectivamente) equivalem as horas seguintes após indução do edema com carragenina. Os resultados foram obtidos utilizando um pletismômetro (Panlab, Barcelona, Espanha), que possui a capacidade de registrar o volume de líquido deslocado em um sistema de vasos comunicantes, em resposta à introdução da pata do camundongo *swiss* em uma das cubas que compõem o sistema. A outra cuba contém um transdutor capaz de detectar, de forma precisa, quantidades mínimas de líquido deslocado da ordem de μL (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; SILVA et al., 2015).

4.5 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Para induzir o edema de pata, os animais receberam a administração de 50 μL de serotonina (5-HT; 1%), ou histamina (HIST; 100 $\mu\text{g/pata}$), ou prostaglandina E2, (PGE2; 3

nmol/pata), composto 48/80 (12 µg/pata, sulfato de dextrana (DEX; 500 µg / pata), ou bradicinina (BK; 6 nmol / pata) na pata traseira direita (SILVA et al, 2015). A pata contralateral recebeu 50 µl de solução salina (0,9%) que serviu como controle negativo. Foram administrados ISP-VT (1mg/kg, melhor dose) ou indometacina (10 mg/kg), via i.p., 30 minutos antes da injeção intraplantar dos agentes inflamatórios listados anteriormente. No experimento com bradicinina, os animais foram pré-tratados com captopril (5 mg/kg, i.p.) 1 hora antes da indução de bradicinina para evitar sua degradação (SILVA et al, 2015). O volume da pata direita foi medida antes (V0; tempo zero) a 30, 60, 90 e 120 min após estímulos (Vt). Os dados foram expressos como média ± S.E.M de 5-6 animais por grupo.

4.6 PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, foi realizado o protocolo de indução da peritonite por administração de carragenina, inicialmente os animais foram pré-tratados com por via intraperitoneal com salina (0,9% i.p), indometacina (10 mg/kg i.p) ou ISP-VT na dose de (1.0 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos depois, os animais foram tratados com carragenina (250 µl; 500 µg/cavidade), os animais foram eutanasiados 4 horas mais tarde e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de fosfato heparinizado de salina tamponada (PBS) para a colheita peritoneal de células. Os volumes recuperados foram uniformes em todos os grupos experimentais e eram equivalentes a 95% do volume injetado. As Contagens de células totais foram realizadas em uma câmara de Neubauer, e as contagens de células diferenciais (100 células total) foram realizadas em lâminas citocentrífuga coradas com hematoxilina e eosina (H & E). Os resultados foram apresentados como o número de leucócitos por mililitro de exsudato peritoneal. Alíquotas de exsudatos peritoneais foram colhidas para análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), dos níveis de citocinas TNF- α e IL-6, dos níveis de glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA) e as concentrações de nitrito (NO₂-) e superóxido dismutase (SOD). Os dados foram expressos como média ± S.E.M de 5-6 animais por grupo (SILVA et al., 2015).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

O ensaio da atividade da enzima MPO foi baseado no método de Bradley et al., (1982). Resumidamente, as amostras do exsudato peritoneal foram centrifugadas, 400 µl de exsudato peritoneal a 40000 x g durante 7 minutos a 4°C. Depois, 10 µl do sobrenadante foram recolhidos e a atividade da MPO determinada por medição da alteração na absorbância a 450 nm, utilizando o-dianisidina e 1% peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Os resultados foram expressos

em unidades/ml. Uma unidade de atividade de MPO foi definida como a conversão de 1 μmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22 ° C.

4.8 AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

A permeabilidade vascular foi analisada em camundongos através da mensuração do extravasamento de Azul de Evans, substâncias que consegue se ligar a albumina sérica. Foi seguido o protocolo de indução da peritonite como descrito anteriormente e os animais foram pré tratados com Isp-vt (1mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) () entretanto 30 minutos antes da eutanásia dos animais foi administrado via plexo ocular de 50 uL de Azul de Evans (50 mg/kg em PBS 10x). Os animais foram eutanasiados 4 horas após a injeção de carragenina e a lavagem peritoneal foi realizada com 3 ml de PBS mais EDTA, e a quantidade de extravasamento de azul de Evans foi medida com o auxílio de um espectrofotômetro a 620 nm após a realização de curva padrão. O veículo (solução salina estéril a 0,9% (p/v) foi utilizado como controle (THURSTON et al., 2000).

4.9 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α e IL-6

Os níveis de TNF- α e IL-6 foram determinados utilizando ensaio de imunabsorbância ligado a enzima (ELISA) (CHAVES et al., 2013). Primeiro uma placa de microtitulação foi incubada a 4° C durante *overnigt* com um anticorpo policlonal para TNF- α ou IL-6 (4 $\mu\text{g/ml}$) DuoSet ELISA Development kit R&D Systems. albumina de soro bovino (BSA) a 2% diluída em PBS foi utilizada para bloquear os locais de ligação inespecífica da placa a incubação dos poços durante 90 min a 37°C. Em seguida, as amostras com ISP-VT e cada amostra padrão foram adicionadas em várias diluições, postas em duplicata e incubadas a 4°C durante 24 h. Feito isso, as placas foram lavadas três vezes com tampão (0,01 M de fosfato, 0,05 M de NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,2). Logo em seguida, foi adicionado 50 μL de biotilado policlonal de ovelha anti-TNF- α , ou anti-IL-6 (diluição de 1:1000 em tampão de ensaio contendo 1% de BSA). Outra incubação à temperatura ambiente durante 1 h foi realizada. Logo depois as placas foram lavadas e 50 μl de peroxidase advinda de conjugado de rábano silvestre na proporção de 1: 5000 foi adicionado a todos os poços, após 15 min, então as placas foram lavadas e o reagente de cor o-fenileno-diamina (40 $\mu\text{g/poço}$) foi adicionado. Depois de 15 min em um ambiente escuro com temperatura de 37°C, a reação da enzima foi interrompida com H₂SO₄ (1 M) e a absorbância foi lida a 490 nm. Os resultados de ELISA foram expressos como pictogramas de cada citocina por mililitro de exsudato peritoneal (pg/ml).

4.10 MICROSCOPIA INTRAVITAL

A microscopia intravital foi utilizada para estabelecer o rolamento e a adesão de leucócitos à microcirculação mesentérica e examinada como descrito anteriormente (FORTES, et al., 1991) Resumidamente, os camundongos foram pré-tratados com administração ISP-VT (1 mg/kg) 30 min antes da administração de carragenina (500 µg/cavidade). Após 4 horas, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg / kg, i.p.) / xilazina (10 mg/kg, i.p.) e o tecido mesentérico foi exteriorizado para exame microscópico in situ. Os animais foram mantidos em uma placa especial que é controlada termostaticamente a 37 ° C, com uma plataforma transparente sobre a qual foi colocado o tecido a ser transiluminado. Os vasos selecionadas para estudo eram vênulas de terceira ordem, definidas de acordo com a localização da ordem de ramificação dentro da rede microvascular. Esses vasos correspondiam a vênulas pós-capilares, com diâmetro de 10 a 15 µm. Os leucócitos em rolamento foram definidos como leucócitos que se movem a uma velocidade menor que os eritrócitos no mesmo fluxo. O número de leucócitos rolantes foi determinado em intervalos de 10 minutos. Estes leucócitos foram contados à medida que rolavam para além de um comprimento de 10 µm de vênula. Considerou-se que o leucócito aderiu ao endotélio venular se ele permaneceu estacionário por 30 segundos. O número de células aderentes (adesivas) foi expresso como o número por 10 µm de comprimento da vênula. As células foram contadas na imagem recorde, usando 3 a 4 campos diferentes para cada animal para evitar a variabilidade da amostragem.

4. 11 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA COX-2

Para os ensaios de imuno-histoquímica, o método de estreptavidina-biotina-peroxidase foi utilizado (HSU; RAINE, 1981). A imuno-histoquímica é utilizada para detecção da expressão de proteínas nas células dos tecidos, usando anticorpos como reagentes específicos que serão capazes de identificar e estabelecer uma ligação com constituintes tecidulares que funcionam como antígenos de acordo com o princípio antígeno/anticorpo (HSU; RAINE, 1981). Para isso três camundongos de cada grupo foram tratados com 0,9% de solução salina estéril, ISP-VT (1mg/kg i.p) e Indometacina (10 mg/kg) após 30 realizou-se uma injeção intraplantar de carragenina (protocolo previamente descrito). Decorridos três horas, os animais foram eutanasiados e secções da região plantar de 5 mm da pata traseira foram imersos em 10% de formol tamponado durante 48 h, logo após foram imersas em uma solução de álcool a 70%. As secções foram então desparafinados, hidratado em xilol e etanol, e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6) com menos de 18 min de aquecimento micro-ondas, para a recuperação de

antígeno. Após o resfriamento a temperatura ambiente, durante 20 min, as secções foram lavadas com uma solução tamponada com fosfato, seguida de 15 minutos de bloqueio da peroxidase endógena, com uma solução de H₂O₂ a 3%. As secções foram incubadas durante a noite (4°C) com os anticorpo primário (anti-COX-2) diluída em PBS, de acordo com as instruções dos fabricantes. No dia seguinte, as secções foram lavadas em PBS e incubadas durante 30 min com o anticorpo secundário de coelho biotilado (anti-IgG), igualmente diluído em PBS (diluição a 1:200). Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas durante 30 minutos com o complexo peroxidase de estreptoavidina conjugada (complexo ABC Vectastain®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Depois de mais uma lavagem com PBS, as secções foram coradas com 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB) cromophore, contra-coradas com hematoxilina Mayer, desidratadas e montadas em lâminas de microscópio para análise, e os dados foram semi quantificados (como a densidade óptica relativa de células imunomarcadas).

4.12 ENSAIO DE INIBIÇÃO DE CICLOOXIGENASES

Inicialmente, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com ISP- VT (1 mg/kg) ou indometacina (Indo, 10 mg / kg i.p.) , após 30 min eles receberam a carragenina via i.p (500 µg / cavidade), depois de 4 h os animais foram eutanasiados e tiveram a sua cavidade peritoneal lavada 1,5 ml de PBS . Para avaliar a inibição da Cicloxigenase- 2 (COX-2), foi utilizado o kit de ensaio de inibição colorimétrico COX da Cayman Chemical (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) e foram seguidos como instruções fornecidas pelo fabricante (SHAIKH; PUND; GACCHE, 2016). O ensaio mede a atividade da peroxidativa da COX, a atividade da peroxidase foi avaliada colorimetricamente por monitorização do aparecimento de N, N, N, N'-tetrametilf enilenodiamina (TMPD) oxidada a 590 nm, foi utilizado indometacina como um fármaco padrão. O kit inclui inibidores isoenzimáticos para distinguir a atividade da COX-2 da atividade da COX-1.

$$\% \text{ Inibição} = \left\{ \frac{\text{Atividade de COX (padrão)} - \text{Atividade de COX com a amostra}}{\text{Atividade de COX}} \right\} \times 100$$

4.13 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4. 13. 1 SEQUESTRO DO RADICAL 1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)

O sequestro do radical livre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) foi analisado de acordo com o método descrito por Blois (1958), com algumas modificações. Tal método é baseado na captura do radical por moléculas antioxidantes, produzindo assim um decréscimo da absorção a 515nm, usado para determinar a habilidade de sequestro de radical livre de amostras (DING, 2011). Primeiramente, 300 µL da amostra do ISP-VT em várias concentrações (0.025–5 mg/ml) foram dissolvidas e agitadas em 200 µL de metanol (MeOH). Em seguida, nessa solução foram adicionados 2,5 ml de DPPH (75 µM em MeOH) e mantidas em temperatura ambiente no escuro por 30 min. As leituras de absorbâncias foram realizadas a 517 nm (A₅₁₇). A atividade antioxidante foi expressa como % de atividade de sequestro de radical DPPH. O hidroxitolueno butilado (BTH) foi utilizado como material de referência. Todas as reações foram realizadas em triplicado. O efeito no sequestro do DPPH foi calculado com base na seguinte fórmula: Efeito do sequestro de DPPH (%) = $[A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$

Em que, A₀ = A₅₁₇ do DPPH sem amostra; A = A₅₁₇ da amostra e DPPH; e A_b = A₅₁₇ da amostra sem DPPH.

4.13. 2 ENSAIO DE QUELAÇÃO DO ÍON FERROSO

O ensaio de quelação do íon ferroso foi realizado de acordo com o método descrito por Chew et al., (2008), com algumas modificações, no qual a ferrozina pode formar um complexo vermelho com Ferro II (Fe⁺²), no entanto na presença de outros agentes quelantes leva a uma diminuição na cor vermelha e, conseqüentemente, na absorbância, indicando uma menor formação de complexo ferrozina-Fe⁺² (CHVÁTALOVÁ, 2008). Nesta ordem, misturou-se 1 mL de Sulfato Ferroso 0,1 mM (FeSO₄), 1 mL de amostra com ISP-VT(0,025 – 5,0 mg/ml) e 1 mL de Ferrozina 0,25 mM (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico). Os tubos foram agitados por 1 minuto e após 10 min foram realizadas as leituras a 562 nm. O branco é realizado substituindo-se a amostra pelo solvente utilizado para todas as amostras (água destilada). EDTA foi utilizado como material de referência. A atividade antioxidante foi expressa como % inibição da atividade quelante de ferro, definida como a concentração do material de teste necessária para causar uma diminuição de 50% na concentração inicial de solução de íon ferroso. Todas as reações foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram expressos como habilidade de quelação do íon ferroso (%) e calculados através da seguinte fórmula:

Habilidade de quelação de íon ferroso (%) = $[A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$

Em que, $A_o = A_{562}$ do FeSO_4 e Ferrozina sem amostra; $A = A_{562}$ da amostra, FeSO_4 e Ferrozina; e $A_b = A_{562}$ da amostra sem FeSO_4 e Ferrozina.

4. 13. 3 ENSAIO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELA FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

O ensaio de capacidade antioxidante foi realizado através da formação do complexo fosfomolibdênio descrito por Prietro, Pineda e Aguilar (1999). Este teste se baseia pela formação de um complexo de fosfomolibdênio, que ocorre pela redução do molibdênio (Mo (VI) a Mo (V) em pH ácido, determinando assim o potencial antioxidante. Resumidamente, adiciona-se 300 μl da amostra com ISP-VT (0,025 – 5,0 mg/ml) a 3 ml de solução de molibdato de amônio 4 mM, ácido sulfúrico 0,6 M e fosfato de sódio 28 mM, homogeneizar e incubar a 95 °C durante 90 min. Após o resfriamento foram realizadas as leituras a 695 nm. A atividade foi expressa como % capacidade antioxidante total, o branco é feito substituindo-se a amostra pelo solvente utilizado para todas as amostras. O BHT foi utilizado como material de referência. Para efeito de cálculo, o ácido ascórbico (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi considerado como 100% de atividade antioxidante. Todas as reações foram realizadas em triplicatas.

Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante total (%) e calculados através da seguinte fórmula: Capacidade antioxidante total (%) = $[(A_{695nm}$ da amostra – A_{695nm} do branco) $\times 100 / A_{695nm}$ do ácido ascórbico – A_{695nm} do branco]

4.13. 4 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA (GSH)

Inicialmente, 400 μl de cada sobrenadante de exsudado peritoneal foram misturadas a 320 μL de água destilada e a 80 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Um total de 400 μL do sobrenadante foi adicionado a 800 μL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 μL de ácido ditio-nitrobenzoico DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As concentrações de GSH foram expressas em $\mu\text{g}/\text{ml}$ de exsudato.

4.13.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

As concentrações de MDA no exsudato peritoneal a partir de cada um dos grupos foi medida de acordo com Mihara e Uchiyama (1978). Resumidamente, alíquotas (500 μl) do exsudato peritoneal foram centrifugados a 3000 g durante 15 min a 4 °C, em seguida, 250 μl de cada sobrenadante foi adicionado a 1,5 ml de ácido fosfórico a 1% (H_3PO_4) e 0,5 ml de ácido

tiobarbitúrico 0,6% (solução aquosa). Em seguida, esta mistura foi agitada e aquecida em banho-maria durante 45 min. Posteriormente, as amostras foram levadas imediatamente a um recipiente com água gelada seguido pela adição de 4 ml de n-butanol. As amostras foram agitadas, e a camada de butanol foi separada por centrifugação a 1200 g durante 15 min e a absorbância foi lida em 520 e 535 nm no espectrofotômetro. As concentrações de MDA foram expressas como mmol/ml de exsudato.

4.13. 6 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRITO (NO₂-)

As concentrações de nitrito (NO₂-) no exsudado peritoneal foi determinada pela reação de Griess como indicador da produção de óxido nítrico como modificado previamente por Mizokami et al (2016). Resumidamente, 50 µl da amostra e 50 µl do reagente de Griess (sulfanilamida mistura de 2% em ácido fosfórico a 5% e 0,2% de N- (1-naftil) etilendiamina hidrocloreto-NEED) foram misturados em 96 poços de placas de ELISA. A absorvância foi medida a 550 nm, e os níveis de NO₂- foram determinadas utilizando uma curva padrão de NaNO₂. Os resultados são µM de NO₂- por cavidade.

4.13. 7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A concentração da superóxido dismutase foi mensurada usando um ensaio espectrofotométrico modificado (DAS et al., 2000). Segundo essa metodologia a atividade enzimática é calculada pela quantidade de sod capaz de inibir a formação de nitrito em 50%. O exsudato peritoneal foi homogenizado em 1 ml/100 mg de tampão de fosfato de tecido (50 mM, pH 7,4), desse homogenato 100 µl foram adicionados a 1110 µl de tampão de fosfato, 75 µl de l-metionina (20 mM), 40 µl de triton x-100 (1% v/v), 75 µl de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100 µl de edta (50 µM). Feito esse processo a solução foi incubada num banho maria a 37 °C por 5 minutos, depois foram adicionados 80 µl de solução de riboflavina (50 µM) e expostos à luz durante 10 minutos. Dessa solução, foram retirados 100 µl da amostra e outros 100 µl de reagente de griess foram adicionados em poços, e decorridos 10 minutos, a absorbância foi lida a 550 nm por espectrofotometria em um leitor de elisa. A quantidade de proteínas totais também foi determinada com um kit comercial da labtest. Os resultados foram expressos como u sod/µg de proteína.

4.14 ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA (HIPERTERMIA INDUZIDA POR LEVEDURA EM CAMUNDONGOS)

Para determinar a atividade antipirética do ISP-VT, os camundongos foram divididos em quatro grupos. A temperatura corporal normal dos animais foi medida por via retal com a ajuda de um termómetro digital, uma hora antes da administração dos fármacos. A atividade antipirética de ISP-VT foi avaliada utilizando injeção subcutânea de levedura de cerveja (10 mL/kg de 15% p/v), para elevação da temperatura corporal de camundongos. Após 18 h da aplicação da injeção de levedura, os animais foram selecionados, ou seja, os que aumentaram a temperatura corporal em mais pelo menos 1°C foram utilizados no experimento, em seguida o fármaco e os composto teste foram administrados, onde paracetamol 100 mg/kg, p.o. foi tomado como droga padrão. A temperatura retal foi medida por termómetro digital no intervalo de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a administração do fármaco (ASONGALEM et al., 2004).

4.15 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GÁSTRICA

Os camundongos receberam ISP-VT (100 mg / kg v.o) por gavagem, indometacina (20 mg / kg v.o.) ou solução salina esterilizada a 0,9%. A eutanásia foi realizada após 7 horas de administração da droga, o estômago foi removido fazendo uma abertura ao longo da curvatura maior. Para medir o dano gástrico macroscópico, o paquímetro digital (Mitutoyoα) foi usado e calculado pela soma dos comprimentos de todas as erosões lineares. Após esse procedimento, amostras de tecido gástrico foram avaliadas quanto à atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), conforme descrito anteriormente (SILVA et al., 2015).

4.16 TOXICIDADE AGUDA DE ISP-VT

Para avaliar a toxicidade aguda do Isp-Vt, o teste foi realizado segundo o Guia 423 das diretrizes da Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OCDE) (Diretriz 423/2001). Para avaliar esses parâmetros de toxicidade aguda, usamos camundongos *Swiss* fêmeas pesando 25-30 g. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle recebeu apenas salina estéril por via oral, e o grupo teste recebeu Isp-Vt (2000 mg / kg) dissolvido em solução salina por via oral.

4.16.1 SCREENING HIPOCRÁTICO

Após a administração de ISP-VT dose única via oral (2.000 mg / kg), os animais foram observados após 10 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h) e, à partir de então, diariamente, e quaisquer mudanças comportamentais foram anotadas de acordo com o Guia 423 das diretrizes

da OCDE até o décimo quarto dia. Foram avaliadas a atividade geral dos animais assim como os sistemas nervoso sensorial, psicomotor, nervoso central e sistema autônomo, além disso foram mensurados diariamente o peso corporal e o consumo de água ou alimentos, como descrito anteriormente (Brito, 1994).

4.16.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Depois de realizar o *screening hipocrático* durante os quatorze dias, os animais foram submetidos a jejum durante 12 horas e anestesiados com cloridrato de xilazina (5 mg / kg i.p.) e cetamina (60 mg / kg i.p). O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Utilizou-se o Analisador Bioquímico Semi-Automático (TEKNA, São Bernardo do Campo - SP) para dosagem da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina, segundo as especificações do fabricante (Labtest Diagnosis, São Paulo, Brasil).

4.16.3. PESOS DE ÓRGÃOS E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a eutanásia dos animais, os órgãos (fígado, rim, baço, coração e intestino) foram removidos e pesados. Para calcular o peso relativo de cada órgão foi utilizada a seguinte fórmula: $\text{Peso corporal/peso corporal após o tratamento} \times 100$. Para análise histológica, os tecidos previamente fixados em formaldeído foram desidratados com imersões consecutivas em concentrações crescentes de álcool seguida de clareamento, inicialmente em xileno II e xilol I. Os cassetes contendo as amostras foram então montadas em blocos de parafina. Um micrótomo foi usado para cortar seções de tecido de 6 mm de espessura. As lâminas foram preparadas por coloração com hematoxilina e eosina (HE), e foram observadas em microscópio de luz para avaliar alterações celulares, intersticiais, vasculares ou inflamatórias, bem como marcadores de distúrbios de crescimento e diferenciação celular (MEIJ et al., 2002; YOUNOSSI et al., 2005; LEÓDIDO et al., 2017).

4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos foram expressos em média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e a significância entre os grupos estabelecida pelos testes de *Student* e *Newman-Keuls*. Valores de $p < 0,05$ foram

considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0* para a realização da análise estatística e confecção dos gráficos.

5.RESULTADOS

5.1 EFEITO DO ISP-VT NO SEQUESTRO DE RADICAL DPPH

O sequestro do radical DPPH pelo ISP-VT é mostrado na Figura 8A. Essa inibição ocorreu de maneira significativa nas doses de 0,025 a 5,0 mg/ml de ISP-VT. Estes resultados mostram um efeito notável na inibição da formação de radical DPPH ($CI_{50} = 1,69 \pm 0,29$ mg/ml), com percentual de inibição máxima de $75,60 \pm 1,15\%$ na concentração de 5 mg/ml. Como esperado, o BHT, um antioxidante sintético usado como controle positivo, apresentou forte atividade antioxidante com $CI_{50} = 0,47 \pm 0,12$ mg/ml. Este resultado mostrou que o ISP-VT tem um efeito significativo no sequestro do radical DPPH.

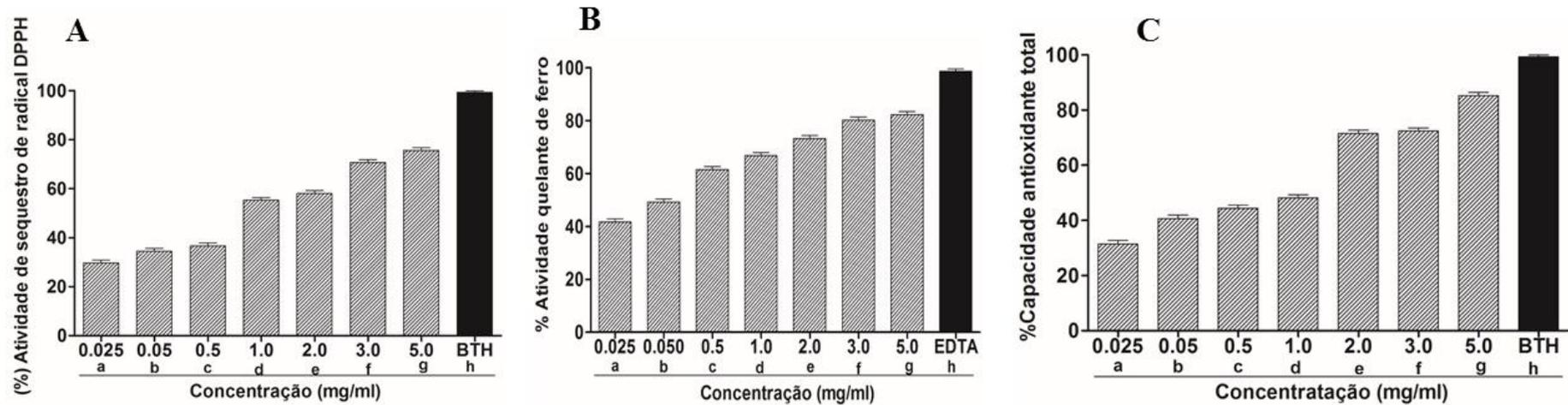
5.2 ISP-VT E QUELAÇÃO DE ÍONS FERROSOS

Medimos a quelação de íons ferrosos em diferentes concentrações de ISP-VT (0,025 a 5,0 mg/ml) (Figura 8B). A IC_{50} de ISP-VT para quelação de ferro foi de $0,86 \pm 0,15$ mg/ml, enquanto que para o EDTA foi de $0,86 \pm 1,12$ mg/ml. A porcentagem de inibição inicial variou de $41,72 \pm 1,10\%$ a $82,32 \pm 1,17\%$ entre as doses testadas a concentração de 5 mg/ml. Este resultado mostra que o ISP-VT foi efetivo ao quelar íons ferrosos.

5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE ISP-VT

A Figura 8C mostra que o ISP-VT (0,025 - 5,0 mg / ml) foi efetivo na redução de Molibdênio (VI) para Molibdênio (V), com IC_{50} de $2,13 \pm 0,38$ mg/ml e uma redução percentual máxima de $85,20 \pm 1,17\%$ na maior concentração. A substância química de referência, o ácido ascórbico, tinha uma IE_{50} de $72,30 \pm 0,59$ μ g/ml. Estes resultados mostram que o ISP-VT tem uma capacidade antioxidante total elevada, conforme determinado pela formação do complexo fosfomolibdênio neste ensaio.

Figura 8. Efeito antioxidante do ISP-VT (A) no sequestro de radicais livres de DPPH, (B) quelção de íons ferrosos e (C) atividade antioxidante total



Diferentes concentrações de ISP-VT são representadas pelas colunas (a) a (g) (0,025, 0,05, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 5,0 mg / mL). A atividade do ISP-VT foi comparada a um antioxidante sintético (butil-hidroxitolueno, BTH) e do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os resultados são expressos como a média \pm DP (n = 3).

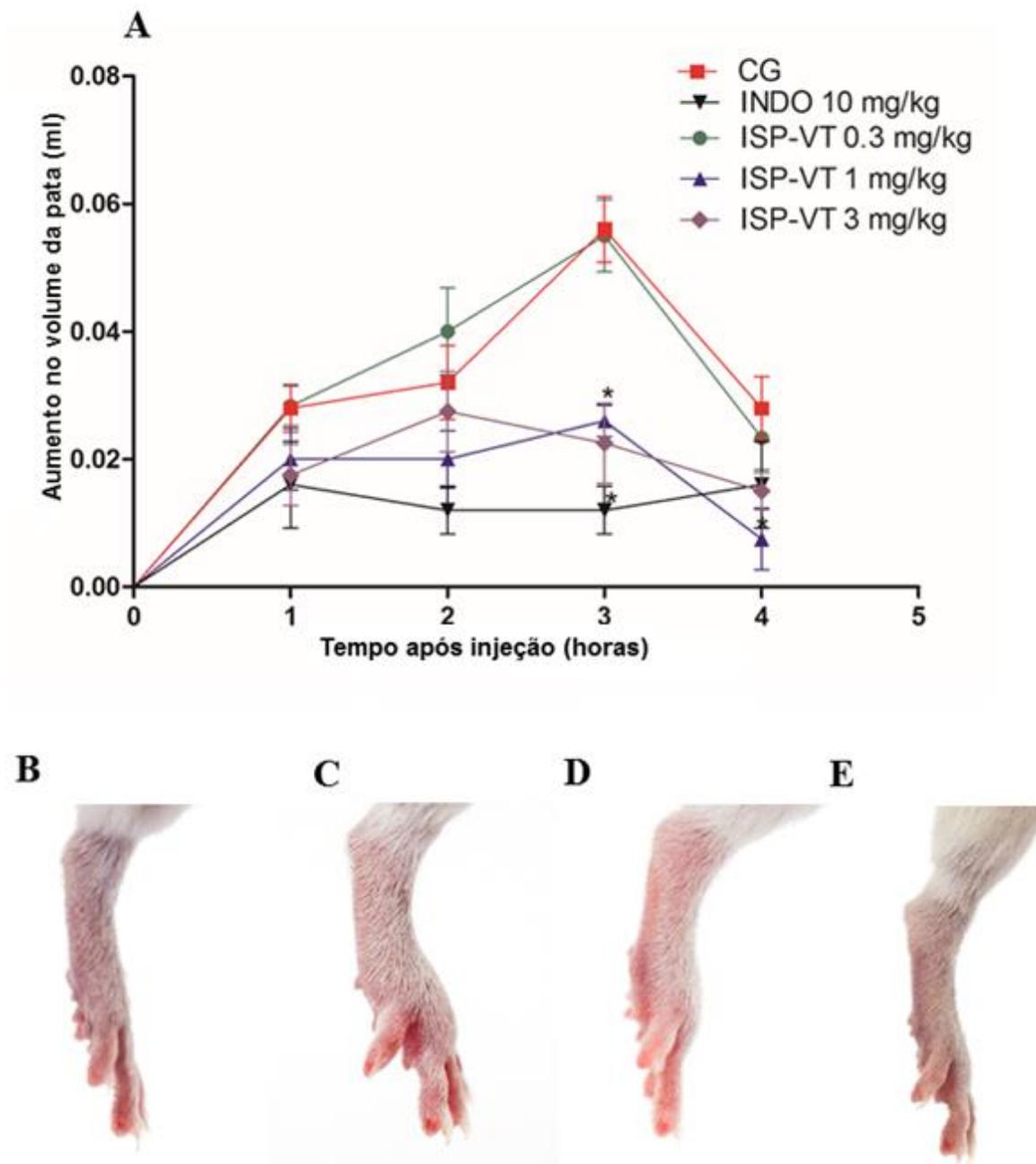
5.4 EFEITOS ISP-VT NO EDEMA DA PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A Figura 9A-9B mostra que a administração de carragenina na pata traseira direita promove a formação de edema, com um pico às 3 h ($0,056 \pm 0,005$ ml), que diminui às 4 h ($0,028 \pm 0,004$ ml). No entanto, o pré-tratamento com ISP-VT nas doses 1 e 3 mg/kg intraperitonealmente produziu uma redução significativa ($p < 0,05$) na formação de edema na pata na 3 h ($0,026 \pm 0,002$ ml, 53,5% de inibição; $0,022 \pm 0,006$ ml, 59,8% de inibição, respectivamente; 9C). A dose de 0,3 mg/kg não reduziu significativamente a formação de edema ($0,055 \pm 0,005$ ml). A indometacina foi efetiva na redução do edema de forma significativa ($0,0120 \pm 0,003$ ml; 9D) Portanto, a dose de 1 mg/kg (9D) proporcionou uma proteção efetiva contra os efeitos inflamatórios causados pela carragenina, ela foi selecionada para estudos posteriores.

5.5 EFEITO DO ISP-VT NA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA COX-2 EM EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.

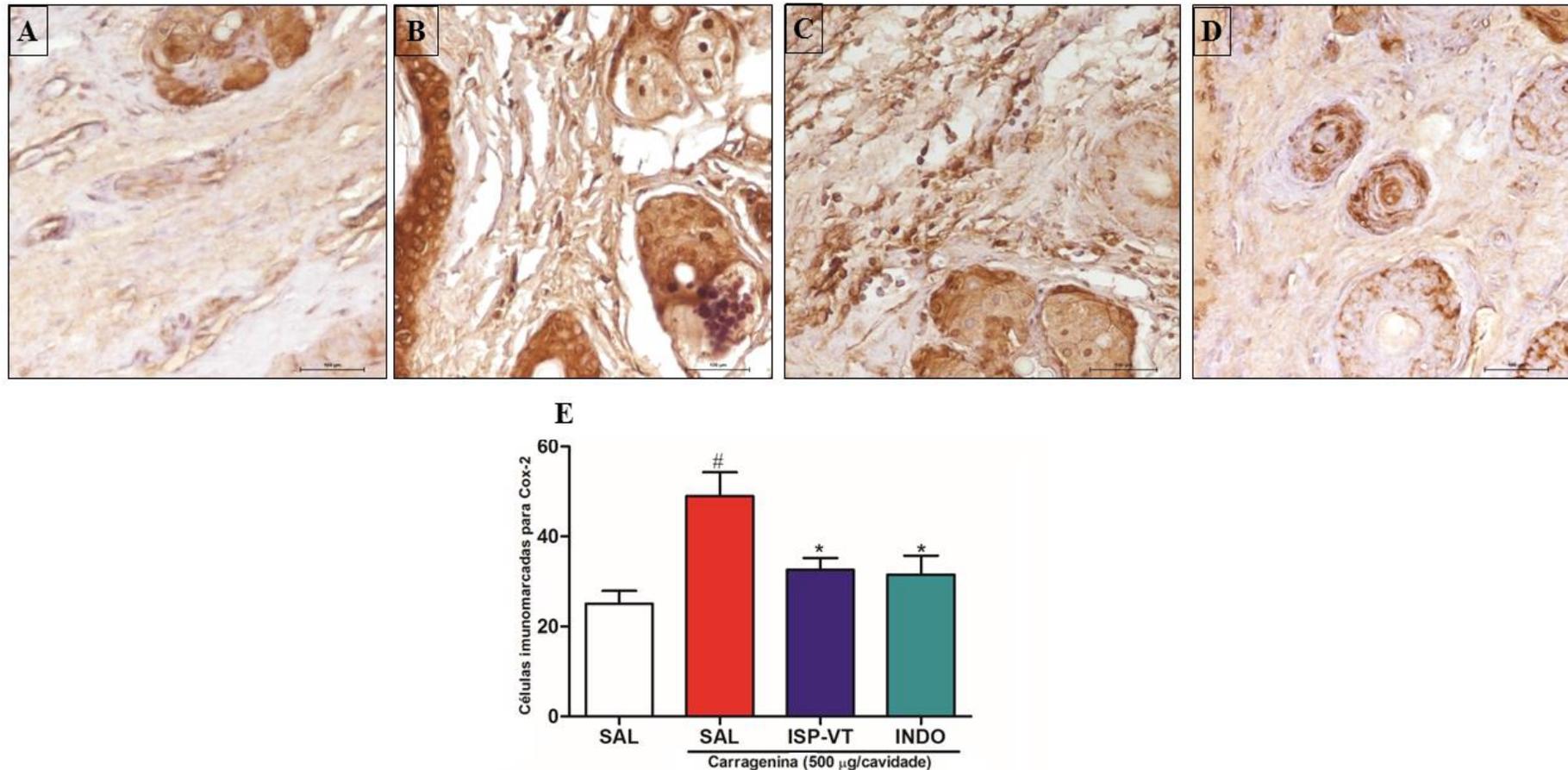
Os resultados da análise imunohistoquímica são mostrados na Figura 10A dos tecidos conectivos e epiteliais do grupo salina, das patas inflamadas de camundongos que receberam carragenina (10B) ($500\mu\text{g/pata}$). Após 3 horas de indução do edema a contagem mostrou que houve um aumento da imunocoloração para COX-2 no grupo carragenina (Fig. 9E), por outro lado, o pré-tratamento com ISP-VT (1,0 mg/kg, ip) (10C) diminuiu esta marcação das células de forma significativa ($32,57 \pm 2,68$; $p < 0,05$) bem como a droga padrão a indometacina (10D) (10 mg/kg, ip) também diminuiu a imunocoloração das células para COX-2 ($31,51 \pm 4,22$).

Figura 9. Edema de pata induzido por carragenina.



Na figura 8A mostrou que o ISP-VT foi eficaz em reduzir o edema da pata induzido por carragenina. Cada ponto representa a média \pm S.E. M de 5-6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo carragenina. A análise estatística foi realizada por testes one-way ANOVA, seguidos por *Newman-Keuls*. CG = carragenina; INDO = Indometacina; i.p. = intra peritoneal

Figura. 10. Imuno-histoquímica para COX-2 em tecidos de pata 4 h após a administração de carragenina e ensaio de inibição para COX

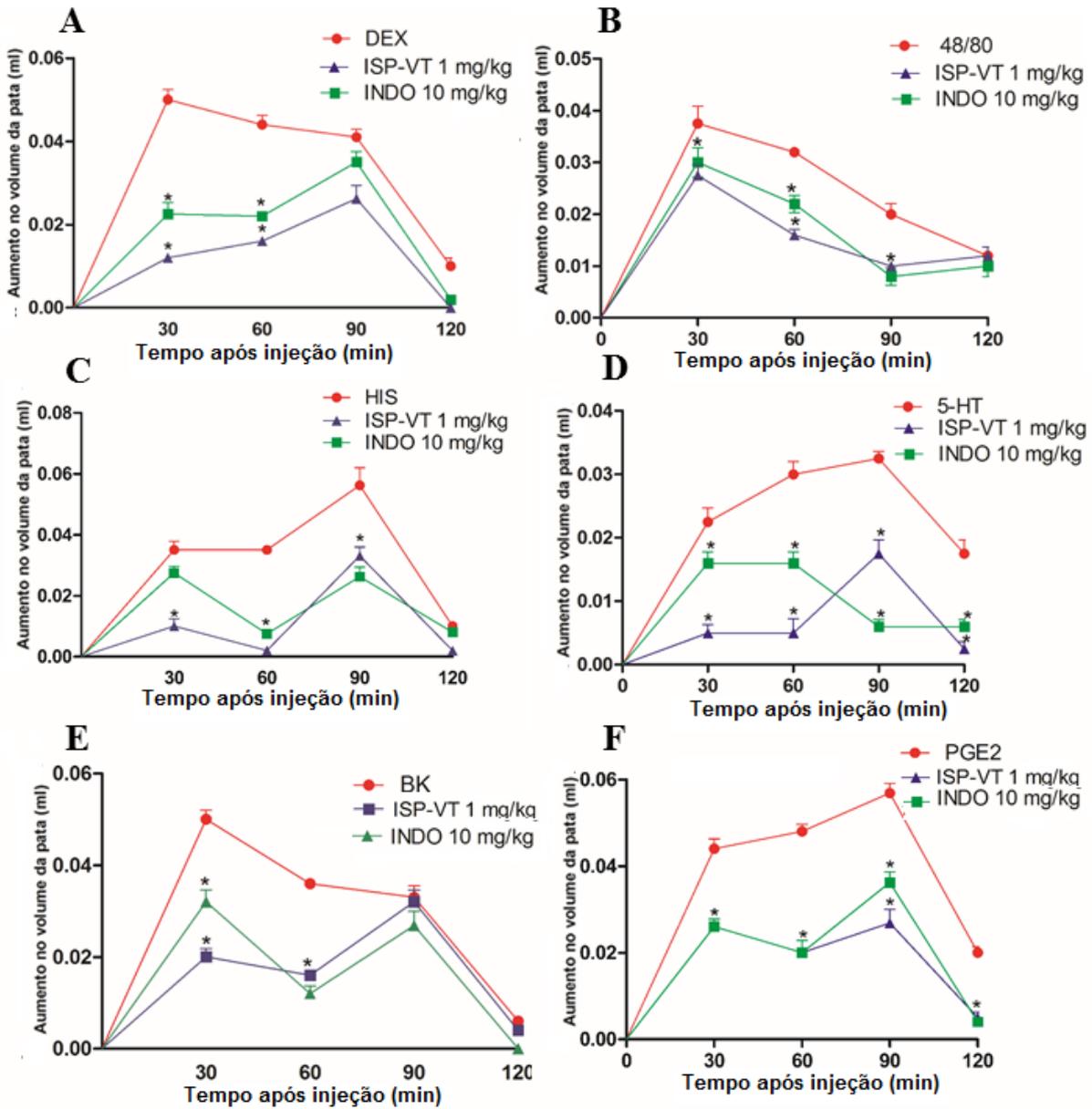


O painel 10A mostra a imuno-histoquímica camundongos tratados com solução salina, 10B: camundongos pré-tratados com solução salina + administração de carragenina, 10C: camundongos pré-tratados com ISP-VT (1mg / kg) + administração de carragenina, no 10D mostra camundongos pré-tratados com indometacina (10mg / kg) + administração de carragenina. Painel 9E pode-se observar que a administração de carragenina aumentou significativamente a expressão de COX-2 e assim como, o número de células marcadas em comparação ao grupo salina, porém o ISP-VT reduziu significativamente a imunomarcagem de COX-2 nas células do tecido das patas.

5.6 EFEITO DO ISP-VT NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR VÁRIOS AGENTES

A Figura 11 mostra o edema da pata induzido pelo composto 48/80 (Fig. 11A, $0,025 \pm 0,005$ ml), sulfato de dextrano (Fig. 11B, $0,036 \pm 0,008$ ml), histamina, (Fig. 11C, $0,034 \pm 0,009$ ml), serotonina (Fig. 11D, $0,025 \pm 0,003$ ml), PGE2 (Fig. 11E, $0,042 \pm 0,007$ ml) e bradicinina (Fig. 11F, $0,031 \pm 0,009$ ml). No entanto, o pré-tratamento com ISP-VT (1.0 mg/kg) inibiu efetivamente o edema de pata induzido pelo composto 48/80 ($0,016 \pm 0,003$ ml, 50% de inibição; Fig 11A), sulfato de dextrano ($0,020 \pm 0,006$ ml, 75,5% de inibição). Fig. 11B) histamina ($0,017 \pm 0,005$ ml, 79% de inibição; Fig 11C), serotonina ($0,007 \pm 0,003$ ml, 83,3% de inibição; Fig 11D), PGE2 ($0,019 \pm 0,005$ ml, 75,7% de inibição; Fig. 11E) e bradicinina ($0,018 \pm 0,005$ ml, 84,3% de inibição; Fig 11F), significativamente ($p < 0,05$) e A droga de referência, indometacina (10 mg/kg, ip), também inibiu significativamente o edema de pata induzido por todos esses agentes flogísticos.

Figura 11. Efeito do ISP-VT (1mg/kg), administrado por via intraperitoneal na formação de edema induzido por vários estímulos inflamatórios.



Os valores são médias \pm SEM de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ * vs agente flogístico. A análise estatística foi realizada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de Newman-Keuls do teste post hoc.

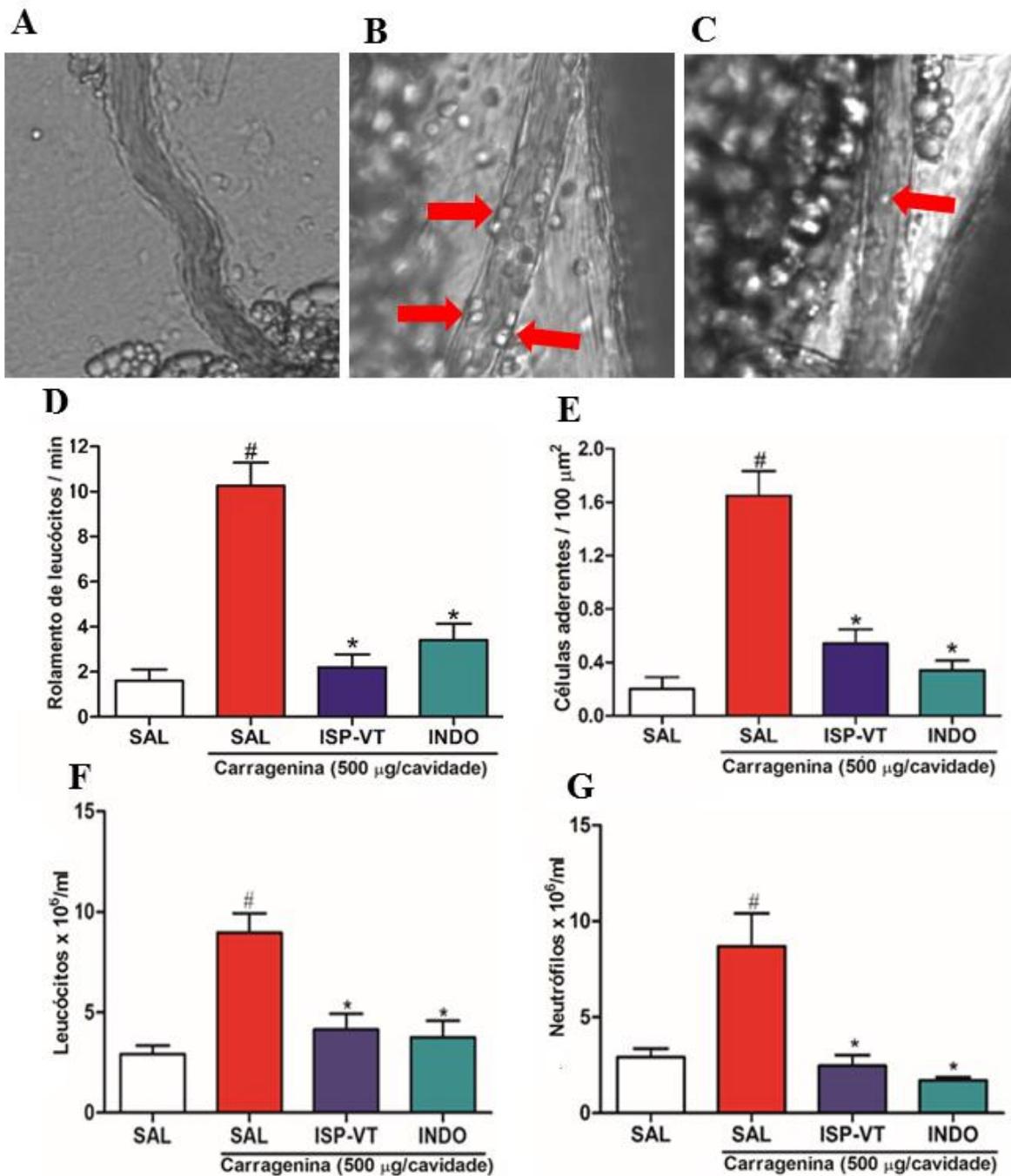
5.7 EFEITO DO ISP-VT NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

A avaliação da migração de neutrófilos foi realizada através do modelo de peritonite. Os animais foram pré-tratados com solução salina (2,5ml/kg), indometacina (10mg/kg) ou ISP-VT (1,0 mg/kg, i.p). A administração de carragenina induziu aumento significativo ($p < 0,05$) nos leucócitos totais ($8,69 \pm 1,71 \times 10^6$ células/ml, Figura 12F) com grande recrutamento de neutrófilos ($8,70 \pm 1,72 \times 10^6$ células/ml, Figura 12G). Em contraste, o pré-tratamento com ISP-VT (1,0 mg/kg, ip) reduziu significativamente a migração de leucócitos ($1,96 \pm 0,25 \times 10^6$ células/ml) e recrutamento de neutrófilos ($2,26 \pm 0,54 \times 10^6$ células/ml) para a cavidade peritoneal (77,44% e 70,02% de inibição, respectivamente) comparativamente ao efeito da indometacina (10 mg/kg, i.p) ($1,70 \pm 0,16 \times 10^6$ células/ml e $1,69 \pm 0,17 \times 10^6$ células/ml, respectivamente).

5.8 EFEITO DO ISP-VT NO ROLAMENTO E ADESÃO DE LEUCÓCITOS INDUZIDOS POR CARRAGENINA.

A administração de carragenina promoveu o aumento significativo ($p < 0,05$) do rolamento e adesão de leucócitos na microcirculação mesentérica ($10,20 \pm 1,01$ rolagem de leucócitos/min e $1,65 \pm 0,18$ células aderentes/100 mm², respectivamente; Figura 12B) quando comparados ao grupo salina ($0,20 \pm 0,08$ rolagem de leucócitos/min e $1,60 \pm 0,50$ de células aderentes/100 mm²; Figura 12A). Por outro lado, a administração de ISP-VT (1,0 mg / kg, i.p) reduziu significativamente o rolamento de leucócitos (Figura 12C; Figura 12D) ($2,20 \pm 0,58$ rolagem de leucócitos / min) e aderência de tais células (Fig. 12E) ($0,54 \pm 0,10$ células aderentes/100 mm²) na microcirculação mesentérica, assim como a indometacina ($0,34 \pm 0,07$ de células aderentes/100 mm² e $3,40 \pm 0,74$ rolagem de leucócitos/min).

Figura 12. ISP-VT reduz a migração celular e diminui o rolamento e a adesão de leucócitos na microcirculação mesentérica de camundongos, e atividade da enzima MPO.



Os animais foram pré-tratados por via i.p. com ISP-VT (1 mg / kg) ou indometacina (Indo, 10 mg / kg i.p.) e 30 min mais tarde foram injetados i.p. com carragenina (Cg, 500 µg / cavidade) e as análises realizada após 4 horas. A Migração celular foi avaliada, (12F) contagem total de leucócitos e (12G) contagem de neutrófilos. A aderência (Painel 12D) e a adesão (Painel 12E) dos leucócitos foram avaliadas por microscopia intravital, 4 horas após a indução do estímulo inflamatório. Cada coluna representa a média ± S.E.M de 5-6 animais por grupo. Os valores são médias ± SEM de 5-6 animais por grupo. #p <0,05 comparado ao grupo salina; * p <0,05 comparado ao grupo

carragenina. A análise estatística foi realizada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida *Newman-Keuls* e de teste post hoc.

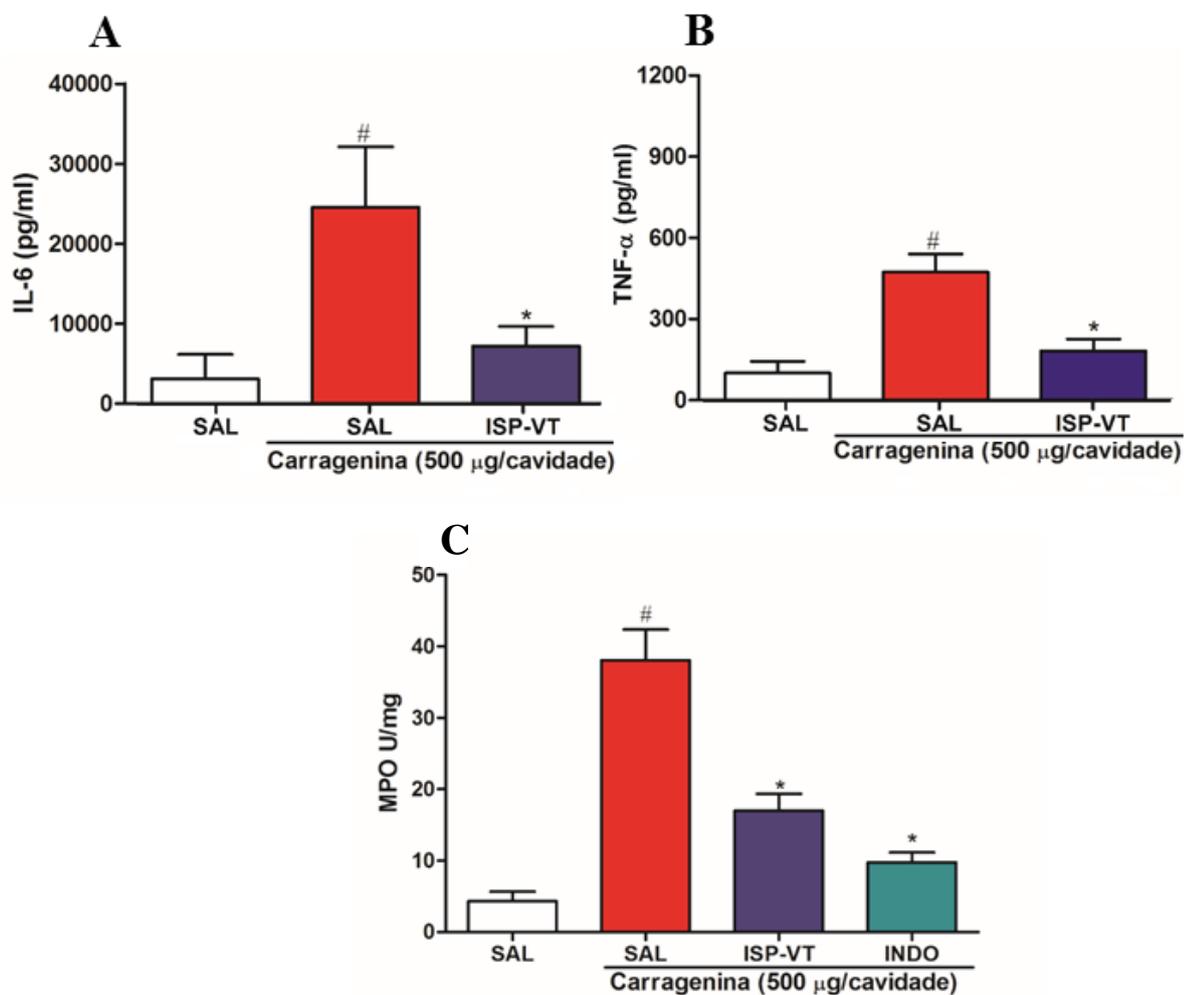
5.9 EFEITO DO ISP-VT NOS NÍVEIS DE TNF- α e IL-6.

A Figura 13 mostra que ocorreu um aumento significativo nos níveis de TNF- α e IL-6 no grupo que recebeu a carragenina ($473,40 \pm 67,20$ pg/ml e $24.542,00 \pm 7.586,00$ pg/ml, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (solução salina) ($100,5 \pm 42,63$ pg/ml e 3.128 ± 3.301 pg/ml de exsudato peritoneal, respectivamente). Enquanto que o pré-tratamento com ISP-VT (1,0 mg / kg, ip) reduziu significativamente os níveis das citocinas TNF-a ($182,99 \pm 43,80$ pg/ml; Fig. 13A) e a IL-6 ($7.185,00 \pm 2.465,00$ pg/ml; 13B) no líquido peritoneal.

5.10 EFEITO DO ISP-VT NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A administração de carragenina produziu um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da enzima MPO nos exsudatos peritoneais ($38,04 \pm 04,32$ U/ml de exsudato peritoneal) (Fig. 13C). O pré-tratamento com ISP-VT (1.0 mg/kg, i.p.) inibiu em 55,38% ($16,97 \pm 2,35$ U/ml de exsudato peritoneal) o aumento da atividade da MPO causada pela carragenina. O fármaco anti-inflamatório padrão, a indometacina (10 mg/kg, i.p.) também inibiu a actividade da MPO ($9,76 \pm 1,36$ U / ml de exsudado peritoneal).

Figura 13. Efeito do ISP-VT na produção de citocinas e na atividade da Mieloperoxidase.

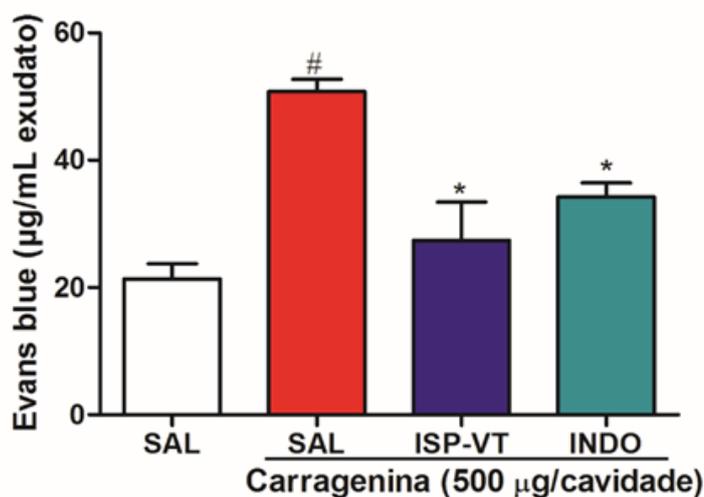


Os níveis de TNF- α (painel 13a) ou IL-6 (painel 13B) nas cavidades peritoneais foram medidos 4 horas após a injeção de carragenina. Cada ponto representa a média \pm SEM de cinco e seis animais. * $p < 0,05$ em comparação com animais tratados com solução salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo carragenina. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido de Newman-Keuls e do teste post hoc.

5.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ISP-VT PERMEABILIDADE VASCULAR

Como mostrado na Figura 14 a administração de carragenina promove um aumento significativo na permeabilidade vascular ($50,78 \pm 1,92 \mu\text{g/ml}$ de exsudato, $p < 0,001$) quando comparado ao grupo salina ($21,35 \pm 2,39 \mu\text{g/ml}$ de exsudato). No entanto, o pré-tratamento com ISP-VT foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) a permeabilidade vascular ($27,39 \pm 6,04 \mu\text{g/ml}$ de exsudato), indometacina (10 mg/kg) também reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$) a permeabilidade vascular ($34,24 \pm 2,19 \mu\text{g/ml}$ de exsudato).

Figura 14 - ISP-VT reduz a permeabilidade vascular.



Cada coluna representa a média \pm S.E.M de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com animais tratados com solução salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo carragenina. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguido de Newman-Keuls e do teste post hoc.

5.9 ISP-VT REDUZIU A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (CONCENTRAÇÃO DE MDA)

A administração de carragenina via i.p. ($2,45 \pm 0,20$ nmol/ml) promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de MDA no exsudado peritoneal em comparação com a administração de solução salina ($1,24 \pm 0,10$ nmol/ml). Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com ISP-VT (1,0 mg/kg, i.p.) inibiu o efeito da carragenina e reduziu de forma significativa os níveis de MDA ($1,42 \pm 0,19$ nmol/ml, 42,04% de inibição) para valores semelhantes aos do grupo de controle (Figura 15A).

5.10 ISP-VT REDUZ A CONCENTRAÇÃO DE NITRITO

A quantidade de NO_2^- no exsudato peritoneal aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) pela administração de carragenina quando comparada ao grupo que recebeu somente a administração de salina ($0,83 \pm 0,01$ μM / ml e $0,46 \pm 0,02$ μM / ml, respectivamente). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com indometacina (10 mg/kg, i.p.) ou ISP-VT (1,0 mg/kg, i.p.) reduziram significativamente a concentração de NO_2^- ($0,36 \pm 0,06$ e $0,33 \pm 0,08$ μM /ml, respectivamente) sendo que o último teve uma redução correspondente a 60,24% (Figura 15B).

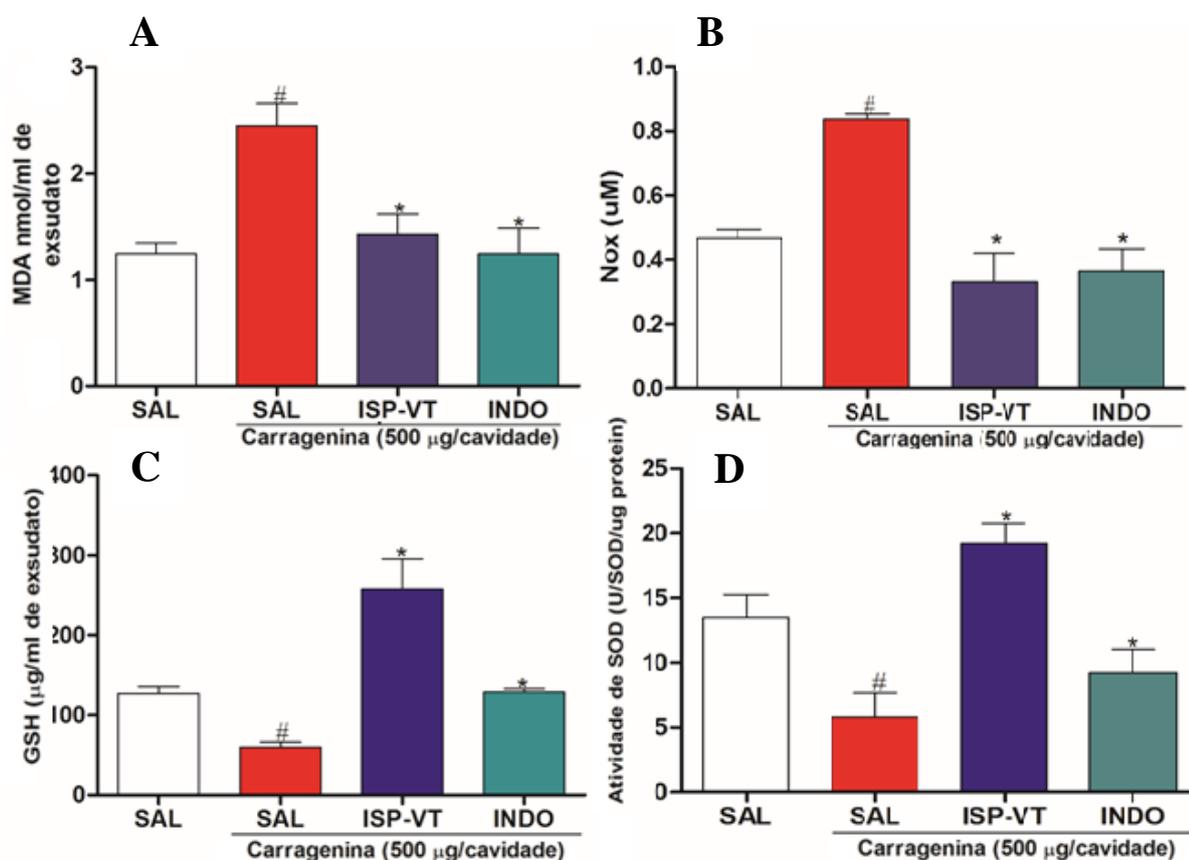
5.11 ISP-VT AUMENTA OS NÍVEIS DE GSH.

A Figura 15C mostra que a administração de carragenina diminuiu os níveis de GSH ($59,82 \pm 6,41$ μg /ml de exsudato peritoneal) de forma significativa ($p < 0,05$), contudo o pré-tratamento com ISP-VT (1,0 mg/kg, i.p) aumentou esses níveis de forma significativa ($257,9 \pm 38,02$ μg /ml de exsudato peritoneal). A indometacina (10 mg/kg, i.p) o fármaco padrão manteve a concentração de GSH aos níveis basais em comparação com o grupo salina ($128,9 \pm 3,91$ μg /ml versus $127,2 \pm 8,77$ μg /ml, respectivamente).

5.12 ISP-VT AUMENTA A ATIVIDADE DE SOD

A atividade da SOD em animais saudáveis foi de $13,48 \pm 0,76$ U/mg. A administração de carragenina diminuiu a atividade da SOD no exsudato peritoneal para $5,83 \pm 1,84$ U/mg (Figura 15D). Todavia, o pré-tratamento com ISP-VT (1,0 mg/kg, i.p) ou indometacina (10 mg/kg, i.p) aumentou significativamente ($p < 0,005$) a atividade da SOD ($19,21 \pm 1,54$ U/mg e $9,22 \pm 1,80$ U/mg, respectivamente) quando comparado com o grupo carragenina.

Figura 15. Efeito do ISP-VT nos níveis de (11A) malondialdeído (MDA), (11B) nitrito (NO₂-), (11C) glutatona (GSH) e (11D) superóxido dismutase (SOD) no exsudato peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina.

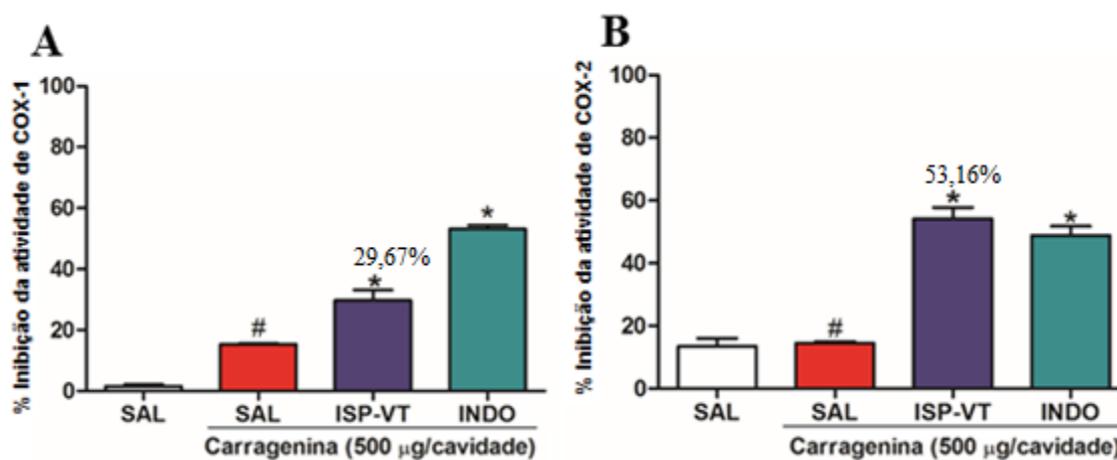


Os animais foram pré-tratados com solução salina, ISP-VT (1 mg / kg, i.p.) ou indometacina (10 mg / kg, i.p.) 30 minutos antes da indução, posteriormente receberam 250 µL de carragenina (500µg/cavidade, i.p.). Os parâmetros bioquímicos foram medidos 4 horas após a injeção de carragenina. Os resultados são expressos como a média ± SEM de 5 a 6 animais por grupo. #p <0,05 vs. grupo tratado com solução salina; * p <0,05 vs. grupo carragenina. Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida por Newman-Keuls e pelo teste post-hoc.

5. 12 EFEITO DO ISP-VT NO ENSAIO DE INIBIÇÃO DA COX *IN VITRO*

Ensaio de inibição da COX-1 e COX-2 foi realizado para avaliar a capacidade de ISP-VT para inibir estas enzimas, e observamos que o mesmo inibiu ambas as isoformas. Como mostrado na Figura 15, o ISP-VT foi capaz de promover uma inibição (média da atividade de COX-2, $54,19 \pm 3,56\%$), significativa ($p < 0,001$) (16A) quando comparado aos grupos tratados apenas com solução salina ($13,46 \pm 2,56\%$, $14,56 \pm 0,47\%$ grupo salina e grupo carragenina, respectivamente), o fármaco padrão indometacina foi eficaz em inibir significativamente a atividade da COX-2 (atividade média $48,85 \pm 2,96\%$) ($p < 0,001$). O ISP-VT foi capaz de inibir a COX-1 (atividade média $29,67 \pm 3,43\%$) (16B) quando comparado com o grupo carragenina (atividade média $14,56 \pm 0,47\%$) ($p < 0,001$), por outro lado, foi menos eficaz em inibindo esta isoforma quando comparado com a droga padrão de indometacina (atividade média de COX-1 $53,16 \pm 1,23\%$).

Figura 16. Efeito do ISP-VT no ensaio de inibição da COX *in vitro*

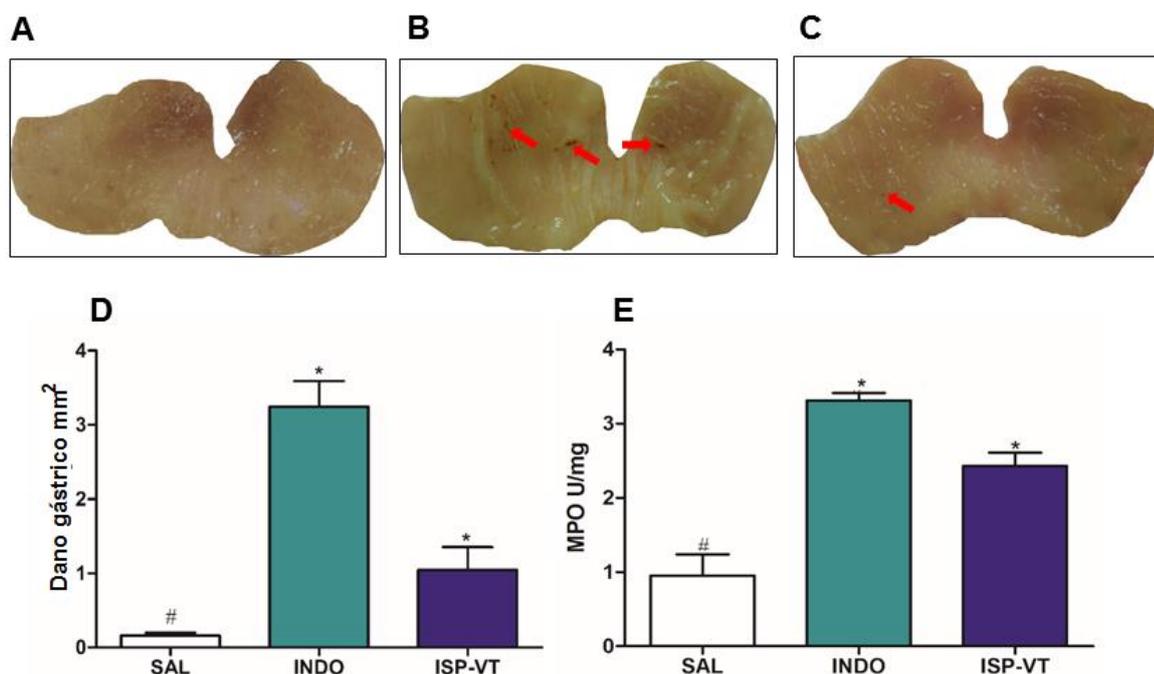


Para avaliar a inibição das ciclooxigenases (COX1, COX-2), foi utilizado o kit de ensaio colorimétrico para rastreamento de inibidores específicos de COX da Cayman Chemical, Como mostrado no Painel 16B, o ISP-VT foi capaz de promover uma inibição significativa da atividade da COX-2 ($p < 0,0005$) quando comparado aos grupos tratados apenas com solução salina, a indometacina foi eficaz na inibição da atividade da COX-2. No Painel 16A ISP-VT foi capaz de inibir COX-1 quando comparado com o grupo carragenina, por outro lado, foi menos eficaz na inibição desta isoforma quando comparado com o fármaco padrão indometacina. Cada linha representa a média \pm SEM de 5-6 animal por grupo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina * $p < 0,05$ versus o grupo carragenina. Foi realizada a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

5.13 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GÁSTRICA

O protocolo experimental foi realizado com o objetivo de avaliar a toxicidade gástrica do ISP-VT (100 mg / kg v.o) e comparar com a indometacina (20mg / kg v.o, fármaco padrão). A Figura 16 mostra que a indometacina promoveu dano gástrico ($3,24 \pm 0,34$ mm) e aumentou a atividade da enzima MPO ($3,31 \pm 0,1$ UMPO/mg de tecido gástrico, Figura 17B) significativamente ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo tratado com solução salina ($0,16 \pm 0,04$ mm e $0,95 \pm 0,28$ UMPO / mg de tecido gástrico; Figura 17A). Por outro lado, o pré-tratamento com ISP-VT ($0,83 \pm 0,27$ mm) diminuiu o dano gástrico quando comparado ao grupo indometacina, e também diminuiu a atividade da MPO ($2,30 \pm 0,17$ UMPO / mg de tecido gástrico; Figura 17C-E) de forma significativa, ($p < 0,001$).

Figura 17. O ISP-VT apresentou menor toxicidade na mucosa gástrica e reduziu os níveis de MPO.

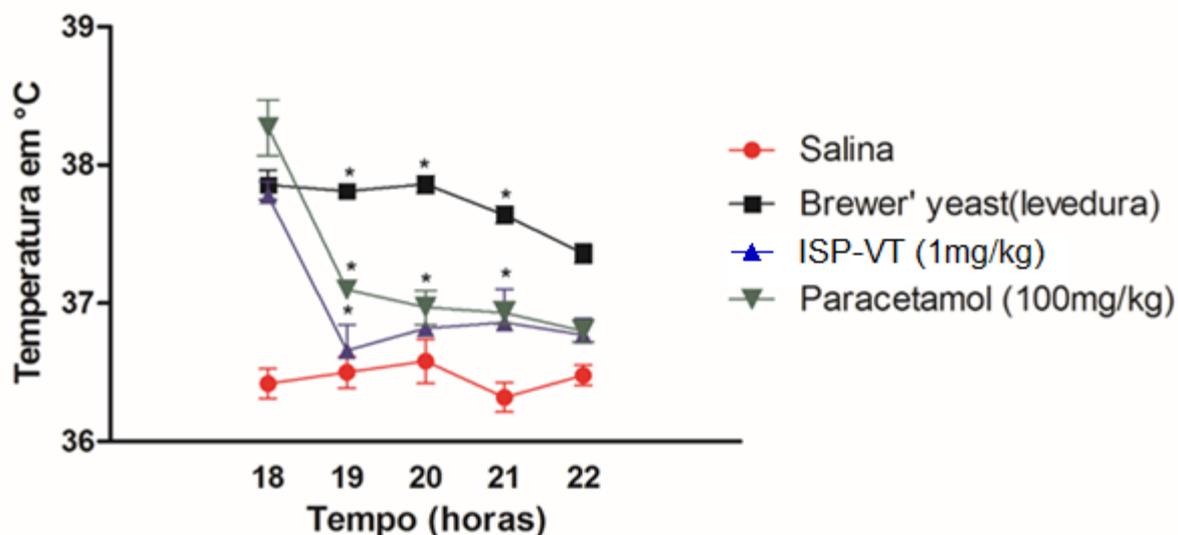


A figura 17-B avaliação macroscópica da toxicidade gástrica e o ensaio de atividade de MPO 17C. Os animais foram pré- tratados com solução salina, ISP-VT (100 mg / kg, p.o.) ou indometacina (20 mg / kg, p.o.). Avaliamos os parâmetros 7h após a administração do medicamento. Cada coluna representa a média \pm SEM de 5-6 ratinhos por grupo. * $P < 0,005$ comparado ao grupo salina. Análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls.

5.14 EFEITO DO ISP-VT NA HIPERTERMIA INDUZIDA POR LEVEDURA EM CAMUNDONGOS

Como mostrado na Figura 18, a injeção subcutânea (s.c.) de levedura de cerveja provocou um aumento significativo da temperatura retal ($37,86 \pm 0,1152$ ° C e $36,66 \pm 0,1778$ ° C para controle salina, $p < 0,001$) com diferenças estatisticamente significativas em todos os Por outro lado, o pré-tratamento com ISP-VT reduziu significativamente a temperatura retal ($36,66 \pm 0,1691$ ° C, $p < 0,001$) a partir de 19 horas após a indução da febre e permaneceu efetivo em todos os tempos avaliados. O fármaco padrão utilizado foi o paracetamol (100 mg/kg) e foi eficaz na redução da temperatura retal a partir de 19 horas ($37,10 \pm 0,036$ ° C, $p < 0,05$) e também se manteve eficaz em todos os tempos avaliados.

Figura 18. Efeito de ISP-VT e Paracetamol na pirexia induzida por levedura em camundongos.



O ISP-VT foi avaliado utilizando uma injeção subcutânea de levedura de cerveja (10 ml / kg de 15% p / v). para elevação da temperatura corporal de camundongos. Após 18 h da injeção de levedura, foram administrados fármacos padrão 100 mg/kg de paracetamol, p.o. foi tomado como droga padrão, e ISP-VT (1mg/kg, i.p) . A temperatura retal foi medida por termômetro digital no intervalo de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a administração do fármaco. Cada ponto representa a média \pm S.E. M de 5-6 animais por grupo. * $P < 0,05$ em relação ao grupo salina. A análise estatística foi realizada por testes one-way ANOVA, seguidos por Newman-Keuls.

5. 17 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ISP-VT NA TOXICIDADE AGUDA

Nós usamos uma dose de 2000 mg/kg para avaliar a toxicidade do ISP-VT e descobrimos que essa dose não causou toxicidade ou morte. Ao final de 14 dias, a taxa de sobrevivência foi de 100% e não houve diferenças comportamentais quando comparados aos animais controles. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso corporal ao longo dos 14 dias do experimento, nem no consumo de água ou alimento pelos animais (Tabela 1 e 2). Além disso, a análise do eritrograma mostrou que não houve variação ou diminuição da massa eritróide entre os grupos ISP-VT e grupo controle.

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de hemoglobina ou valores de hematócrito; As frações VCM e HCM estavam dentro da faixa normal em ambos os grupos (Tabela 3). As análises bioquímicas mostraram que a função renal estava normal em animais tratados com ISP-VT, sem diferença significativa nos níveis de creatinina ou uréia em relação aos animais tratados com salina. Também não observamos diferença significativa nos níveis de ALT (SGPT) ou AST (SGOT) (Tabela 3). A análise macroscópica determinou que o grupo tratado com ISP-VT não apresentou qualquer diferença ou anormalidade no peso corporal médio ou na análise macroscópica dos órgãos internos quando comparado ao grupo controle (Tabela 4). A análise histológica dos órgãos também não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 4). Como mostrado na Figura 19 e na Tabela 4, não foram observadas alterações que indicassem patologia no grupo tratado com ISP-VT.

	Respiração	G1	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		G2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Constipação Intestinal	G1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		G2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mortalidade		G1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		G2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Escores: 4: normal; 3: levemente reduzido; 2: moderadamente reduzido; 1: intensamente reduzido; 0: ausente (De acordo com Brito et al).

Tabela 2

Efeito do ISP-VT (2.000 mg/kg, *v.o.*) no ganho de Massa Corporal (g) e na Massa relativa dos órgãos (%) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos.

Tratamento	Dose	Massa Corporal (g)		Massa relativa dos órgãos (%)				
		Antes	Depois	Fígado	Coração	Baço	Rins	Intestino Delgado
Controle	2.5 (ml/kg)	27.00 ±0.57	28.50±0.80	4.28±0.57	0.50±0.09	0.46±0.02	1.29±0.05	5.45±0.55
ISP-VT	2.000 (mg/kg)	26.00±0.81	29.50±0.95	4.17±0.02	0.52±0.06	0.49±0.06	1.34±0.04	5.67±0.78

Os valores são apresentados como média ± EPM. Número de animais/ grupo: cinco. *P <0,05 vs. Grupo controle (salina), Teste t de Student. A massa relativa dos órgãos foi calculada como a relação da massa do órgão/massa corporal após o tratamento x 100.

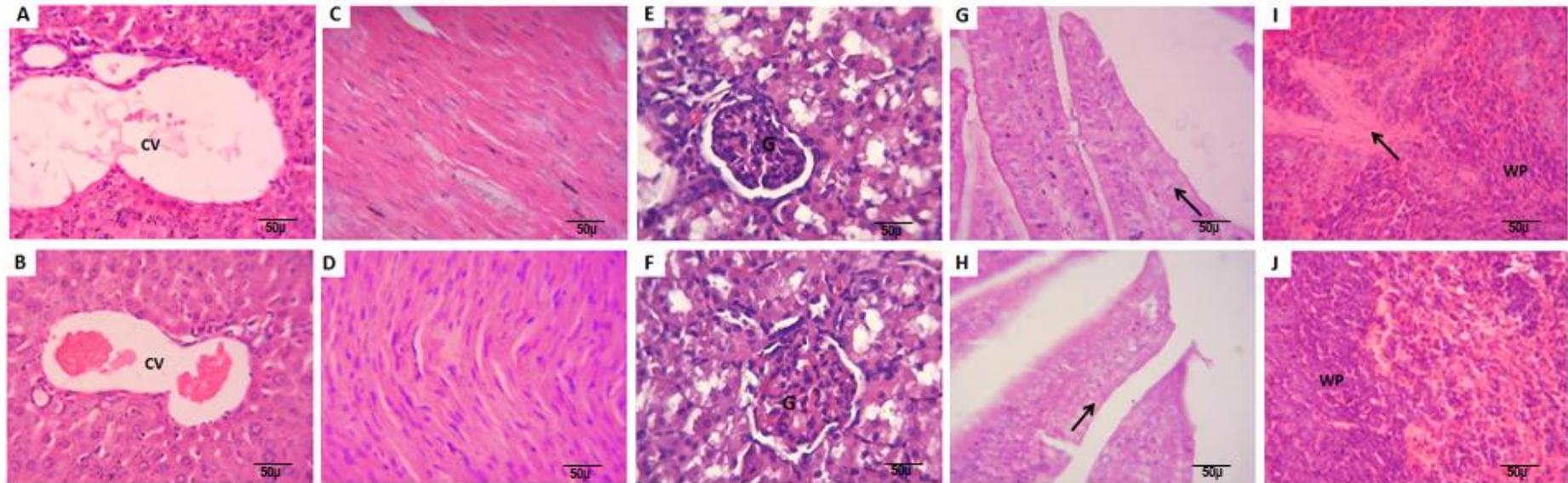
Tabela 3

Análises hematológicas e bioquímicas de sangue e plasma (respectivamente) após administração oral em dose única do ISP-VT (2.000 mg/kg) em camundongos fêmeas após 14 dias consecutivos.

Parâmetros		Controle	ISP-VT (2.000 mg/kg, v.o.)	
Hematológicos	Eritrócitos (milhões/mm ³)	2.27±0.34	2.47±0.58	
	Hemoglobina (g/dL)	5.16±0.25	5.50±0.33	
	Hematócrito (%)	47.00±0.37	50.00±1.65	
	-VCM (fL)	24.44±5.65	26,50±6.58	
	-HCM (pg)	11.24±1.63	13.72±3.70	
	-CHCM (g/dL)	26.97±3.78	29.55±2.40	
	Leucócitos/mm ³	3.875±324.17	3.600±256.00	
	-Segmentados (%)	30.00±1.20	33.75±1.33	
	-Monócitos (%)	6.75±1.02	4.50±1.07	
	-Linfócitos (%)	35.2±1.74	39.00±1.00	
	-Eosinófilos (%)	3.00±0.00	2.00±0.00	
	Plaquetas/μL	873.135	880.456	
Bioquímicos		0.21±0.06	0.24±0.04	
	Função Renal	Creatinina (mg/gL)	41.77±3.60	39.94±3.29
		Ureia (mg/gL)		
			3.17±0.11	3.08±0.16
	Função Hepática	Proteínas Totais (g/dL)	52.38±6.46	52.48±7.86
		ALT (TGP) (U/L)	187.40±4.05	176.34±5.17
	AST (TGO) (U/L)			

Os valores são apresentados como média ± EPM. Número de animais/ grupo: cinco. *P <0,05 vs. Grupo controle (salina), Teste t de Student. Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).

Figura 19. Análise histopatológica dos órgãos dos animais analisados para o teste de toxicidade aguda.



(A) Histologia do fígado do grupo salina e (B) grupo Isp-Vt. CV, veia central. Histopatologia miocárdica normal mostrada no grupo salina (C) e (D) no grupo Isp-Vt. Imagens histológicas do rim para o grupo salina (E) e (F) do grupo Isp-Vt. G, glomérulo. Em (G) pode se observar as imagens histológicas do intestino do grupo salina (G) e grupo (H) Isp-Vt. A seta indica células epiteliais. Em (I) evidência-se a histologia do baço para o grupo salina e do grupo Isp-Vt em (J). WP, (polpa branca). Ad seta indicam trabéculas do tecido conjuntivo. Coloração feita com hematoxilina e eosina em (A-J) a uma ampliação de 150X.

Tabela 4. Efeito do ISP-VT (2000 mg / kg v.o) na avaliação histopatológica dos tecidos.

Grupos	Salina	ISP-VT
Parâmetros do Fígado		
Escore de esteatose	1 (1-1)	1 (1-1)
Escore de inflamação	1 (1-1)	1 (1-1)
Escore de necrose	1 (1-1)	1 (1-1)
Escores do rim	0 (0-0)	0 (0-1)
Escores do intestino	0 (0-0)	0 (0-1)
Escores do coração	0 (0-0)	0 (0-0)
Escores do baço	0 (0-0)	0 (0-1)

Os valores são apresentados como média \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. grupo controle (salina), teste t de Student e teste de Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o ISP-VT foi eficaz na redução de edema induzido por carragenina e mediadores inflamatórios, que ele diminui também a migração celular, atuando tanto na inibição do rolamento e adesão, outra atividade descrita foi sua atividade antipirética e inibitória de Ciclooxygenases, além disso diminui o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica com aumento de antioxidantes,

Investigamos a atividade anti-inflamatória do ISP-VT, uma vez que dados na literatura já mostravam o efeito benéfico do seu homólogo natural, o ácido vanílico, no processo inflamatório (CHOU et al. 2010; HAIDA et al., 2011; CALIXTO-CAMPOS et al., 2015; MINH et al., 2016). Inicialmente, o primeiro modelo testado foi o edema de pata induzido por carragenina, que é um protótipo da fase exsudativa da inflamação aguda (DIVAKAR et al., 2010; SARKAR, 2015). Após uma hora de injeção de carragenina, o aumento da permeabilidade vascular é geralmente mediado pela histamina e serotonina. Na segunda hora, o aumento da permeabilidade deve-se à atividade das cininas, como a bradicinina, bem como ao recrutamento de citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-2 e IFN- γ , (VILAR et al., 2016). No entanto, a fase de maior intensidade do edema ocorre na terceira e quarta hora após sua aplicação, sendo caracterizada pela ação das prostaglandinas na permeabilidade capilar, principalmente na PGE2, com intensa infiltração de células polimorfonucleares (PMN), além disso sabe-se que o edema de pata induzido por carragenina é sensível aos inibidores de COX (SMITH et al., 1998; PRAJAPATI et al., 2014).

Nossos resultados são os primeiros da literatura a demonstrar a atividade anti-inflamatória do ISP-VT, um análogo sintético de ácido vanílico. A literatura tem apenas um relato sobre a atividade antitrombótica de ésteres de ácido vanílico (YUN-CHOI et al., 1996). Mostramos que o ISP inibiu a formação de edema no pico do edema às 3 horas. Assim, ao atuar nessa segunda fase, o ISP-VT pode estar atuando pela inibição da COX e, conseqüentemente, da PGE2, já que essa fase é caracterizada por sua liberação intensa. Como já mencionado, o edema de pata induzido por carragenina envolve inúmeros mediadores, e a atividade anti-inflamatória de ISP-VT no edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos foi investigada. O dextrano e o composto 48/80 promovem a formação de edema osmótico acelular, principalmente aumentando a permeabilidade vascular e a liberação de aminas vasoativas, como a histamina e a serotonina e a bradicinina que são derivadas da degranulação de mastócitos (MALING et al., 1974; CHATTERJEA et al., 2012; WERNERSSON; PEJLER, 2014; SILVA et al., 2015).

Nossos dados demonstraram que o ISP-VT diminuiu significativamente o edema de pata induzido pelo composto 48/80 e o DEX. O ISP-VT pode atuar estabilizando a membrana do mastócito, impedindo a liberação do conteúdo presente em seus grânulos. De fato, essa afirmação foi confirmada porque nossos resultados mostraram que a ISP-VT também inibiu a formação de edema induzido por histamina e 5-HT. A histamina é uma importante amina bioativa liberada pela degranulação dos mastócitos. A ativação dos receptores H1 promove vasodilatação das arteríolas, aumentando o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento de plasma (RILEY; WEST, 1953; SJOERDSMA; WAALKES; WEISSBACH, 1957; HUANG; KUSHNIR-SUKHOV et al., 2007; THURMOND, 2008; KIMURA et al., 2015; RIBATTI, 2016)

Outro estudo já demonstrou que o ácido vanílico diminuiu a liberação de histamina pela inibição da degranulação de mastócitos em células HMC-1. A 5-HT foi identificada como uma molécula imunomoduladora porque tem uma capacidade de estimular ou inibir a inflamação. Essa capacidade está relacionada aos mecanismos de expressão dos receptores 5-HT (5-HTR) nos leucócitos. Um estudo relacionado foi descrito na literatura demonstrando uma possível atividade antinoceptiva do ácido vanílico, sugerindo que sua ação é devida à inibição dos receptores serotoninérgicos tipo 5HT3 e 5HT1 (ARREOLA et al., 2015; CHOI et al., 2015; DE LOS ANGELES YRBAS et al., 2015).

A serotonina, juntamente com outros mediadores, como a PGE2, e a bradicinina são responsáveis pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade vascular (KUSHNIR-SUKHOV et al., 2007; SHAJIB; KHAN, 2015). Portanto, investigamos o desempenho do ISP-VT com esses mediadores e nossos resultados mostraram que ele reduz o edema de pata induzido por PGE2 e bradicinina. A bradicinina é responsável por causar aumento da permeabilidade vascular e dilatação das arteríolas (REGOLI; BARABE, 1980; FROHLANDER; LJUNGGREN; LERNER, 1989; HOFMAN et al., 2016).

Com base no que já foi mostrado acima, estes resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório do ISP-VT está intimamente relacionado com a inibição da liberação de mediadores inflamatórios ou com a atividade de tais moléculas. Nós também investigamos o papel do ISP-VT no extravasamento vascular usando o corante azul Evans, que forma um complexo estável com proteínas plasmáticas (principalmente albumina) (MOTIRAM KAKALIJ et al., 2016). Nossos dados mostraram que o pré-tratamento com ISP-VT reduziu a permeabilidade vascular induzida por carragenina, um efeito que foi comparável ao da indometacina. Estes dados sugerem que o efeito do ISP-VT na permeabilidade vascular foi

através da inibição de mediadores inflamatórios que interagem com a permeabilidade e que já foram discutidos acima.

A PGE2 é considerada um mediador inflamatório lipídico essencial na patogênese da inflamação. Dados da literatura mostraram que o ácido vanílico inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, PGE2, bem como a expressão de COX-2 (KIM et al., 2011). Quando ocorre a desregulação do ciclo de indução e produção de PGE2, isso provoca a exacerbação da resposta inflamatória, uma vez que é responsável pela indução da expressão de COX-2 (OBERMAJER et al., 2011).

Neste estudo, utilizando o modelo de peritonite induzida por carragenina, demonstramos que o recrutamento celular na cavidade peritoneal 3 h após a administração de carragenina, reduziu de forma significativa em camundongos pré-tratados com ISP-VT, diminuindo a contagem de leucócitos, bem como neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal, o que pode ser confirmado pelo ensaio da mensuração da mieloperoxidase (MPO) no exsudato inflamatório. A MPO é uma enzima encontrada principalmente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, liberada em locais inflamatórios que induzem danos ao tecido adjacente e, portanto, contribuem para a patogênese da inflamação e, como sua atividade está diretamente ligada à infiltração de neutrófilos nos tecidos, é usada como um marcador de infiltração de neutrófilos (HAMPTON, 1999; PARKER, 2013; WINTERBOURN; KETTLE; BJORNSDOTTIR et al., 2015; ODOBASIC; KITCHING; HOLDSWORTH, 2016). Os resultados mostraram que o pré-tratamento com ISP-VT reduziu significativamente os níveis de MPO, reforçando que o efeito anti-inflamatório deste composto semissintético envolve, pelo menos em parte, a inibição da infiltração de neutrófilos.

A migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para áreas infectadas ou lesionadas desempenha um papel fundamental na resposta de defesa do hospedeiro durante o processo inflamatório neutrófilos circulantes representam uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra patógenos ao migrar para os sítios inflamatórios em respostas aos sinais quimiotáticos liberados por várias citocinas, e sua infiltração nos tecidos inflamados é uma das características da resposta inflamatória inata aguda, podendo também causar lesão tecidual e a exacerbação do processo inflamatório (CANO; VARGAS; LAVOIE, 2015; PIETROSIMONE, 2015; WÉRA; LANCELLOTTI; OURY, 2016)

Citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-6 geralmente podem subsequentemente ativar novos neutrófilos e células endoteliais, que levam à interação de neutrófilos, culminando nos eventos sequenciais de rolamento, adesão e transmigração na microcirculação. A produção excessiva ou inapropriada de citocinas pró-inflamatórias pode

resultar em várias condições patológicas que envolvem destruição tecidual e exacerbação da resposta inflamatória. (SCHEURICH; 2003; LIU, 2005; MOLLER; VILLIGER et al., 2006; POPA et al., 2007; SCHETT et al., 2013).

Neste estudo, observamos que o pré-tratamento com ISP-VT promoveu uma redução dos níveis de TNF- α e IL-6 no líquido peritoneal de camundongos com peritonite induzida por carragenina. O TNF- α é o primeiro dos agentes liberados em resposta à carragenina e é um marcador de citocinas de inflamação aguda, também responsivo à biossíntese de IL-6 (SCHETT et al., 2013; PALOMO et al., 2015; WYNN, 2015; KISHIMOTO; TANAKA, 2016). Em concordância, o ácido vanílico inibiu a produção de TNF- α , IL-6 e PGE2 por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos em estudos *in vitro* e *in vivo* (KIM et al., 2011; CALIXTO-CAMPOS et al., 2015).

A febre é um dos componentes da resposta inflamatória aguda que ocorre alterando o ponto de ajuste térmico modulado pelo hipotálamo em resposta a um estímulo externo, como lesão, trauma ou invasão de agente infeccioso. Portanto, os mecanismos que causam a febre são idênticos aqueles capazes de iniciar uma resposta inflamatória, ou seja, são causados pela ativação de citocinas e mediadores inflamatórios que são recrutados no momento em que os pirogênicos externos entram no corpo levando a desregulação do *set point* hipotalâmico e consequentemente febre. (ROMANOVSKY; SZEKELY, 1998; ROMANOVSKY et al., 2005; HUBSCHLE, THOMAS et al., 2006; NARUMIYA; FURUYASHIKI, 2011)

A pirexia induzida por levedura é denominada febre patogênica por aumentar a síntese de prostaglandina, é um modelo amplamente utilizado para a triagem de compostos, bem como drogas sintéticas para seu efeito antipirético (DANGAREMBIZI et al., 2017). No presente estudo, a injeção subcutânea de suspensão de levedura elevou acentuadamente a temperatura retal após 18 h de sua administração; no tratamento com ISP-VT foi observada uma redução significativa na temperatura retal. Estes resultados mostraram que um dos mecanismos pelo qual a ISP-VT provoca redução na temperatura retal pode ser a inibição das prostaglandinas, principalmente PGE2, pelo bloqueio da atividade da enzima ciclooxigenase, uma vez que estudos anteriores evidenciaram que o ácido vanílico diminuiu os níveis de COX-2 e a produção de prostaglandina E2 (KIM et al, 201

Além disso, nossos resultados demonstraram que o ISP-VT inibiu significativamente o rolamento e a adesão de leucócitos, assim como os níveis de TNF- α e IL-6, como mencionado acima. Está bem relatado na literatura que o ácido vanílico inibe a dor inflamatória inibindo o recrutamento de neutrófilos. O importante papel dessas citocinas no recrutamento de neutrófilos e tal envolvimento nesse mecanismo depende de eventos moleculares entre leucócitos e células

endoteliais na microcirculação (KIM et al., 2011). Assim, nossos resultados sugerem que o ISP-VT exerce sua atividade anti-inflamatória por mecanismos dependentes da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias em sítios inflamatórios, o que leva a uma diminuição do rolamento e da adesão de leucócitos nas células endoteliais.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre as terapêuticas mais comumente prescritas para o tratamento da dor e da inflamação no mundo embora o uso contínuo de AINEs esteja associado a efeitos colaterais, principalmente toxicidade gastrointestinal. A lesão gástrica causada por AINEs tem sido associada à inibição inespecífica das isoformas da ciclooxigenase (COX) e isso é resultado da natureza ácida da maioria dessas drogas. A COX-1 está presente na maioria das células encontradas na constituição do trato gastrintestinal, a inibição desta isoforma e consequente inibição de produção de prostaglandinas, em particular, prostaglandina E2 (PGE2), que são essenciais para a manutenção da homeostase gástrica, sendo associada à produção de muco protetor e bicarbonato e inibição da secreção ácida levando assim ao aparecimento de úlceras gástricas (RAINSFORD, 1987; WALLACE, 2008; VAN ESCH; KOOL; VAN, 2013; SILVA 2015).

A enzima COX-2 é expressa por células envolvidas em processos inflamatórios, em resposta a estímulos físicos, químicos e biológicos, e está envolvida na produção de prostaglandinas responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, provocando febre e promovendo inflamação, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Essa resposta inflamatória também é mediada pela regulação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF α e pela ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B (HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008; EL SHITANY et al., 2010; BAGCHI, 2016).

O ISP-VT reduziu significativamente a expressão de COX-2 no tecido subplantar de camundongos na contagem de células marcadas positivamente para essa enzima quando comparado ao grupo tratado com carragenina. No ensaio de inibição de COX, nossos resultados mostraram que o ISP-VT tem maior atividade na inibição da COX-2, porém uma das questões levantadas em relação a este mecanismo é a possibilidade de causar lesões gástricas se o composto também se ligar à COX-1, os resultados mostraram que mesmo usando uma dose 100 vezes maior, o ISP-VT causou menos lesão em comparação com a droga padrão, resultado corroborado pela análise de MPO tecido gástrico, que mostrou que o ISP-VT diminuiu os níveis desta enzima.

De fato dados da literatura mostrando que o ácido vanílico, assim como outros derivados fenólicos atua diminuindo os níveis de COX-2 e a produção de prostaglandina E2 em macrófagos peritoneais de camundongos (KIM et al., 2011) outros estudos também

descobriram que o ácido vanílico suprimiu significativamente a expressão de COX-2, fator de transcrição nuclear- κ B (NF κ B) no modelo de colite ulcerativa (KIM et al., 2010). Além disso Calixto-Campos (2015) demonstrou que o ácido vanílico, não induz lesões hepáticas ou estomacais na dose de 30 mg/kg durante 7 dias. Outro trabalho também mostrou que a vanilina tem efeito gastroprotetor na úlcera gástrica induzida pela indometacina e não altera os níveis de PGE2 da mucosa (KATARY; SALAHUDDIN, 2017). Apesar de sua ligação a COX-1 o ISP-VT ainda foi menos tóxico que a indometacina.

Outro ponto importante que está envolvido no processo inflamatório é o estresse oxidativo que está envolvido na etiologia de várias doenças crônicas e degenerativas. Muitos artigos têm mostrado que os polifenóis eliminam os radicais livres através da doação de hidrogênio e hidroxilação aromática. Por outro lado, estes compostos fenólicos ainda podem atuar através de diferentes mecanismos antioxidantes, incluindo a inibição da formação de radicais livres e a inibindo das reações de propagação, quelatação de íons metálicos de transição e interferência no processo de transferência de elétrons através da formação de produtos estáveis (GROOTVELD; HALLIWELL, 1986; JOVANOVIC et al., 1994; ; RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996; ARUOMA, 1998; LOBO et al., 2010; TAI, SAWANO, YAZAMA, 2011; LUSHCHAK, 2014; SEVGI, TEPE, SARIKURKCU, 2015; ZHANG E TSAO, 2016).

As numerosas atividades biológicas do ácido vanílico são bem descritas na literatura. *in vitro*, o ácido vanílico tem mostrado alta capacidade de remoção de radicais com relação a outros compostos fenólicos com a etil vanilina ou vanilina. Estudos *in vivo* mostraram uma capacidade de inibição de produtos de peroxidação lipídica e restauração de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (TAI, SAWANO, YAZAMA, 2011; SEVGI, TEPE, SARIKURKCU, 2015; DIANAT et al., 2016; VINOITHIYA E ASHOKKUMAR, 2017).

A adição do radical isopropílico ao ácido vanílico, formando assim o ISP-VT, introduz dois grupos metoxi, que já são substituintes comuns em antioxidantes fenólicos. Sabe-se que a adição destes substituintes aumenta a capacidade de doação de hidrogênio, aumentando assim a propriedade de remoção de radicais livres quando comparado o derivado fénelico com homólogo original. Um exemplo disto é observado quando o álcool siringico é comparado com o álcool vanílico, onde o grupo metoxi adicional aumenta a atividade de sequestro do radical. Este efeito ocorre devido à geração de um radical fénelico mais estável (DE PINEDO; PENALVER; MORALES, 2007).

Outro fator que pode ter ajudado em uma boa atividade antioxidante do ISP-VT foi o comprimento da cadeia alquílica, com relação ao seu análogo natural, que conecta ao anel

fenólico. Este aumento no comprimento leva a elevação da atividade de eliminação de radicais livres da molécula antioxidante, presumivelmente devido ao aumento da estabilidade e capacidade de doação de elétrons (IWAOKA et al., 2015; PANDE E AKOH, 2016).

A capacidade antioxidante total foi medida espectrofotometricamente pela formação de um complexo de fosfomolibdênio, que ocorre pela redução do molibdênio (Mo (VI) a Mo (V) em pH ácido (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Os resultados do nosso estudo mostraram que o ISP-VT tinha uma alta capacidade antioxidante total, mas isso já é bem compreendido em relação aos compostos fenólicos. Nós investigamos se a modificação química alterou essa propriedade de ISP-VT. O modelo de sequestro de radical DPPH é um método amplamente utilizado para avaliar as atividades de eliminação de radicais livres de antioxidantes. No ensaio DPPH, os antioxidantes são capazes de reduzir o DPPH estável (roxo) para a forma não radical DPPH-H (amarelo) quando o DPPH aceita um elétron doado por um antioxidante. Isso resulta em uma diminuição na absorbância em 517 nm, indicando uma atividade antioxidante efetiva (VELIOGLU et al., 1998; WONG et al., 2014; BLOIS, 1958).

Nossos resultados mostraram que o ISP-VT possui atividade antioxidante no ensaio do DPPH. Outros estudos demonstraram que os compostos fenólicos que possuem grupos hidroxila exibiram uma atividade de eliminação de radicais livres elevada no sequestro de DPPH. Por exemplo, o ácido vanílico (CE50 = 34,9 μ M) exibiu maior atividade quando comparado ao ácido p-hidroxibenzóico (CE50 = 311,5 μ M) (ZHANG et al., 2009). A adição de um grupo metoxil no anel aromático foi a diferença mais significativa entre os dois compostos fenólicos (DING, 2011). Estes resultados mostraram que a modificação química não altera a capacidade antioxidante de compostos semissintéticos derivados do ácido vanílico. Nem sempre esse é o caso, pois Tai e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antioxidante de ésteres de ácido vanílico e mostraram que a esterificação da molécula modifica sua capacidade antioxidante no teste do DPPH.

Outro teste realizado foi a quelação de íon ferroso, nossos resultados mostraram que o ISP-VT possui uma atividade quelante substancial de íons ferrosos, o que corresponde aos dados de Sevgi e colaboradores (2015) mostrando o efeito do ácido vanílico na quelação de íons (61,46%; CE50 0,86 \pm 015) Outro estudo também mostrou que o ácido vanílico é eficaz na diminuição da taxa de auto-oxidação de Fe⁺² (CHVÁTALOVÁ et al., 2008).

A quelação de íons de ferro é de suma importância na redução do estresse oxidativo gerado por espécies reativas de oxigênio. Antioxidantes com capacidade de quelar o Fe⁺² inibem sua capacidade de formar radicais livres, levando à proteção contra o dano oxidativo (JOMOVA; VALKO, 2011). Tem sido descrito na literatura que a terapia de uso de quelantes

reduz as doenças inflamatórias relacionadas a disfunção ferro, particularmente a aterosclerose e a doença de Alzheimer (BREWER, 2007). Os íons ferrosos podem mover elétrons individuais e promover a propagação de reações de inúmeros radicais, inclusive com radicais não reativos. Além disso, íons ferrosos estão envolvidos na formação de ânion superóxido que é rapidamente produzido através do processo de redução de um elétron por oxigênio molecular por íons ferrosos (HIPPELI E ELSTNER, 1999).

A confirmação de atividade antioxidante não deve ser concluída com base em um único modelo de teste de antioxidante. Portanto, decidimos avaliar a atividade antioxidante do ISP-VT usando modelos *ex vivo*. Usamos um modelo de peritonite induzida por carragenina porque a inflamação causa estresse oxidativo, que frequentemente resulta em níveis reduzidos de antioxidantes e aumento da produção de oxidantes. A presença de estresse oxidativo é um parâmetro importante que pode ser medido para indicar dano tecidual. Além disso, vários estudos mostraram que a carragenina promove a produção de EROs em diferentes tipos de células, e que o estresse oxidativo é um importante mecanismo de inflamação induzida por carragenina (ANDERSSON et al., 2008; BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN 2008; VALERIO et al., 2009).

No presente estudo, observamos o efeito redox-protetor do ISP-VT, determinado pela diminuição da concentração de MDA (um importante marcador de peroxidação lipídica) no fluido peritoneal de camundongos tratados com carragenina (MOORE; ROBERTS, 1998, SINGH et al., 2014). Estudos anteriores mostraram que a atividade do ácido vanílico na peroxidação lipídica é indicada por uma diminuição nos níveis de malondialdeído no tecido plantar de camundongos com inflamação induzida por carragenina em cerca de 48, 15% na dose de 30mg/kg (CALIXTO-CAMPOS et al., 2015). Além disso, o tratamento com ácido vanílico inibiu significativamente a produção de MDA no contexto de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno em ratos Wistar (RAMACHANDRAN et al., 2010) e protegeu contra lesão miocárdica (DIANAT et al., 2014), por outro lado nossos resultados mostraram que ISP-VT na dose de 1,0 mg/kg diminuiu em 42,04% os níveis de MDA. Nossos resultados foram corroborados pelos dados da literatura.

Kim e colaboradores (2011) e Dianet (2016) mostraram que o ácido vanílico aumentou o nível de expressão de mRNA da eNOS e diminuiu o nível de expressão de mRNA da iNOS em modelo induzido por lesão de isquemia-reperfusão em coração de rato isolado. Além disso, Kumar et al (2014) mostraram que o ácido vanílico reduziu a sintase endotelial do óxido nítrico endotelial (eNOS) e regulou a expressão da endotelina 1. Estes estudos corroboram nossos resultados mostrando que o ácido vanílico reduz a produção de NO, uma vez que, o NO reage

rapidamente com radicais superóxido para formar peroxinitrito, que pode ser oxidado em nitrato, e o desacoplamento da NOS gera ânion superóxido em vez de NO. O peroxinitrito é um potente oxidante produzido em vários processos inflamatórios e patológicos, e pode ser usado em adição ao nitrito e ao nitrato (NO_x) como medida indireta da produção de NO *in vivo*. (ALVAREZ; RADI, 2003; DHAWAN, 2014).

Além de seu efeito protetor contra a peroxidação lipídica, o ISP-VT também aumentou os níveis de GSH e SOD em relação aos parâmetros normais, conforme avaliado no grupo experimental não tratado. Os resultados demonstram que, além de sua atividade antioxidante *in vitro*, o ISP-VT também atua *in vivo* na diminuição do estresse oxidativo. Esses dados são corroborados por outro estudo no qual o ácido vanílico aumentou os níveis desses antioxidantes endógenos, e que mesmo com a indução do estresse esses níveis permanecem elevados (ANBALAGAN et al., 2017).

Diante dos resultados satisfatórios com relação as atividades biológicas do ISP-VT, decidimos investigar se o mesmo pode ser tóxico ao organismo, e nossos resultados mostraram que o ISP-VT não causou toxicidade na maior dose testada (2.000 mg/kg) em camundongos, além disso não alterou parâmetros hematológicos ou bioquímicos que foram avaliados. Este resultado está de acordo com um estudo anterior, que demonstrou que o ácido vanílico não tem toxicidade na mesma dose. Estes resultados mostram que o seu LD é superior a 2.000 mg / kg, sugerindo que o ISP-VT deve ser classificado na categoria 5 de acordo com a OCDE 423 (MOTIRAM KAKALIJ et al., 2016). Outros autores como Kumar e colaboradores (2011) demonstraram que a administração de ácido vanílico reduziu significativamente as concentrações séricas de marcadores renais como uréia, ácido úrico e creatinina em ratos hipertensos, e que tem um efeito hepatoprotetor na lesão hepática induzida pela concanavalina A, na qual o ácido vanílico reduziu de forma dependente da dose a atividade da AST e da ALT (ITOH et al., 2009).

Neste estudo, seguimos as recomendações da Diretriz da OECD 423 (Diretriz 423/2001) para avaliar a toxicidade aguda de ISP-VT. De acordo com essas diretrizes, quando estudos disponíveis na literatura sugerem que a toxicidade e a mortalidade são improváveis mesmo em altas doses (SHAH et al., 2011; MOTIRAM KAKALIJ et al., 2016), a dose limite pode ser usada primeiro. Em nosso estudo de toxicidade oral, o ISP-VT não apresentou toxicidade em camundongos na dose mais alta testada (2.000 mg / kg), e não foram observados óbitos, alterações comportamentais ou alterações clínicas. Além do que, verificou-se que o ISP-VT não causou alteração no peso corporal dos animais após 14 dias.

Um importante fator nos estudos de toxicidade oral é a avaliação de órgãos sensíveis que desempenham papéis importantes no metabolismo e excreção de xenobióticos, incluindo fígado, baço, rins, intestino e coração. Neste estudo, esses órgãos vitais não apresentaram diferenças significativas, ou histopatológicas ou microscópicas, no grupo de tratamento com ISP-VT em relação ao grupo controle. Substâncias tóxicas iniciam respostas fisiológicas no corpo; portanto, os ensaios que avaliam a lesão hepática (AST e ALT) e a função renal (uréia e creatinina) são úteis na determinação da extensão dos danos a esses órgãos (OBIDAH et al., 2009; SHAH et al., 2011). Neste estudo, não houve alteração nos níveis de ALT, AST, uréia ou creatinina, corroborando os resultados obtidos nas análises macroscópicas.

7. CONCLUSÃO

Portanto, nossos resultados confirmam a evidência de que o vanilato de isipropila um derivado semissintético, do ácido vanílico, ISP-VT, possui alto potencial anti-inflamatório do em modelos experimentais de inflamação aguda. Seu efeito anti-inflamatório ocorre por diversos mecanismos que envolvem a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, PGE2 e bradicinina, além de promover redução da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. O ISP-VT foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), e a expressão da COX-2, com efeito antipirético e inibição de Ciclooxygenases com maior especificidade para COX-2. Além disso, demonstrou capacidade antioxidante *in vitro* e atividade antioxidantes *ex vivo* via sequestro de radicais, quelação iônica, diminuição da peroxidação lipídica e aumento de antioxidantes endógenos.

ISP-VT não apresentou toxicidade em camundongos na dose mais alta testada e nenhuma alteração comportamental ou clínica foi observada. Este é um ponto importante para o desenvolvimento futuro desta droga. Concluindo, nossos resultados sugerem que o ISP-VT pode ser um candidato importante para o desenvolvimento de um novo possível anti-inflamatório e antipirético, representando uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias associadas ao estresse oxidativo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBADIE, C.; et al. Chemokines and pain mechanisms. **Brain. Res. Rev**, v. 60, n. 1, p. 125-134, 2009.

ABBAS, M. et al. Natural polyphenols: An overview. **Inter J Food Prop**, v. 20, n. 8, p. 1689-1699, 2017.

ADEREM, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. **J Infect Dis.**, v. 187, n. 4, p. S340-S345, 2003.

ADLER, V. et al. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6104, 1999.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Acesso em: 13/06/2017, 2013.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J reprod infertil**, v. 97, n. 2, p. 441-450, 1993.

ALLER, M. A. et al. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. **Theor Biol Med Model**, v. 4, n. 1, p. 1, 2007.

ALOV, P.; TSAKOVSKA, I.; PAJEVA, I. Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. **Curr Top Med Chem**, v. 15, p.85–104, 2015.

ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. **Amino acids**, v. 25, n. 3-4, p. 295-311, 2003.

ANDERSSON, D. A. et al. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **J Neurol**, v. 28, n. 10, p. 2485-2494, 2008.

ANDJELKOVIC.M. et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chem**, v. 98, p. 23–31,2006.

ANTUNES, F.; HAN, D.; CADENAS, E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 9, p. 1260-1267, 2002.

ANBALAGAN, V.; RAJU, K.; SHANMUGAM, M. Assessment of Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Vanillic Acid Treated 7, 12-Dimethylbenz [a] Anthracene Induced

Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. **J Clin Diagn Resear** : JCDR, v. 11, n. 3, p. BF01, 2017.

ARREOLA, R. et al. Immunomodulatory effects mediated by serotonin. **Int J Immunol Res**, v. 12, n. 4. P 123-125, 2015.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **J Am oil chem soc**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ASADA, K.; KANEMATSU, S. Reactivity of thiols with superoxide radicals. **Agri Biol Chem**, v. 40, n. 9, p. 1891-1892, 1976.

ASONGALEM, E. A. et al. Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson. **J ethnopharmacol**, v. 95, n. 1, p. 63-68, 2004.

ATANASOV, A. G.; et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

BAEUERLE, P. A.; BAICHWAL, V. R. NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. **Adv in immunol**, v. 65, p. 111-138, 1997.

BAGCHI, A. NF κ B pathway and inhibition: an overview. **Comput Mol Biol**, v. 6, n. 1, 2016.

BAKER, R.G.; HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11-22, 2011.

BALLY, M. et al. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. **Bmj**, v. 357, p. 1907-1909, 2017.

BANDGAR, B. P. et al. Synthesis and biological evaluation of asymmetric indole curcumin analogs as potential anti-inflammatory and antioxidant agents. **J enzyme inhib med chem**, v. 29, n. 1, p. 7-11, 2014.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Nat Acad of Sciec**, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BEESON, P. B. Observations on the fever caused by bacterial pyrogens. 1. A study of the relationship between the fever caused by bacterial pyrogens and the fever accompanying acute infections. **J Exp Med**, v. 88, p. 267-278, 1948.

BENES, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life sciences**, v. 65, n. 18-19, p. 1865-1874, 1999.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, D.K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NFκB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **BBA Gen Subj**, v. 1780, n. 7, p. 973-982, 2008.

BIANCHI, M.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BJORNSDOTTIR, H. et al. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. **Free Radic Biol Med**, v. 89, p. 1024-1035, 2015.

BLATTEIS, C. M. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management. **Pharmac & therap**, v. 111, n. 1, p. 194-223, 2006.

BLATTEIS, Clark M. et al. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. **Prostag & other lipid mediat**, v. 76, n. 1-4, p. 1-18, 2005.

BLATTEIS, Clark M. The cytokine-prostaglandin cascade in fever production: fact or fancy?. **J of Ther Biol**, v. 29, n. 7-8, p. 359-368, 2004.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199, 1958.

BRADLEY, P.P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermat**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRATER, D. Craig et al. Renal effects of COX-2-selective inhibitors. **Ame Nephro**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2001.

BRENNER, D.; BLASER, H.; MAK, T.W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 6, p. 362-74, 2015.

BREWER, G. J. Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. **Expe Biol Med**, v. 232, n. 2, p. 323-335, 2007.

BRUNE, K.; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Pain Res**, v. 8, p. 105-18, 2015.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M.L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Sem Fetal & Neon Med**, Amsterdam, v. 15, p. 186-190, 2010.

CAIN, Derek W.; CIDLOWSKI, John A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nat Rev Immun**, v. 17, n. 4, p. 233, 2017.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. Vanillic acid inhibits inflammatory pain by inhibiting neutrophil recruitment, oxidative stress, cytokine production, and NF κ B activation in mice. **J Nat Prod**, v. 78, n. 8, p. 1799-1808, 2015.

CAMPBELL, Duncan J. The kallikrein–kinin system in humans. **Clin exp pharma phys**, v. 28, n. 12, p. 1060-1065, 2001.

CANO, P. M.; VARGAS. A.; LAVOIE, J. A real-time assay for neutrophil chemotaxis. **BioTechniques**, v. 60, n. 5, p. 245-251, 2016.

CANTIN, A. M. et al. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. **J app phys**, v. 63, n. 1, p. 152-157, 1987.

CAO, C. et al. Lipopolysaccharide injected into the cerebral ventricle evokes fever through induction of cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells. **J Neur**, v. 19, n. 2, p. 716-725, 1999.

CAVAILLON, J. M. Cytokines in inflammation. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, v. 189, n. 4, p. 531-544, 1995.

CAVALCANTI, L. P. G. et al. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. **Rev Soc Bra Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 355-358, 2010.

CHAE, H.S. et al. Anti-inflammatory effects of *Hylomecon hylomeconoides* in RAW 264.7 cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v.16. p. 121-125, 2012.

CHATTERJEA, D. et al. Mast cell degranulation mediates compound 48/80-induced hyperalgesia in mice. **Bioch bioph res computol**, v. 425, n. 2, p. 237-243, 2012.

CHAVES, L. S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CHOI, H. G. et al. Anti-allergic inflammatory activities of compounds of *amomi fructus*. **Natur prod commun**, v. 10, n. 4, p. 631-632, 2015.

CHOI, Y.H. et al. Inhibitory effects of curcumin on passive cutaneous anaphylactoid response and compound 48/80-induced mast cell activation. **Anatom Cell Biol**, v. 43, n. 1, p. 36-43, 2010.

CHOU, T.H. et al. Antioxidative characteristics and inhibition of α -melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*. **Exp Dermatol**, v. 19, n. 8, p. 742-750, 2010.

CHVÁTALOVÁ, K. et al. Influence of dietary phenolic acids on redox status of iron: Ferrous iron autoxidation and ferric iron reduction. **Food Chem**, v. 106, n. 2, p. 650-660, 2008.

CIRCU, M. L.; AW, Tak Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

COLGAN, S. P. Neutrophils and inflammatory resolution in the mucosa. **Semin Immunol**, v. 27, n. 3, p. 177-83, 2015.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2, p. 53-72, 2010.

COSTELLO, A. H.; HARGREAVES, K. M. Suppression of carrageenan-induced hyperalgesia, hyperthermia and edema by a bradykinin antagonist. **Eur J Pharm**, v. 171, n. 2-3, p. 259-263, 1989.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Bioph Acta (BBA)**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CROFFORD, L.J. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. **The J of Rheum Suppl**, v. 49, p. 15-19, 1997.

CROSS, C.E. et al. Oxygen radicals and human disease. **Ann of int med**, v. 107, n. 4, p. 526-545, 1987.

CRUVINEL, W.M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DANGAREMBIZI, R. et al. Brewer's yeast is a potent inducer of fever, sickness behavior and inflammation within the brain. **Brain behav and immun**, 2017.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G. B. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. 2000.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochem rev**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DE GROOT, H. Reactive oxygen species in tissue injury. **Hepat-gastroenterol**, v. 41, n. 4, p. 328, 1994.

DE LOS ANGELES YRBAS, M. et al. Pharmacological mechanism underlying the antinociceptive activity of vanillic acid. **Pharm Bioch Behav**, v. 132, p. 88-95, 2015.

DE OLIVEIRA, C. M. et al. Cytokines and pain. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255-259, 2011.

DE PINEDO, A. T.; PENALVER, P.; MORALES, J. C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. **Food Chem**, v. 103, n. 1, p. 55-61, 2007.

DE TONI, L. G. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from Bothrops atrox snake venom. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 1, p. 199-207, 2015.

DELERIVE, P. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. **J Biol Chem**, v. 274, n. 45, p. 32048-32054, 1999.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interf Cytok Res**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DHAWAN, V. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. In: **Studies on Respiratory Disorders**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 27-47.
. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 27-47.

DIANAT, M. et al. Disturbance effects of PM 10 on iNOS and eNOS mRNA expression levels and antioxidant activity induced by ischemia–reperfusion injury in isolated rat heart: protective role of vanillic acid. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 6, p. 5154-5165, 2016a.

DIDONATO, J. A. et al. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 548, 1997.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trend Food Sci Technol**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trend Food Sci Technol**, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

- DINARELLO, C. A. Role of pro-and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. **Biol Regul Homeost Agents**, v. 11, n. 3, p. 91-103, 1997.
- DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **J endot res** v. 10, n. 4, p. 201-222, 2004.
- DING, H.Y. Extracts and constituents of *Rubus chingii* with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity. **Int J Mol Sci** v. 12, n. 6, p. 3941-3949, 2011.
- DIVAKAR, C. Madhu et al. Anti-inflammatory and Antioxidant activities of *Polyscias filicifolia* saponins. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2, n. 1, p. 41-47, 2010.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Brit J anaesthesiol**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.
- DREHER, D.; JUNOD, A F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur J Canc** v. 32, n. 1, p. 30-38, 1996.
- EDDLESTON, J. et al. Bradykinin increases the in vivo expression of the CXC chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in patients with allergic rhinitis. **J allergy clin immunol**, v. 111, n. 1, p. 106-112, 2003.
- El-Benna, J. et al. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunol rev**, v. 273 ,p. 180-193, 2016..
- EL-SHITANY, N. A. et al. Thiocetic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation in rats by reduction in oxidative stress, downregulation of COX-2 mRNA and enhancement of IL-10 mRNA. **Fund clin pharmacol** v. 24, n. 1, p. 91-99, 2010.
- FANG, H. et al. Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis. **J Immunol Res**, v. 2015, p. 1 - 8, 2015.
- FAUSTINO-ROCHA, A. I. et al. Antihistamines as promising drugs in cancer therapy. **Life Sci**, 2016.
- FERNANDES, J. V. et al. The role of the mediators of inflammation in cancer development. **Pathol Oncol Res**, v. 21, n. 3, p. 527-534, 2015.
- FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **Brit pharmacol**, v. 49, n. 1, p. 86-97, 1973.
- FITZGERALD, G. A. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. **Am J Cardiol** v. 89, n. 6, p. 26-32, 2002.

FLOEGE, J.; LÜSCHER, B.; MÜLLER-NEWEN, Gerhard. Cytokines and inflammation. **Eur J cell biol**, v. 6, n. 91, p. 427, 2012.

FORTES, Z. B. et al. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, n. 10, p. 1267-1273, 1991.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 69, n. Suppl_1, p. S4-S9, 2014.

FRÖHLANDER, N.; LJUNGGREN, O.; LERNER, U. H. Haptoglobin synergistically potentiates bradykinin and thrombin induced prostaglandin biosynthesis in isolated osteroblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 178, n. 1, p. 343-351, 1991.

ORTMANN, W.; KOLACZKOWSKA, E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. **Cell and tissue res**, v. 371, n. 3, p. 473-488, 2018.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arths resear therap**, v. 8, n. 2, p. S3, 2006.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N Engl J Med**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. **Nat Rev Immunol**, 2018.

MANTOVANI, A. The inflammation–cancer connection. **FEBS J**, v. 285, n. 4, p. 638-640, 2018.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Cur opinion chem biol** v. 12, n. 3, p. 306-317, 2008.

GARCIA-SALAS, Patricia et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813-8826, 2010.

GAUR, U.; AGGARWAL, B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Bioch pharm**, v. 66, n. 8, p. 1403-1408, 2003.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J lipid res**, v. 39, n. 8, p. 1529-1542, 1998.

GOEPTAR, A. R.; SCHEERENS, H.; VERMEULEN, Nico PE. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. **Crit reviews toxicol**, v. 25, n. 1, p. 25-65, 1995.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **Brit J Surg**, v. 81, n. 5, p. 637-647, 1994.

GRIENDLING, K. K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arter, throm, vascr biol**, v. 20, n. 10, p. 2175-2183, 2000.

Grootveld, M., Halliwell, B., 1986. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation in vivo. **Biochem. J.** 237, 499–504.

GUÉMOURI, LYBCGG et al. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. **Clin Chem**, v. 37, n. 11, p. 1932-1937, 1991.

GUIDI, I. et al. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neur aging**, v. 27, n. 2, p. 262-269, 2006.

GUNTER, B. R. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. **J clin pharm and therap**, v. 42, n. 1, p. 27-38, 2017.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Ann New York A of Sci**, v. 899, n. 1, p. 136-147, 2000.

HAIDA, K. S. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of two varieties of guava and rue. **Rer Bras CiêncSaúde**, v. 28, p. 11-19, 2011.

HALE, Karin K. et al. Multifunctional regulation of the biological effects of TNF- α by the soluble type I and type II TNF receptors. **Cytokine**, v. 7, n. 1, p. 26-38, 1995.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and other reactive species in disease. **eLS**, 2005.

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **J neuroch**, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and medicine. 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch obiochem bioph**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.C; CROSS, Carroll E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. **J lab clin med**. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.; GUALDE, Norbert. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trend mol med**, v. 14, n. 10, p. 461-469, 2008.

HARRIS, H. Role of chemotaxis in inflammation. **Phys reviews**, v. 34, n. 3, p. 529-562, 1954.

HARRIS, Sarah G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends immunol**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. In: **Sem immunol**. Academic Press, 2015. p. 149-160.

HEITZER, T. et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 104, n. 22, p. 2673-2678, 2001.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. **FEBS J**, v. 274, n. 9, p. 2163-2180, 2007.

HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. Transition metal ion-catalyzed oxygen activation during pathogenic processes. **FEBS lett**, v. 443, n. 1, p. 1-7, 1999.

HIRANO, T.; ISHIHARA, K.; HIBI, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. **Oncogene**, v. 19, n. 21, p. 2548, 2000.

HOFMAN, Z. et al. Bradykinin: inflammatory product of the coagulation system. **Clin reviews all immunol**, v. 51, n. 2, p. 152-161, 2016.

HOIDAL, J. R. Reactive oxygen species and cell signaling. **Amer j resp cell and molec biol**, v. 25, n. 6, p. 661-663, 2001.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. **Int j bioch cell biol**, v. 63, p. 16-20, 2015.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Vet Rec**, v. 144, n. 16, p. 437-441, 1999.

HUANG, J. F.; THURMOND, R. L. The new biology of histamine receptors. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 8, p. 21-27, 2008.

HUBSCHLE, T; et al. Pyrexia, anorexia, adipsia, and depressed motor activity in rats during systemic inflammation induced by the Toll-like receptors-2 and-6 agonists MALP-2 and FSL-1. **Amer J Phys-Regul, Integ Comp Phys**, v. 290, n. 1, p. R180-R187, 2006.

HWANG, O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Exp neurob**, v. 22, n. 1, p. 11-17, 2013.

HYUN, D. H. et al. The plasma membrane redox system in aging. **Ag res reviews**, v. 5, n. 2, p. 209-220, 2006.

IOVINO, M. et al. Bradykinin Signal Pathways Modulate Neurohypophyseal Hormones Secretion. **Autacoids**, v. 3, n. 104, p. 2161-0479.1000104, 2014.

IRSHAD, M.; CHAUDHURI, P. S. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. 2002.

ITOH, A. et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. **Biol Pharm Bul**, v. 32, n. 7, p. 1215-1219, 2009.

IWAOKA, Mi. et al. Fatty Acid Conjugates of Water-Soluble (\pm)-trans-Selenolane-3, 4-diol: Effects of Alkyl Chain Length on the Antioxidant Capacity. **Chem Bio Chem**, v. 16, n. 8, p. 1226-1234, 2015.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. **Cur pharm design**, v. 17, n. 31, p. 3460-3473, 2011.

JOVANOVIC, D. V. et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. **The J of Immun**, v. 160, n. 7, p. 3513-3521, 1998.

JOVANOVIC, S. V. et al. Flavonoids as antioxidants. **J the Ame Chem Soc**, v. 116, n. 11, p. 4846-4851, 1994.

KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nat Rev Rheum**, v. 7, n. 12, p. 691–699, 2011.

KATARY, M. A.; SALAHUDDIN, A. Gastroprotective Effect Of Vanillin On Indomethacininduced Gastric Ulcer In Rats: Protective Pathways And Anti-Secretory Mechanism. **Clin. Exp. Pharmacol**, n. 7, p. 232, 2017.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **J of indust microb & biotec**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E 2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Bioch et Bioph Acta (BBA)-Mol and Cell Biol of Lip**, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.

KHAN, F.; KHAN, M. F. Inflammation and acute phase response. 2010.

Khansari, N.; Shakiba, Y.; Mahmoudi, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, v. 3, n. 1, p. 73-80, 2009.

KIM, MIN-CHEOL et al. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunophar and immunotox*, v. 33, n. 3, p. 525-532, 2011.

KIM, Su-Jin et al. The beneficial effect of vanillic acid on ulcerative colitis. *Molecules*, v. 15, n. 10, p. 7208-7217, 2010.

KIMURA, L. F. et al. Mast cells and histamine play an important role in edema and leukocyte recruitment induced by Potamotrygon motoro stingray venom in mice. *Toxicon*, v. 103, p. 65-73, 2015.

KINNULA, V.L.; CRAPO, J.D.. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic. Biol. Med*, v. 36, n. 6, p. 718-744, 2004

KISHIMOTO, T.; TANAKA, T. Interleukin 6. *Enc of Inflamm Dis*, p. 1-8, 2015.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann of Int Med*, v. 93, n. 3, p. 480-489, 1980.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Phys rev* v. 71, n. 1, p. 93-127, 1991.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. *Drug Disc Today*, v. 19, n. 12, p. 1871-1882, 2014.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES. P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Imm*, v. 13, n. 3, p. 159, 2013.

KRANKEL, N. et al. Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circulation research*, v. 103, n. 11, p. 1335-1343, 2008.

KRUGER, Philipp et al. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens*, v. 11, n. 3, p. e1004651, 2015.

KRYSKO, Dmitri V. et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, v. 12, n. 12, p. 860, 2012.

KUHR, F. et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, v. 44, n. 2, p. 145-54, 2010.

- KUMAR, S.; PRAHALATHAN, P.; RAJA, B. Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study. **Redox Report**, v. 16, n. 5, p. 208-215, 2011.
- KUSHNIR-SUKHOV, N. M. et al. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. **J of All and Clin Imm**, v. 119, n. 2, p. 498-499, 2007.
- LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **J. Pharm. Pharmacol**, v. 4, n. 3A, p. 17, 2013.
- LAHLOU, Mouhssen. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacol Pharm**, v. 4, n. 3A, p. 17-31, 2013.
- LALRINZUALI, K.; VABEIRYUREILAI, M.; JAGETIA, G. C. Investigation of the Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of Ethanol Extract of Stem Bark of *Sonapatha Oroxylum indicum* In Vivo. **Int J Inflamm**, p.1-8, 2016
- LANAS, A.; BOERS, M.; NUEVO. J. Gastrointestinal events in at-risk patients starting non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for rheumatic diseases: the EVIDENCE study of European routine practice. **Ann of the rheum dis**, v. 74, n. 4, p. 675-681, 2015.
- LANGER, Harald F.; CHAVAKIS, Triantafyllos. Leukocyte–endothelial interactions in inflammation. **J cell and mol med**, v. 13, n. 7, p. 1211-1220, 2009.
- LARSEN, Gary L.; HENSON, Peter M. Mediators of inflammation. **Ann rev of imm**, v. 1, n. 1, p. 335-359, 1983.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spr Harb perspec in biol**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.
- LEAL, L. K. A. M. et al. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* AC Smith. **Phytomedicine**, v. 18, n. 2-3, p. 230-233, 2011.
- LEÓDIDO, A. C. M. et al. Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. **Internat J of biol macrom**, v. 97, p. 34-45, 2017.
- LEON, L. R. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. **J App Phys**, v. 92, n. 6, p. 2648-2655, 2002.
- LI, HI; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. **Ather**, v. 237, n. 1, p. 208-219, 2014.

LI, J. W.H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LI, X.; YANG, Y.; ASHWELL, J. D. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 345, 2002.

LIOCHEV, S. I. Superoxide dismutase mimics, other mimics, antioxidants, prooxidants, and related matters. **Chem reser toxic**, v. 26, n. 9, p. 1312-1319, 2013.

LIU, J.; CAO, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. **Cell Mol Immunol**, v. 13, n. 6, p. 711-721, 2016.

LIU, Z. G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 24-27, 2005.

LI, G.; LOU, H. X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal research reviews**, v. 38, n. 4, p. 1255-1294, 2018.

LOBO, Vijaya et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacog rev**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LUIS, A. et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant physiol**, v. 141, n. 2, p. 330-335, 2006.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem-biol interac** v. 224, p. 164-175, 2014.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, Ulrich H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nat immu**, v. 6, n. 12, p. 1182, 2005.

MACKOW, E.R.; GORBUNOVA, E. E.; GAVRILOVSKAYA, I. N. Endothelial cell dysfunction in viral hemorrhage and edema. **Front microb**, v. 5, p. 733, 2015.

MALING, H. M. et al. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **J Pharm and Exp Therap**, v. 191, n. 2, p. 300-310, 1974.

MALVAR, D. C. et al. Dipyrone metabolite 4-MAA induces hypothermia and inhibits PGE2-dependent and-independent fever while 4-AA only blocks PGE2-dependent fever. **Brit j pharmany**, v. 171, n. 15, p. 3666-3679, 2014.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Ann Rev Path: Mech of Dis**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact?. **Cur opin microb**, v. 7, n. 1, p. 62-66, 2004.

MCCORD, J. O. E.; FRIDOVICH, IRWIN. Production of O₂ in photolyzed water demonstrated through the use of superoxide dismutase. **Photoch photob**, v. 17, n. 2, p. 115-121, 1973.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J Biol chem** v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MCMASTER, W. G. et al. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. **Circ res**, v. 116, n. 6, p. 1022-1033, 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 428-435, 2008.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Meth in enzym**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MELOV, S. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Nat genetics**, v. 18, n. 2, p. 159, 1998.

MENKIN, V. **Bioch mech inflam**. Thomas, 1956.

MINH, T.N. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of Phalaenopsis orchid hybrids. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, p. 31, 2016.

MITCHELL, J.; LARKIN, S.; WILLIAMS, T. J. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. **Bioch pharm**, v. 50, n. 10, p. 1535-1542, 1995.

MÖLLER, B.; VILLIGER, P. M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF- α in immune-mediated inflammatory diseases. In: **Spring sem in imm**. Springer-Verlag, p. 391, 2006.

MOORE, K.; ROBERTS, L. Jackson. Measurement of lipid peroxidation. **Free rad res**, v. 28, n. 6, p. 659-671, 1998.

MORAND, E.F. Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. **Cur op in rheum** v. 19, n. 3, p. 302-307, 2007.

MORGAN, M. J.; LIU, Zheng-gang. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 103, 2011.

MORTON, R. A. Natural Phenolic Compounds. **Nature**, v. 193, n. 4820, p. 1015-1015, 1962.

- MOTIRAM KAKALIJ, R. et al. Vanillic acid ameliorates cationic bovine serum albumin induced immune complex glomerulonephritis in BALB/c mice. **Drug develop res**, v. 77, n. 4, p. 171-179, 2016.
- MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **Jama**, v. 286, n. 8, p. 954-959, 2001.
- MULLER, W. A. Getting leukocytes to the site of inflammation. **Vet Pathol**, v. 50, n. 1, p. 7-22, 2013.
- MUNNE-BOSCH, S.; PINTO-MARIJUAN, M. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. **Encycl Appl Plant Sci**, v. 2, p. 16-19, 2016.
- NAKANISHI, Masako; ROSENBERG, Daniel W. Multifaceted roles of PGE 2 in inflammation and cancer. In: **Sem in immun**. Springer-Verlag, 2013. p. 123-137.
- NARUMIYA, S.; FURUYASHIKI, T. Fever, inflammation, pain and beyond: prostanoid receptor research during these 25 years. **Faseb J** v. 25, n. 3, p. 813-818, 2011.
- NETEA, Mihai G.; KULLBERG, Bart Jan; VAN DER MEER, Jos WM. Circulating cytokines as mediators of fever. **Clin Infec Dis**, v. 31, n. Supplement_5, p. S178-S184, 2000.
- NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery?. **J Med. Chem**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J nat prod**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NEWTON, R. et al. Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . **Biochem biophys res commun**, v. 237, n. 1, p. 28-32, 1997.
- OBERMAJER, N. et al. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. **Blood**, v. 118, n. 20, p. 5498-5505, 2011.
- OBIDAH, W. et al. Toxic effects of aqueous stem bark extract of *Cassia sieberiana* on some biochemical parameters in rats. **Afr J Biochem Res**, v. 3, n. 5, p. 229-231, 2009.
- ODOBASIC, D.; KITCHING, A. R.; HOLDSWORTH, S. R. Neutrophil-mediated regulation of innate and adaptive immunity: the role of myeloperoxidase. **J immunol res**, v. 2016, 2016.

OKA, T. et al. Characteristics of thermoregulatory and febrile responses in mice deficient in prostaglandin EP1 and EP3 receptors. **J phys**, v. 551, n. 3, p. 945-954, 2003.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.

ORTMANN, W.; KOLACZKOWSKA, E Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. **Cell tissue res**, p. 1-16, 2017.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Phys rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PAGANGA, G. et al. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. **Redox Report**, v. 2, n. 6, p. 359-364, 1996.

PALOMO, J. et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family—Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 25-37, 2015.

PANDE, G.; AKOH, C. C. Enzymatic Synthesis of Tyrosol-Based Phenolipids: Characterization and Effect of Alkyl Chain Unsaturation on the Antioxidant Activities in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. **J Amer Oil Chem Soc** v. 93, n. 3, p. 329-337, 2016.

PANDEY, A.; KUMAR, V. L. Protective effect of metformin against acute inflammation and oxidative stress in rat. **Drug develop res**, v. 77, n. 6, p. 278-284, 2016.

PANDEY, K.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Ox med and cell long**, v. 2, n. 5, p. 270-278, 2009.

PARK, J. et al. Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK and NF- κ B pathways. **Neur letters**, v. 584, p. 191-196, 2015.

PARKER, H.; WINTERBOURN, C. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. **Front imm**, v. 3, p. 424, 2013.

PATERSON, Ian; ANDERSON, Edward A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 451-453, 2005.

PETERSON, J.R.; RUSSELL, M. E.; SURJASASMITA, I. B. Synthesis and experimental ionization energies of certain (E)-3-arylpropenoic acids and their methyl esters. **J Chem Eng Data**, v. 33, n. 4, p. 534-537, 1988.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, Latha. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Ind J Clin Bioch**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381, 2011.

PIETARINEN-RUNTTI, P. et al. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. **Amer J Phy-Cell Phys**, v. 278, n. 1, p. C118-C125, 2000.

PIETROSIMONE, K. M.; LIU, P. Contributions of neutrophils to the adaptive immune response in autoimmune disease. **W J Oransl med**, v. 4, n. 3, p. 60, 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Europ J medic chemic** v. 97, p. 55-74, 2015.

PLOYPRADITH, P. et al. Solid-supported acids as mild and versatile reagents for the deprotection of aromatic ethers. **Organic letters**, v. 9, n. 14, p. 2637-2640, 2007.

POPA, C. et al. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **J lipid res**, v. 48, n. 4, p. 751-762, 2007.

PRADO, W. A.; SCHIAVON, V. F.; CUNHA, Fernando Q. Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **Eur j pharmac**, v. 441, n. 1-2, p. 57-65, 2002.

PRAJAPATI, V. D. et al. RETRACTED: Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carb polymers**, v. 105, p. 97-112, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal biochec**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRINCE, P. S. M.; RAJAKUMAR, S.; DHANASEKAR, K. Protective effects of vanillic acid on electrocardiogram, lipid peroxidation, antioxidants, proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. **Europ J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 233-240, 2011.

PRYOR, W.A.; SQUADRITO, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Amer J Phys-Lung Cell Mol Phys**, v. 268, n. 5, p. L699-L722, 1995.

QADRI, F.; BADER, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. **Expert opin therap targ**, v. 22, n. 1, p. 31-44, 2018.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked?. **J transl med**, v. 16, n. 1, p. 14, 2018.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proc Nat Acad Sci**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, Paul A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Bioch Pharmacol** v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Sub-Cellr Bioch**, v. 42, p. 3–27, 2007.

MIRAGLIA, C. et al. P. 01.29 Gastric Ulcer: Risk Factors, Helicobacter Pylori Infection And Nsaids Use In A Sample Of 256 People. **Digest Liv Dis**, v. 50, n. 2, p. e131, 2018.

RAVEENDRAN, N. N. et al. Drug-induced alterations to gene and protein expression in intestinal epithelial cell 6 cells suggest a role for calpains in the gastrointestinal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory agents. **J Pharm Exp Therap**, v. 325, n. 2, p. 389-399, 2008.

RAJAGOPALAN, S. et al. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **The J clin invest**, v. 98, n. 11, p. 2572-2579, 1996.

RAMAKRISHNA, B. S. et al. Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity. **J of gastroent and hepat** v. 12, n. 7, p. 490-494, 1997.

RAY, P.D.; HUANG, W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell sign**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharm rev**, v. 32, n. 1, p. 1-46, 1980.

RIBATTI, D. Mast cells as therapeutic target in cancer. **Eur J Pharmacol**, v. 778, p. 152-157, 2016.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosc thromb, vascul biol** v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radic biol med**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

- RILEY, J. F.; WEST, G. B. The presence of histamine in tissue mast cells. **J phys**, v. 120, n. 4, p. 528-537, 1953.
- ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **J agric food chem**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.
- ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu Rev pathmechdis Mech Dis**, v. 3, p. 99-126, 2008.
- ROMANO, M. et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. **Immunity**, v. 6, n. 3, p. 315-325, 1997.
- ROMANOVSKY, A. A.; SZEKELY, M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. **Medic hypot**, v. 50, n. 3, p. 219-226, 1998.
- ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Front Biosci**, v. 10, n. September, p. 2193-2216, 2005.
- ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Neurologic clinics**, v. 24, n. 3, p. 421-439, 2006.
- RUBIÓ, L.; MACIÀ, A.; MOTILVA, M. J. Impact of various factors on pharmacokinetics of bioactive polyphenols: an overview. **Current drug metabolism**, v. 15, n. 1, p. 62-76, 2014.
- SACCA, R.; CUFF, C. A.; RUDDLE, N. H. Mediators of inflammation. **Curr opin immunol**, v. 9, n. 6, p. 851-857, 1997.
- SADIK, C. D.; KIM, Nancy D.; LUSTER, Andrew D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trend immunol**, v. 32, n. 10, p. 452-460, 2011.
- SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nat Immunol**, v. 9, n. 9, p. 949-52, 2008.
- SARKAR, M. Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Leaf Extract of *Mangifera indica* L.(Anacardiaceae) in Rats. **Int J Drug Develol Res**, v. 7, n. 3, p. 021-025, 2015.
- SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant physiol**, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.
- SCHETT, G. et al. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 822-824, 2013.

- SCHMIDT, K. N. et al. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. **Chem Biol**, v. 2, n. 1, p. 13-22, 1995.
- SCHRECK, R.; ALBERMANN, K. A. J.; BAEUERLE, P.A. Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). **Free radic res comm**, v. 17, n. 4, p. 221-237, 1992.
- SCHRECK, R. BAEUERLE, P.A. A role for oxygen radicals as second messengers. **Trend in cell biol** v. 1, n. 2-3, p. 39-42, 1991.
- SCHUSTER, B.; HERRMANN, K. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. **Phytoch**, v. 24, n. 11, p. 2761-2764, 1985.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal bioch**, v. 25, p. 192-205, 1968.
- SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The Fas J** v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.
- SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, Jesmond. The resolution code of acute inflammation: novel pro-resolving lipid mediators in resolution. In: **Sem immun**. Academic Press, 2015. p. 200-215.
- SERHAN, C. N.; SAVILL, John. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat immunol**, v. 6, n. 12, p. 1191, 2005.
- SEVGI, K.; TEPE, B.; SARIKURKCU, C. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. **Food Chem Toxic**, v. 77, p. 12-21, 2015.
- SHAH, R.I et al. Evaluation of hepatoprotective activity of ethyl acetate fraction of *Tephrosia purpurea*. **Pharmacolog**, v. 3, p. 188-194, 2011.
- SHAIKH, R. U.; PUND, M. M.; GACCHE, R. N. Evaluation of anti-inflammatory activity of selected medicinal plants used in Indian traditional medication system in vitro as well as in vivo. **J trad complem med** v. 6, n. 4, p. 355-361, 2016.
- SHAJIB, M.S., KHAN, W.I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiol (Oxf)**., v.213, p.561-574, 2015.
- SHAKHOV, A.N. et al. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. **J Exper Med**, v. 171, n. 1, p. 35-47, 1990.

SHIRLEY, Rachel; ORD, Emily NJ; WORK, Lorraine M. Oxidative stress and the use of antioxidants in stroke. **Antioxidants**, v. 3, n. 3, p. 472-501, 2014.

SHI, Shan-Rong; SHI, Y; TAYLOR, C. R. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. **J Histochem Cytochem** v. 59, n. 1, p. 13-32, 2011.

SIES, Helmut. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. **Redox byol**, v. 11, p. 613-619, 2017.

SIKANDER, A.; RANA, S.V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clinic Chim Acta**, v. 403, n. 1, p. 47-55, 2009.

SILVA, R. O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chem-biolol interac** v. 229, p. 55-63, 2015.

SIMON, H.-U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v. 5, n. 5, p. 415-418, 2000.

SINGH, Z. et al. Use of malondialdehyde as a biomarker for assessing oxidative stress in different disease pathologies: a review. **Iran J Pub Health**, v. 43, n. 3, p. 7, 2014.

SJOERDSMA, A.; WAALKES, T. P.; WEISSBACH, H. Serotonin and histamine in mast cells. **Science**, v. 125, n. 3259, p. 1202-1203, 1957.

SKULACHEV, V. P. How to clean the dirtiest place in the cell: cationic antioxidants as intramitochondrial ROS scavengers. **IUBMB life**, v. 57, n. 4-5, p. 305-310, 2005.

SKULACHEV, V. P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Mol aspec med**, v. 20, n. 3, p. 139-184, 1999.

SMITH, C. J. et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proc Nat Acad Sci**, v. 95, n. 22, p. 13313-13318, 1998.

SMITH, M. A. et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Bioch Bioph Acta (BBA)-Mol Basic Dise** v. 1502, n. 1, p. 139-144, 2000.

SMITH, R. S. et al. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. **The Am J path** v. 151, n. 2, p. 317, 1997.

SPECTOR, W. G.; WILLOUGHBY, D. A. Vasoactive amines in acute inflammation. **Ann New York Acad Sci**, v. 116, n. 1, p. 839-846, 1964.

STEINER, M. Serotonin, depression, and cardiovascular disease: sex-specific issues. **Acta Physiol**, v. 203, n. 1, p. 253-258, 2011.

Tai, A., Sawano, T., Ito, H. Antioxidative properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. **Biosc biotech biochem**, v.76, n. 6, p. 314-318, 2012

TAI, A.; SAWANO, T.; YAZAMA, F. Antioxidant properties of ethyl vanillin in vitro and in vivo. **Biosc biotech, and biochem**, v. 75, n. 12, p. 2346-2350, 2011.

TATSUMI, K. et al. Enzymatic coupling of chloroanilines with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid. **Soil Biol and Biochem**, v. 26, n. 6, p. 735-742, 1994.

THURSTON, G. et al. Angiotensin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nat medic**, v. 6, n. 4, p. 460, 2000. 72

TILG, H.; DINARELLO, C.A.; MIER, J. W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. **Immunol today**, v. 18, n. 9, p. 428-432, 1997.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analy biochem**, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

USHIKUBI, F. et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP 3. **Nature**, v. 395, n. 6699, p. 281, 1998.

VALERIO, D. A. et al. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **J Nat Products**, v. 72, n. 11, p. 1975-1979, 2009.

VALKO M, D. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN MIERT, A.S.J.P.A.M. Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. **Vet Res Commun**, v. 26, n. 2, p. 111-126, 2002.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **J agric food chem**, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Cur Pharm Design**, v. 18, n. 26, p. 3831-3852, 2012.

VILAR, M.S. A. et al. Assessment of phenolic compounds and anti-inflammatory activity of ethyl acetate phase of *Anacardium occidentale* L. bark. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1087, 2016.

VILE, G.F.; TANEW-ILIITSCHIEW, A.; TYRRELL, R. M. Activation of NF- κ B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. **Photochem photobiolog**, v. 62, n. 3, p. 463-468, 1995.

VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NIZET, V. Innate immunity turned inside-out: Antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. **J Mol Medic**, v. 87, n. 8, p. 775–783, 2009.

VON SCHEVEN, E. et al. Glucocorticoid-associated osteoporosis in chronic inflammatory diseases: epidemiology, mechanisms, diagnosis, and treatment. **Curr osteop rep**, v. 12, n. 3, p. 289-299, 2014.

VUILLEUMIER, P. H.; SCHLIESSBACH, J.; CURATOLO, M. Current evidence for central analgesic effects of NSAIDs: an overview of the literature. **Min anesthesiol**, 2018.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003.

WANG, CY.; MAYO, M. W.; BALDWIN, A. S. TNF-and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. **Science**, v. 274, n. 5288, p. 784-787, 1996.

WÉRA, O.; LANCELLOTTI, P.; OURY, C. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. **J clin medic**, v. 5, n. 12, p. 118, 2016.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nat Rev Immuno**, v. 14, n. 7, p. 478, 2014.

WEST, A. P.; SHADEL, G.S. Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. **Nat Rev Immun**, v. 17, n. 6, p. 363, 2017.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc soc experim boil and med**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WINTER, M.; HERRMANN, K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. **J Agric Food Chem**, v. 34, n. 4, p. 616-620, 1986.

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

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive oxygen species and

neutrophil function. **Ann rev biochem**, v. 85, p. 765-792, 2016.

WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. **Free Radic Bio Med**, v. 27, n. 3-4, p. 322-328, 1999.

WOLFF, S. P.; GARNER, A.; DEAN, R. T. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trend Biochem Sci**, v. 11, n. 1, p. 27-31, 1986.

WONG, J. Y. et al. Evaluation of antioxidant activities in relation to total phenolics and flavonoids content of selected Malaysian wild edible plants by multivariate analysis. **Int j food prop**, v. 17, n. 8, p. 1763-1778, 2014.

WRIGHT, Helen L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, 2010.

WYNN, T.A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 5, p. 271-282, 2015.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflammation Research**, v. 55, n. 9, p. 359-363, 2006.

YOUN, Gi Soo et al. Overexpression of HDAC6 induces pro-inflammatory responses by regulating ROS-MAPK-NF- κ B/AP-1 signaling pathways in macrophages. **Free Rad Biol and Med**, v. 97, p. 14-23, 2016.

YUN-CHOI, H.S.; KIM, M. H.; JUNG, K. H.. Esters of substituted benzoic acids as anti-thrombotic agents. **Arch of Pharm Res**, v. 19, n. 1, p. 66-70, 1996.

YOUNOSSI, Z. M. et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 3, p. 665-674, 2005.

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **J Thermal Biol**, v. 24, n. 5-6, p. 287-326, 1999.

ZEMAN, K. Role of neutrophils in inflammation. **Inflammation. Pathoph clinic Med press. W-wa**, p. 76-97, 1998.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Curr Opin Food Sci**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHANG, Hua; TSAO, Rong. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, R. et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. **J Biol Chem**, v. 277, n. 48, p. 46116-46122, 2002.

ZHANG, X. et al. Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. **Inflamm Res**, v. 57, n. 11, p. 524-529, 2008.

ZHANG, X. et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 228-236, 2007.

ZHANG, Zijia et al. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). **Food chemistry**, v. 113, n. 1, p. 160-165, 2009.

ZHENG. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 103, 2011.

ZHOU, J.; CIDLOWSKI, J. A. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. **Steroids**, v. 70, n. 5-7, p. 407-417, 2005.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Forum in immunology. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microb and Infec**, Paris, v.5, n.14, p.1289-1291, 2003.

ANEXO 1



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 24 de Outubro de 2014.

Ilmo.

Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS
Departamento: Biotecnologia- CMRV_ Parnaíba /UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (24 de Outubro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **068/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Prospecção farmacológica de moléculas biologicamente ativas extraídas de produtos naturais- ênfase no potencial terapêutico**", sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Dezembro/2014 à Dezembro/2020, e serão usados 340 Camundongos isogênicos (machos e fêmeas) e 320 Ratos isogênicos (machos e fêmeas). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof.ª Ivere L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

