

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IMUNOLOGIA E DIP

Letícia Moroni Lacerda

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTITUMORAL DE NOVOS ADUTOS DA REAÇÃO DE MORITA-
BAYLIS-HILLMAN**

Juiz de Fora
2017

LETÍCIA MORONI LACERDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTITUMORAL DE NOVOS ADUTOS DA REAÇÃO DE MORITA-
BAYLIS-HILLMAN**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Costa Macedo

Juiz de Fora
2017

LETÍCIA MORONI LACERDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTITUMORAL
E ANTIOXIDANTE DE NOVOS ADUTOS DA REAÇÃO DE MORITA-
BAYLIS-HILLMAN**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Dissertação de mestrado aprovada em:
22/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior
Universidade Federal de Juiz de Fora.

Profa. Dra. Rafaela Chitarra Rodrigues Hell
Emprapa - Gado de Leite

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo (orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me fazer forte nos momentos em que foi necessário ser forte.

O agradecimento especial deste trabalho é para minha mãe, a mais batalhadora das mulheres que eu conheço e exemplo de pessoa que eu quero seguir. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me estimulando e me incentivando em todos os desafios, por comprar todas as minhas ideias, por me ouvir sempre que precisei e por não medir esforços para fazer o melhor por mim!

À tia Cida, minha mãe de coração, por estar sempre ao meu lado cuidando de mim e me fazendo uma pessoa melhor.

Ao Rafa, pela enorme bondade e por estar sempre disposto a ajudar em tudo o que preciso.

Minha família foi meu porto seguro e, sem dúvida, sem eles eu não teria chegado até aqui.

Às minhas amigas queridas, Thays, Ju e Camila, por me darem força durante todo o projeto e estarem sempre ao meu lado, me fazendo querer sempre ir em frente e buscar novos desafios

Ao Gilson, o melhor professor, meu querido orientador, pelo grande aprendizado, paciência e dedicação para que este projeto se desenvolvesse da melhor forma possível. Esses 2 anos não foram fáceis, mas com certeza ter um orientador como você foi a melhor escolha que eu poderia ter feito.

À família Lab <3, Ju por me ajudarem tanto nos experimentos e pelos momentos de descontração, que foram imprescindíveis para tornar o laboratório um lugar mais divertido e prazeroso. Mas em especial, agradeço à Ju, Bruna e Danny, por compartilharem comigo os sentimentos bons e ruins destes 2 anos. Agradeço muito pela cumplicidade e amizade.

À todos do laboratório de Imunologia que me acolheram e me ajudaram em tudo o que precisei!

RESUMO

Nos últimos anos, tem se notado uma mudança no perfil populacional, com conseqüente redução das doenças infectocontagiosas e aumento da prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) que, em sua maioria, compartilham uma patogênese de caráter inflamatório. A inflamação é uma reação normal à perturbação da homeostase do tecido, seguida por uma fase de resolução e reparo. Dentre as células que participam do processo inflamatório, os macrófagos têm recebido grande atenção, uma vez que são responsáveis pela produção de uma grande variedade de mediadores, como citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio bem como mediadores lipídicos. Apesar de benéfica, a inflamação precisa ser finamente controlada visto que sua exacerbação pode resultar no surgimento de diversos tipos de patologias. Neste contexto, é crescente a necessidade de se desenvolver novos compostos capazes de atuar nos processos inflamatórios e/ou no câncer, de maneira efetiva e com o mínimo de efeitos adversos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antitumoral de novos adutos da reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH), verificando se esta atividade tinha relação com uma possível atividade antioxidante, também testada. Para isso, primeiramente, foi determinada a viabilidade das células RAW 264.7 e J774A.1 após tratamento com adutos utilizando o ensaio de MTT. Em seguida, a ação destes adutos sobre a produção de óxido nítrico (NO), TNF- α , IL-6, CCL2 e moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 e CD40) foi determinada em células RAW 264.7, enquanto sua ação sob a IL-1 β foi determinada em células J774A.1. O melhor dos adutos foi também submetido aos testes *in vivo* em modelo murino de edema de orelha. Além disso, foi avaliada a viabilidade de células 4T1 e B16 tratadas com os compostos através do método do MTT enquanto a ação antioxidante foi determinada pelo teste de DPPH. Os resultados mostraram que somente um dos adutos apresentou citotoxicidade significativa na concentração de 75 μ M enquanto a 50 μ M nenhum dos adutos foi citotóxico. Concomitantemente, o tratamento com os adutos foi capaz de reduzir, a produção de NO, assim como de TNF- α , IL-6, IL-1 β e CCL2. Os compostos também modularam a expressão das moléculas co-estimuladoras CD86 e CD40. *In vivo*, o aduto 4Br foi eficaz em reduzir o edema de orelha, o infiltrado inflamatório e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), embora não tenha sido capaz de reduzir a produção de IL-1 β , IL-6 e CCL-2 no tecido auricular. Em relação à viabilidade de células tumorais, cinco adutos foram tóxicos para células 4T1, enquanto seis deles foram efetivos em induzir a redução da viabilidade de células B16. Nenhum dos adutos apresentou atividade antioxidante, o que sugere que os mecanismos anti-inflamatórios e antitumorais desencadeados pelos adutos são independentes do potencial antioxidante. Os resultados encontrados até o momento sugerem uma possível aplicabilidade destes adutos em novas estratégias de combate a doenças inflamatórias e/ou na terapia contra o câncer.

Palavras-chave: Inflamação. Câncer. Adutos. Morita-Baylis-Hillman.

ABSTRACT

Over the years, there has been a change in the population profile with a consequent reduction of infectious diseases and an increase in the prevalence of chronic noncommunicable diseases which, for the most of them, share an inflammatory pathogenesis. Inflammation is a normal reaction to disturbance of tissue homeostasis, followed by a resolution and repair phase. Among the cells that participate in the inflammatory process, macrophages have received great attention, since they are responsible for the production of a great variety of mediators, such as cytokines, chemokines, reactive species of oxygen and nitrogen as well as lipid mediators. Despite of beneficial, inflammation needs to be finely controlled since its exacerbation can result in the onset of various types of pathologies. In this context, the need to develop new compounds capable of acting in inflammatory processes and/or cancer is increasing in an effective way and with the minimum of adverse effects. Thus, the objective of the present study was to evaluate the anti-inflammatory and antitumor of new adducts of the Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction, verifying if this activity was related to a possible antioxidant activity, also tested. For this, the viability of RAW 264.7 and J774A.1 cells was determined after treatment with adducts using the MTT assay. The action of these adducts on the production of nitric oxide, TNF- α , IL-6, CCL2 and costimulatory molecules (CD80, CD86 and CD40) was determined in RAW 264.7 cells, while its action under IL-1 β was determined in J774A.1 cells. The best of the adducts was also submitted to *in vivo* tests in a murine model of ear edema. In addition, the viability of 4T1 and B16 cells treated with the compounds was assessed by the MTT method while the antioxidant action was determined by the DPPH test. The results showed that only one of the adducts presented significant cytotoxicity at the concentration of 75 μ M whereas at 50 μ M none of the adducts was cytotoxic. Concomitantly, treatment with adducts was able to reduce NO production, as well as TNF- α , IL-6, IL-1 β and CCL2. The compounds also modulated the expression of CD86 and CD40 costimulatory molecules. *In vivo*, the 4Br adduct was effective in reducing ear edema, inflammatory infiltrate and myeloperoxidase enzyme activity. Although it was not able to reduce the production of IL-1 β , IL-6 and CCL-2 in the tissue of the ears. Regarding the viability of tumor cells, five adducts were toxic to 4T1 cells, while six of them were effective in inducing the reduction of viability of B16 cells. None of the adducts presented antioxidant activity, which suggests that the anti-inflammatory and antitumor mechanisms triggered by the adducts are independent of the antioxidant potential. The result suggests a possible applicability of these adducts in new strategies to combat inflammatory diseases and/or cancer therapy.

Keywords: Inflammation. Cancer. Adducts. Morita-Baylis-Hillman

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A cascata inflamatória	20
Figura 2: Os 5 sinais cardinais da inflamação	21
Figura 3: Efeitores da Inflamação e Resolução.....	23
Figura 4: Subconjuntos dos macrófagos ativados.....	30
Figura 5: Metabolismo do ácido araquidônico através das vias das cicloxigenases e lipoxigenases.....	31
Figura 6: Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman.....	39
Figura 7: Fármacos sintetizados a partir de um intermediário sintético proveniente da reação de MBH	40
Figura 8: Delineamento experimental com as etapas de triagem in vitro e também dos ensaios realizados in vivo	43
Figura 9: Reação utilizada para a obtenção dos adutos MBH	44
Figura 10: Estrutura dos adutos MBH testados neste trabalho	45
Figura 11: Estratégia de <i>gate</i>	50
Figura 12: Avaliação da viabilidade de células RAW 264.7 e J774 A.1 após tratamento com adutos de MBH.....	56
Figura 13: Avaliação da produção de NO por células RAW 264.7 tratadas com os adutos de MBH.....	57
Figura 14: Avaliação da produção de TNF- α por células RAW 264.7 tratadas com os adutos de MBH.....	58
Figura 15: Avaliação da produção de IL-1 β por células J774A.1 tratadas com adutos de MBH	60
Figura 16: Avaliação da produção de IL-6 por células RAW 264.7 tratadas com adutos de MBH.....	61
Figura 17: Avaliação da produção de CCL2 por células RAW 264.7 tratadas com adutos de MBH.....	62
Figura 18: Avaliação da interferência na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 pelos adutos de MBH sobre células RAW 264.7	64
Figura 19: Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	66
Figura 20: Análise histológica do efeito do aduto de MBH 4Br sobre o edema e infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido por TPA.	67

Figura 21: Avaliação da produção de IL-6, IL-1 β e CCL2 no sobrenadante das orelhas maceradas e tratadas com o aduto de MBH 4Br.....	68
Figura 22: Quantificação de MPO presente na orelha dos camundongos em resposta ao tratamento com TPA.....	69
Figura 23: Avaliação da citotoxicidade dos adutos de MBH sobre células 4T1 e B16	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria	50
Tabela 2: Atividade antioxidante dos adutos de MBH	71

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Cálculo da viabilidade.	47
Equação 2: Porcentagem de atividade antioxidante.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido Araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BSA	Albumina Sérica Bovina
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CDs	Células dendríticas
CD	Cluster de diferenciação
COX	Cicloxigenase
CSF-1	Fator estimulador de colônias - 1
CTe	Controle estimulado e não tratado
CTLA-4	Antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico
CTn	Controle não estimulado e não tratado
CTng	Controle Negativo
CTi	Controle Inflamado
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
Dexa	Dexametasona
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO _{595a}	Valor médio da densidade óptica das amostras testadas
DO _{595CTe}	Valor médio da densidade óptica do controle estimulado e não tratado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio

FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FSC	<i>Forward Scatter</i> (tamanho)
GPMS	Grupo de Pesquisas em Metodologias Sintéticas
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IL-6R	Receptor de IL-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzível
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrienos
MAPK	MAP quinase
MBH	Morita-Baylis-Hillman
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
ml	Mililitro
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NEED	Naftiletenodiamino-bicloridrato
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear κ B
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	Receptores do Tipo NOD
nm	nanômetro
nNOS	Óxido Nítrico sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato

NOS	Óxido Nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
pg	Picograma
PBS	Tampão fosfato salino
PGs	Prostaglandinas
PLA2	Fosfolipase A2
PMN	Polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
RLR	Receptores do Tipo RIG
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	<i>Side Scatter</i> (granulosidade)
TAM	Macrófagos associados a tumores
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador- β
T _H	T <i>helper</i>
TLR	Receptores do Tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TPA	Acetato de tetradecainol-forbol
TX	Tromboxanos
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 INFLAMAÇÃO	18
2.2 MACRÓFAGOS E A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	24
2.2.1 ÓXIDO NÍTRICO	25
2.2.2 CITOCINAS	26
2.2.3 QUIMIOCINAS	30
2.2.4 PROSTAGLANDINAS	31
2.3 A INFLAMAÇÃO E O CÂNCER	32
2.4 TERAPIAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E ANTINEOPLÁSICAS	36
2.5 A REAÇÃO DE MORITA BAYLIS-HILLMAN (MBH)	39
3. OBJETIVOS	42
3.1 GERAL	42
3.2 ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
4.2 PREPARO DOS COMPOSTOS	44
4.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	45
4.3.1 LINHAGENS CELULARES	45
4.3.2. CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7, J774A.1, 4T1 E B16	46
4.3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO MTT	46
4.3.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO	47
4.3.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETERMINAÇÃO DE TNF- α , IL-6, CCL2 E IL-1 β	48
4.3.6 CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES DE SUPERFÍCIE	49
4.3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
4.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	52
4.4.1 ANIMAIS	52
4.4.2 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÓLEO DE CRÓTON (TPA)	52

4.4.3 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6 E IL-1 β E DA QUIMIOCINA CCL2	53
4.4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO	53
4.4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS	54
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	55
5.1 INFLAMAÇÃO	55
5.1.1 RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	55
5.1.1.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7 E CÉLULAS J774A.1 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	55
5.1.1.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	56
5.1.1.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- α POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	57
5.1.1.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1 β POR CÉLULAS J774A.1 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	59
5.1.1.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-6 POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	60
5.1.1.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CCL2 POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	61
5.1.1.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CD80, CD86 E CD40, EM CÉLULAS RAW 264.7	62
5.1.2 RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	65
5.1.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ADUTO 4BR EM MODELO DE EDEMA DE ORELHA MURINO INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON (TPA)	65
5.2 CÂNCER	69
5.2.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS 4T1 (CARCINOMA MAMÁRIO MURINO) E B16 (MELANOMA) QUANDO TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH	69
5.3 ENSAIO ANTIOXIDANTE	71
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	82
8 PERSPECTIVAS	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, pela primeira vez na história, a maioria das pessoas já pode esperar viver até os 60 anos ou mais. Esse aumento na expectativa de vida, combinado com quedas acentuadas nas taxas de fertilidade, levam ao rápido envelhecimento das populações em todo o mundo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou, em setembro de 2015, o Relatório Mundial sobre o envelhecimento da população que revela que o número de pessoas com 60 anos no mundo passará de 12,3% para 21,5% até 2050. No Brasil, o ritmo deve ser ainda mais acelerado. Nos próximos 35 anos, idosos devem passar de 12,5% (23 milhões) para 30% (64 milhões) da população do país (OMS, 2015).

Com a mudança no perfil demográfico da sociedade, há diminuição da ocorrência das doenças infectocontagiosas, deixando em destaque as doenças associadas a condições crônicas (INCA, 2014), principalmente doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como as doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, diabetes, doenças respiratórias crônicas, obesidade, demência e o câncer (OMS, 2015; DUNCAN et al., 2012), sendo que muitas dessas doenças compartilham uma patogênese inflamatória (MINCIULLO et al., 2016). No Brasil as DCNT são também a principal causa de mortalidade (SCHMIDT et al., 2011).

As respostas inflamatórias são geralmente benéficas ao organismo, atuando como importante mecanismo de defesa. Estas respostas são capazes de limitar a sobrevivência e proliferação de microrganismos invasores, além de promover o reparo tecidual (KIKUTA e ISHII, 2012). Apesar disso, este potente mecanismo de defesa precisa ser finamente controlado. Processos inflamatórios desregulados podem resultar em inflamação crônica e provocar lesão tissular incipiente por meio da ativação a longo prazo do sistema imune inato e adquirido, podendo causar posterior manifestação das DCNTs citadas acima (LAHOZ e MOSTAZA, 2007).

Em relação ao Câncer, somente no Brasil, a estimativa para o biênio 2016-2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil casos

novos), ocorrerão cerca de 420 mil casos novos de câncer, onde os cânceres de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres serão os mais frequentes (INCA, 2016). Estes dados demonstram o grande impacto deste tipo de enfermidade sobre a população brasileira.

É incontestável que, tanto as doenças inflamatórias quanto o câncer são hoje, um problema de saúde pública mundial, cujo controle e prevenção devem ser priorizados em todas as regiões (INCA, 2014). Associado a isso, levando-se em conta o importante papel dos processos inflamatórios nas doenças acima mencionadas, o estabelecimento de métodos para controlar estes processos torna-se crucial no tratamento e cura destas importantes enfermidades (MURAKAMI e HIRANO, 2012).

Neste contexto, a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos contra algumas patologias ainda sem tratamento adequado e que possam substituir os existentes, porém a custos menores e dotados de menores efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a ação anti-inflamatória e antitumoral de novos adutos da reação de Morita-Bailys-Hillman (MBH), verificando se esta atividade tem relação com uma possível atividade antioxidante, também testada. Os adutos de MBH têm sido utilizados por químicos como intermediários sintéticos de vários produtos naturais (KOHN et al., 2006; LIMA-JÚNIOR e VASCONCELLOS, 2012). Além disso, estes compostos têm apresentado diversas funções biológicas de interesse, tais como antineoplásica (LIMA-JÚNIOR e VASCONCELLOS, 2012), antileishmania (KAUR et al., 2011), antibacteriana (SINGH e BHAT, 2011), dentre outras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma reação biológica à perturbação da homeostase do tecido (MEDZHITOV, 2008) que pode ser desencadeada por infecção, injúria tecidual, trauma ou exposição a partículas estranhas, irritantes e poluentes (Figura 1A) (ASHLEY et al., 2012; MEDZHITOV, 2008). Sua função primária é destruir ou isolar a fonte do distúrbio, remover o dano tecidual e restaurar a homeostase do tecido (MEDZHITOV, 2008).

Esta resposta requer ação da imunidade inata e, em alguns casos, da imunidade adaptativa, dois principais componentes que integram o sistema de defesa do hospedeiro. A imunidade inata não só age como a primeira linha de defesa contra o material nocivo, mas após o reconhecimento de um estímulo apropriado, proporciona os sinais necessários para instruir o sistema imune adaptativo a montar uma resposta. Por sua vez, a resposta adaptativa depende do sistema imune inato para fornecer os efetores necessários, sob a forma de fagócitos e granulócitos, para lidar com o estímulo inicial (LAWRENCE et al., 2002).

A inflamação pode ser dividida em aguda ou crônica, conforme seu tempo de duração. A inflamação aguda é de curta duração, se estendendo por minutos, horas ou alguns dias e suas principais características são a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e a emigração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Já a inflamação crônica é de longa duração e está associada, histologicamente, com a presença de linfócitos e macrófagos, neovascularização, fibrose e necrose do tecido (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

A resposta inflamatória consiste de uma série de eventos finamente controlados que se inicia com a liberação de quimiocinas, citocinas e mediadores solúveis por células residentes no local da invasão ou dano, tais como mastócitos, macrófagos e células dendríticas (CDs) (ASHLEY et al., 2012). Estas células são capazes de detectar componentes moleculares presentes nos patógenos e que dificilmente sofreriam algum tipo de mutação. Essas estruturas são conhecidas como

Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e seu reconhecimento ocorre através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR). Além dos PAMPs, os PRRs também podem reconhecer produtos derivados de tecidos danificados ou células necróticas, denominados Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) e este reconhecimento é crucial para a defesa do hospedeiro e remodelamento tecidual (MEDZHITOV, 2007; BROZ e MONACK, 2013; CAO, 2016). As três maiores famílias de PRRs responsáveis pelo reconhecimento de uma grande variedade de PAMPs e DAMPS são a Família dos Receptores do tipo Toll (TOLL Like Receptors - TLRs), Receptores do tipo RIG (RIG Like Receptors - RLRs) e Receptores do tipo NOD (NOD Like Receptors - NLR) (CAO, 2016).

Uma vez que o reconhecimento dos ligantes ocorre, os TLRs, por exemplo, ativam uma via de transdução de sinal dependente da proteína adaptadora MyD88 que culmina na ativação do Fator de Transcrição Nuclear NF- κ B (Figura 1 B). Este fator de transcrição é encontrado em praticamente todos os tipos de células e permanece em estado inativo ligado a uma proteína inibitória, a I κ B (GHOSH et al., 1998). Uma vez ativado, o NF- κ B é liberado da I κ B e transloca-se para o núcleo, onde regula positivamente a transcrição através da ligação em genes alvo (Figura 1 C), que são, posteriormente, traduzidos em citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6), IL-8, IL-12, entre outras (Figura 1 D) (ASHLEY et al., 2012).

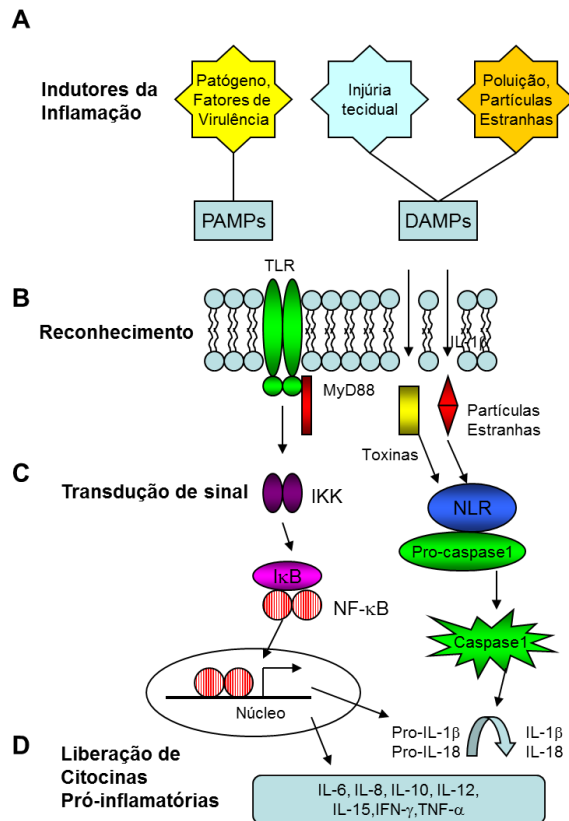


Figura 1: A cascata inflamatória. (A) Patógenos, injúria tecidual e partículas estranhas são fontes de PAMPs e DAMPs que iniciam a inflamação. (B) Os TLRs e os NLRs se ligam aos PAMPs e DAMPs, respectivamente. (C) Os TLRs ativam uma via de transdução de sinal que envolve a fosforilação de IκB, liberando o fator de transcrição N-κB que transloca-se para o núcleo, onde ocorre a transcrição de genes inflamatórios. Os NLRs sinalizam através da formação do inflamassoma, que ativa a caspase-1 para converter as citocinas IL-1β e IL-18 em suas formas ativas. (D) Uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são produzidas e liberadas para promover as funções efetoras de inflamação (Fonte: Adaptada de ASHLEY et al., 2012).

Enquanto os TLRs são expressos na membrana celular, os NLRs são sensores citoplasmáticos que oligomerizam para formar compostos multimoleculares denominados inflamassomas (constituídos pela proteína NLR, o adaptador ASC e a enzima caspase-1) que controlam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1β e a IL-18 (Figura 1 C e D) (OLIVEIRA et al., 2012).

Essa variedade de citocinas pró-inflamatórias, em conjunto com outros mediadores, regulam as alterações vasculares e facilitam o recrutamento das células efetoras, como os monócitos e neutrófilos, ao sítio inflamatório. Dentre os vários mediadores inflamatórios envolvidos, os principais são: a) as aminas vasoativas, como a histamina e serotonina (5-HT); b) espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs); c) moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular-

1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e as selectinas; d) mediadores lipídicos, como as Prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LT); e) quimiocinas, como a IL-8 (CXCL8) e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1 ou CCL2). Também estão presentes fragmentos do sistema do complemento, como C2a, C4a e C5a (MEDZHITOV, 2008; PALOZZA et al., 2010).

Assim, uma cascata de eventos permite que os leucócitos circulantes reconheçam o endotélio vascular do tecido inflamado e interajam com a parede do vaso sanguíneo por meio de uma série de passos: as selectinas são induzidas na superfície das células endoteliais em tecidos inflamados e proporcionam a captura dos leucócitos de um fluxo sanguíneo rápido e essa interação resulta no rolamento do leucócito ao longo da superfície endotelial (VESTWEBER, 2015); em seguida, ocorre imobilização do leucócito sobre a superfície do endotélio vascular por meio da forte adesão das integrinas (presentes na superfície do leucócito) e moléculas de adesão expressas na célula endotelial (PROOST et al., 1996). Ocorre, então, transmigração dos leucócitos através dos espaços celulares interendoteliais para seus locais de destino (VESTWEBER, 2015).

O efeito das interações que ocorrem durante esse processo de inflamação aguda culmina com os cinco sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda de função (Figura 2) (ASHLEY et al., 2012; LAWRENCE et al., 2002).

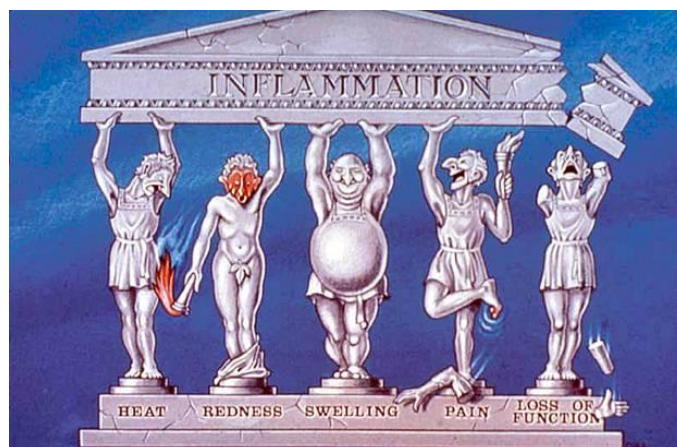


Figura 2: Os 5 sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda de função (Fonte: LAWRENCE et al., 2002)

Calor e rubor são decorrentes do aumento do fluxo sanguíneo para o local inflamado (CHANDRASOMA e TAYLOR, 2005); o edema é promovido pelo influxo

de células para o tecido que é acompanhado de um fluido rico em proteínas, conhecido como exsudato (ASHLEY et al., 2012); a dor é produzida pela liberação de mediadores químicos que estimulam as terminações nervosas e/ou pela compressão dos nervos devido a formação do edema; a perda da função refere-se a simples perda de mobilidade de uma articulação, devido ao edema e a dor ou a substituição de tecido funcional por tecido fibroso (CHANDRASOMA e TAYLOR, 2005; PUNCHARD et al., 2004).

Devido a migração de células, ocorre uma predominância de neutrófilos na região inflamada no início da lesão, os quais são gradualmente substituídos por células mononucleares – principalmente monócitos, que então se diferenciam em macrófagos no tecido. Estas células fagocíticas ingerem material estranho e detritos celulares, liberam enzimas hidrolíticas e proteolíticas e geram EROs e ERNs que eliminam e digerem organismos invasores (Figura 3A) (LAWRENCE et al., 2002). No entanto, os mediadores liberados por estas células são inespecíficos e podem prejudicar tanto o patógeno quanto o hospedeiro (NATHAN, 2002) e, por esta razão, são os principais contribuintes de danos colaterais resultantes do processo inflamatório (ASHLEY et al., 2012).

Sendo assim, de forma a limitar os danos colaterais ao hospedeiro, uma resposta inflamatória aguda bem-sucedida resulta na eliminação do agente causador seguida por uma fase de resolução e reparo (SERHAN e SAVILL, 2005). Depois das primeiras horas da inflamação, um programa coordenado de resolução é iniciado pelos macrófagos presentes no tecido. Nesta fase de resolução, eles começam a produzir mediadores anti-inflamatórios endógenos, como as lipoxinas e a citocina IL-10, os quais revertem os eventos vasculares e inibem a migração e a ativação de leucócitos, enquanto promovem a remoção segura de células inflamatórias por apoptose e fagocitose e a cicatrização e remodelamento tecidual (Figura 3B), reestabelecendo a homeostase no tecido (MEDZHITOV, 2008; ASHLEY et al., 2012; LAWRENCE et al., 2002; WYNN et al., 2013).

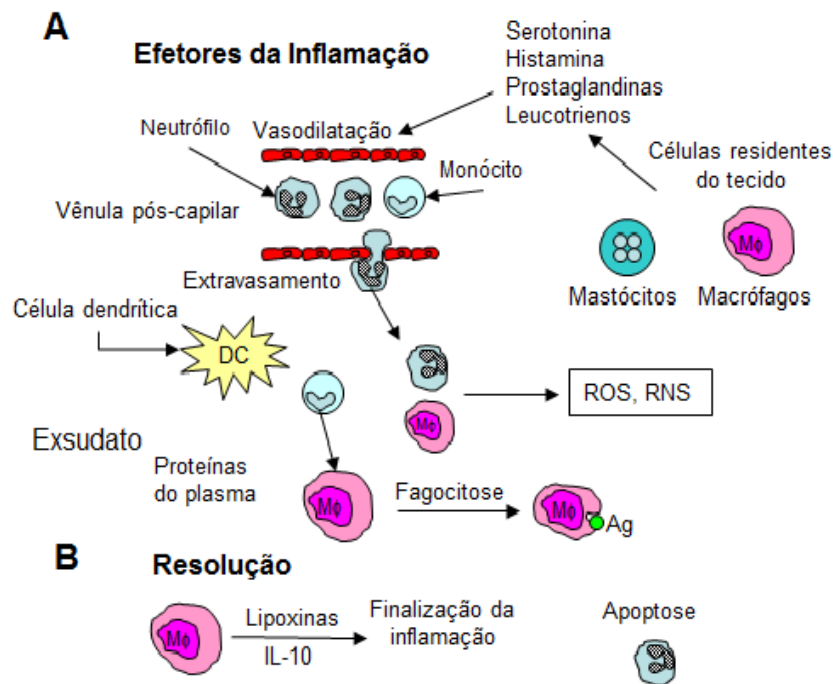


Figura 3: Efeitores da Inflamação e Resolução. (A) Neutrófilos e monócitos provenientes do sangue migram para o local da inflamação por quimiotaxia, atravessando seletivamente os espaços interendoteliais (extravasamento). Este influxo de células é acompanhado de um líquido rico em proteínas (exsudato) que promove o edema. Os mastócitos e macrófagos residentes do tecido promovem esta migração através da liberação de 5-HT, histamina, PG e LT que promovem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Neutrófilos liberam compostos tóxicos, incluindo EROs e ERNs que, por serem inespecíficos, prejudicam tanto o patógeno quanto o hospedeiro. Os macrófagos e as células dendríticas participam na fagocitose de Antígenos. (B) A resolução da inflamação ocorre quando os neutrófilos fazem a troca dos LT produzidos pelos macrófagos e por outras células em lipoxinas, além de aumentarem sua produção de IL-10, que iniciam o processo de finalização da inflamação. Ocorre apoptose das células inflamatórias seguida de fagocitose dos detritos celulares pelos macrófagos (Fonte: Adaptada de ASHLEY et al., 2012).

Porém, se a resposta inflamatória aguda falha em eliminar o agente causador, a inflamação pode deixar de ser um evento benéfico, adquirindo novas características. Nesse contexto, neutrófilos infiltrados são substituídos por macrófagos e também por células T. Se os efeitos combinados destas células ainda forem insuficientes, ou seja, se o agente causador ainda permanecer, segue-se um estado inflamatório crônico, envolvendo a formação de granulomas e tecidos linfoides terciários (DRAYTON, 2006).

Por este motivo, embora o processo inflamatório seja importante e benéfico, ele precisa ser finamente controlado, visto que a inflamação pode se tornar patológica, causando lesões teciduais graves, bem como consequências sistêmicas importantes, podendo levar ao desenvolvimento de doenças, tais como a asma brônquica (HAMID et al., 1993), artrite reumatoide (SAKURAI et al., 1995),

aterosclerose (BUTTERY et al., 1996), Alzheimer (VODOVOTZ et al., 1996) e até mesmo o câncer (CHHATWAL et al., 1996).

2.2 MACRÓFAGOS E A PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

Dentre os diversos tipos celulares que atuam nas respostas inflamatórias, os macrófagos têm recebido grande atenção, uma vez que são uma das células secretoras mais ativas do corpo, liberando uma grande variedade de mediadores que regulam diversos aspectos da defesa do hospedeiro, desde a inflamação até a homeostase. Dentre as substâncias secretadas por estas células estão enzimas, proteínas do complemento, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e substâncias oxidantes. Além disso, os macrófagos são importantes nos processos de fagocitose e apresentação de antígenos, sendo considerados como células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, envolvidas na iniciação de respostas imunes específicas de linfócitos T (LASKIN, 2009). Além disso, através do processo de fagocitose, os macrófagos funcionam como agentes de limpeza, eliminando células apoptóticas e reciclando nutrientes através da digestão de resíduos de produtos dos tecidos (SIEWEKE e ALLEN, 2013; ZHANG e MOSSER, 2008).

No processo inflamatório, os macrófagos desempenham um papel central, visto que são os primeiros a entrar em contato com os PAMPs ou DAMPs provenientes de uma infecção ou de injúria tecidual através dos PRRs. Uma vez que estas substâncias são reconhecidas, os macrófagos saem do estado de repouso para um estado de ativação, no qual produzem diversos tipos de mediadores (LASKIN, 2009; FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005) e expressam diferentes tipos de moléculas em sua superfície, como MHC de classe I e II, moléculas CD40, CD80 e CD86 (GHOSH e SAXENA, 2004; LEE, RHEE e CHO, 2008). Essas duas últimas promovem o segundo sinal necessário à ativação e proliferação dos linfócitos T por meio da ligação ao receptor CD28, ou inibem a resposta por essas células por meio da ligação ao receptor CTLA4, ambos expressos na superfície dos linfócitos (MIGLIORI, 2010). Já o receptor de membrana CD40, quando ativado através de seu ligante CD154 (comumente chamado de CD40L), desencadeia uma série de

processos celulares destinados à ativação da resposta imune. Nas células apresentadoras de antígenos, a ativação de CD40 é fundamental para decisão do sistema imune de criar uma resposta eficaz ou tolerância (SOUZA, 2007).

Os principais mediadores produzidos por macrófagos em um processo inflamatório serão comentados a seguir.

2.2.1 ÓXIDO NÍTRICO

Macrófagos ativados são importantes produtores de Óxido Nítrico (NO). A produção de NO é catalisada principalmente pela enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) que converte L-arginina em L-citrulina e NO. Existem três isoformas da enzima NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). As enzimas eNOS e nNOS são produzidas de forma constitutiva e desempenham papéis importantes em situações de normalidade fisiológica. Já a iNOS é produzida em grandes quantidades na presença de sinais oriundos de estímulos, como o lipopolissacarídeo (LPS), interferon-gama (IFN- γ), TNF- α e IL-1, sendo capaz de promover os processos inflamatórios (DUDZINSKI et al., 2006).

O NO é produzido no estado gasoso e rapidamente se oxida dando origem a nitratos/nitritos (NO₂/NO₃) que agem destruindo pontes de ferro-enxofre presentes em determinadas enzimas, causando danos letais à atividade mitocondrial e no DNA da célula alvo, sendo assim, um potente agente microbicida (MONCADA et al., 1991).

A vasodilatação, um dos sinais cardinais de uma resposta inflamatória, também é causada, em grande parte, por meio de um processo dependente de NO. Vários mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina e a histamina, produzem vasodilatação através da estimulação da liberação de NO endotelial (WALLACE, 2005).

Em reações inflamatórias, as citocinas pró-inflamatórias ou endotoxinas (em caso de infecção bacteriana) levam ao aumento da expressão da enzima iNOS em macrófagos, neutrófilos e muitas outras células. Como consequência, grandes quantidades de NO são sintetizados, excedendo sua produção fisiológica em até 1000 vezes (FORSTERMANN et al., 1994; KNOWLES e MONCADA, 1994;

WEINBERG et al., 1995; COOK e CATTELL, 1996). Além disso, o NO é capaz de ativar as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2), aumentando a produção de PGs que podem agravar os processos inflamatórios (ASANUMA et al., 2001). Vários estudos têm sugerido que a expressão aumentada de iNOS ou COX-2 está intimamente envolvida na patogênese da inflamação, câncer, esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, entre outras (PRESCOTT e WHITE, 1996; IYENGAR et al., 1987; HINZ e BRUNE, 1999; LIANG, et al., 1999).

Devido à grande relevância da enzima óxido nítrico sintase e de seu caráter induzível em processos inflamatórios, inibidores de iNOS estão sob investigação para o tratamento de estados inflamatórios (HOCHER et al., 2000).

2.2.2 CITOCINAS

Embora não sejam os únicos, os macrófagos são os maiores produtores da citocina TNF- α e, curiosamente, são extremamente responsivos a ela (ação autócrina) (BEUTLER e CERAMI, 1986). Essa citocina é uma das primeiras a serem liberadas em resposta a um agente patogênico e estimula a fase aguda da resposta inflamatória, sendo capaz de exercer os seus efeitos em diversos órgãos (BEUTLER, 1999). A principal função fisiológica do TNF- α é recrutar neutrófilos e outros macrófagos para o local da inflamação bem como ativar estas células no intuito de eliminar microrganismos. Entretanto, suas ações são bem mais abrangentes incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (PARAMESWARAN e PATIAL, 2010). Em níveis adequados, o TNF- α é capaz de aumentar a vasodilatação e a permeabilidade vascular, facilitando a infiltração de linfócitos, neutrófilos e monócitos para o sítio da inflamação. Em conjunto com a IL-17, ela desencadeia a expressão das quimiocinas atraentes de neutrófilos, CXCL1, CXCL2 e CXCL5 (GRIFFIN et al., 2012) e pode também aumentar a expressão de moléculas de adesão celular (VIEIRA et al., 2009). Além disso, esta citocina é capaz de ativar e aumentar a atividade microbicida de fagócitos (aumentando a produção de óxido nítrico), aumentar a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos, como o MHC de classe II, além de estimular a produção de diversas outras citocinas de caráter inflamatório, como a IL-1 β e a IL-6 (KINDLER et al., 1989;

NIKCEVICH et al., 1999; OPPENHEIM et al., 1989, MURRAY et al., 1992). Apesar disso, o TNF- α também pode ser extremamente prejudicial quando produzido em níveis elevados. Sua ação está relacionada à patogênese de diversas doenças, incluindo a doença inflamatória do intestino, psoríase, artrite reumatoide, asma, câncer, doenças infecciosas e outras patologias autoimunes (SOZZANI et al., 2014).

De modo semelhante ao TNF- α , a IL-1 β também é produzida e liberada nas primeiras fases da resposta imune a infecções, lesões e stress. Embora monócitos e macrófagos sejam as principais fontes de IL-1 β , ela também pode ser produzida por células *Natural Killer* (NK), linfócitos B, células dendríticas, fibroblastos e células epiteliais. Durante a inflamação, a IL-1 β estimula a produção de proteínas de fase aguda no fígado e atua sobre o sistema nervoso central para induzir febre e secreção de PGs. Em mastócitos, a IL-1 β induz a liberação de histamina, que por sua vez, provoca vasodilatação e inflamação localizada. Também é um quimioatraente para os granulócitos, aumenta a expansão e a diferenciação de células T CD4⁺ (BEN-SASSON et al., 2009) e aumenta a expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais e leucócitos (ARANGO DUQUE e DESCOTEAUX, 2014) e, juntamente com o TNF- α , estimula a produção de IL-6 e IL-8 (HWANG et al., 2004). A IL-1 β também está envolvida na regulação de respostas imunes adaptativas induzindo a diferenciação de células T_H17 e a produção de IL-17 em humanos (SUTTON et al., 2006).

Devido a suas características pró-inflamatórias, diversos estudos têm sugerido um papel importante para a IL-1 β no desenvolvimento de doenças como a artrite reumatoide (KAY e CALABRESE, 2004), doença de Alzheimer (NICOLL et al., 2000; RAINERO et al., 2004), diabetes mellitus (DINARELLO et al., 2010; BANERJEE e SAXENA, 2012.), periodontite (LÓPEZ et al., 2005) e esclerose sistêmica (KAWAGUCHI et al., 2006).

Outra importante citocina produzida por macrófagos e relacionada aos processos inflamatórios é a IL-6. Sua ação pleiotrópica permite a ela afetar processos que vão desde a imunidade até a reparação dos tecidos e metabolismo. Assim como o TNF- α e a IL-1 β , a IL-6 também é pirogênica, levando a febre e produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (ARANGO DUQUE e DESCOTEAUX, 2014). Além disso, esta citocina promove a diferenciação das células B em plasmócitos e ativa as células T citotóxicas, estando intimamente relacionada a indução de respostas T_H17 (HOU et al., 2009). Já foi demonstrado que

a IL-6 desempenha importante papel na inibição da apoptose celular induzida por vários estímulos, tais como o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), além de promover o crescimento e a sobrevivência de várias células, incluindo células tumorais (HIDESHIMA et al., 2001). Esta ação tem sido associada, em parte, a produção de IL-17 pelas células T_H17 (BETTELLI et al., 2006; ZHOU et al., 2007).

De maneira semelhante ao TNF- α e a IL-1 β , a participação da IL-6 em diversas patologias inflamatórias já foi evidenciada, como na doença de Crohn e na artrite reumatoide (NISHIMOTO e KISHIMOTO, 2004). Além disso, a ação conjunta da IL-6 e de células T_H17 tem sido associada com o desenvolvimento de diversas doenças autoimunes, tais como a esclerose múltipla, bem como na progressão do câncer (SCHATTNER e RAGER-ZISMAN, 1990; HORWITZ e SARVETNICK, 1999; ARZUMANYAN et al., 2013).

Macrófagos são também excelentes produtores de IL-12, uma citocina que promove a imunidade mediada por células e é decisiva para influenciar a polarização dos linfócitos T *helper naive* (T_H0) para o perfil T *helper 1* (T_H1), com consequente produção da citocina IFN- γ (NATHAN e DING, 2010). Os linfócitos T_H1 são os responsáveis por dar continuidade, pelo sistema imune adaptativo, às respostas inflamatórias iniciadas pelo sistema imune inato, podendo levar à inflamação crônica (CRUVINEL et al., 2010). Além dos linfócitos T, a IL-12 também atua sobre as células NK induzindo sua ativação e produção de mais IFN- γ . Este IFN- γ produzido por células T_H1 ou células NK é capaz de agir sobre os macrófagos estimulando a produção de EROs e ERNs que, como já comentado anteriormente, também são importantes mediadores da inflamação. Além disso, esta citocina potencializa a ação citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ e estimula a produção de anticorpos pelos linfócitos B (MACHADO et al., 2004).

Em relação a estrutura, a IL-12 é uma citocina heterodimérica, composta por duas subunidades, IL-12p40 e IL-12p35 que se juntam formando a IL-12p70, forma biologicamente ativa da molécula (MARTIN et al., 2012). Já foi demonstrado que a IL-12p40 também faz parte da citocina IL-23, estando relacionada a patogênese de doenças como a psoríase, doença inflamatória do intestino, artrite reumatoide e câncer (CROXFORD et al., 2014).

É importante ressaltar que, de acordo com as funções executadas, propriedades celulares e principalmente o perfil de secreção de citocinas, os

macrófagos podem ser subdivididos em dois grandes grupos: macrófagos M1, ou classicamente ativados e macrófagos M2, ou alternativamente ativados (FRIDMAN et al., 2012; BISWAS e MANTOVANI, 2010; LASKIN, 2009). A exposição dos monócitos ou macrófagos não ativados à citocina IFN- γ ou ao lipopolissacarídeo (LPS) promove o desenvolvimento de macrófagos M1. Estes macrófagos, por sua vez, secretam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-23 e promovem o desenvolvimento de linfócitos T_H1. Além disso, os macrófagos M1 promovem o metabolismo da arginina em óxido nítrico e citrulina e secretam altos níveis de EROs e ERNs. Como resultado, os macrófagos M1 promovem um ambiente altamente microbicida e têm um papel na mediação da destruição de agentes patogênicos (Figura 4A) (ARANGO DUQUE e DESCOTEAUX, 2014).

Em contraste, a exposição dos monócitos às citocinas IL-13 e IL-4 polariza estas células para um fenótipo M2 (GUNDRA et al., 2014). Macrófagos M2 liberam IL-10 e TGF- β , exercem atividade imunossupressora seletiva e inibem a proliferação de células T, além de também desempenharem um papel na resolução da inflamação através da fagocitose de neutrófilos apoptóticos e aumento da síntese de mediadores importantes na remodelação de tecidos, angiogênese e cicatrização de feridas (LASKIN, 2009), como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e mediadores lipídicos (eicosanoides e fator de agregação plaquetária - PAF) (BALBINO et al., 2005).

Assim, as mesmas células podem inicialmente ser pró-inflamatórias e citotóxicas e depois participar na resolução da inflamação e cicatrização de feridas, de acordo com as alterações no seu microambiente (Figura 4 B).

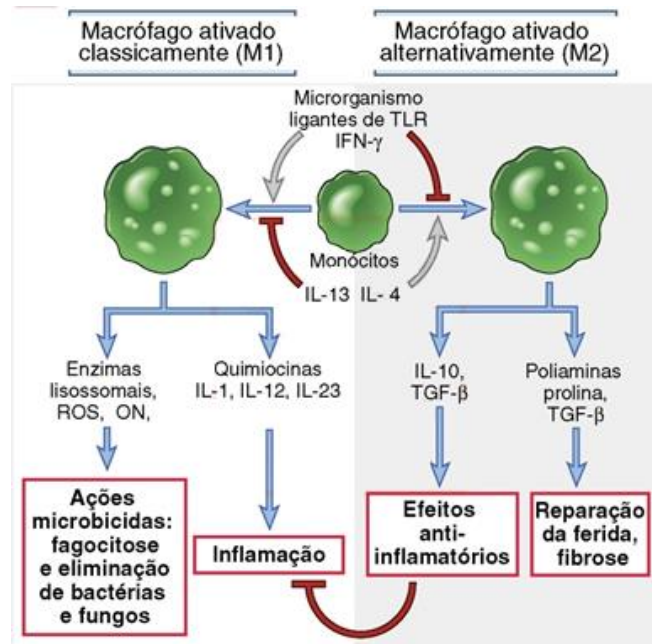


Figura 4: Subconjuntos dos macrófagos ativados. Diferentes estímulos ativam os monócitos a se desenvolverem em populações funcionalmente distintas. Os macrófagos ativados classicamente (M1) são induzidos por produtos microbianos e citocinas, particularmente, o IFN- γ , e são microbicidas e envolvidos na inflamação potencialmente prejudicial. Os macrófagos alternativamente ativados (M2) são induzidos por IL-13 e pela IL-4 produzidos pelas células T_H2 e outros leucócitos, e são importantes no reparo dos tecidos e na fibrose (Fonte: ABBAS et al., 2015).

2.2.3 QUIMIOCINAS

Além da produção de citocinas, os macrófagos também são produtores de quimiocinas envolvidas na regulação do tráfego celular. As quimiocinas constituem uma família de citocinas que são capazes de orientar a migração celular, num processo conhecido como quimiotaxia. Durante a vigilância imune, as quimiocinas desempenham um papel crucial em guiar as células do sistema imune ao local onde são necessárias. Na resposta inflamatória, as quimiocinas são liberadas por uma ampla variedade de células envolvidas tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa (COMERFORD e MCCOLL, 2011). Essa liberação, muitas vezes, é induzida por citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6, e IL-1 β e resulta no acúmulo de células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, no local inflamado (ARANGO DUQUE e DESCOTEAUX, 2014).

Dentre as principais quimiocinas produzidas e liberadas por macrófagos, estão a CCL2 (MCP-1), CCL-5 (RANTES), CXCL1, CXCL2 (MIP-2a) e CXCL8 (IL-8),

porém, possui destaque a CCL2 por estar entre os membros mais estudados da família de quimiocinas.

A CCL2 é produzida por diversos tipos de células além dos macrófagos, incluindo as células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, células do músculo liso, células mesangiais, astrócitos e células microgliais (CUSHING et al., 1990; STANDIFORD et al., 1991; BROWN et al., 1992; BARNA et al., 1994). Sua produção pode ocorrer de forma constitutiva ou após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento (DESHMANE et al., 2009). Essa quimiocina regula a migração e infiltração de monócitos, linfócitos T de memória e células NK e já foi demonstrada como sendo um potencial ponto de intervenção para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, incluindo a esclerose múltipla (SORENSEN et al., 2004), artrite reumatoide (HAYASHIDA et al., 2001), aterosclerose (KUSANO et al., 2004) e diabetes (SARTIPY e LOSKUTOFF, 2003).

2.2.4 PROSTAGLANDINAS

Os macrófagos também produzem vários mediadores lipídicos gerados a partir do metabolismo do Ácido Araquidônico (AA), pela ação da Fosfolipase A2 (PLA2) sobre os fosfolipídios de membrana. O AA dará origem a mediadores inflamatórios por duas vias: a primeira via, das cicloxigenases (COX), produzindo PGs e tromboxanos (TXs), e a segunda via, das lipoxigenases (LOX), levando a formação de LTs e lipoxinas (Figura 5). Os produtos do metabolismo do AA por estas duas vias enzimáticas são chamados de eicosanoides (CASTRO, 2011).

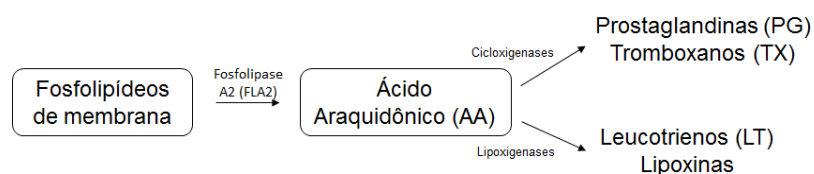


Figura 5: Metabolismo do ácido araquidônico através das vias das cicloxigenases e lipoxigenases (Fonte: do autor)

As PGs desempenham um papel fundamental na geração da resposta inflamatória. Sua biossíntese é aumentada significativamente no tecido inflamado e elas contribuem para o desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação aguda. Elas são produzidas ubiquamente e agem como mediadores lipídicos autócrinos e parácrinos para manter a homeostase do corpo (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Durante uma resposta inflamatória, tanto o nível quanto o perfil de produção de PGs mudam drasticamente, sendo geralmente muito baixa nos tecidos, mas aumentando imediatamente na inflamação aguda, antes do recrutamento de leucócitos e da infiltração de células imunes (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

A produção de PGs depende da atividade das COXs, enzimas bifuncionais que existem como isoformas distintas: COX-1 e COX-2 (SMITH et al., 2000). A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células e é a fonte dominante dos prostanoídes que auxiliam nas funções de manutenção, tais como citoproteção epitelial gástrica e homeostase (DUBOIS et al., 1995). Já a COX2 é induzida em vários tipos celulares por citocinas e fatores de crescimento, como IL-1, IL-2 e TNF- α , enquanto as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 inibem sua expressão (VANE et al., 1998). Esta enzima é a fonte mais importante na formação de prostanoídes na inflamação e injúria tecidual e em doenças proliferativas, tais como o câncer (DUBOIS et al., 1995). No entanto, ambas as enzimas contribuem para a produção de prostanoídes auto reguladores e homeostáticos e ambas podem contribuir para a liberação de prostanoídes durante a inflamação (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011).

Os mediadores lipídicos inflamatórios também estão envolvidos em muitas doenças, incluindo a artrite reumatoide e outras formas de artrite, esclerose múltipla, distúrbios reprodutivos, pólipos intestinais, asma brônquica e fibrose pulmonar e cardíaca (SHIMIZU, 2009), sendo consideradas, por isso, alvos farmacológicos importantes.

2.3 A INFLAMAÇÃO E O CÂNCER

No intuito de manter a homeostase, durante uma resposta inflamatória aguda típica, logo que o agente causador é eliminado, segue-se a etapa de resolução (STABLES e GILROY, 2011). Nesta etapa, diversos sistemas endógenos

são ativados, tais como a inibição do tráfego de células polimorfonucleares (PMNs), catabolismo de mediadores pró-inflamatórios (como citocinas, quimiocinas, eicosanoides e moléculas de adesão), morte celular programada (apoptose), entre outros. Quando todos estes mecanismos funcionam de forma coordenada, a inflamação aguda se resolverá sem causar maiores danos teciduais (GILROY e DE MAEYER, 2015).

No entanto, caso aconteça o surgimento de falhas em qualquer parte desta via de reparo, a inflamação irá persistir e tornar-se crônica, podendo se estender por dias, meses ou anos, levando a danos em excesso no tecido. Esta é uma característica da patogênese de várias doenças prevalentes na civilização ocidental moderna, tais como artrite reumatoide e doença periodontal (VAN DYKE e SERHAN, 2003); doenças cardiovasculares, tais como infarto do miocárdio (ANSELMINI et al., 2004) e aterosclerose (LIBBY, 2002); várias desordens neuropatológicas, tais como o acidente vascular cerebral (AVC), a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson (KOISTINAHO e KOISTINAHO, 2005), além do câncer (KARIN e GRETEN, 2005; PHILIP et al., 2004).

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 200 doenças (NPG, 2016) que se desenvolvem ao longo do tempo, como uma longa e complexa sucessão de mutações ou alterações genéticas. Tais alterações podem ser resultado de uma variedade de fatores, tanto intrínsecos, tais como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, quanto extrínsecos, como por exemplo, dano e instabilidade genética induzida por radiação, substâncias químicas ou infecção viral. Essas mutações irão progressivamente interferir nos mecanismos responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e morte celular, resultando na formação do tumor (LODISH et al., 2004; TANNOCK, 2005).

O impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos 30 anos. Desde então, a doença tem sido amplamente estudada em diferentes aspectos e sua cura permanece como o maior paradigma médico-científico já estabelecido (MIJAN, 2012).

Estudos já demonstraram que a resolução inadequada das respostas inflamatórias representa uma importante base patológica para o desenvolvimento de tumores, sendo que cerca de 25% de todos os casos de câncer no mundo estão ligados à inflamação crônica causada por infecções crônicas, doenças autoimunes ou condições inflamatórias de origem incerta (BALKWILL e MANTOVANI, 2001).

Uma vez que a inflamação crônica é um processo complexo e dinâmico envolvendo múltiplos tipos celulares e mediadores solúveis, não é surpreendente que vários mecanismos tenham sido identificados pelo qual a inflamação promove malignidade (DEMARIA, 2010).

A percepção do câncer como um microambiente tumoral, onde interagem células geneticamente alteradas, células normais (como fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea, tem se mostrado muito mais satisfatória na compreensão do desenvolvimento tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Dentre as células normais do microambiente tumoral, estudos recentes vêm demonstrando uma importância crescente da atuação das células do sistema imune e seus produtos (ONUCHIC e CHAMMAS, 2010).

As células tumorais produzem várias citocinas, quimiocinas e mediadores pró-angiogênicos que compõem os microambientes tumorais e atraem leucócitos. Os componentes inflamatórios de uma neoplasia em desenvolvimento podem incluir uma população de leucócitos diversos, todos os quais são capazes de produzir um conjunto variado de citocinas, mediadores citotóxicos incluindo EROs, serina e cisteína-proteases, metaloproteinases de matriz (MMPs), agentes de perfuração de membrana e mediadores solúveis de morte celular (KUPER et al., 2000; WAHL e KLEINMAN, 1998).

Dentre os componentes do microambiente tumoral estão o TNF- α , o TGF-B, o VEGF e as citocinas IL-1 e IL-6 (BALKWILL et al., 2005). A produção de VEGF é um mecanismo pelo qual os leucócitos infiltrados no tumor aumentam a angiogênese e o desenvolvimento do tumor (ESPOSITO et al., 2004; BARBERA-GUILLEM et al., 2002). Da mesma forma, o TNF- α , uma citocina chave mobilizada durante a inflamação aguda (SZLOSAREK e BALKWILL, 2003), medeia o desenvolvimento do câncer diretamente, através da regulação da proliferação e sobrevivência de células neoplásicas e, indiretamente, ao exercer os seus efeitos sobre as células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune no microambiente tumoral (BALKWILL et al., 2005).

Vários estudos utilizando animais geneticamente modificados, juntamente com a análise de tumores humanos, revelaram que a expressão alterada de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 e/ou anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β tem um papel crucial na promoção de diferentes tipos de tumores,

incluindo o tumor gástrico, colorretal, do fígado, da mama e da pele (LIN e KARIN, 2007).

O fator de transcrição NF- κ B, que tem um papel central na imunidade inata e na inflamação, representa também uma ponte molecular entre a inflamação e o câncer (KARIN, 2006). O NF- κ B induz a expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, fatores angiogênicos e enzimas, como a COX-2 e iNOS que são importantes para a síntese de mediadores inflamatórios (PGs e NO, respectivamente). No tumor e em células epiteliais expostas a agentes cancerígenos, o NF- κ B promove a sobrevivência e proliferação das células através da ativação de genes que codificam proteínas que regulam a progressão do ciclo celular e apoptose (PORTA et al., 2011).

A capacidade peculiar dos tumores de promover o recrutamento de leucócitos depende, em grande parte, da sua expressão constitutiva de genes que codificam as quimiocinas inflamatórias, como a CCL2, que desempenha um papel importante na progressão do tumor por estimular diretamente o crescimento neoplásico, promovendo a inflamação e induzindo a angiogênese (BALKWILL, 2003) e cuja expressão é controlada pelo NF- κ B (RICHMOND, 2002). Estes dados sustentam o papel central de NF- κ B na comunicação funcional entre tumores e o sistema imune e sugere uma relação causal entre a inflamação mediada por NF- κ B e tumorigênese (KARIN e GRETEN, 2005).

Entre as células componentes do sistema imune que infiltram o tumor, a participação de macrófagos vem ganhando importância e complexidade crescentes, pois os macrófagos estão envolvidos em processos de inflamação crônica e parecem estar associados à progressão tumoral e metástase. Densidades elevadas de macrófagos no tecido neoplásico foram relacionadas a mau prognóstico em mais de 80% de estudos publicados e a superexpressão do Fator Estimulador de Colônias – 1 (CSF-1), um fator de crescimento de macrófagos, já encontrada em tumores de mama, útero e ovário, está correlacionada a um alto grau neoplásico e pior prognóstico (ONUICHIC e CHAMMAS, 2010). Além disso, os macrófagos associados aos tumores (TAM), monócitos circulantes diferenciados em TAMs pela quimiocina CCL2, normalmente expressam baixos níveis de MHC de classe II e pouca atividade tumoricida, tendo potencial de suprimir a imunidade adaptativa antitumoral (MANTOVANI e LOCATI, 2013).

Além de tudo isso, também já é bem sabido que o rompimento do equilíbrio oxidante - antioxidante provoca danos no DNA e pode resultar em morte celular e/ou na geração de mutações que conduzem a um aumento da expressão de oncogenes e inativação de genes supressores de tumores (PORTA et al., 2011). Já foi evidenciado que a síntese desregulada de NO está envolvida na patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer, visto que a expressão de iNOS já foi detectada no câncer do colo do útero (THOMSEN et al., 1994), câncer de mama (REVENEAU et al., 1999), do sistema nervoso central (COBBS et al., 1995), da laringe (TAYSI et al., 2003), e da cabeça e pescoço (ROSBE et al., 1995).

Devido a correlação existente entre a inflamação e o câncer, conforme demonstrado acima, o controle das respostas inflamatórias poderia ser uma alternativa aos tratamentos para o câncer já existentes e conhecidos.

2.4 TERAPIAS ANTI-INFLAMATÓRIAS E ANTINEOPLÁSICAS

Apesar dos grandes avanços na descoberta de novos agentes antineoplásicos e anti-inflamatórios, o câncer e as doenças inflamatórias crônicas ainda são uma grande causa de óbitos e incapacitações em todo o mundo, tornando-se assim evidente a necessidade de se desenvolver novas formas de tratamento capazes de combater essas doenças causando o mínimo de efeitos adversos possíveis.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os agentes anti-inflamatórios mais utilizados na terapêutica e atuam inibindo a enzima cicloxigenase, impedindo a formação de prostaglandinas e tromboxanos, mediadores do processo inflamatório (RANG et al., 2016). Há evidências de que estes agentes também têm promissora atividade anticâncer (THUN et al., 2002). A quimioprevenção da patologia neoplásica foi iniciada pelo estudo realizado por KUNE et al. (1988), que demonstrou que indivíduos tratados com AINEs para outras indicações tiveram uma significativa redução da incidência de câncer colorretal. Muitos AINEs são não seletivos e inibem ambas as isoformas COX-1 e COX-2 e, por isso, podem apresentar diversos efeitos colaterais, dentre os quais o mais importante é a tendência a produzir ulceração gástrica e duodenal. Este efeito colateral pode ser

explicado pelo fato da inibição da COX-1 constitutivamente expressa no estômago resultar no bloqueio da biossíntese de importantes prostaglandinas (PGE2 e PGI2) envolvidas na citoproteção gástrica (BOTTING, 2006). A fim de se evitar esses efeitos adversos gastrointestinais causados pelos inibidores da COX-1, foram introduzidos no mercado os inibidores seletivos para COX-2 que, além da atividade anti-inflamatória, demonstraram efeitos antitumorais numa variedade de cânceres, incluindo o câncer do cólon, de mama, pulmão e de próstata (TURINI e DUBOIS, 2002)

Apesar da diminuição na incidência de complicações gástricas com o uso de inibidores seletivos da COX-2, estes fármacos também podem causar problemas, tais como doenças cardiovasculares e renais. Além disso, em doses altas também são capazes de causar dano gastrointestinal (BRICKS e SILVA, 2005)

Outros agentes anti-inflamatórios bastante utilizados são os glicocorticoides. Seu emprego na terapêutica deve-se, principalmente, ao fato destes apresentarem poderosos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Eles inibem manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação, isto é, não apenas a vermelhidão, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparo de feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica (BAVARESCO et al., 2005). O mecanismo de ação exato destes compostos é complexo e ainda não totalmente compreendido. Entretanto, sabe-se que a diminuição e a inibição de linfócitos e macrófagos periféricos têm participação no processo. Há também forte evidência que os glicocorticoides induzem a síntese de uma proteína que inibe a FLA2 e, portanto, diminui a liberação de AA dos fosfolípidios, o que reduz a formação de PG, LT e compostos correlatos, que tem papel importante na quimiotaxia e na inflamação (RANG et al., 2016). Os glicocorticoides também são empregados no tratamento de uma variedade de tumores em combinação com agentes citotóxicos por exercerem efeitos inibitórios sobre a proliferação de linfócitos. Eles são bastante utilizados para reduzir o edema nos pacientes com tumores cerebrais metastáticos ou primários. Isso se refere principalmente a dexametasona, que é o fármaco glicocorticoide mais utilizado como adjuvante na quimioterapia. Os glicocorticoides representam uma classe importante em muitos outros tipos de cânceres, como linfomas e leucemia mieloide, onde a dexametasona também diminui a proliferação linfocitária, sendo este fármaco um grande aliado durante o tratamento (BAVARESCO et al., 2005). A dexametasona é

também muito usada clinicamente no tratamento das desordens inflamatórias da pele e, por isso, é frequentemente utilizada na pesquisa científica como controle positivo para determinados testes anti-inflamatórios (ASHWELL et al., 2000; PINTO et al., 2015).

Assim como os AINEs, os glicocorticoides também apresentam muitos efeitos colaterais relacionados principalmente com sua função hormonal endógena, como por exemplo, osteoporose, imunossupressão, hiperglicemia, hipertensão, glaucoma, diminuição do crescimento e Síndrome de Cushing, o que limita seu uso crônico (LONGUI, 2007).

Além dos compostos relacionados acima, as terapias biológicas vêm sendo amplamente estudadas para o tratamento da inflamação. Estas terapias incluem agentes que reduzem a atividade de citocinas específicas e/ou seus receptores (terapias anti-citocinas), bloqueiam o tráfego de linfócitos para os tecidos e previnem a ligação entre as moléculas co-estimuladoras dos monócitos e linfócitos. As terapias anti-citocinas atuais tem sido amplamente empregadas no tratamento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, psoríase, esclerose múltipla, entre outras (DINARELLO, 2010).

Já o tratamento convencional do câncer inclui a cirurgia (RECHT e HOULIHAN, 1995; LEZOCHÉ et al., 2013), radiação (MANSFIELD et al., 1991; MUNSHI et al., 2013), quimioterapia (JOHNSON, 2012; GOFFIN et al., 2010) e a terapia hormonal (PREZIOSO et al., 2004). Os agentes quimioterápicos mais empregados incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros.

Entre as possíveis abordagens terapêuticas do câncer, a terapia gênica surge como uma importante alternativa e uma esperança para pacientes. A imunoterapia tem sido uma das principais estratégias adotadas para terapia gênica do câncer. As abordagens utilizadas para estimular a resposta contra o câncer incluem a transferência de genes imuno-estimulatórios em células tumorais ou o melhoramento no processo de apresentação de antígenos (LI et al., 2005).

Entre as moléculas imuno-estimulatórias, a administração sistêmica de citocinas constitui um tratamento corrente para vários tipos de cânceres. Tais moléculas induzem processos biológicos como proliferação, quimiotaxia, diferenciação, inflamação, eliminação de patógenos e morte celular. Porém o uso

sistêmico de citocinas recombinantes está ligado a uma elevada toxicidade, limitando seu uso (LI et al., 2005).

Apesar dos grandes avanços na terapêutica da inflamação e do câncer, o desenvolvimento de novos compostos mais seguros, eficazes e com menos efeitos colaterais ainda é de extrema necessidade, levando-se em conta a grande importância dos processos inflamatórios no desenvolvimento desta importante enfermidade que é o câncer.

2.5 A REAÇÃO DE MORITA BAYLIS-HILLMAN (MBH)

Atualmente, o uso de moléculas obtidas de plantas medicinais tem resultado em algumas alternativas terapêuticas, mas a pequena quantidade do extrato obtido a partir de plantas e/ou a alta complexidade dessas estruturas, tornam a produção desses fármacos naturais, muitas vezes impraticáveis, tanto pela extração natural, como pela síntese química. Dessa forma, a descoberta e identificação de substâncias relativamente simples, que possam ser preparadas através de poucas etapas e com uma boa produtividade, se apresenta como uma alternativa eficiente para a síntese de novas moléculas bioativas (LIMA-JÚNIOR et al., 2010).

Dentro desse contexto encontra-se a reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH). Essa reação pode ser considerada como a condensação entre carbonos eletrofílicos sp^2 (normalmente aldeídos) e ésteres, nitrilas, amidas ou cetonas α,β -insaturadas (nucleófilos) na presença de catalisador, sendo normalmente o 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano (DABCO) o mais utilizado, levando à formação de substâncias α -metileno- β -hidroxicarboniladas (ou adutos de MBH). Essa pode ser caracterizada como uma reação de formação de ligação carbono-carbono¹¹ (SILVEIRA, 2006).

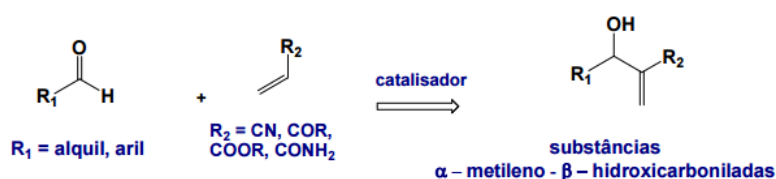


Figura 6: Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman (Fonte: Silveira, 2006)

Com base na sua economia de átomos e viabilidade, a reação de MBH é atualmente considerada como uma das transformações mais eficientes na química orgânica (AMARANTE et al., 2009)

Alguns grupos de pesquisas vêm utilizando essa reação para produzir compostos altamente funcionalizados, que servem como substratos para a síntese de moléculas biologicamente ativas (AMARANTE et al., 2010), pois explorando a reatividade dos grupos funcionais destes compostos, pode-se ter acesso a importantes intermediários para síntese de fármacos, como a Espisulosina (AMARANTE et al., 2010), o (+) Efaroxan (SILVEIRA e COELHO, 2005), Cloranfenicol e derivados (COELHO e ROSSI, 2002; MATEUS e COELHO, 2005) e Bupropion (AMARANTE et al., 2008) (Figura 7).

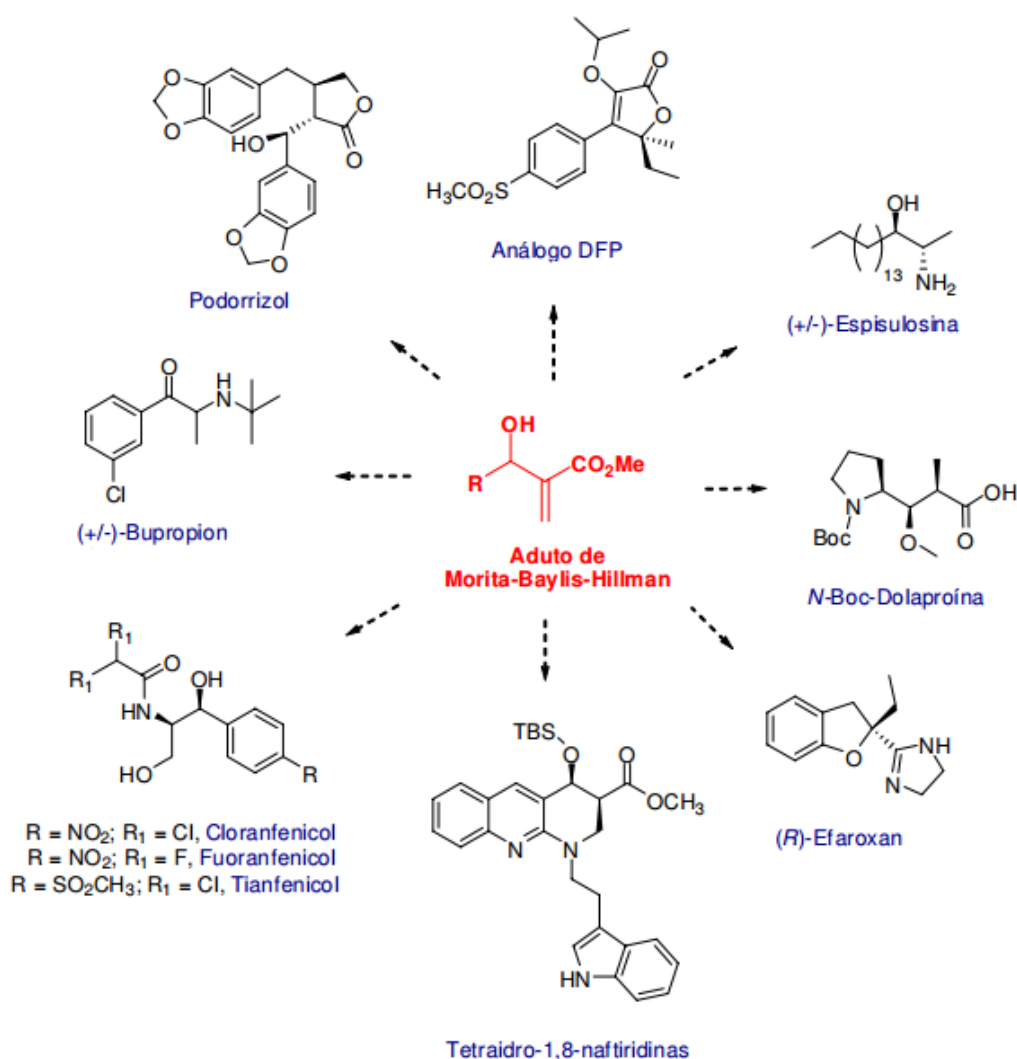


Figura 7: Fármacos sintetizados a partir de um intermediário sintético proveniente da reação de MBH. (Fonte: Adaptado de Ferreira, 2010)

Diversas características evidenciam a vantagem de se utilizar a reação MBH como método sintético, tais como: ser régio- e quimiosseletiva, do ponto de vista estrutural, serem moléculas polifuncionalizadas (GOMES, 2010), além de poder ser considerada uma transformação de “química verde”, já que apresenta uma elevada economia de átomos, utiliza reagentes de baixo custo e reduzido impacto ambiental e gera um volume de resíduos químicos reduzido, pois o DABCO e o acrilato podem ser totalmente recuperados no final da reação (TROST, 2002; ROSA et al., 2001).

Apenas um inconveniente surge com a utilização deste método sintético, a velocidade de sua reação, sendo relatado na literatura processos com até 65 dias de reação. Contudo diversas pesquisas utilizando outros catalisadores, altas pressões, ultrassom, entre outras metodologias têm sido utilizadas para aumentar a eficiência e a velocidade destas reações (BASAVIAH et al., 2003; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012).

Desde sua descoberta, diversas moléculas de interesse químico e biológico já foram sintetizadas a partir desta reação. Entretanto, apenas após três décadas da publicação do trabalho de Morita, estudos relacionados a atividade biológica destes compostos foram realizados. Em 1999, surgiu o primeiro artigo relatando a atividade dos adutos de MBH sobre os principais causadores da malária, o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berghei* (KUNDU et al., 1999). Posteriormente, outras atividades atribuídas aos adutos foram relatadas, tais como ação antineoplásica (KOHN et al., 2006; LIMA-JÚNIOR e VASCONCELLOS, 2012), antibacteriana (SINGH e BHAT, 2011) e antifúngica (YU et al., 2006). Relatos de atividade anti-inflamatória também foram feitos recentemente por MARTINS (2015).

Neste sentido, uma vez que é crescente a necessidade de se desenvolver novos compostos capazes de atuar em doenças inflamatórias e/ou no câncer de maneira efetiva e com o mínimo de efeitos adversos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante de novos adutos de MBH.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antitumoral de 10 novos adutos da reação Morita-Baylis-Hillman (MBH), verificando se esta atividade tem relação com uma possível atividade antioxidante, também testada.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a influência do tratamento com os adutos de MBH na viabilidade de células RAW 264.7 e J774A.1;
- Avaliar a influência do tratamento com os adutos de MBH na produção Óxido Nítrico;
- Avaliar a influência do tratamento com os adutos de MBH na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 assim como da quimiocina CCL2 (MCP-1);
- Avaliar a influência do tratamento com os adutos de MBH na expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40);
- Determinar a atividade anti-inflamatória do melhor aduto de MBH em modelo murino de edema de orelha;
- Avaliar a influência dos adutos de MBH sobre a viabilidade de células de carcinoma mamário murino (4T1) e melanoma murino (B16);
- Avaliar o potencial antioxidante dos adutos MBH;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo foram realizados tanto ensaios *in vitro* para a triagem dos compostos, quanto ensaios *in vivo* para a confirmação das propriedades anti-inflamatórias dos adutos de MBH. Os ensaios de viabilidade celular tumoral e antioxidante (DPPH) foram realizados somente *in vitro*. Na Figura 8 está representado o delineamento experimental deste trabalho.

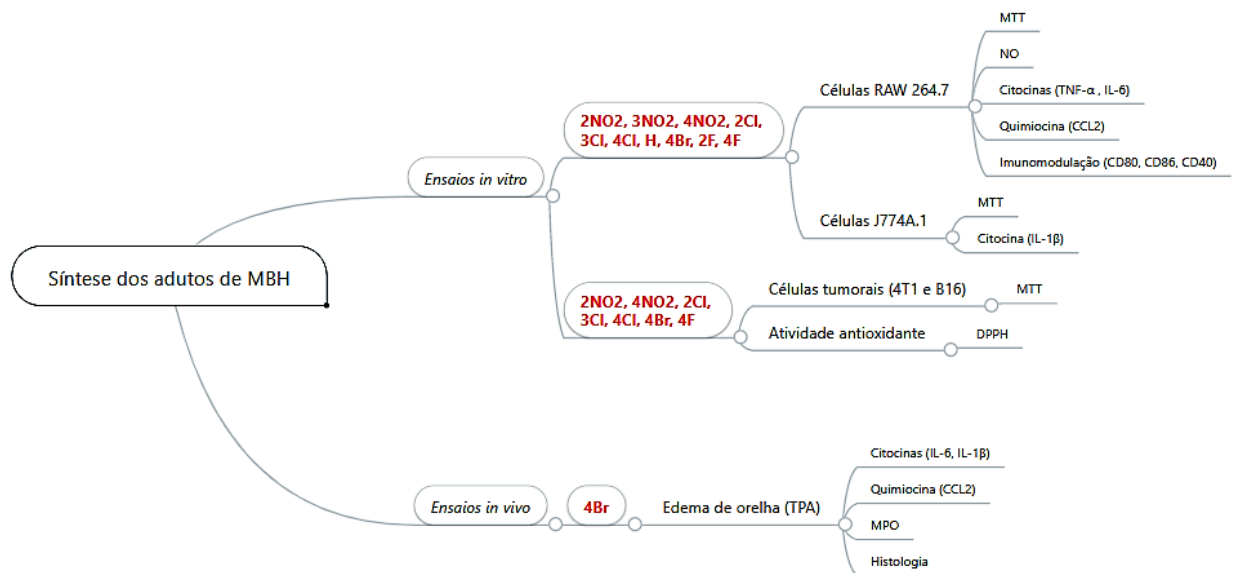


Figura 8: Delineamento experimental com as etapas de triagem *in vitro* e também dos ensaios realizados *in vivo* (Fonte: do autor)

Os ensaios anti-inflamatórios *in vitro* consistiram da determinação da viabilidade tanto de células RAW 264.7 e J774A.1 quanto de células 4T1 e B16 frente aos adutos e dos efeitos dos compostos sobre a produção de NO, citocinas, quimiocina e também na expressão de moléculas co-estimuladoras, em células RAW 264.7, após estimulação com LPS. Após essa etapa, foi selecionado o aduto de MBH com a melhor atividade frente aos mediadores dosados para a realização de ensaios *in vivo*. Os adutos foram testados nas concentrações de 75, 50 e 25µM para todos os ensaios, com exceção do ensaio de expressão de moléculas co-estimuladoras, onde foi testada apenas a maior concentração efetiva e não tóxica dos compostos.

O ensaio *in vivo* foi realizado através de um modelo de edema de orelha murino induzido por óleo de cróton, através do qual foi possível dosar também as citocinas e quimiocina envolvidas no processo inflamatório, a enzima mieloperoxidase (MPO), além da realização de análises histológicas das orelhas. Os grupos experimentais para o ensaio *in vivo* foram os seguintes (n=4):

- **Grupo 1** – Controle inflamado e não tratado, os quais receberam óleo de cróton na orelha, mas não foram tratados com os adutos;
- **Grupo 2** – Controle inflamado e tratado com dexametasona, o qual recebeu óleo de cróton nas orelhas e foram tratados com dexametasona, um anti-inflamatório eficaz para esse tipo de ensaio;
- **Grupo 3** – Grupo experimental inflamado e tratado com o aduto de MBH 4Br, os quais receberam óleo de cróton na orelha e foram tratados com o aduto de MBH 4Br.

4.2 PREPARO DOS COMPOSTOS

Os 10 adutos de MBH foram sintetizados pelo Grupo de Pesquisas em Metodologias Sintéticas (GPMS), coordenado pelo Prof. Dr. Giovanni Wilson Amarante do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e devidamente caracterizados por técnicas espectroscópicas de análise.

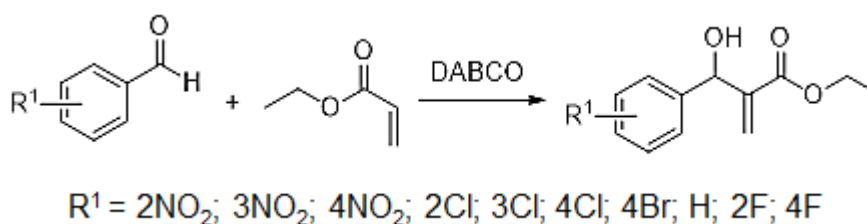


Figura 9: Reação utilizada para a obtenção dos adutos MBH (Fonte: do autor)

A síntese dos 10 compostos se deu pela reação de Morita-Baylis-Hillman, explicada anteriormente, em um único passo (Figura 9). As estruturas dos 10 compostos resultantes são mostradas abaixo, na Figura 10.

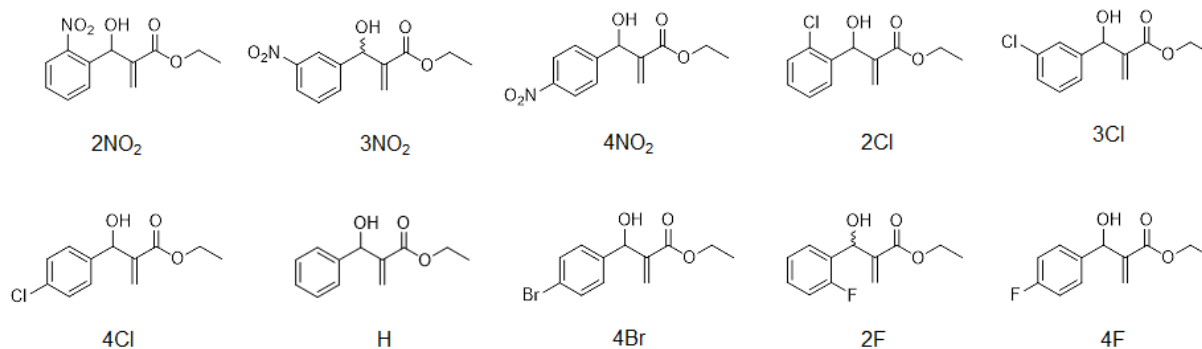


Figura 10: Estrutura dos adutos MBH testados neste trabalho (Fonte: do autor)

Inicialmente, os adutos de MBH foram solubilizados em Dimetilsufóxido (DMSO; Synth) e posteriormente diluídos em meio de cultura para obtenção de uma solução de trabalho a 75 μ M. As soluções subsequentes, por sua vez, também foram diluídas em meio de cultura para obtenção das concentrações de 50 e 25 μ M. A concentração máxima de DMSO alcançada no poço foi < 0,2%.

4.3 ENSAIOS *IN VITRO*

4.3.1 LINHAGENS CELULARES

Nos ensaios de viabilidade e produção de mediadores inflamatórios foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71[™]) e J774A.1 (ATCC[®] TIB-67[™]), ambas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira.

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios de viabilidade celular tumoral foram 4T1 (ATCC[®] CRL 253[™]) e B16F10 (ATCC[®] CRL 6475[™]), gentilmente cedidas pelos professores Jacy Gameiro e Carlos Maranduba, respectivamente.

4.3.2. CULTURA DE CÉLULAS RAW 264.7, J774A.1, 4T1 E B16

As linhagens celulares RAW 264.7, 4T1 e B16 foram cultivadas em garrafas de cultura (NUNC) de 25cm² em meio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico 100UI/mL (penicilina e estreptomicina) a 37°C em 5% de CO₂. Após 2 dias, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 75cm². Uma vez que as linhagens celulares utilizadas são aderentes, para sua remoção do interior das garrafas utilizou-se um suporte plástico (*cell scraper*-SARSTED) para RAW 264.7 e tratamento com solução de tripsina-EDTA (0,25% Sigma-Aldrich) para 4T1 e B16, por entre 5 a 10 minutos.

Após um novo período de incubação de aproximadamente 4 dias, as células passaram novamente pelo mesmo tratamento, porém desta vez, ao invés de serem transferidas para garrafas de cultura, elas foram ressuspensas em meio RPMI suplementado e sua concentração foi determinada em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços de fundo chato, na concentração de 1 x 10⁵ células por poço para células RAW 264.7 e 1 x 10⁴ células por poço para células 4T1 e B16, em um volume final de 100µl. Seguiu-se então um período de incubação de 24 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Para as células J774A.1 foi realizado o mesmo procedimento descrito, no entanto, estas células foram cultivadas em Meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) ao invés de meio RPMI.

Após o período de incubação, os estímulos e os adutos foram adicionados às placas em diferentes concentrações. Seguiu-se nova incubação por 48 horas, quando então foi realizado o ensaio de MTT. Para as células J774A.1 o ensaio de MTT foi realizado 24 horas após essa segunda incubação.

4.3.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO MTT

Para determinar a viabilidade celular após tratamento com os diferentes compostos ou solventes foi utilizado o método colorimétrico do MTT (brometo de 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O princípio deste método consiste na metabolização do sal MTT pelas células, sendo reduzido, no interior da mitocôndria, a um produto chamado formazan. Este produto, acumulado dentro da célula, é solubilizado através da adição de um solvente apropriado (MOSMANN, 1983).

Após o período de incubação previamente descrito, foram adicionados 10 µL do corante MTT (5 mg/mL, Sigma®) completando-se o volume do poço com meio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.) ou DMEM suplementado para 100 µL, seguindo-se nova incubação por mais 2 horas e meia para a formação dos cristais de formazan. Ao final deste período, o meio foi removido cuidadosamente para a adição de 100 µL de DMSO (Sigma®) para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, a 595 nm.

Para calcular a viabilidade celular, a Equação 1 foi utilizada.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{100 \times DO_{595a}}{DO_{595CTe}}$$

Equação 1: Cálculo da viabilidade. DO_{595a} = valor médio da densidade óptica das amostras testadas; DO_{595CTe} = valor médio da densidade óptica do controle estimulado e não tratado (CTe) (Fonte: ISO 10993-5:2009)

Quanto menor a viabilidade, maior o potencial citotóxico do composto testado. Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados são representativos.

4.3.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO

Como a meia vida do NO é da ordem de segundos, medições diretas do mesmo são difíceis. Dessa forma, estas medições são feitas de forma indireta, através da medida do acúmulo de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) (GREEN et al., 1982). Para a determinação da concentração de NO neste trabalho, foi mensurada a concentração de nitrito (NO_2^-) pelo método colorimétrico de Griess. O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida e 0.1% de naftiletenodiaminobicloridrato (NEED) em ácido fosfórico (H_3PO_4) a 2,5%.

Para determinar a concentração de NO_2^- , os sobrenadantes das culturas celulares estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e $\text{IFN-}\gamma$ (20 U/mL), tratadas com os adutos de MBH e incubadas durante 48 horas, conforme ensaios de padronização realizados em nosso laboratório pelo nosso grupo de pesquisa, foram transferidos, em triplicatas, para uma placa de 96 poços de fundo chato (50 $\mu\text{l}/\text{poço}$). Às amostras foram adicionados 50 μL por poço do reagente de Griess e após 5 minutos, a absorbância foi determinada por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, a 540nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a 200 μM em meio RPMI e comparadas ao controle estimulado e não tratado (CTe). Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados são representativos.

4.3.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETERMINAÇÃO DE TNF- α , IL-6, CCL2 E IL-1 β

A dosagem das citocinas e da quimiocina nos sobrenadantes das culturas celulares foram realizadas pelo método de ELISA do tipo sanduíche, de acordo com o protocolo do fabricante (B&D Pharmingen, San Diego, CA, USA), após incubação de 48 horas para as citocinas TNF- α , IL-6 e a quimiocina CCL2 e 24 horas para a citocina IL-1 β .

A leitura da absorbância foi feita a 450 nm por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível e as concentrações das amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão, na qual foi utilizada proteína recombinante purificada específica de cada teste. Os valores foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mL}$ e comparados com um controle estimulado e não tratado (CTe). Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados são representativos.

4.3.6 CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES CELULARES DE SUPERFÍCIE

Após serem mantidas em cultura durante 24h, as células RAW 264.7 foram contadas em câmara de Neubauer e, posteriormente, transferidas para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de 5×10^5 células por poço. As células foram então incubadas por mais 24 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂, quando iniciou-se o processo de marcação celular.

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira (n=3):

- Controle não marcado
- Controles de cor (APC, FITC e BV421)
- Amostras marcadas
 - Controle não estimulado e não tratado (CTn)
 - Controle estimulado e não tratado (CTe)
 - Adutos de MBH

Inicialmente, as placas contendo as células foram lavadas com 200 µl de tampão de FACS (PBS acrescido de 1% de soro fetal bovino e 0,09% de azida) gelado a fim de remover as células aderidas. Em seguida o conteúdo celular foi transferido para uma placa de fundo em “U”, centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi removido por inversão rápida da placa.

O conteúdo celular foi então ressuspendido em 200 µl de PBS e, posteriormente, centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante por inversão rápida da placa, as células receberam o anticorpo de bloqueio anti-CD16/CD32 (Clone 93) na concentração de 0,3 µg por poço. As células foram então incubadas por 15 minutos a 4° C e posteriormente foram adicionados 100 µl/poço de tampão de FACS seguido de centrifugação por 5 minutos, 1500 RPM a 4° C.

O sobrenadante foi então removido por inversão rápida da placa e as células foram ressuspendidas no volume residual, sendo adicionados a cada poço 20µL de tampão de FACS acrescido de 0,3 µg por poço dos diferentes anticorpos de interesse, conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1).

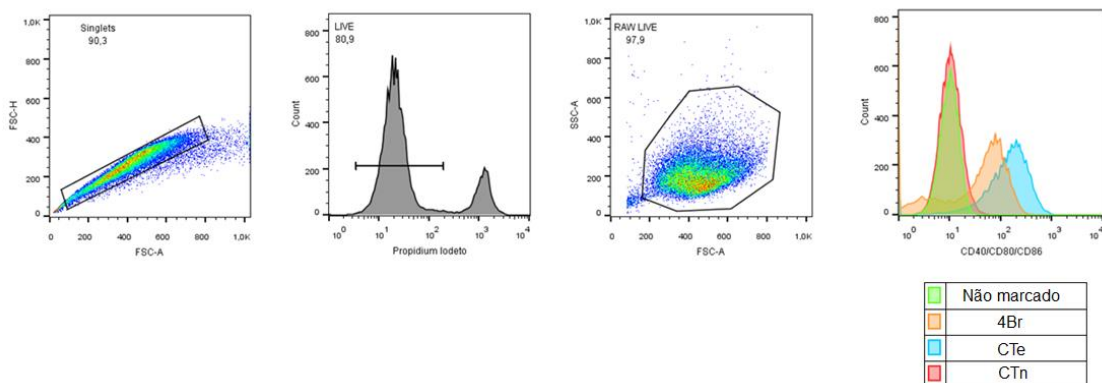
Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de citometria (Becton & Dickinson)

Anticorpos	Clone	Fluorocromos
anti-CD80	Clone 16-10A1	APC
anti-CD86	Clone GL1	FITC
anti-CD40	Clone 3/23	BV421

Fonte: do autor

Posteriormente, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro e em seguida foram adicionados 100 µl/poço de tampão de FACS seguido de centrifugação por 5 minutos, 1500 RPM, 4°C, sendo esse procedimento realizado duas vezes. As células foram então ressuspensas em 150 µl de tampão de FACS e transferidas para tubos específicos (CORNING). As amostras foram coletadas em citômetro de fluxo FACScanto II (Becton & Dickinson), onde 30.000 eventos foram adquiridos e os resultados foram analisados pelo software Flowjo.

A estratégia de *gate* (Figura 11) utilizada para determinação dos fenótipos celulares consistiu, inicialmente, da retirada dos *doublets*, seguida pela determinação das células viáveis a partir da utilização do corante iodeto de propídeo. A zona de demarcação celular foi determinada de acordo com o tamanho (FSC) x granulidade (SSC) característicos das células alvo e a média de intensidade de fluorescência (MIF) destas células foi determinada. Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados são representativos.

**Figura 11:** Estratégia de *gate* (Fonte: do autor)

4.3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método utilizado para a avaliação da atividade antioxidante dos adutos de MBH baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de antioxidante ou espécie radicalar, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente diminuição da absorbância. A partir dos resultados é possível determinar a capacidade antioxidante ou sequestradora de radicais livres, bem como comparar o resultado com substâncias com relevante poder antioxidante (CALIL et al., 2012). Esta técnica foi inicialmente proposta por MARCO (1968), e neste ensaio foi utilizada a adaptação proposta por CALIL e colaboradores (2012).

As soluções das substâncias em teste foram preparadas utilizando-se etanol como solvente em uma faixa que contemplou oito concentrações diferentes entre 800 µM e 6,25 µM. Do mesmo modo, preparou-se a solução de DPPH na concentração de 300 µM (120 µg/mL) que foi plaqueada em um volume de 150 µL em todos os poços que receberiam as substâncias testadas. Em seguida foram adicionados 50 µL das substâncias em suas diferentes concentrações. O poço utilizado como controle continha de 150 µL da solução de DPPH e 50 µL de etanol PA (solvente).

Após 30 minutos a placa de 96 poços foi lida por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, a 515 nm, sendo as leituras repetidas até total estabilização das absorbâncias.

A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{\text{CTng-amostra}}{\text{CTng}} \right) \times 100$$

Equação 2: Porcentagem de atividade antioxidante. CTng – Controle negativo (Fonte: SILVA et al., 2013)

Os resultados foram comparados com o percentual de atividade antioxidante da rutina encontrado na literatura.

4.4 ENSAIOS *IN VIVO*

4.4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas Balb/c provenientes do Centro da Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF). Eles foram mantidos em temperatura padrão (22°C), ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas e com comida e água à vontade. Cada grupo continha 4 animais. Todos os experimentos foram feitos de acordo com os princípios éticos de pesquisa animal adotado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - Protocolo nº 045/2016).

4.4.2 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÓLEO DE CRÓTON (TPA)

Este teste foi realizado de acordo com o método descrito por SCHIANTARELLI et al. (1982) e é um modelo de inflamação aguda que permite avaliar a ação anti-inflamatória dos compostos estudados. O processo inflamatório agudo foi induzido pela aplicação tópica única do óleo de cróton (2,5% v/v em 20 µL de acetona) na superfície interna da orelha direita dos camundongos. Os compostos (0,1 e 0,5 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) foram administrados imediatamente após a aplicação do óleo de cróton por via tópica. À orelha esquerda foi aplicado somente o veículo acetona para ser utilizado como controle negativo. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados e pesados individualmente utilizando uma balança analítica. A diferença de peso entre a orelha direita inflamada e a orelha esquerda não inflamada de cada camundongo indicou a intensidade do edema.

Os círculos de 6mm obtidos da orelha direita foram seccionados ao meio com o auxílio de uma tesoura e armazenados a -80°C para, posteriormente, serem utilizados na determinação dos níveis das citocinas IL-6 e IL-1 β e da quimiocina

CCL2, na avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e na realização da análise histológica.

4.4.3 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6 E IL-1 β E DA QUIMIOCINA CCL2

A metade das orelhas direitas obtidas anteriormente foram homogeneizadas em 400 μ L de tampão de extração de citocinas de tecidos (NaCl 2.34%, Tween 20 0.05%, BSA 0.5%, PMSF 0.0017%, Cloreto de Benzetônio 0.00448%, EDTA 0.0372%, Aprotinina 0.002% em água destilada) e centrifugadas a 3000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação dos níveis das citocinas e da quimiocina pelo método de ELISA do tipo sanduíche, de acordo com o protocolo do fabricante (B&D Pharmingen, San Diego, CA, USA).

A leitura da absorbância foi feita a 450 nm por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível e as concentrações das amostras foram calculadas a partir de uma curva padrão, na qual foi utilizada proteína recombinante purificada específica de cada teste. Os valores foram expressos em pg/mL e comparados com o controle inflamado e não tratado (CTe).

4.4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MPO

Os pellets/precipitados resultantes da centrifugação anterior foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática da MPO. Para isso, eles foram ressuspensos em solução salina 0,2% gelada e homogeneizados. Após 15 segundos, foi adicionada uma segunda solução salina (NaCl 1,6% e glicose 5%) e eles foram novamente homogeneizados e, desta vez, centrifugados a 3000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 75 μ L de solução de HTAB 0,5%. Em seguida, a solução preparada anteriormente foi submetida ao congelamento com nitrogênio e descongelamento em temperatura ambiente por 3 vezes consecutivas e centrifugadas a 14000 RPM durante 15

minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram plaqueados em placas de 96 poços de fundo chato e, a eles, foi adicionada uma solução tampão citrato (citrato 0,1M; H₂O₂ 0,04%; OPD 0,04%) na mesma proporção. Após 15 minutos, a absorbância foi determinada por espectrofotometria de absorção molecular na região do visível, a 490 nm e os resultados foram expressos em unidade de densidade ótica e comparados com o controle inflamado e não tratado (CTi).

4.4.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após serem fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas, os fragmentos das orelhas foram armazenados em álcool 70% até o início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, blocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos e edema foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 100 e 400x.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 5.00, utilizando-se o teste não-paramétrico ANOVA seguido do pós-teste Dunnet para os ensaios *in vitro* e pós-teste Newman-Keuls para os ensaios *in vivo*. O nível de significância adotado foi de 5% (P<0,05).

5 RESULTADOS

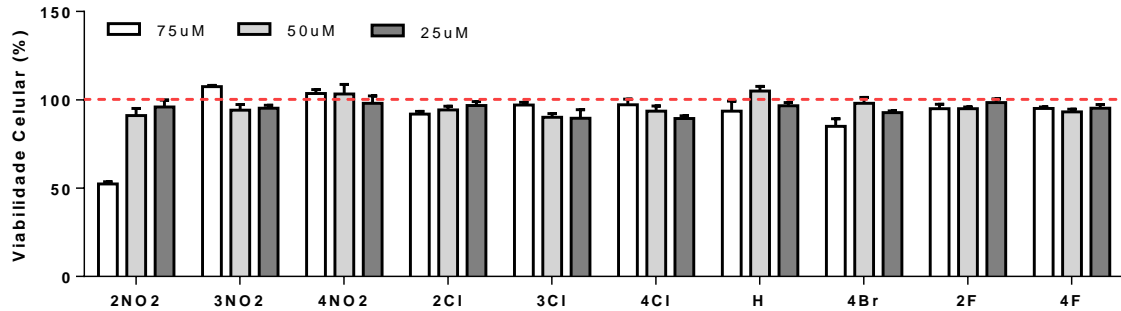
5.1 INFLAMAÇÃO

5.1.1 RESULTADOS *IN VITRO*

5.1.1.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS RAW 264.7 E CÉLULAS J774A.1 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

Para a determinação da viabilidade dos adutos de MBH, células RAW 264.7 e células J774A.1 foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações dos adutos (75, 50, 25uM). A viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT após 48 horas de tratamento para as células RAW 264.7 e 24h para as células J774A.1.

RAW 264.7



J774 A.1

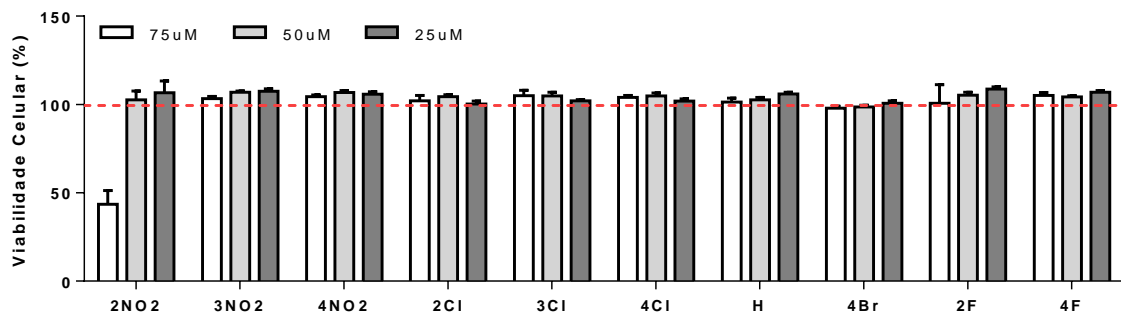


Figura 12: Avaliação da viabilidade de células RAW 264.7 e J774 A.1 após tratamento com adutos de MBH. Células RAW 264.7 e J774A.1 (1×10^5 células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações dos adutos de MBH (75, 50, 25uM) durante 48 e 24 horas, respectivamente. Após este tempo, o percentual de sobrevivência foi determinado através do método colorimétrico de MTT, considerando-se a Equação 1 para obter a viabilidade celular. O DMSO, utilizado em uma concentração $< 0,2\%$ (não demonstrado) não apresentou diferença estatística (Fonte: do autor).

Considerando-se aceitável uma taxa de sobrevivência de 70% ou superior (ISO 10993-5:2009), apenas o composto 2NO₂ se mostrou citotóxico na concentração de 75uM para ambas as células estudadas. Os outros compostos não apresentaram influência significativa na viabilidade celular em nenhuma concentração avaliada (Figura 12).

5.1.1.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

Conforme previamente comentado, o NO é um radical livre de curta duração, que participa de muitos processos fisiológicos, em especial os processos inflamatórios (NAGY et al., 2007). Já foi demonstrado que níveis elevados de NO

estão relacionados a diversas patologias, tais como esclerose múltipla, doença de Parkinson, Alzheimer (DUNCAN e HEALES, 2005) e até no câncer (XU et al., 2002).

Assim, para determinar se os adutos de MBH são capazes de atuar sobre processos inflamatórios, foi avaliada a produção de NO por células RAW 264.7 estimuladas com LPS e IFN- γ e, em seguida, tratadas com os referidos compostos.

Conforme demonstrado na Figura 13, todos os compostos foram capazes de reduzir significativamente a concentração de NO em todas as concentrações avaliadas. Essa redução se mostrou bastante efetiva nas maiores concentrações chegando a níveis basais em alguns casos.

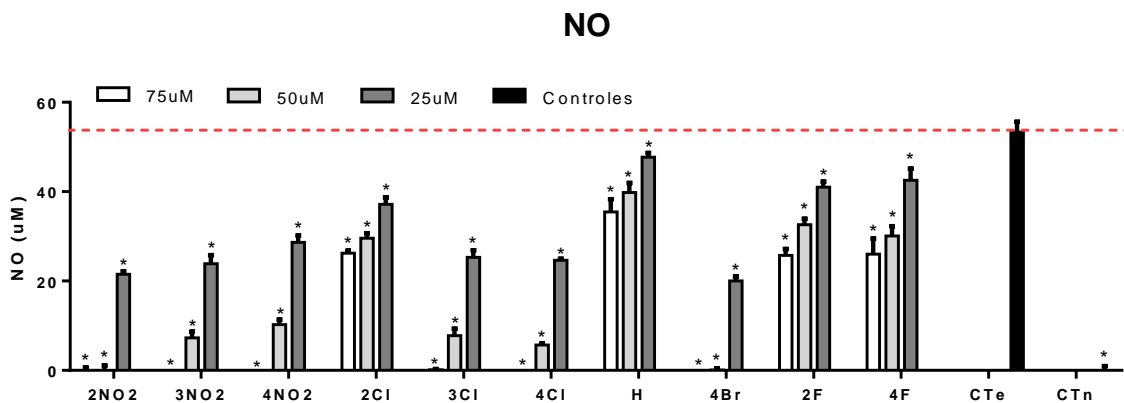


Figura 13: Avaliação da produção de NO por células RAW 264.7 tratadas com os adutos de MBH. Células RAW 264.7 (1×10^5 células/poço) foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL) e IFN- γ (20 U/mL) e, após 1 hora de estímulo, tratadas com os adutos de MBH (75, 50 e 25 μ M). Após 48 horas de cultivo, os níveis de nitrito foram avaliados no sobrenadante das culturas pelo método colorimétrico de Griess. Células tratadas somente com DMSO (<0,2%) não demonstraram diferença estatística com os controles. CTe controle estimulado e não tratado; CTn controle não estimulado e não tratado. (*) $P < 0,05$ em relação ao grupo CTe (Fonte: do autor).

5.1.1.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- α POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que desempenha um papel essencial nos mecanismos de defesa do hospedeiro e apresenta propriedades pró-inflamatórias multifuncionais (TRACEY et al., 2008; SFIKAKIS e TSOKOS, 2011; KOLLIAS et al., 1999; CAMINERO et al., 2011). Dentre elas estão o aumento da síntese de moléculas de adesão endotelial, ativação de neutrófilos, aumento da atividade microbicida dos fagócitos, indução da produção de outras citocinas, como

IL-1 e IL-6 (LOCKSLEY et al., 2001; RIBEIRO-SOBRINHO et al., 2005; HANADA E YOSHIMURA, 2002). Além disso, o TNF- α é capaz de induzir a expressão de iNOS em macrófagos, aumentando ainda mais o processo inflamatório (CUNHA et al., 1993).

Neste contexto, visto que o TNF- α apresenta grande importância no processo inflamatório, a influência dos compostos também foi determinada sobre a produção desta citocina.

Conforme observado na Figura 14, os compostos 2NO₂, 4NO₂, 2Cl, 3Cl e 4Br foram capazes de reduzir significativamente a concentração de TNF- α em suas maiores concentrações (75uM), sendo que os compostos 2NO₂ e 3Cl também foram capazes de promover esta redução nas duas menores concentrações testadas (50uM e 25uM). Merece destaque o composto 3Cl por ter sido capaz de reduzir os níveis desta citocina em todas as concentrações e por não apresentar citotoxicidade em nenhuma delas.

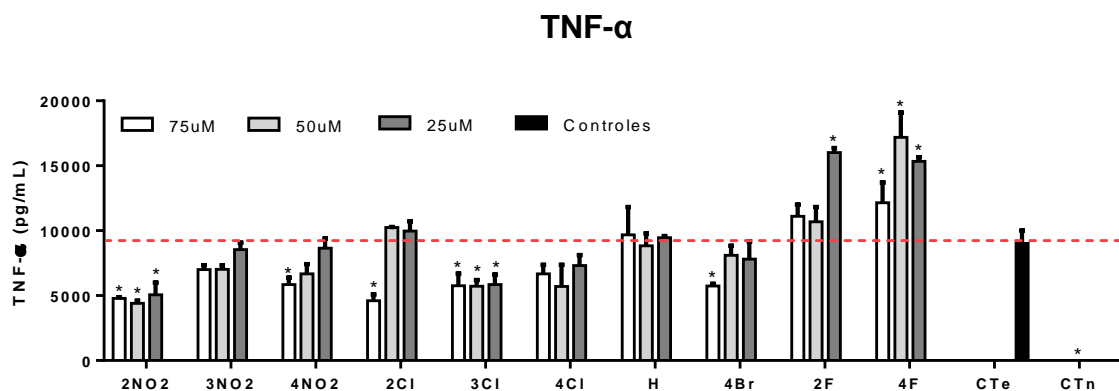


Figura 14: Avaliação da produção de TNF- α por células RAW 264.7 tratadas com os adutos de MBH. Células RAW 264.7 (1×10^5 células/poço) foram estimuladas com LPS (1ug/mL) e, após 1 hora de estímulo, tratadas com os adutos de MBH (75, 50 e 25uM). Após 48 horas de incubação, a produção de TNF- α foi determinada no sobrenadante das culturas pelo método de Elisa. CTe controle estimulado e não tratado; CTn controle não estimulado e não tratado. (*) $P < 0,05$ em relação ao grupo CTe (Fonte: do autor).

5.1.1.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-1 β POR CÉLULAS J774A.1 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

A IL-1 β é outra potente citocina pró-inflamatória que, assim como o TNF- α , é derivada predominantemente de macrófagos. Ela é capaz de ativar neutrófilos, induzir a regulação positiva de moléculas de adesão em leucócitos (OKUSAWA et al., 1988), além de induzir a produção de proteínas de fase aguda no fígado (VOLTARELLI, 1994) e ativar a produção de outras citocinas, incluindo IL-6 e IL-8 e TNF- α (RAMNATH et al., 2006).

A IL-1 β é produzida em sua forma inativa (pró-IL1 β) após a ativação das células através do reconhecimento de PAMPs ou DAMPs por receptores tais como os TLRs ou NLRs (DINARELLO, 2009). Os NLRs uma vez ativados, recrutam caspase-1 via proteína adaptadora ASC, originando um complexo multiproteico, denominado inflamassoma, que possui finalidade de ativar caspase-1, a qual, após sofrer clivagem, induz a secreção da citocina pró-IL-1 β em sua forma biologicamente ativa (IL-1 β) (CARVALHO e ARRUDA, 2016).

Neste contexto, PELLEGRIN et al. (2008) demonstraram que as células RAW 264.7 são deficientes na proteína ASC e, devido a isso, não são capazes de processar a pró-IL-1 β em IL-1 β . Devido a isso, para avaliar a ação dos adutos de MBH sobre a produção de IL-1 β , foram utilizadas células J774A.1 que, segundo este mesmo autor, é capaz de produzi-la de maneira adequada em sua forma ativa.

Os resultados demonstraram que o tratamento com os compostos também foi bastante efetivo em reduzir a produção de IL-1 β em todas as concentrações avaliadas (Figura 15). Além disso, foi percebido que o solvente DMSO também reduziu significativamente a produção desta citocina em relação ao controle estimulado e não tratado (CTe). Essa redução na produção de IL-1 β induzida pelo DMSO pode ser explicada devido a sua pequena atividade anti-inflamatória, já relatada anteriormente na literatura (SMITH et al., 1998). Sendo assim, para excluir a ação do DMSO, os resultados dos compostos também foram comparados ao resultado obtido com o DMSO. Em concordância, a redução da produção de IL-1 β induzida pelos compostos foi superior àquela induzida pelo DMSO.

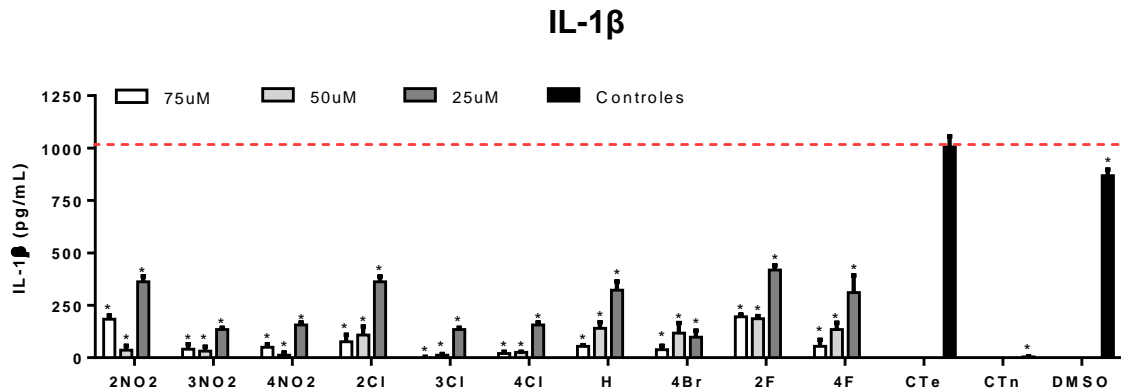


Figura 15: Avaliação da produção de IL-1 β por células J774A.1 tratadas com adutos de MBH. Células J774 A.1 (1×10^5 células/poço) foram estimuladas com LPS (1ug/mL) e, após 1 hora de estímulo, tratadas com os adutos de MBH (75, 50 e 25 μ M). Após 24 horas de incubação, a produção de IL-1 β foi determinada no sobrenadante das culturas pelo método de Elisa. CTe controle estimulado e não tratado; CTn controle não estimulado e não tratado. (*) $P < 0,05$ em relação as células tratadas com DMSO (<0,2%) (Fonte: do autor).

5.1.1.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-6 POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

Outra citocina pró-inflamatória importante é a IL-6. Esta molécula é produzida por diversos tipos celulares (em especial por monócitos/macrófagos) em resposta a estimulação por LPS, IL-1 β e TNF- α (VARELLA e FORTE, 2001). Além disso a IL-6 é um dos mais precoces e importantes indutores da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, estando ainda envolvida na indução de febre, entre outras (OLIVEIRA et al., 2011).

Devido a sua grande importância no processo inflamatório, a produção de IL-6 também foi avaliada nos sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com os adutos de MBH.

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que todos os compostos foram eficazes em reduzir os níveis de IL-6 em pelo menos uma das concentrações avaliadas (75 μ M). Merecem destaque ainda os compostos 2NO₂, 4NO₂, 4Cl, H e 4Br por terem sido eficazes em todas as concentrações. Além disso, levando-se em conta somente a menor concentração (25 μ M), os compostos 2NO₂ e 4Br foram os que mais reduziram os níveis desta citocina sugerindo que estes compostos sejam os mais eficientes no controle do processo inflamatório.

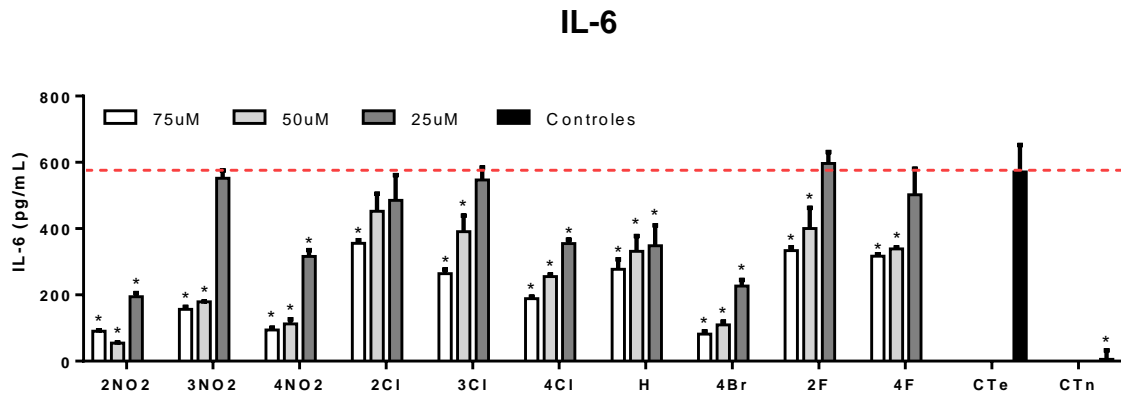


Figura 16: Avaliação da produção de IL-6 por células RAW 264.7 tratadas com adutos de MBH. Células RAW 264.7 (1×10^5 células/poço) foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL) e, após 1 hora de estímulo, tratadas com os adutos de MBH (75, 50 e 25 μ M). Após 48 horas de incubação, a produção de IL-6 foi determinada no sobrenadante das culturas pelo método de Elisa. CTe controle estimulado e não tratado; CTn controle não estimulado e não tratado. (*) $P < 0,05$ em relação ao grupo CTe (Fonte: do autor).

5.1.1.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CCL2 POR CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

A CCL2 é uma quimiocina que está envolvida em diversas funções relacionadas ao processo inflamatório. Dentre elas é importante ressaltar a regulação do recrutamento de monócitos/macrófagos para os sítios de inflamação, promoção da produção de EROs e indução da expressão de genes pró-inflamatórios em monócitos (CHARO e TAUBMAN, 2004).

Assim, uma vez que os compostos MBH tem apresentado características anti-inflamatórias, avaliamos sua influência também na produção desta quimiocina.

Condizente com o ocorrido em relação as citocinas, os adutos MBH também foram efetivos em reduzir a produção de CCL2 em pelo menos uma das concentrações avaliadas, com exceção dos adutos H e 2F, que não afetaram significativamente a produção desta quimiocina e 2Cl, que apresentou um aumento significativo na produção deste mediador. (Figura 17). Mais uma vez o composto 4Br se destacou visto que foi efetivo em reduzir a produção desta quimiocina nas três concentrações avaliadas.

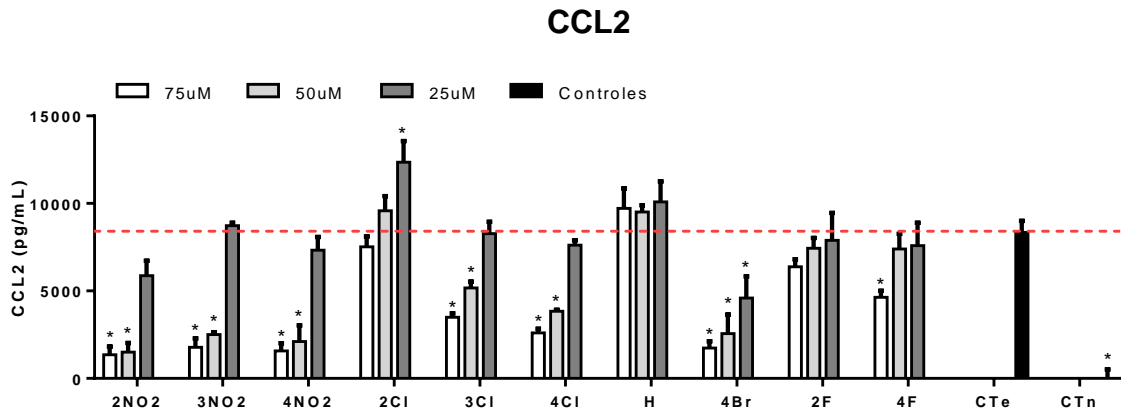


Figura 17: Avaliação da produção de CCL2 por células RAW 264.7 tratadas com adutos de MBH. Células RAW 264.7 (1×10^5 células/poço) foram estimuladas com LPS (1ug/mL) e, após 1 hora de estímulo, tratadas com os adutos de MBH (75, 50 e 25uM). Após 48 horas de incubação, a produção de CCL2 foi determinada no sobrenadante das culturas pelo método de Elisa. CTe controle estimulado e não tratado; CTn controle não estimulado e não tratado. (*) $P < 0,05$ em relação ao grupo CTe (Fonte: do autor).

5.1.1.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS CD80, CD86 E CD40, EM CÉLULAS RAW 264.7

As moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, expressas principalmente na superfície das células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), tais como os macrófagos, possuem participação fundamental na ativação da resposta imune e na manutenção da tolerância imunológica, motivo pelo qual são consideradas alvos terapêuticos promissores (MIGLIORI, 2010). Essas moléculas promovem o segundo sinal necessário à ativação e proliferação dos linfócitos T por meio da ligação ao receptor CD28, ou inibem a resposta por essas células por meio da ligação ao receptor CTLA-4, ambos expressos na superfície dos linfócitos (MIGLIORI, 2010). Já a ativação da molécula CD40 presente na superfície das APCs pode resultar na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α , assim como de quimiocinas e NO. Além disso, a ativação do CD40 potencializa a apresentação de antígenos por aumentar a expressão de CD80 e CD86 (OXER, 2008). Dessa forma, tanto CD40 quanto CD80 e CD86 estão intimamente envolvidos nas respostas inflamatórias e na ligação da imunidade inata e imunidade adquirida.

Visto que os compostos derivados da reação de MBH mostraram-se promissores na modulação da atividade inflamatória, sua ação sobre os co-estimuladores também foi determinada.

Os resultados apresentados nos gráficos da Figura 18 demonstram que o composto 4NO₂ foi efetivo em inibir a expressão de todos os marcadores avaliados. Também merecem destaque os compostos 2NO₂, 3NO₂ e 4Br por terem sido efetivos tanto em reduzir os níveis de CD80 quanto de CD40. Em relação a molécula CD86, somente os compostos 2NO₂ e 4NO₂ foram capazes de influenciar a expressão deste marcador, sendo que o primeiro, ao contrário do esperado, demonstrou aumento significativo na expressão de CD86. Estes resultados sugerem que alguns dos adutos de MBH podem ser capazes de influenciar tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida.

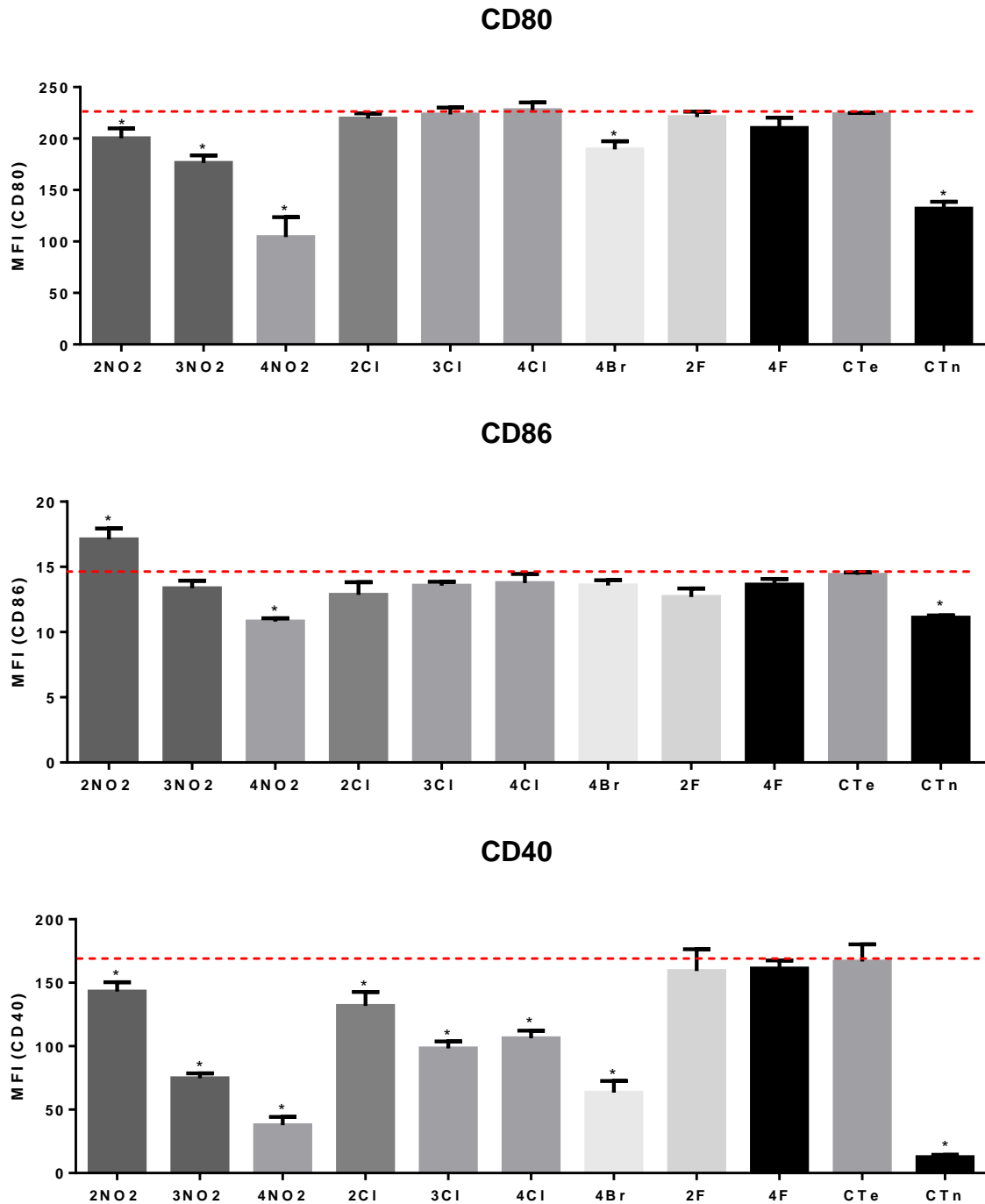


Figura 18: Avaliação da interferência na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 pelos adutos de MBH sobre células RAW 264.7. Células RAW 264.7 (5×10^5 /poço) foram estimuladas com LPS (1 μ g/mL) e IFN- γ (20 U/mL) e, após 1 hora de estímulo, tratadas com os adutos de MBH na maior concentração não citotóxica utilizada (50 μ M para o 2NO₂ e 75 μ M para os demais). A expressão de CD80, CD86 e CD40 foi determinada por citometria de fluxo após 24h. CTe controle estimulado e não tratado; CTn controle não estimulado e não tratado. (*) $P < 0,05$ em relação ao grupo CTe (Fonte: do autor).

5.1.2 RESULTADOS *IN VIVO*

5.1.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ADUTO 4BR EM MODELO DE EDEMA DE ORELHA MURINO INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON (TPA)

Visto que o aduto 4Br foi bastante efetivo na redução das citocinas pró-inflamatórias, em especial para a citocina IL-1 β , este composto foi selecionado para os testes *in vivo* em modelo de edema de orelha. Para isso, um processo inflamatório foi induzido na orelha de camundongos Balb/c utilizando óleo de cróton. Em seguida, esta orelha foi tratada topicamente com as concentrações dos adutos de 0,1 e 0,5 mg/orelha, conforme previamente reportado (PINTO et al., 2015). A intensidade do edema foi determinada após 4 horas através da diferença de peso entre a orelha controle e a orelha inflamada.

Os resultados demonstraram que, em animais não tratados, o óleo de cróton induziu a formação de um edema considerável, evidenciado pela grande diferença de peso entre as orelhas (cerca de 9 mg). Além disso, conforme esperado, o tratamento com Dexametasona reduziu em mais de 90% a diferença de peso entre as orelhas. De forma contraditória, na concentração de 0,1 mg/orelha, o composto 4Br não foi capaz de reduzir de forma significativa a intensidade do edema, que permaneceu semelhante ao grupo não tratado. Apesar disso, uma redução de aproximadamente 47% foi observada quando o tratamento foi realizado com a concentração de 0,5mg/orelha (Figura 19).

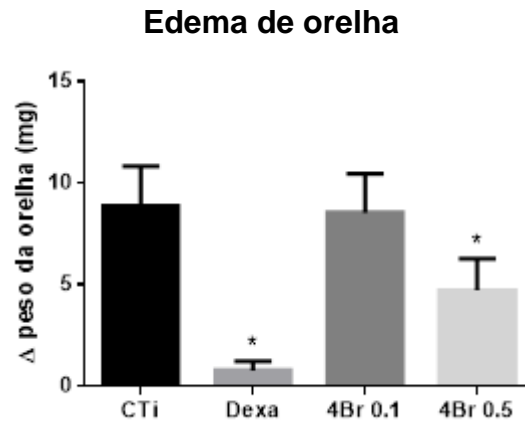


Figura 19: Edema de orelha induzido por óleo de cróton. O resultado está representado pelas médias das diferenças dos pesos das orelhas com inflamação induzida em comparação às orelhas não inflamadas dos animais tratados com o fármaco anti-inflamatório dexametasona (Dexa) e diferentes doses do aduto de MBH 4Br. CTi: controle inflamado e não tratado; Dexa: dexametasona. (*) $P < 0,05$ (Fonte: do autor)

Em conformidade com a redução do edema, a análise histológica do tecido auricular revelou um intenso infiltrado inflamatório em animais não tratados. Este infiltrado foi visivelmente reduzido após a realização do tratamento com Dexametasona. Uma redução do infiltrado também foi observada no tecido oriundo de animais tratados com o composto 4Br (0,5 mg/orelha) confirmando os resultados descritos acima (Figura 20).

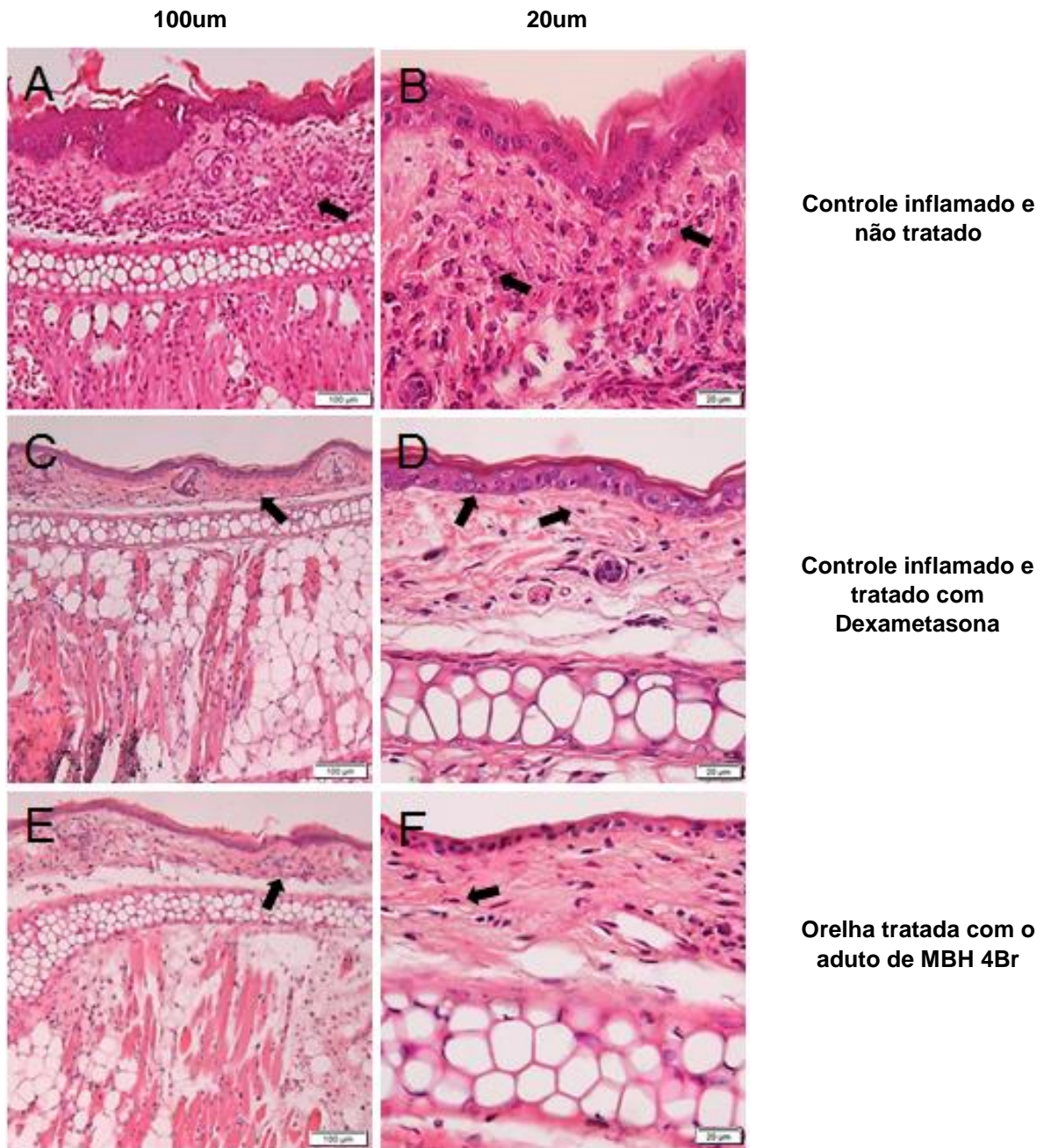


Figura 20: Análise histológica do efeito do aduto de MBH 4Br sobre o edema e infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido por TPA. Fotos representativas de cortes transversais de orelhas de camundongos coradas com hematoxilina-eosina (aumento de 100x e 400x, escala de 100 µm e 20 µm, respectivamente) coletadas 4 horas após a aplicação do TPA. (A) e (B) controle inflamado e não tratado, (C) e (D) controle inflamado e tratado com Dexametasona (0,1g/orelha), (E) e (F) animal tratado com o aduto de MBH 4Br (0,5 mg/orelha). As setas pretas indicam a presença de células inflamatórias no tecido (Fonte: do autor).

Após avaliado o edema, a orelha dos camundongos foi utilizada também para dosagem das citocinas IL-6 e IL-1 β e da quimiocina CCL2, devido a importante participação destes mediadores nos processos inflamatórios, conforme já comentado anteriormente. De acordo com a Figura 21, o tratamento com o

composto 4Br (0,5mg/orelha) não foi capaz de reduzir nenhum destes mediadores quando comparado ao controle não tratado.

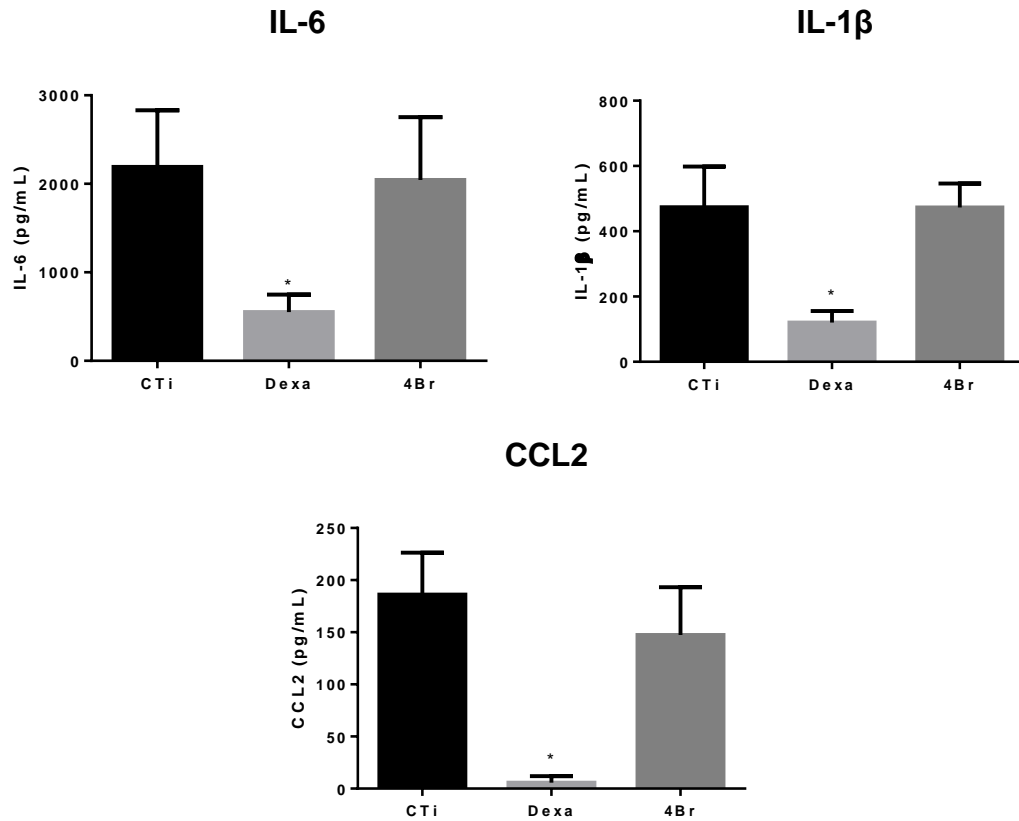


Figura 21: Avaliação da produção de IL-6, IL-1 β e CCL2 no sobrenadante das orelhas maceradas e tratadas com o aduto de MBH 4Br. As orelhas foram maceradas utilizando solução de extração de citocinas e centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. A concentração de citocinas e da quimiocina foi determinada através do método de Elisa e comparada com o controle inflamado e não tratado (CTi). Dexa: Dexametasona. (*) P<0,05 (Fonte: do autor)

Outro mediador inflamatório avaliado no tecido auricular inflamado foi a enzima Mieloperoxidase (MPO). Esta enzima, produzida principalmente por macrófagos e neutrófilos, corresponde, indiretamente, à intensidade da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (PAIVA, 2013).

Os resultados demonstraram que o tratamento com o aduto 4Br foi efetivo em reduzir a produção da enzima MPO. Esta redução se mostrou bastante proeminente, sendo semelhante a droga de referencia (dexametasona) (Figura 22).

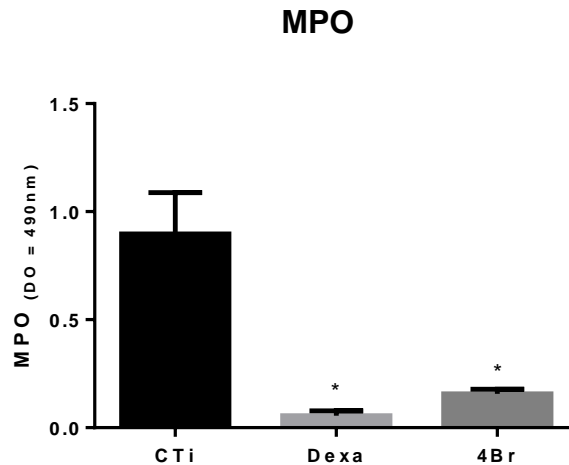


Figura 22: Quantificação de MPO presente na orelha dos camundongos em resposta ao tratamento com TPA. O ensaio foi realizado com o pellet do tecido macerado e a atividade enzimática da MPO foi quantificada por espectrofotometria molecular de absorção na região do visível (590 nm) e comparada com o controle inflamado e não tratado (CTi). Dexa: dexametasona. (*) $P < 0,05$ (Fonte: do autor)

5.2 CÂNCER

5.2.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS 4T1 (CARCINOMA MAMÁRIO MURINO) E B16 (MELANOMA) QUANDO TRATADAS COM OS ADUTOS DE MBH

O câncer de mama é a neoplasia sólida mais frequente em todo o mundo e a neoplasia maligna mais diagnosticada em mulheres desde os anos 90, acometendo as mais diversas faixas etárias (ZHU et al., 2011). Já o câncer de pele configura-se como o mais frequente em todas as populações e se apresenta basicamente sob duas formas: o melanoma e o não melanoma. Apesar de o melanoma apresentar incidência baixa, sua letalidade é elevada (3 mil casos novos em homens e 2.670 casos novos em mulheres são esperados para 2016), sendo o mais agressivo tipo de câncer de pele (INCA, 2016).

Neste contexto, o presente estudo também avaliou a atividade dos adutos de MBH em células de carcinoma mamário murino 4T1 e melanoma B16.

Como observado na Figura 23, os compostos 2NO₂, 4NO₂, 2Cl, 3Cl e 4Br foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade de ambas as células tumorais testadas, quando utilizados em suas maiores concentrações (75uM).

Na concentração de 50µM, os compostos 2NO₂ e 3Cl foram tóxicos para células 4T1 enquanto os compostos 2NO₂, 4NO₂, 2Cl, 3Cl e 4Br apresentaram toxicidade para as células B16. Somente o composto 2NO₂ foi capaz de matar células tumorais na concentração de 25uM enquanto o composto 4F não foi efetivo em nenhuma concentração.

Estes resultados demonstram que, além da atividade anti-inflamatória, os adutos de MBH avaliados neste estudo também possuem potencial antitumoral.

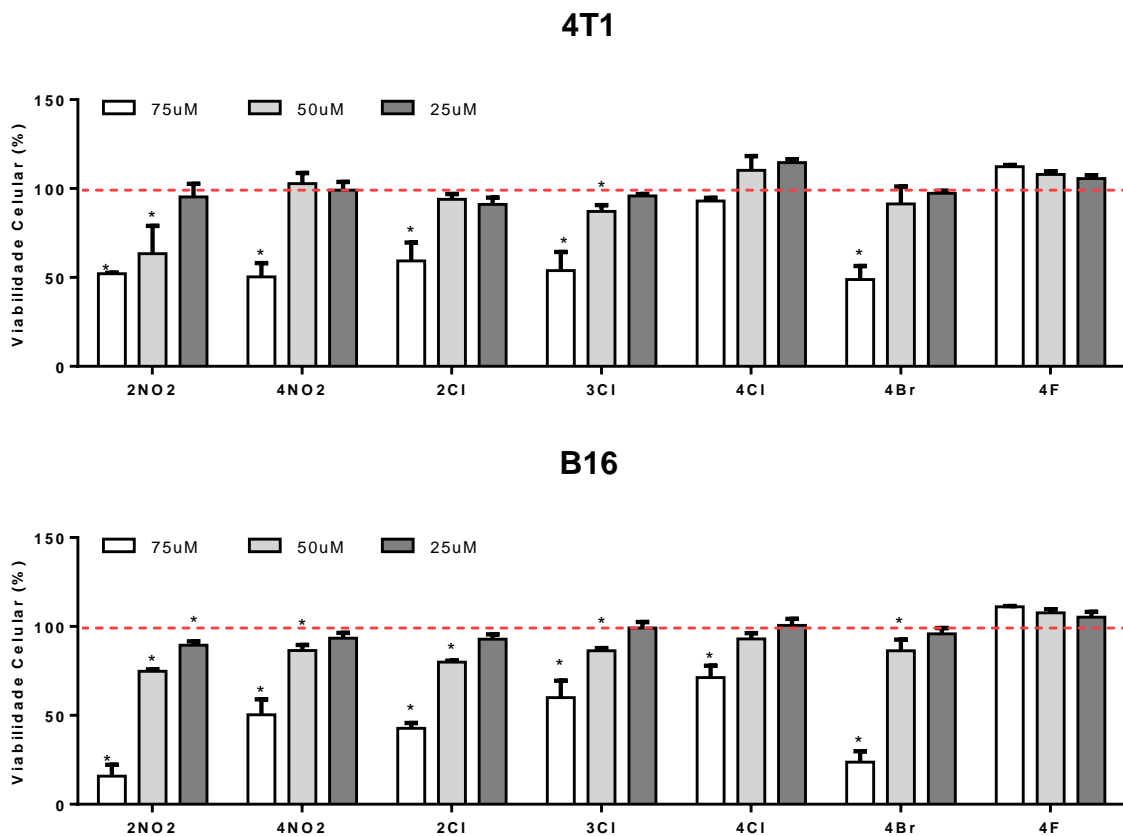


Figura 23: Avaliação da citotoxicidade dos adutos de MBH sobre células 4T1 e B16. Células 4T1 e B16 (1×10^4 células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações dos adutos de MBH (100, 50, 25uM) durante 48 horas. Após este tempo, o percentual de sobrevivência foi determinado através do método colorimétrico do MTT, considerando-se a Equação 1 para obter a viabilidade celular (%). O DMSO 0,3% (não demonstrado) não apresentou diferença estatística. (*) $p < 0,05$.

5.3 ENSAIO ANTIOXIDANTE

O stress oxidativo e a inflamação são dois dos fatores mais críticos implicados na carcinogênese e em outras doenças degenerativas (HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2009.). Além disso, diversos estudos têm evidenciado uma relação entre o aumento da atividade antioxidante e o potencial anti-inflamatório (FILIPPIN et al., 2008). Sendo assim, uma vez verificada a atividade anti-inflamatória e antitumoral dos adutos MBH, o próximo objetivo foi determinar se estas atividades estão relacionadas ao aumento do potencial antioxidante.

Conforme demonstrado na Tabela 2, nenhum dos adutos testados possui atividade antioxidante significativa, quando comparados ao padrão de rotina que, nas concentrações de 60 a 600uM apresenta percentual de atividade antioxidante maior que 95% (SILVA et al., 2013). Estes resultados sugerem que as atividades dos compostos MBH descritas previamente não se relacionam ao aumento do potencial antioxidante destes compostos

Tabela 2: Atividade antioxidante dos adutos de MBH expressa em percentual de atividade antioxidante (%), pelo método DPPH.

Compostos	2NO ₂	4NO ₂	2Cl	3Cl	4Cl	2Br	4Br	4F
Concentrações (uM)								
800	6,55	5,64	5,72	4,36	5,07	5,37	4,86	3,25
400	13,25	0,92	2,30	0,59	1,59	0,75	0,53	-0,65
200	6,92	0,95	1,99	0,40	0,77	-0,18	-0,05	-0,20
100	4,37	0,82	2,40	1,22	1,06	0,35	-0,52	-0,55
50	3,67	1,08	1,86	0,67	1,30	0,22	0,22	-0,44
25	3,33	0,19	2,01	-0,05	-0,36	1,09	0,01	0,09
12,5	3,46	0,19	2,37	0,32	1,09	1,41	0,56	0,72
6,25	4,81	1,18	3,44	1,54	1,19	1,51	2,33	0,51

Fonte: do autor

6 DISCUSSÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa ou resposta protetora do organismo contra uma injúria tecidual causada por agentes físicos, químicos e/ou provocadas por microrganismos (FLOWER e PERRETTI, 2005; NATHAN, 2002; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). No processo de inflamação, células competentes da resposta imunológica são ativadas e atuam no processo de inativação e/ou destruição dos microrganismos invasores, remoção de substâncias irritantes e antígenos proteicos, além de iniciar a reparação tecidual. Quando o agente causador é eliminado e o processo reparatório se completa, naturalmente os sinais de inflamação desaparecem (FLOWER e PERRETTI, 2005). Apesar disso, se a inflamação persistir por um longo período de tempo (inflamação crônica), ela pode se tornar patogênica, predispondo o hospedeiro a uma série de doenças (REUTER et al., 2010).

O tratamento medicamentoso das reações inflamatórias é feito primariamente através de AINEs e glicocorticoides (RIBEIRO et al., 2006; SAWYNOK, 2003), sendo que os AINEs estão entre os agentes anti-inflamatórios mais utilizados no mundo (HILÁRIO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). Conforme previamente comentado, atualmente existem mais de 50 AINEs no mercado, mas nenhum considerado ideal para controlar ou modificar os sinais e sintomas da inflamação. Além disso, podem apresentar efeitos indesejáveis significativos, como eventos gastrintestinais, insuficiência renal, eritema, urticária e toxicidade hepática, particularmente nos idosos (GADDI et al., 2004; HILÁRIO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2006). Sendo assim, a busca por novos fármacos que apresentem maior eficácia terapêutica e efeitos adversos reduzidos é extremamente necessária.

Neste contexto, este estudo avaliou a atividade anti-inflamatória de 10 novos adutos derivados da reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) *in vitro* em cultura de linhagens de macrófagos e *in vivo* em modelo experimental de edema de orelha induzido por óleo de cróton.

A reação de MBH tem despertado interesse, devido à sua fascinante potencialidade sintética e por ser considerada uma importante metodologia para a formação de ligação carbono-carbono. Essa metodologia conduz à formação de derivados acrílicos altamente funcionalizados, a partir de reagentes simples, baratos

e sob condições brandas. Ao mesmo tempo, esses compostos α -metileno- β -hidroxicarbonilados são utilizados como intermediários na síntese de outras substâncias com atividades biológicas importantes (FERREIRA, 2010). No caso das moléculas testadas no presente trabalho, optou-se por adicionar o anel aromático, pois ele é essencial para a sua atividade biológica devido a influência que esse grupo possui na hidrofobicidade (lipossolubilidade) dos fármacos. Já o acréscimo de substituintes a essa estrutura (NO_2 , Cl, Br e F) pode alterar a hidrofobicidade da molécula, que por sua vez, afeta a forma como ela atravessa as membranas das células (CABRAL, 2010) (Figura 10).

Além disso, os adutos de MBH possuem características que os inserem no contexto da “química verde” (LENARDÃO et al., 2003).

Primeiramente, a toxicidade dos 10 adutos resultantes da reação de MBH foi avaliada sobre diferentes linhagens de macrófagos. Na faixa de concentração testada (25 a 75 μM) somente o composto 2NO_2 em sua maior concentração apresentou influência sobre a viabilidade celular, sugerindo que, em geral, os adutos não demonstram toxicidade elevada. Sendo assim, estes compostos foram submetidos a análise de atividade anti-inflamatória através da dosagem da produção de diversos mediadores-chave da resposta inflamatória, dentre eles o NO, as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β e a quimiocina CCL2, além da expressão das moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 e CD86.

O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune. No entanto, devido a sua capacidade de lesar células normais, o descontrole na sua síntese está implicado na patogênese de diversas doenças, tais como a esclerose múltipla (ROY e PAHAN, 2013), diabetes do tipo 1 (FETTERMAN et al., 2016), doenças cardiovasculares (NATHAN, 1992), injúria neuronal, doenças cerebrais degenerativas (como Parkinson e Alzheimer) (RADI et al., 2014), indução de câncer (SCHMIDT & WALTER, 1994), entre outras.

Devido a isso, o controle farmacológico da produção de NO pode ser crucial no tratamento destas importantes enfermidades e, neste contexto, os compostos avaliados parecem ser promissores, uma vez que todos foram capazes de reduzir, consideravelmente, a produção deste mediador. Este resultado está de acordo com estudos prévios que já demonstraram a capacidade de adutos de MBH

em inibir completamente a produção de NO por células RAW 264.7 mesmo em baixas concentrações (2,5 μ M) (MARTINS, 2015).

O uso de inibidores de NO tem mostrado um efeito benéfico em várias patologias. Em modelo de artrite, a inibição de NO resulta em uma atenuação dos sinais clínicos e histológicos da doença (MOILANEN e VAPPATALO, 1995). Na glomerulonefrite, há uma diminuição da deposição de complexos imunes nos rins, levando a uma considerável melhora clínica (MOILANEN e VAPPATALO, 1995). No diabetes dependente de insulina (tipo 1), estudos demonstraram que a destruição de células pancreáticas beta é mediada pelo NO e as primeiras tentativas de inibir a iNOS foram animadoras (KRÖNCKE, 1997). Além disso, a redução de iNOS e conseqüentemente, de NO, foi promissora no tratamento do choque séptico (SZABÓ, 1995) e na rejeição de transplante renal (ALBRECHT, 2000).

Uma das principais respostas do sistema imune inato a infecções e danos teciduais é a secreção de citocinas, as quais são extremamente importantes nas respostas inflamatórias (ABBAS et al, 2015). Distúrbios no equilíbrio da produção e liberação destas citocinas têm papel significativo no desencadeamento e agravamento de diversas patologias (VARELLA e FORTE, 2001). Assim, no presente estudo, foi avaliada a influência dos compostos na produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , em decorrência de suas conhecidas importâncias fisiopatológicas (ZÍDEK et al., 2009).

A citocina IL-1 β apresenta importante função no processo inflamatório visto que promove o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da inflamação através da indução de moléculas de adesão em células endoteliais e através da indução da produção de outras citocinas. A IL-1 β também induz a produção de enzimas como a fosfolipase A2, COX2 e iNOS, levando a liberação dos mediadores inflamatórios PGE2 e NO, os quais contribuem para a resposta sistêmica. (GABAY et al., 2010). Em termos patológicos, esta citocina está envolvida em diversas patologias, como as doenças auto-inflamatórias (onde monócitos mutados liberam mais IL-1 β em comparação com células normais [DINARELLO e VAN DER MEER, 2013; DINARELLO, 2011b]), a Artrite Reumatoide, a gota, o Diabetes do tipo 2, o Mieloma Múltiplo, a Osteoartrite (DINARELLO, 2011a), a esclerose múltipla, a doença de Alzheimer, dentre outras (BRADDOCK E QUINN, 2004).

No presente estudo, a análise desta citocina demonstrou que os compostos são extremamente potentes em reduzir a produção de IL-1 β (figura 15),

inibindo completamente sua produção em alguns casos. Neste sentido, apesar da grande escassez de estudos que demonstrem atividade anti-inflamatória de adutos de MBH, estes resultados estão de acordo com dados encontrados por MARTINS (2015) que também demonstram redução de IL-1 β por adutos de MBH.

A proeminente redução de IL-1 β é bastante promissora, visto que o bloqueio na produção desta citocina já se mostrou benéfico em doenças, tais como diabetes tipo 2 (LARSEN, 2007), insuficiência cardíaca (VAN TASSELL et al., 2015; ABBATE, 2010), gota (SO et al., 2007), artrite reumatoide (CUNNANE et al., 2001), osteoartrite (CHEVALIER et al., 2009), entre outras.

Em relação a citocina IL-6, os compostos avaliados aqui também demonstraram importante capacidade em reduzir sua produção, confirmando mais uma vez seu perfil anti-inflamatório. Novamente, estes resultados estão de acordo com os estudos de MARTINS (2015) que também observou redução nos níveis de IL-6 por compostos derivados desta reação.

Considerando-se que níveis elevados de IL-6 estão relacionados a patogênese de diversos distúrbios, tais como artrite reumatoide (HIRANO et al., 1988), glomerulonefrite (HORII et al., 1989), sepse (HACK et al., 1989) e até no câncer (STRASSMANN et al., 1992), a redução desta citocina induzida pelos adutos sugere que estes compostos possuem potencial terapêutico no tratamento destas enfermidades.

A citocina TNF- α também é crucial no desenvolvimento de patologias de caráter inflamatório. De acordo com HASHIMOTO (2002); MUKHOPADHYAY et al. (2006); e LIN et al. (2008), níveis elevados de TNF- α estão associados ao estabelecimento e desenvolvimento de várias doenças, tais como artrite reumatoide, doença de Crohn, psoríase, Eritema Nodoso Leproso e Mieloma Múltiplo (HASHIMOTO, 2002; MUKHOPADHYAY et al., 2006; LIN et al., 2008), sendo assim, a influência dos adutos sobre a produção desta citocina também foi avaliada.

Diferente dos resultados encontrados por MARTINS (2015) no qual os adutos de MBH não apresentaram ação sobre a citocina TNF- α , no presente estudo, os compostos 2NO₂, 4NO₂, 3CL e 4Br, foram efetivos em reduzir a produção desta citocina em pelo menos uma concentração testada. Este resultado sugere que estes compostos possam apresentar maior efetividade na redução de reações inflamatórias e conseqüentemente em doenças relacionadas a inflamação.

Ao se ligar ao seu receptor, o TNF- α causa a translocação do NF- κ B que desempenha um papel crucial nas respostas inflamatórias através da regulação dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (como o próprio TNF- α , IL-1 e IL-6) moléculas de adesão, quimiocinas (como a CCL2), fatores de crescimento, entre outras. O TNF- α é também um forte indutor da geração de NO induzido pela enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (BAUD e KARIN, 2001). Assim, a redução de TNF- α encontrada no presente estudo poderia culminar com a redução de outros mediadores e assim, reduzir o processo inflamatório como um todo. Apesar disso, mais estudos são necessários a fim de esclarecer se a redução de NO, IL-1 e IL-6 induzida pelos compostos é resultado de uma ação direta sobre a via de produção (como, por exemplo, no NF- κ B e iNOS) ou indireta devido à redução da produção de TNF- α .

É importante ressaltar que, além dos efeitos diretos, a redução tanto nos níveis de TNF- α quanto nos níveis de IL-1 β poderia também influenciar os níveis da enzima COX2, uma vez que, conforme já relatado, sua síntese é ausente ou baixa em indivíduos saudáveis, mas é rapidamente aumentada pelas citocinas IL-1 β e TNF- α durante o processo inflamatório (PANG e KNOX, 1997).

Outro mediador de destaque no processo inflamatório é a quimiocina CCL2, também conhecida como MCP-1. Esta quimiocina é um potente quimioatraente ou ativador de monócitos para os locais da inflamação (ABBAS et al., 2015) e está envolvida na indução de várias doenças como a esclerose múltipla (TANUMA et al., 2006), doença inflamatória do intestino (SPOETTL et al., 2006), asma alérgica (LIN et al., 2008), artrite reumatoide (RANTAPAA-DAHLQVIST et al., 2007), aterosclerose (NAMIKI et al., 2002) e no câncer (CONTI e ROLLINS, 2004).

No presente trabalho, com exceção dos compostos 2Cl, H e 2F, todos os adutos foram capazes de reduzir significativamente a concentração desta quimiocina, demonstrando mais uma vez sua efetividade no controle da inflamação e, possivelmente, na patogênese das doenças mencionadas acima. Agentes que bloqueiam a atividade da MCP-1 podem limitar o excesso de tráfico de monócitos para os sítios inflamatórios, reduzindo assim a inflamação e poupando o tráfico basal de fagócitos, evitando assim a imunossupressão geral e o risco aumentado de infecções (DOWSON et al., 2003).

Alguns estudos já demonstraram que a IL-1 β e o TNF- α também são capazes de estimular a produção da quimiocina CCL2 em culturas de astrócitos de

rato. Além disso, também já foi mostrado que a via do NF- κ B é importante para a produção de CCL2 estimulada por citocinas (THOMPSON e VAN ELDIK, 2009). Sendo assim, é possível sugerir que a redução observada nos níveis de CCL2 pode ser, em parte, atribuída a redução nos níveis de TNF- α e IL-1 β também observados quando as células foram tratadas com os adutos de MBH.

De forma interessante, o tratamento com os adutos de MBH também demonstrou influência sobre a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40. Este resultado sugere uma ação destes compostos também na imunidade adquirida, visto que estas moléculas estão intimamente relacionadas à ativação de linfócitos, bem como a produção de citocinas, motivo pelo qual são consideradas alvos terapêuticos promissores (MIGLIORI, 2010).

Classicamente, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) expressos na superfície da APC interagem com o receptor CD28 que é constitutivamente expresso na superfície das células T (DAMLE et al., 1992; GROSS et al., 1992). O efeito global da ligação de CD28 é aumentar o nível de proliferação e produção de citocinas, promover a sobrevivência celular e aumentar a expressão do ligante de CD40 (CD40L) e moléculas de adesão necessárias para o tráfego celular (HARDING et al., 1992; NORTON et al., 1992; SEDER et al., 1994).

A interação entre a molécula CD40 com seu ligante desencadeia respostas específicas dependendo da célula que o expressa, sendo comum exibirem a capacidade de ativar uma sinalização pró-inflamatória (VAN KOOTEN e BANCHEREAU, 2000). Assim, em linfócitos B a ligação CD40/CD40L promove diretamente a diferenciação, proliferação e mudança (“switching”) na classe de imunoglobulina produzida (XU e SONG, 2004; BISHOP e HOSTAGER, 2001). Em células apresentadoras de antígenos, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α), expressão de quimiocinas, metaloproteinases de matriz extracelular, óxido nítrico sintase, ciclooxygenase, além de aumentar a expressão dos co-estimuladores CD-80 e CD86 (SCHONBECK e LIBBY, 2001).

Tanto as moléculas CD80/CD86 quanto o CD40 representam alvos terapêuticos para a inibição da ativação de linfócitos auto reativos e seu bloqueio já vem apresentando sucesso na redução de doenças autoimunes como a esclerose múltipla e diabetes tipo 1 (PODOJIL e MILLER, 2009). Assim, a redução de

moléculas co-estimuladoras encontradas aqui sugere que estes compostos poderiam ter algum efeito na terapia contra doenças autoimunes.

Em termos estruturais, é possível verificar que a adição de grupamentos cloreto, nitro, flúor e bromo aos compostos parece aumentar sua atividade anti-inflamatória, uma vez que o composto H, na maioria dos ensaios realizados, foi o menos eficaz. Além disso, analisando especificamente a ação dos adutos sobre as moléculas co-estimuladoras, foi possível observar que a mudança de posição do grupamento nitro na molécula parece estar relacionada aos seus efeitos, uma vez que o composto 4NO₂ foi o mais eficaz, seguido pelo 3NO₂ e, por fim, pelo 2NO₂.

Uma vez que os adutos de MBH foram eficazes nos testes anti-inflamatórios *in vitro*, o composto 4Br foi selecionado para os testes *in vivo* visto que ele foi bastante efetivo na redução de NO, IL-1, IL-6 e CCL-2, sendo ainda capaz de reduzir a produção de TNF- α .

O modelo utilizado para avaliar o potencial anti-inflamatório *in vivo* foi o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Este agente flogístico apresenta ação tópica e induz uma inflamação local. Isto é resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de células PMN e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS et al., 1994; FURSTENBERGER et al., 1983).

O modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton consiste num modelo útil para a triagem da atividade anti-inflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GÁBOR, 2000).

O acetato de tetradecainol-forbol (TPA) é um dos principais ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, que por sua vez é uma mistura de lipídios extraídos da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae). Ele exerce seu efeito a partir da ativação da PKC, bem como da ativação sequencial da via da MAP quinase (MAPK), PLA2, indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular. (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). Além disso, a ativação da via da MAPK promove a ativação de alguns fatores de transcrição, como o NF-kB, o qual têm um papel central na regulação de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-

α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (PASCUAL e GLASS, 2006; GLASS e OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ e MORENO, 1999).

Condizente com a redução da produção dos mediadores inflamatórios *in vitro*, o composto 4Br também foi efetivo em conter o edema induzido pelo óleo de cróton, embora somente em sua maior concentração. Estes resultados ficaram ainda mais consistentes com a visível redução no infiltrado inflamatório no tecido observado nas análises histológicas após o tratamento com o 4Br, confirmando assim o potencial anti-inflamatório do composto. Apesar disso, de forma contraditória, o tratamento com 4Br não foi capaz de alterar os níveis de IL-1 β , IL-6 e CCL2 no tecido inflamado. Uma possível justificativa para este fato é de que as concentrações testadas *in vivo* não foram suficientes a ponto de inibir a produção destes mediadores. Assim, novos ensaios utilizando diferentes concentrações dos compostos serão realizados a fim de averiguar essa proposição.

É importante comentar que, como o óleo de cróton é capaz de ativar diversas vias relacionadas a inflamação, a redução do edema induzida pelo 4Br desassociada da redução das citocinas, sugere que o aduto seja capaz de atuar também em outras vias do processo inflamatório que não foram contempladas aqui. Novos estudos serão conduzidos para elucidar esta hipótese.

O acúmulo de neutrófilos é uma característica importante de diversas doenças inflamatórias cutâneas, sendo que a estimativa da quantidade dessas células no tecido inflamado pode ser útil como indicativo da severidade do processo inflamatório, ou ainda pode servir para verificar o efeito de novas ferramentas capazes de alterar o processo inflamatório ou alterar a migração dessas para a pele (BRADLEY et al., 1982). Uma vez nos tecidos, os neutrófilos sofrem um processo de degranulação com a liberação da enzima MPO, que faz parte de um eficiente e importante sistema com ação antimicrobiana presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos (WINTERBOURN et al., 1992; SEPE e CLARK, 1985).

A MPO também exerce efeitos diretos sobre as células endoteliais, induzindo uma produção intracelular de substâncias oxidantes por estas células. Esse efeito pode contribuir para o aumento do dano tecidual em focos inflamatórios. Assim, a MPO vem sendo associada a diversas condições patológicas, especialmente aquelas onde existe um processo inflamatório mediado por

neutrófilos, como artrite reumatoide, asma e o câncer (ARATANI et al., 1999; GUILPAIN et al., 2008).

Conforme mostrado na figura 22, o tratamento com o composto 4Br foi bastante efetivo na inibição da enzima MPO, de maneira semelhante a dexametasona. Os dados encontrados na histologia também confirmam a redução de MPO, uma vez que é possível verificar uma menor infiltração leucocitária nos tecidos tratados com a dexametasona e também com o aduto de MBH 4Br.

Já é bem estabelecido que o nível de atividade da MPO é diretamente proporcional a concentração de neutrófilos no tecido inflamado, sendo a medida da atividade da enzima considerada um sensível marcador quantitativo da quimiotaxia e da infiltração de neutrófilos no processo inflamatório (GARRIDO et al., 2004). Neste contexto, é possível inferir que a menor produção de MPO induzida pelo 4Br seja resultado da menor migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, conforme foi verificado nas análises histológicas. Esta redução na migração de neutrófilos e consequentemente na atividade de MPO pode resultar em um menor dano tecidual causado por enzimas hidrolíticas e também por algumas espécies oxidativas (GARRIDO et al., 2004)

Em relação ao câncer, esta é uma doença extremamente complexa e que apresenta um grande impacto na população mundial (INCA, 2016). Assim como ocorre para as doenças inflamatórias, as formas de tratamento para o câncer existentes atualmente são insatisfatórias, apresentando diversos efeitos colaterais e não garantindo a cura (MILLER et al., 2016). Assim é iminente a necessidade de novas abordagens terapêuticas que sejam mais efetivas e com o mínimo impacto negativo. Neste contexto, a ação antitumoral dos compostos MBH também foi determinada, utilizando duas linhagens tumorais, 4T1 e B16.

Os resultados demonstraram que, dentre os adutos de MBH testados, com exceção do 4F e do 4Cl, todos os compostos foram capazes de inibir a sobrevivência de ambas as linhagens tumorais estudadas, de maneira significativa. Além disso, conforme demonstrado na figura 23, somente o composto 2NO₂ diminuiu a viabilidade de células não tumorais, sugerindo que os adutos possuam algum tipo de seletividade para células tumorais. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, demonstrados em uma revisão feita por LIMA-JÚNIOR e VASCONCELLOS (2012), que descrevem a atividade antiproliferativa de adutos de MBH contra oito linhagens celulares de câncer humano (UACC62, MCF7, NCIADR,

786-0, NCI460, PC-03, OVCAR e HT29). Outros estudos serão realizados para determinar a forma de atuação dos adutos sobre as células tumorais.

Por fim, uma vez que a atividade anti-inflamatória e antitumoral tem sido diretamente associada a ação antioxidante (SILVA e JASIULIONIS, 2014), esta também foi verificada no presente estudo. No entanto, apesar de os compostos apresentarem proeminente perfil anti-inflamatório frente a diversos mediadores importantes além de atuar inibindo a sobrevivência de células tumorais, eles não apresentaram atividade antioxidante significativa, conforme demonstrado na Tabela 2. Estes resultados sugerem que os mecanismos anti-inflamatórios e antitumorais desencadeados pelos adutos são independentes do potencial antioxidante.

7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta Dissertação de Mestrado permitem concluir que os adutos de MBH testados apresentam baixa toxicidade e grande potencial anti-inflamatório, sendo capazes de reduzir os mais diversos mediadores relacionados a inflamação. Além disso, os compostos também apresentam bom potencial antitumoral reduzindo a viabilidade celular de duas importantes linhagens tumorais. Todas estas ações são independentes da atividade antioxidante.

Estes achados servem de base para a realização de novos estudos envolvendo estes compostos e sugerem uma possível aplicabilidade destes adutos em novas estratégias de combate a doenças inflamatórias ou na terapia contra o câncer.

8 PERSPECTIVAS

- Determinar a influência dos adutos na produção de outras citocinas inflamatórias, como a IL-12 e anti-inflamatórias, como a IL-10;
- Avaliar a ação dos adutos na proliferação de linfócitos;
- Verificar a ação dos adutos de MBH sobre os marcadores necrose/apoptose nas células tumorais testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução da 8ª edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2015.
- ABBATE, A.; KONTOS, M. C.; GRIZZARD, J. D.; BIONDI-ZOCCAI, G. G.; VAN TASSELL, B. W.; ROBATI, R.; ROACH, L. M.; ARENA, R. A.; ROBERTS, C. S.; VARMA, A.; GELWIX, C. C.; SALLOUM, F. N.; HASTILLO, A.; DINARELLO, C. A.; VETROVEC, G. W. Interleukin-1 blockade with anakinra to prevent adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology*, v. 105, n. 10, p. 1371-1377, 2010.
- ALBRECHT, E. W. J. A.; VAN GOOR, H.; TIEBOSCH, A. T. M. G.; MOSHAGE, H.; TEGZESS, A. M.; STEGEMAN, C. A. Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation*, v. 70, n. 11, p. 1610-6, 2000.
- AMARANTE, G. W.; REZENDE, P.; CAVALLARO, M.; COELHO, F. Acyloins from Morita–Baylis–Hillman adducts: an alternative approach to the racemic total synthesis of bupropion. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 23, p. 3744-3748, 2008.
- AMARANTE, G. W.; MILAGRE, H. M. S.; VAZ, B. G.; FERREIRA, B. R. V.; EBERLIN, M. N.; COELHO, F. Dualistic Nature of the Mechanism of the Morita–Baylis–Hillman Reaction Probed by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Organical Chemistry*, v. 74, p. 3031–3037, 2009.
- AMARANTE, G. W.; CAVALLARO, M.; COELHO, F. Highly diastereoselective total synthesis of the anti-tumoral agent (\pm)-Spisulosine (ES285) from a Morita–Baylis–Hillman adduct. *Tetrahedron Letters*, v. 51, n. 19, p. 2597-2599, 2010.
- ANSELMINI, A.; ABBATE, A.; GIROLA, F.; NASSO, G.; BIONDI-ZOCCAI, G. G.; POSSATI, G.; GAUDINO, M. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *European Journal Cardio-Thoracic Surgery*, v. 25, n. 3, p. 304-311, 2004.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 491, 2014.
- ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infection and Immunity*, v. 67, p. 1828- 1836, 1999.
- ARZUMANYAN, A.; REIS, H. M.; FEITELSON, M. A. Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 2, p. 123-135, 2013.
- ASANUMA, M.; NISHIBAYASHI-ASANUMA, S.; MIYAZAKI, I.; KOHNO, M.; OGAWA N. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct

scavenging of nitric oxide radicals. *Journal of Neurochemistry*, v.76, n. 6, p. 1895-1904, 2001.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 43, p. 385-406, 2011.

ASHWELL, J. D.; LU, F. W.; VACCHIO, M. S. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annual Review of Immunology*, v. 18, p. 309-45, 2000.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALKWILL, F. Chemokine biology in cancer. *Seminars in Immunology*, v. 15, n. 1, p. 49-55, 2003.

BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, v. 7, n. 3, p. 211-217, 2005.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet*, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.

BALKWILL, F.R., MANTOVANI, A. Cancer-related inflammation: Common themes and therapeutic opportunities. *Seminars in Cancer Biology*, v. 22, p.33-40, 2012.

BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clinica Chimica Acta*, v. 413, n. 15-16, p. 1163-1170, 2012.

BARBERA-GUILLEM, E.; NYHUS, J. K.; WOLFORD, C. C.; FRIECE, C. R.; SAMPSEL, J. W. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Research*, v. 62, n. 23, p. 7042-7049, 2002.

BARNA, B. P.; PETTAY, J.; BARNETT, G. H.; ZHOU, P.; IWASAKI, K.; ESTES, M. L. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *Journal of Neuroimmunology*, v. 50, n. 1, p. 101-107, 1994.

BASAVAI AH, D.; RAO, A. J.; SATYANARAYANA, T. Recent advances in the Baylis-Hillman reaction and applications. *Chemical Reviews*, v. 103, n. 3, p. 811-92, 2003.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, v. 11, n. 9, p. 372-7, 2001.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI A. M. O, GLICOCORTICÓIDES: USOS CLÁSSICOS E EMPREGO NO TRATAMENTO DO CÂNCER. *Infarma*, v.17, n. 7-9, p. 58-60, 2005.

BEN-SASSON, S. Z.; HU-LI, J.; QUIEL, J.; CAUCHETAUX, S.; RATNER, M.; SHAPIRA, I.; DINARELLO, C. A.; PAUL, W. E. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proceedings of National Academy of Sciences*, v. 106, n. 17, p. 7119-7124, 2009.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*, v. 320, n. 6063, p. 584-548, 1986.

BEUTLER, B. A. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *The Journal of Rheumatology*, v. 57, p. 16-21, 1999.

BISHOP, G. A.; HOSTAGER, B. S. Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunologic Research*, v. 24, n. 2, p. 97-109, 2001.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, v. 11, n. 10, p. 889-896, 2010.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane. *Journal of Thermal Biology*, v. 31, n. 1-2, p. 208-219, 2006.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 4, p. 330-9, 2004.

BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D. A., CHRISTENSEN, R. D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal Investigative of Dermatology*, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos antiinflamatórios não-hormonais. *Pediatria*, v. 27, n. 3, p. 181-193, 2005.

BROWN, Z.; STRIETER, R. M.; NEILD, G. H.; THOMPSON, R. C.; KUNKEL, S. L.; WESTWICK, J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney International*, v. 42, n. 1, p. 95-101, 1992.

BROZ, P.; MONACK, D. M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, n. 8, p. 551-565, 2013.

BUTTERY, L. D.; SPRINGALL, D. R.; CHESTER, A. H.; EVANS, T. J.; STANDFIELD, E. N. PARUMS, D. V.; YACOUB, M. H.; POLAK, J. M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the

formation and activity of peroxyne. Laboratory Investigation, v. 75, n. 1, p. 77-85, 1996.

CABRAL, M. A. Anotações em farmacologia e farmácia clínica. 2010.

CALIL, N. O.; DE CARVALHO, G. S. G.; DA SILVA, A. F.; DA SILVA, A. D.; RAPOSO, N. R. B. Antioxidant Activity of Synthetic Resveratrol Analogs: A Structure-Activity Insight. Letters and Drug Design and Discovery, v. 9, n. 7, p. 676-679, 2012.

CAMINERO, A.; COMABELLA, M.; MONTALBAN, X. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), anti-TNF- α and demyelination revisited: an ongoing story. Journal of Neuroimmunology, v. 234, n. 1-2, p. 1-6, 2011.

CAO, X. Self-regulation and cross-regulation of pattern-recognition receptor signalling in health and disease. Nature Reviews Immunology, v. 16, n. 1, p. 35-50, 2016.

CARVALHO, R. V. H.; ARRUDA, L. Inflamassoma de NLRP3: A descoberta de um mecanismo regulador com possíveis implicações Clínicas. Disponível em: <<http://sbi.org.br/inflamassoma-de-nlrp3-a-descoberta-de-um-mecanismo-regulador-com-possiveis-implicacoes-clinicas/>> Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

CASTRO, R. A. Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP. 2011. 95f. Dissertação (Mestrado em patologia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. Química Nova, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CHANDRASOMA, P.; TAYLOR, C. R. "Part A. General Pathology, Section II. The Host Response to Injury, Chapter 3. The Acute Inflammatory Response, sub-section Cardinal Clinical Signs". Concise Pathology. 3rd edition. New York, N.Y.: McGraw-Hill, 2005.

CHARO, I. F.; TAUBMAN, M. B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. Circulation Research, v. 95, p. 858-866, 2004.

CHEVALIER, X.; GOUPILLE, P.; BEAULIEU, A. D.; BEAULIEU, A. D.; BURCH, F. X.; BENSON, W. G.; CONROZIER, T.; LOEUILLE, D.; KIVITZ, A. J.; SILVER, D.; APPLETON, B. E. Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. Arthritis Rheum, v. 61, n. 3, p. 344-52, 2009.

CHHATWAL, V. J.; MOOCHHALA, S. M.; CHAN, S. T.; NGOI, S. S. Nitric Oxide and Cancer. Medical Hypotheses, v. 46, n. 1, p. 21-24, 1996.

COBBS, C. S.; BRENNAN, J. E.; ALDAPE, K. D.; BRETT, D. S.; ISRAEL, M. A. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. Cancer Research, v. 55, n. 4, p. 727-730, 1995.

COELHO, R.; ROSSI, R. C. An approach to oxazolidin-2-ones from the Baylis–Hillman adducts. Formal synthesis of a chloramphenicol derivative. *Tetrahedron Letters*, v. 43, n. 15, p. 2797-2800, 2002.

COMERFORD, I.; MCCOLL, S. R. Mini-review series: focus on chemokines. *Immunology & Cell Biology*, v. 89, n. 2, p. 183-184, 2011.

CONTI, I.; ROLLINS, B. J. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v.14, n. 3, p. 149–154, 2004.

COOK, H. T.; CATTELL, V. Role of nitric oxide in immune-mediated diseases. *Clinical Science*, v. 91, p. 375–384, 1996.

CROXFORD, A. L.; KULIG, P.; BECHER, B. IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine Growth Factor Review*, v. 25, n. 4, p. 415-421, 2014.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário - Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*, v. 79, n. 3, p. 408–411, 1993.

CUNNANE, G.; MADIGAN, A.; MURPHY, E.; FITZGERALD, O.; BRESNIHAN, B. The effects of treatment with interleukin-1 receptor antagonist on the inflamed synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 40, p. 62–69, 2001.

CUSHING, S. D.; BERLINER, J. A.; VALENTE, A. J.; TERRITO, M. C.; NAVAB, M.; PARHAMI, F.; GERRITY, R.; SCHWARTZ, C. J.; FOGELMAN, A. M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 87, n. 13, p. 5134–5138, 1990.

DAMLE, N. K.; KLUSSMAN, K.; LINSLEY, P. S.; ARUFFO, A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4 + T lymphocytes. *Journal of Immunology*, v. 148, p. 1985–92., 1992.

DAWSON, J.; MILTZ, W.; MIR, A. K.; WIESSNER, C. Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 7, n. 1, p. 35-48, 2003.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V. M; ARNICOROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF induced rat paw oedema. *Agents and Actions*, v. 42, n. 1-2, p.29-33, 1994.

DEMARIA, S.; PIKARSKY, E.; KARIN, M.; COUSSENS, L. M.; CHEN, Y. C.; EL-OMAR, E. M.; TRINCHIERI, G.; DUBINETT, S. M.; MAO, J. T.; SZABO, E.; KRIEG, A.; WEINER, G. J.; FOX, B. A.; COUKOS, G.; WANG, E.; ABRAHAM, R. T.; CARBONE, M.; LOTZE, M. T. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *Journal of Immunotherapy*, v. 33, n. 4, p. 335-51, 2010.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 29, n. 6, p. 313-312, 2009.

DINARELLO, C. A. Blocking interleukin-1 β in acute and chronic autoinflammatory diseases. *Journal of Internal Medicine*, v. 269, p. 16-28, 2011a.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review Immunology*, v. 27, p. 519-50, 2009.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, v. 117, n. 14, p. 3720-3, 2011b.

DINARELLO, C. A.; DONATH, M. Y.; MANDRUP-POULSEN, T. Role of IL-1 β in type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, v. 17, n. 4, p. 314-321, 2010.

Dinarello, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, v. 140, n. 6, p.935-50, 2010.

DINARELLO, C. A.; VAN DER MEER, J. W. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in Immunology*, v. 25, n. 6, p. 469-84, 2013.

DRAYTON, D. L.; LIAO, S.; MOUNZER, R. H.; RUDDLE, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology*, v. 7, n. 4, p. 344-353, 2006.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

DUDZINSKI, D. M.; IGARASHI, J.; GREIF, D.; MICHEL, T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 46, p. 235-276, 2006.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. Nitric oxide and neurological disorders. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, n. 1-2, p. 67-96, 2005.

DUNCAN, B. B.; CHOR, D.; AQUINO, E. M. L.; BENSENOR, I. M.; MILL, J. G.; SCHMIDT, M. I.; LOTUFO, P. A.; VIGO, A.; BARRETO, S. M. Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. *Revista de Saúde Pública*, v. 46, p. 126-134, 2012.

ESPOSITO, I.; MENICAGLI, M.; FUNEL, N.; BERGMANN, F.; BOGGI, U.; MOSCA, F.; BEVILACQUA, G.; CAMPANI, D. Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, v. 57, n. 6, p. 630-636, 2004.

FERREIRA, B. R. V. Aplicações sintéticas dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman em reações mediadas por Paládio. 2010. 281f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FETTERMAN, J. L.; HOLBROOK, M.; FLINT, N.; FENG, B.; BRETONROMERO, R.; LINDER, E. A.; BERK, B. D.; DUESS, M. A.; FARB, M. G.; GOKCE, N.; SHIRIHAI, O. S.; HAMBURG, N. M.; VITA, J. A. Restoration of autophagy in endothelial cells from patients with diabetes mellitus improves nitric oxide signaling. *Atherosclerosis*, n.247, p.207-217, 2016.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. *Rev Bras Reumatol*, v. 48, n. 1, p. 17-24, 2008.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, p. 671-674, 2005.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E. I.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide isozymes, Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, v. 23, p. 1121–1131, 1994.

FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FURSTENBERGER, G.; SORG, B.; MARKS, F. Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. *Science*, v. 220, p. 89-91, 1983.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 6, n. 4, p. 232-41, 2010.

GÀBOR, M. *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

GADDI, A., CÍCERO, A. F. G., PEDRO, E. J. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Archives Gerontology and Geriatrics*, v. 38, p. 201-212, 2004.

- GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 39713-39720, 2001.
- GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacological Research*, v. 50, p. 143-149, 2004.
- GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, v. 16, p. 225-60, 1998.
- GHOSH, S.; SAXENA R. K. Early effect of *Mycobacterium tuberculosis* infection on Mac-1 and ICAM-1 expression on mouse peritoneal macrophages. *Experimental Journal of Molecular Medicine*, v. 36, n. 5, p. 387-95, 2004.
- GILROY, D.; DE MAEYER, R. New insights into the resolution of inflammation. *Seminars in Immunology*, v. 27, n. 3, p. 161-168, 2015.
- GLASS, C. K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature Reviews in Immunology*, v. 6, p. 44-55, 2006.
- GOFFIN, J.; LACCHETTI, C.; ELLIS, P. M.; UNG, Y. C.; EVANS, W. K. First-line systemic chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 5, n. 2, p. 260-274, 2010.
- GOMES, J. C. Morita-Baylis-Hillman na síntese de antitumorais. 2010. 174f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analyses of nitrate, nitrite and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GRIFFIN, G. K.; NEWTON, G.; TARRIO, M. L.; BU, D. X.; MAGANTO-GARCIA, E.; AZCUTIA, V.; ALCAIDE, P.; GRABIE, N.; LUSCINSKAS, F. W.; CROCE, K. J.; LICHTMAN, A. H. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 12, p. 6287-6299, 2012.
- GROSS, J. A.; CALLAS, E.; ALLISON, J. P. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *Journal of Immunology*, v. 149, p. 380-8, 1992.
- GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, p. 421-425, 2008.

GUNDRÁ, U. M.; GIRGIS, N. M.; RUCKERL, D.; JENKINS, S.; WARD, L. N.; KURTZ, Z. D.; WIENS, K. E.; TANG, M. S.; BASU-ROY, U.; MANSUKHANI, A.; ALLEN, J. E.; LOKE, P. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*, v. 123, n. 20, p. 110-122, 2014.

HACK, C. E.; DE GROOT, E. R.; FELT-BERSMA, R. J.; NUIJENS, J. H.; STRACK VAN SCHIJNDEL, R. J.; EERENBERG-BELMER, A. J.; THIJS, L. G.; AARDEN, L. A. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*, v. 74, n. 5, p. 1704-10, 1989.

HAMID, Q.; SPRINGALL, D. R.; RIVEROS-MORENO, V.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J. M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *The Lancet*, v. 342, n. 8886-8887, p. 1510-1513, 1993.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, p. 413-421, 2002.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARDING, F. A.; MCARTHUR, J.; GROSS, J. A.; RAULET, D.; ALLISON, J. P. CD28 mediated signalling costimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature*, v. 356, p. 607-9, 1992.

HASHIMOTO, Y. Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 461-479, 2002.

HAYASHIDA, K.; NANKI, T.; GIRSCHICK, H.; YAVUZ, S.; OCHI, T.; LIPSKY, P. E. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Research & Therapy*, v. 3, n. 2, p. 118-126, 2001.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; HSIEH, C. C.; DE LUMEN, B. O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 390, n. 3, p. 803-808, 2009.

HIDESHIMA, T.; NAKAMURA, N.; CHAUHAN, D.; ANDERSON, K. C. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*, v. 20, n. 42, p. 5991-6000, 2001.

HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T., LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Journal of Pediatrics*, v. 82, n. 5 Supl, p. S206-12, 2006.

HINZ, B.; BRUNE, K. Specific COX-2 inhibitors: prospects of therapy with new analgesic and anti-inflammatory substances. *Wiener Klinische Wochenschrift*, v. 111, n. 3, p. 103-112, 1999.

HIRANO, T.; MATSUDA, T.; TURNER, M.; MIYASAKA, N.; BUCHAN, G.; TANG, B.; SATO, K.; SHIMIZU, M.; MAINI, R.; FELDMANN, M. et al. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, v. 18, n. 11, p. 1797-801, 1988.

HOCHER, B.; SCHWARZ, A.; FAGAN, K. A.; THÖNE-REINEKE, C.; EL-HAG, K.; KUSSEROW, H.; ELITOK, S.; BAUER, C.; NEUMAYER, H. H.; RODMAN, D. M.; THEURING, F. Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 23, n. 1, p. 19-26, 2000.

HORII, Y.; MURAGUCHI, A.; IWANO, M.; MATSUDA, T.; HIRAYAMA, T.; YAMADA, H.; FUJII, Y.; DOHI, K.; ISHIKAWA, H.; OHMOTO, Y. et al. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Journal of Immunology*. v. 143, n. 12, p. 3949-55, 1989.

HORWITZ, M. S.; SARVETNICK, N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunological Reviews*, v. 169, p. 241-253, 1999.

HOU, W.; KANG, H. S.; KIM, B. S. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 2, p. 313-328, 2009.

HWANG, S. Y.; KIM, J. Y.; KIM, K. W.; PARK, M. K.; MOON, Y.; KIM, W. U.; KIM, H. Y. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Research & Therapy*, v. 6, n. 2, p.120-128, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/Estimativa_2014.pdf. Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf. Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Switzerland, 42f.

IYENGAR, R.; STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 18, p. 6369-6373, 1987.

JOHNSON, M. Chemotherapy treatment decision making by professionals and older patients with cancer: a narrative review of the literature. *European Journal of Cancer Care*, v. 21, n. 1, p. 3-9, 2012.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 10, p. 749-759, 2005.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 431-436, 2006.

KAUR, J.; KUMAR, P.; TYAGI, S.; PATHAK, R.; BATRA, S.; SINGH, P.; SINGH, N. In silico screening, structure-activity relationship, and biologic evaluation of selective pteridine reductase inhibitors targeting visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 55, n. 2, p. 659-666, 2011.

KAWAGUCHI, Y.; NISHIMAGI, E.; TOCHIMOTO, A.; KAWAMOTO, M.; KATSUMATA, Y.; SOEJIMA, M.; KANNO, T.; KAMATANI, N.; HARA, M. Intracellular IL-1alpha-binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1alpha in systemic sclerosis fibroblasts. *Proceedings of National Academy of Science*, v. 103, n. 39, p. 14501-14506, 2006.

KAY, J.; CALABRESE, L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 43, p. iii2-iii9, 2004.

KIKUTA, J.; ISHII, M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutics targets for rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*, v. 52, n. 2, p. 1-9, 2012.

KINDLER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*, v. 56, n. 5, p. 731-740, 1989.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, v. 298, p. 249-258, 1994.

KOHN, L. K.; PAVAM, C. H.; VERONESE, D.; COELHO, F.; DE CARVALHO, J. E.; ALMEIDA, W. P. Antiproliferative effect of Baylis-Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 6, p. 738 - 744, 2006.

KOISTINAHO, M.; KOISTINAHO, J. Interactions between Alzheimer's disease and cerebral ischemia--focus on inflammation. *Brain Research Reviews*, v. 48, n. 2, p. 240-250, 2005.

KOLLIAS, G.; DOUNI, E.; KASSIOTIS, G.; KONTOYIANNIS, D. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunological Reviews*, v. 169, p. 175-194, 1999.

KRÖNCKE, K. D. Nitric oxide: Citotoxicity versus cytoprotection – How, why, when and where? *Nitric oxide: Biology and Chemistry*, v. 1, p. 107-20, 1997.

KUNDU, M. K.; SUNDAR, N.; KUMAR, S. K.; BHAT, S. V.; BISWAS, S.; VALECHA, N. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2methylene-propionic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 9, n. 5, p. 731 – 736, 1999.

KUNE, G. A.; KUNE, S.; WATSON, L. F. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study." *Cancer Research*, v. 48, n. 15, p. 4399-4404, 1988.

KUPER, H.; ADAMI, H. O.; TRICHOPOULOS, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine*, v. 248, n. 3, p. 171-183, 2000.

KUSANO, K. F.; NAKAMURA, K.; KUSANO, H.; NISHII, N.; BANBA, M.; IKEDA, T.; HASHIMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; FUJIO, H.; MIURA, A.; OHTA, K.; MORITA, H.; SAITO, H.; EMORI, T.; NAKAMURA, Y.; KUSANO, I.; OHE, T. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circulation Journal*, v. 68, n. 7, p. 671–676, 2004.

LAHOZ, C.; MOSTAZA, J.M. Atherosclerosis as a systemic disease. *Revista Española de Cardiología*, v. 60, n. 2, p. 184-195, 2007.

LARSEN, C. M.; FAULENBACH, M.; VAAG, A.; VØLUND, A.; EHSES, J. A.; SEIFERT, B.; MANDRUP-POULSEN, T.; DONATH, M. Y. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, v. 356, n. 15, p. 1517-26, 2007.

LASKIN, D. L. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chemical Research in Toxicology*, v. 22, n. 8, p. 1376-1385, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 787-795, 2002.

LEE, J. Y.; RHEE, M. H.; CHO, J. Y. Novel modulatory effects of SDZ 62-434 on inflammatory events in activated macrophage-like and monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 377, n. 2, p. 111-24, 2008.

LENARDÃO, J. E.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green Chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, v. 26, p. 123, 2003.

LEZOUCHE, G.; PAGANINI, A. M.; CAMPAGNACCI, R.; GHISELLI, R.; PELLONI, M.; ROMBINI, A.; GUERRIERI, M. Treatment of rectal cancer by transanal endoscopic microsurgery: review of the literature. *Minerva Chirurgica*, v. 68, n. 1, p. 1-9, 2013.

LI, C. Y.; HUANG, Q.; KUNG, H. F. Cytokine and immuno-gene therapy for solid tumors. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 2, n. 2, p. 81-91, 2005.

LIANG, Y. C.; HUANG, Y. T.; TSAI, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; CHEN, C. F.; LIN, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by

apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, v. 20, n. 10, p. 1945-1952, 1999.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIMA-JUNIOR, C. G.; ASSIS, P. A. C.; SILVA, F. P. L.; SOUSA, S. C. O.; DE ANDRADE, N. G.; BARBOSA, T. P.; NERÍS, P. L. N.; SEGUNDO, L. V. G.; ANJOS, I. C.; CARVALHO, G. A. U.; ROCHA, G. B.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita–Baylis– Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. *Bioorganic Chemistry*, v.38, p. 279-284, 2010.

LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS M. L. A. A. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Oxford, v. 20, p. 3954 – 3971, 2012.

LIN, J.; ZIRING, D.; DESAI, S.; KIM, S.; WONG, M.; KORIN, Y.; BRAUN, J.; REED, E. GJERTSON, D.; SINGH, R.R. TNF α blockade in human diseases: An overview of efficacy and safety. *Clinical Immunology*, v. 126, n. 1, p. 13-30, 2008.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LEONARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies. *Integrating mammalian biology*. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LODISH, B.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Molecular cell biology*. 5^a ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2004.
Longui, C.A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *J Pediatrics*, v. 83, p. 163-77, 2007.

LÓPEZ, N. J.; JARA, L.; VALENZUELA, C. Y. Association of interleukin-1 polymorphisms with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, v. 76, n. 2, p. 234-243, 2005.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MANSFIELD, C. M.; KRISHNAN, L.; KOMARNICKY, L. T.; AYYANGAR, K. M.; KRAMER, C. A. A review of the role of radiation therapy in the treatment of patients with breast cancer. *Seminars in Oncology*, v. 18, n. 6, p. 525-535, 1991.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 45, p. 594-598, 1968.

MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 33, n. 7, p. 1478-1483, 2013.

MARTIN, J. G.; KUROKAWA, C. S.; CARPI, M. F.; BONATTO, R. C.; MORAES, M. A.; FIORETTO, J. R. Interleucina-12 em crianças com sepse e choque séptico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. São Paulo, v. 24, n. 2, p. 130-136, 2012.

MARTINS, G. V. F. POTENCIAL ANTICÂNCER E ANTI-INFLAMATÓRIO DE ADUTOS DE MORITA BAYLIS-HILLMAN. 2015. 152f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, João Pessoa.

MATEUS, C. R.; COELHO, F. An alternative approach to aminodiols from Baylis-Hillman adducts: stereoselective synthesis of chloramphenicol, fluoramphenicol and thiamphenicol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, n. 3A, p. 386-396, 2005.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, p. 428–35, 2008.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, v. 449, n. 7164, p. 819–826, 2007.

MIGLIORI, I. K. Avaliação da função das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 em células dendríticas na capacidade de ativação de Linfócitos T. 2010. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade de São Paulo – São Paulo..

SOUZA, H. P. Mecanismos de modulação da via de sinalização CD40/CD40L. 2007. 189f. Tese (Professor Livre-Docente no Departamento de Clínica Médica) – Universidade de São Paulo – São Paulo.

MIJAN, M. C. Terapia fotodinâmica mediada por alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama in vitro e in vivo: mecanismos de ação e perfil imunoestimulatório. 2012. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, Brasília.

MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *Cancer Journal for Clinicians*, v. 66, n. 4, p. 271-89, 2016.

MINCIULLO, P. L.; CATALANO, A.; MANDRAFFINO, G.; CASCIARO, M.; CRUCITTI, A.; MALTESE, G.; MORABITO, N.; LASCO, A.; GANGEMI, S.; BASILE, G. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, v. 64, n. 2, p. 111-126, 2016.

MOILANEN, E.; VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Annals of Medicine*, v. 27, p. 359-67, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUThON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. *Autoimmunity Reviews*, v. 7, p. 421-425, 2008.

MUKHOPADHYAY, S.; HOIDAL, J. R.; MUKHERJEE, T. K. Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology. *Respiratory Research*, v. 7, n. 125, p. 1-9, 2006.

MUNSHI, A.; AGARWAL, J. P.; PANDEY, K. C. Cancer patients with cardiac pacemakers needing radiation treatment: a systematic review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 9, n. 2, p. 193-198, 2013.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 1-2, 2012.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)- induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology*, v.71, p. 1331-1336, 2006.

MURRAY, J. S.; PFEIFFER, C.; MADRI, J.; BOTTOMLY, K. Major histocompatibility complex (MHC) control of CD4 T cell subset activation. II. A single peptide induces either humoral or cell-mediated responses in mice of distinct MHC genotype. *European Journal of Immunology*, v. 22, n. 2, p. 559-565, 1992.

NAGY, G.; CLARK, J. M.; BUZÁS, E. I.; GORMAN, C. L.; COPE, A. P. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunology Letters*, v. 111, n. 1, p. 1-5, 2007.

NAMIKI, M.; KAWASHIMA, S.; YAMASHITA, T.; OZAKI, M.; HIRASE, T.; ISHIDA, T.; INOUE, N.; HIRATA, K.; MATSUKAWA, A.; MORISHITA, R.; KANEDA, Y.; YOKOYAMA, M. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 22, n. 1, p. 115–120, 2002.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal*, v. 6, n. 12, p. 3051–3064, 1992.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation, *Cell*. v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NATURE PUBLISHING GROUP (NPG). 2016. Cancer. Disponível em: <http://www.nature.com/subjects/cancer>. Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

NICOLL, J. A.; MRAK, R. E.; GRAHAM, D. I.; STEWART, J.; WILCOCK, G.; MACGOWAN, S.; ESIRI, M. M.; MURRAY, L. S.; DEWAR, D.; LOVE, S.; MOSS, T.; GRIFFIN, W. S. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, v. 47, n. 3, p. 365-368, 2000.

NIKCEVICH, K. M.; PISKURICH, J. F.; HELLENDALL, R. P.; WANG, Y.; TING, J. P. Differential selectivity of CIITA promoter activation by IFN-gamma and IRF-1 in astrocytes and macrophages: CIITA promoter activation is not affected by TNF-alpha. *Journal of Neuroimmunology*, v. 99, n. 2, p. 195-204, 1999.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 4, n. 4, p. 386-391, 2004.

NORTON, S. D.; ZUCKERMAN, L.; URDAHL, K.B.; SHEFNER, R.; MILLER, J.; JENKINS, M. K. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *Journal of Immunology*, v. 149, p. 1556-61, 1992.

OKUSAWA, S.; GELFAND, J. A.; IKEJIMA, T.; CONNOLLY, R. J.; DINARELLO, C.A. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *Journal of Clinical Investigation*, v. 81, n. 4, p. 1162-72, 1998.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OLIVEIRA, E. L. P.; SILVA, A. C.; SILVA, R. M.; SEVENINI, L. A.; MELO, H. A.; CANDIDO, J. L.; SANTOS, T. Q. Inflamassoma e sua repercussão clínica: Revisão da literatura. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 11, n. 1, p. 96-102, 2012.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista de Medicina de São Paulo*, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

OPPENHEIM, J. J.; MATSUSHIMA, K.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E. J.; NETA, R. Relationship between interleukin 1 (IL1), tumor necrosis factor (TNF) and a neutrophil attracting peptide (NAP-1). *Agents and actions*, v. 26, n. 1-2, p. 134-140, 1989.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Resumo – Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde 2015. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186468/6/WHO_FWC_ALC_15.01_por.pdf?ua=1. Acesso em: 12 de janeiro de 2017.

OXER, D. S. Interação entre as vias de sinalização CD40/CD40L e os PPARs. 2008. 92f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAIVA, D. C. C. Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. proveniente da caatinga

potiguar. 2013. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, MOSSORÓ – RN.

PALOZZA, P.; PARRONE, N.; CATALANO, A.; SIMONE, R. Tomato lycopene and inflammatory cascade: basic interactions and clinical implications. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 23, p. 2547-2463, 2010.

PANG, L.; KNOX, A.J. Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 121, n. 3, p. 579-87, 1997.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryot Gene Expression*, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 17, p. 321-328, 2006.

PELEGRIN, P.; BARROSO-GUTIERREZ, C.; SURPRENANT, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *Journal of Immunology*, v. 180, n. 11, p. 7147-57, 2008.

PHILIP, M.; ROWLEY, D. A.; SCHREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology*, v. 14, n. 6, p. 433-439, 2004.

PINTO, N. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L.; GUALBERTO, A. C.; GAMEIRO, J.; CHEDIER, L. M.; CASTAÑON, M. C.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller leaves presente in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J Ethnopharmacol*, v. 173, p. 330-7, 2015.

PODOJIL, J. R.; MILLER, S. D. Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. *Immunological Reviews*, v. 229, n. 1, p. 337-55, 2009.

PORTA, C.; RIBOLDI, E.; SICA, A. Mechanisms linking pathogens-associated inflammation and cancer. *Cancer Letters*, v. 305, n. 2, p. 250-262, 2011.

PRESCOTT, S. M.; WHITE, R. L. Self-Promotion? Intimate Connections Between APC and Prostaglandin H Synthase-2. *Cell*, v. 87, n. 5, p. 783-786, 1996.

PREZIOSO, D.; PICCIRILLO, G.; GALASSO, R.; ALTIERI, V.; MIRONE, V.; LOTTI, T. Gynecomastia due to hormone therapy for advanced prostate cancer: a report of ten surgically treated cases and a review of treatment options. *Tumori Journal*, v. 90, n. 4, p. 410-415, 2004.

PROOST, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. The role of chemokines in inflammation. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, v. 26, n. 4, p. 211-23, 1996.

PUNCHARD, N. A.; WHELAN, C. J.; ADCOCK, I. The Journal of Inflammation. *Journal of Inflammation*, p. 1-4, 2004.

QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO, R. In RADI, E.; FORMICHI, P.; BATTISTI, C.; FEDERICO, A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease*, v.42 n. 3, p.125-152, 2014.

RAINERO, I.; BO, M.; FERRERO, M.; VALFRÈ, W.; VAULA, G.; PINESSI, L. Association between the interleukin-1alpha gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurobiology of Aging*, v. 25, n. 10, p. 1293-1298, 2004.

RAMNATH, R. D.; WEING, S.; HE, M.; SUN, J.; ZHANG, H.; BAWA, M. S.; BHATIA, M. Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. *Journal of Organ Dysfunction*, v. 2, p. 8092, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Farmacologia*, 8ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.

RANTAPAA-DAHLQVIST, S.; BOMAN, K.; TARKOWSKI, A.; HALLMANS, G. Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Disease*, v. 66, n. 1, p. 121–123, 2007.

RECHT, A.; HOULIHAN, M. J. Conservative surgery without radiotherapy in the treatment of patients with early-stage invasive breast cancer. A review. *Annals of Surgery*, v. 22, n. 1, p. 9–18, 1995.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

REVENEAU, S.; ARNOULD, L.; JOLIMOY, G.; HILPERT, S.; LEJEUNE, P.; SAINT-GIORGIO, V.; BELICHARD, C.; JEANNIN, J.F. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Laboratory Investigation*, v. 79, n. 10, p. 1215-1225, 1999.

RIBEIRO, A. Q., SEVALHO, G., CÉSAR, C. The use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and the occurrence of gastric lesions among patients undergoing upper endoscopy in a university hospital in Brazil. *Clinics*, v. 61, n. 5, p. 409-16, 2006.

RIBEIRO-SOBRINHO, A.P.; RABELO, F.L.; FIGUEIREDO, C.B.; ALVAREZ LEITE, J.L.; NICOLI, J.R.; UZEDA, M.; VIEIRA, L.Q. Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells. *Journal of Medicinal Microbiology*, v. 54, n. Pt4, p. 413-416, 2005.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.

RICHMOND, A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 9, p. 664-674, 2002.

ROSA, J. N.; AFONSO, C. A. M.; SANTOS, A. G. Ionic liquids as a recyclable reaction medium for the Baylis-Hillman reaction". *Tetrahedron*, v. 57, p. 4189-4193, 2001.

ROSBIE, K. W.; PRAZMA, J.; PETRUSZ, P.; MIMS, W.; BALL, S. S.; WEISSLER, M. C. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, v. 113, n. 5, p. 541-549, 1995.

ROY, A.; PAHAN, K. Myelin Basic Protein-primed T Helper 2 Cells Suppress Microglial Activation via AlphaV Beta3 Integrin: Implications for Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, v. 2013, n. 7, p. 158, 2013.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M. F.; HIGASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MIYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *Journal of Clinical Investigation*, v. 96, n. 5, p. 2357-2363, 1995.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, p. 877-879, 1999.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 100, n. 12, p. 7265-7270, 2003.

SAWYNOK, J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacological Reviews*, v. 55, p. 1-20, 2004.

SCHATTNER, A.; RAGER-ZISMAN, B. Virus-induced autoimmunity. *Reviews of Infectious Disease*, v. 12, n. 2, p. 204-222, 1990.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneimittel Forschung / Drug Research*, v. 32, n. 3, p. 230-35, 1982.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; AZEVEDO E SILVA, G.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P. R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The Lancet*, v. 377, n. 9781, p. 1949-1961, 2011.

SCHONBECK, U.; P. LIBBY. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 58, n. 1, p. 4-43, 2001.

SEDER, R.A.; GERMAIN, R.N.; LINSLEY, P.S.; PAUL, W.E. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *Journal of Experimental Medicine*, v. 179, p. 299-304, 1994.

SEPE, S. M.; CLARK, R. A. Oxidant membrane injury by the neutrophil myeloperoxidase system. II. Injury by stimulated neutrophils and protection by lipid-soluble antioxidants. *The Journal of Immunology*, v. 134, n. 3, p. 1896-1901, 1985.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.

SFIKAKIS, P. P.; TSOKOS, G. C. Towards the next generation of anti-TNF drugs. *Clinical Immunology*, v. 141, n. 3, p. 231-235, 2011.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SHIMIZU, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 49, p. 123-50, 2009.

SIEWEKE, M. H.; ALLEN, J. E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 12429-74, 2013.

SILVA, C. E. L.; VALOTA, R.; GEBARA, K. S.; SILVA, R. C. L.; SIMIONATTO, E. Avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em extrato metanólico obtido de folhas da *Commiphora Myrrha*. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 34, n. 1, p. 117-124, 2013.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. *Ciência e cultura*, v. 66, n. 1, 2014.

SILVEIRA, G. P. C. USO DA REAÇÃO DE BAYLISHILLMAN: SÍNTESE ASSIMÉTRICA DO EFAROXAN E ANÁLOGOS. 2006. 167f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de Campinas, Campinas.

SILVEIRA, G.P.C; COELHO, F. Enantioselective synthesis of 2-ethyl-2,3-dihydrobenzofuran carboxylic acid, direct precursor of (+)-efaroxan, from a Baylis–Hillman adduct. *Tetrahedron Letters*, v. 46, n. 38, p. 6477-6481, 2005.

SINGH, S. A.; BHAT, S. V. Antimicrobial potential of 3-hydroxy-2-methylene-3-phenylpropionic acid derivatives. *Acta Pharmaceutica*, v. 61, n. 4, p. 447-455, 2011.

SMITH, G.; BERTONE, A.L.; KAEDING, C.; SIMMONS, E.J.; APOSTOLES, S. Anti-inflammatory effects of topically applied dimethyl sulfoxide gel on endotoxin-induced synovitis in horses. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 9, p. 1149-52, 1998.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, p. 145-82, 2000.

SO, A.; DE SMEDT, T.; REVAZ, S.; TSCHOPP, J. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther*, v. 9, n. R28, 2007.

SORENSEN, T. L.; RANSOHOFF, R. M.; STRIETER, R. M.; SELLEBJERG, F. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, v. 11, n. 7, p. 445–449, 2004.

SOZZANI, S.; ABBRACCHIO, M. P.; ANNESE, V.; DANESE, S.; DE PITÀ, O.; DE SARRO, G.; MAIONE, S.; OLIVIERI, I.; PARODI, A.; SARZI-PUTTINI, P. Chronic inflammatory diseases: do immunological patterns drive the choice of biotechnology drugs? A critical review. *Autoimmunity*, v. 47, n. 5, p. 287-306, 2014.

SPOETTL, T.; HAUSMANN, M.; HERLYN, M.; GUNCKEL, M.; DIRMEIER, A.; FALK, W.; HERFARTH, H.; SCHOELMERICH, J.; ROGLER, G. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 145, n. 1, p. 190–199, 2006.

STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*, v. 50, n. 1, p. 35-51, 2011.

STANDIFORD, T. J.; KUNKEL, S. L.; PHAN, S. H.; ROLLINS, B. J.; STRIETER, R. M. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 15, p. 9912–9918, 1991.

STRASSMANN, G.; FONG, M.; KENNEY, J.S.; JACOB, C.O. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *Journal of Clinical Investigation*, v. 89, n. 5, p. 1681-4, 1992.

SUTTON, C.; BRERETON, C.; KEOGH, B.; MILLS, K.H.; LAVELLE, E.C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 7, p. 1685-91, 2006.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horizons*, v. 3, n. 1, p. 2-32, 1995.

SZLOSAREK, P. W.; BALKWILL, F. R. Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *The Lancet Oncology*, v. 4, n. 9, p. 565-573, 2003.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 6, n. 10, p. 1-16, 2014.

TANNOCK, I.F. *The basic science of oncology*. 4^a ed. Nova Iorque: McGraw Hill, 2005.

TANUMA, N.; SAKUMA, H.; SASAKI, A.; MATSUMOTO, Y. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent

neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica*, v. 112, n. 2, p. 195–204, 2006.

TAYSI, S.; USLU, C.; AKCAY, F.; SUTBEYAZ, M. Y. Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer. *Surgery Today*, v. 33, n. 9, p. 651-654, 2003.

THOMPSON, W. L.; VAN ELDIK, L. J. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected]. *Brain Research*, v. 1, n. 1287, p. 47-57, 2009.

THOMSEN, L. L.; LAWTON, F. G.; KNOWLES, R. G.; BEESLEY, J. E.; RIVEROS-MORENO, V.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Research*, v. 54, n. 5, p. 1352-1354, 1994.

THUN, M. J., HENLEY, S. J., PATRONO, C. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic pharmacologic, and clinical issues. *Journal of National Cancer Institute*, v. 94, p.252-66, 2002.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 117, n. 2, p. 244–279, 2008.

TROST, B. M. On inventing reactions for atom economy. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 9, p. 695-705, 2002.

TURINI, M. E.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annual Review of Medicine*, v. 53, p. 35-57, 2002.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of Dental Research*, v. 82, n. 2, p. 82-90, 2003.

VAN KOOTEN, C.; BANCHEREAU, J. CD40-CD40 ligand. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, n. 1, p. 2-17, 2000.

VAN TASSELL, B. W.; RALEIGH, J. M.; ABBATE, A. Targeting interleukin-1 in heart failure and inflammatory heart disease. *Current Heart Failure Reports*, v. 12, n. 1, p. 33-41, 2015.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 38, p. 97-120, 1998.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 11, p. 692-704, 2015.

VIEIRA, S. M.; LEMOS, H. P.; GRESPAN, R.; NAPIMOGA, M. H.; DAL-SECCO, D.; FREITAS, A.; CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; SOUZA-JUNIOR, D. A.; JAMUR, M. C.; FERNANDES, K. S.; OLIVER, C.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *British Journal of Pharmacology*, v. 158, n. 3, p. 779-789, 2009.

VODOVOTZ, Y.; LUCIA, M. S.; FLANDERS, K. C.; CHESLER, L.; XIE, Q. W.; SMITH, T. W.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; WEBBER, R.; NATHAN, C.; ROBERTS, A. B.; LIPPA, C. F.; SPORN, M. B. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 184, n. 4, p. 1425-1433, 1996.

VOLTARELLI, J. C. FEBRE E INFLAMAÇÃO. Simpósio: SEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA CLÍNICA. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1-2, p. 7-48, 1994.

WAHL, L. M.; KLEINMAN, H. K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 21, p. 1583-1584, 1998.

WALLACE, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 5-9, 2005.

WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P. J.; MASON, S. N.; SAULS, D. L.; DITTMAN, W. A.; WOOD, E. R.; SMITH, G. K.; MCDONALD, B.; BACHUS, K. E.; et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. M.; ROITMAN, E.; KUYPERS, F. A. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Archives of biochemistry. Biophysics*, v. 296, n. 2, p. 547-555, 1992.

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

XU, W.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Research*, v. 12, n. 5-6, p. 311-20, 2002.

XU, Y.; SONG, G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *Journal of Biomedical Science*, v. 11, n. 4, p. 426-38, 2004.

YU, C. R.; XU, L.H.; TU, S.; LI, Z.N.; LI, B. Synthesis and bioactivity of novel (3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yloxy)phenyl containing acrylate and acrylonitrile derivatives. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 127, n. 12, p. 1540-1546, 2006.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. *The Journal of Pathology*, v. 214, n. 2, p. 161-178, 2008.

ZHOU, L.; IVANOV, I. I.; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY, D. E.; LEONARD, W. J.; LITTMAN, D. R. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology*, v. 8, n. 9, p. 967-974, 2007.

ZHU, H. H.; HU, C.H.; STRICKLAND, P. Perspectives of breast cancer etiology: synergistic interaction between smoking and exogenous hormone use. *Chinese Journal of Cancer*, v. 30, n. 7, p. 433- 441, 2011.

ZÍDEK, Z.; ANZENBACHER, P.; KMONÍČKOVÁ, E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British Journal of Pharmacological*, v. 157, n. 3, p. 342–361, 2009.