

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

**ELAINE DE FREITAS CASTRO REIS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS**

**JUIZ DE FORA**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**

Elaine de Freitas Castro Reis

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Saúde.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida

JUIZ DE FORA

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis, Elaine de Freitas Castro.  
Avaliação da atividade anti-inflamatória de aminoálcoois lipofílicos / Elaine de Freitas Castro Reis. -- 2014.  
66 f.

Orientadora: Ana Paula Ferreira  
Coorientadora: Mauro Vieira de Almeida  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2014.

1. Aminoálcoois lipofílicos. 2. atividade anti-inflamatória.  
I. Ferreira, Ana Paula, orient. II. Almeida, Mauro Vieira de, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELAINE DE FREITAS CASTRO REIS

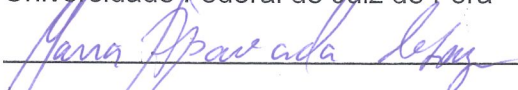
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

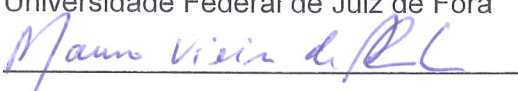
  
\_\_\_\_\_  
**Profª Drª. Ana Paula Ferreira**

Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_

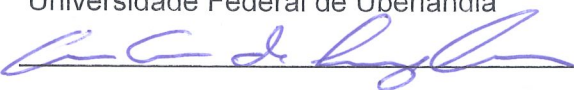
**Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida**

Universidade Federal de Juiz de Fora

  
\_\_\_\_\_

**Profª. Drª. Maria Aparecida de Souza**

Universidade Federal de Uberlândia

  
\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Caio César de Souza Alves**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- Teófilo Otoni

  
\_\_\_\_\_

**Profª Drª Sandra Bertelli Ribeiro de Castro**

Universidade Federal de Juiz de Fora- Governador Valadares



“Ser feliz não é ter uma vida perfeita,  
mas deixar de ser vítima dos problemas e  
se tornar o autor da própria história”.

Abraham Lincoln

Dedico este trabalho:

Ao meu filho **Otávio**, por ser a realização do meu maior sonho.

Ao meu grande amor e companheiro, **Júlio**.

A meus queridos pais, **José e Irani**, por serem tão maravilhosos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado força e saúde para alcançar meus objetivos, o que não foi fácil.

Ao meu filho Otávio, razão de tudo, que por tantas vezes se abdicou da minha companhia com lágrimas nos olhos.

Ao meu esposo Júlio, pelo amor verdadeiro, companheiro e incentivador de meus ideais, muito obrigada por tudo.

Aos meus pais, José e Irani, pelo amor sem medida e eterno apoio. Sem vocês nada seria possível. Pai, meu eterno herói, suas palavras de incentivo foram tudo. Mãe, sua dedicação ao meu filho foi fundamental.

À querida professora Dra Ana Paula Ferreira, que sempre esteve disponível em todos os momentos, mais do que uma orientadora, agradeço a oportunidade e colaboração neste trabalho.

Ao prezado professor Dr Mauro Vieira de Almeida, a quem tanto admiro e me espelho, pela confiança e relevante contribuição em meu trabalho.

Agradeço de forma muito especial ao Caio e a Sandra, que superaram em amizade e trabalho.

A Taís, Eric, Luan e a todos os amigos e companheiros de laboratório, por terem me ajudado em todos os momentos.

Ao professor Dr Gilson Macedo e à colega Carol, que muito me ajudaram no início deste trabalho.

A FAPEMIG e UFJF pelo suporte financeiro.

## RESUMO

O processo inflamatório é uma resposta coordenada do organismo a infecções e lesões teciduais, ativando a resposta imune e levando à liberação de substâncias pró- inflamatórias, como o óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Neste trabalho uma série de aminoálcoois lipofílicos de cadeia alifática longa foi avaliada na linhagem de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos peritoneais inflamados de camundongos BALB/c, para verificar a viabilidade celular pelo Método do MTT, a produção de óxido nítrico pelo Método de Griess, assim como a dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por Elisa. Os aminoálcoois lipofílicos que apresentaram bons resultados *in vitro*, foram utilizados *in vivo* no tratamento de camundongos nos modelos de indução de edema em patas de camundongos pela carragenina, na dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no sobrenadante do macerado de coxins plantares de patas de camundongos, assim como no modelo de reação de hipersensibilidade tardia (RHT) à ovalbumina. Foram realizadas culturas com macrófagos da linhagem RAW 264.7 na presença de aminoálcoois com diferentes concentrações (1, 0,5 , 0,05 e 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ). Os aminoálcoois testados não alteraram a viabilidade celular e inibiram a produção de NO e de TNF- $\alpha$ , na maioria das concentrações testadas, porém sem alterar a produção de IL-1 $\beta$ . Nas culturas de macrófagos primários foram testados os aminoálcoois **4a** e **4b**, que alteraram a viabilidade celular, e não induziram a diminuição da produção de NO e das citocinas pro-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os aminoálcoois **4a** e **4b** foram escolhidos para os testes *in vivo*. A dexametasona foi escolhida como referência, por ser um dos fármacos de escolha para o tratamento das desordens inflamatórias, porém apresenta efeitos secundários indesejados devido à supressão total da resposta imune. O aminoálcool **4b** mostrou redução do edema induzido em pata de camundongo pela carragenina, e diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tão eficiente quanto o tratamento com dexametasona. Na reação de hipersensibilidade tardia à OVA os aminoálcoois **4a** e **4b** apresentaram redução no edema em pata de camundongo similar a dexametasona. Em função dos resultados observados *in vitro* e *in vivo* o composto **4b** mostrou propriedades anti-inflamatórias promissoras.

Palavras chaves: aminoálcoois, atividade anti-inflamatória.

## ABSTRACT

The inflammatory process is a coordinated response to infections and tissue damage by activating the immune response and leading to the release of pro-inflammatory substances, such as nitric oxide, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In this study a series of lipophilic long chain aliphatic aminoalcohols was evaluated in RAW 264.7 macrophage lineage and inflamed peritoneal macrophages of mice BALB/c, to verify cell viability by the MTT method, the production of nitric oxide by Griess method, as well as dosage TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by ELISA. Lipophilic amino alcohols that presented good results *in vitro*, were used *in vivo* treatment of mice in models of the carrageenan- induced paw edema in mouse and measure the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the supernatant of macerated of footpad mice as well as in the delayed hypersensitivity reaction (RHT) to ovalbumin model. Cultures of RAW 264.7 macrophage lineage with aminoalcohols in the presence of different concentrations (1, 0.5, 0.05 and 0.005 mg / mL) were evaluated. The aminoalcohols tested did not affect cell viability and inhibit the production of NO and TNF- $\alpha$ , most of the concentrations tested, but without altering the production of IL-1 $\beta$ . In cultures of primary macrophages the amino alcohols **4a** and **4b**, which altered cell viability and did not induce a decrease in NO production and pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were tested. The amino alcohols **4a** and **4b** were chosen for testing *in vivo*. Dexamethasone is chosen as the reference drug for treating various inflammatory diseases, but have unwanted side effects due to the complete suppression of immune response. The amino alcohol **4b** showed reduced edema induced in mouse paw by carrageenan, and decreased TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  as effective as treatment with dexamethasone. In the anti-ovalbumin delayed hypersensitivity reaction the aminoalcohols **4a** and **4b** showed reduction in paw edema mice similar dexamethasone. In function of the results observed *in vitro* and *in vivo* compound **4b** showed promissory anti-inflammatory properties.

Keywords: amino alcohols, anti inflammatory activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estruturas químicas do ISP-1 (miriocina) e do FTY720.....	23
<b>Figura 2.</b> Ensaio da viabilidade celular através do Método MTT.....	28
<b>Figura 3.</b> Tratamento dos camundongos por gavagem.....	33
<b>Figura 4.</b> Medida da pata posterior do camundongo utilizando o espectímetro.....	33
<b>Figura 5.</b> Inibição da produção de TNF- $\alpha$ por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos RAW-264.7.....	38
<b>Figura 6.</b> Inibição da produção de IL-1 $\beta$ por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos RAW-264.7.....	39
<b>Figura 7.</b> Inibição da produção de TNF- $\alpha$ por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos primários.....	41
<b>Figura 8.</b> Inibição da produção de IL-1 $\beta$ por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos primários.....	41
<b>Figura 9.</b> Edema induzido pela carragenina em patas de camundongos.....	43
<b>Figura 10.</b> Avaliação das citocina TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no sobrenadante do macerado de tecido inflamado das patas de camundongos após serem removidas e pesadas.....	45
<b>Figura 11.</b> Reação de Hipersensibilidade Tardia OVA em camundongos Balb/c ....	47

## LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Síntese dos aminoálcoois lipofílicos 4a, 4b, 5, 6, 9 e 10.....	25
---	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem da inibição da viabilidade celular pelos aminoálcoois em macrófagos RAW 264.7 estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.....35
- Tabela 2.** Porcentagem da inibição da produção de Óxido Nítrico macrófagos primários estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.....35
- Tabela 3.** Porcentagem da inibição da viabilidade celular pelos aminoálcoois em macrófagos peritoneais primários estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.....36
- Tabela 4.** Porcentagem da inibição da produção de Óxido Nítrico macrófagos primários estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.....36

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

- APC: Células apresentadoras de antígenos
- DC: Célula dendrítica
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- FTY720: {Cloridrato de 2-amino-2-2[2-(4-octilfenil)etil]1,3- propanodiol}
- HCl: Ácido clorídrico
- IFN-  $\gamma$ : Interferon gama
- IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 beta
- ISP-1: Miriocina
- LNMMA: N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina
- LPS: Lipopolissacarídeo
- MsCl: Cloreto de mesila
- MTT: Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio
- NK: Células natural killer
- NO: Óxido nítrico
- NOS: Óxido nítrico sintase
- OVA: Ovalbumina
- PAMP: Padrão molecular associado ao patógeno
- PGE: Prostaglandina
- PRR: Receptor de reconhecimento padrão
- RHT: Reação de hipersensibilidade tardia
- RMN de <sup>1</sup>H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- RMN de <sup>13</sup>C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
- TLR: Receptor Toll-like
- TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa
- Th: T helper



## SUMÁRIO

1 Introdução .....	13
2 Referencial teórico.....	15
2.1 Características gerais da resposta imune.....	15
2.2 Modelos animais de resposta inflamatória.....	19
2.2.1 Modelo de edema de pata induzido pela carragenina em camundongo BALB/c .....	19
2.2.2 Modelo de Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT).....	20
2.3 Os aminoálcoois lipofílicos como potenciais agentes anti-inflamatórios.....	22
3 Objetivos.....	24
3.1 Objetivos gerais.....	24
3.1 Objetivos específicos.....	24
4 Materiais e métodos.....	25
4.1 Síntese e caracterização dos aminoálcoois lipofílicos.....	25
4.2 Avaliação do efeito dos aminoálcoois lipofílicos em macrófagos RAW-264.7 e macrófagos primários estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .....	26
4.2.1 Preparação e diluição dos aminoálcoois para testes <i>in vitro</i> .....	26
4.2.2 Linhagem celular e cultura macrófagos RAW-264.7.....	26
4.2.3 Linhagem celular e cultura macrófagos primários.....	26
4.2.4 Avaliação da citotoxicidade dos aminoálcoois lipofílicos.....	27
4.2.5 Determinação da produção de NO.....	28
4.2.6 Dòsagem de citocinas.....	28
4.3 Avaliação do efeito dos aminoálcoois lipofílicos no modelo <i>in vivo</i> de indução de edema de patas em camundongos pela carragenina.....	29
4.3.1 Animais.....	29
4.3.2 Preparação e utilização dos compostos para testes <i>in vivo</i> .....	29
4.3.3 Indução do edema em pata de camundongo através da inoculação de carragenina e o tratamento com aminoálcoois lipofílicos.....	29
4.3.4 Eutanásia e coleta de tecidos dos animais.....	30
4.3.5 Quantificação de citocinas por Elisa.....	30

4.4 Avaliação dos efeitos dos aminoálcoois lipofílicos no Modelo da Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT) à OVA.....	31
4.4.1 Animais.....	31
4.4.2 Reação de hipersensibilidade tardia e tratamento com aminoálcoois lipofílicos.....	32
4.5 Análise estatística.....	33
5 Resultados.....	34
5.1 Avaliação do efeito dos aminoálcoois lipofílicos na viabilidade celular e produção de NO em macrófagos RAW-264.7 e macrófagos peritoneais primários estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .....	34
5.2 Avaliação do efeito dos derivados dos aminoálcoois lipofílicos na produção de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em macrófago da linhagem RAW-264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .....	37
5.3 Avaliação do efeito dos derivados dos aminoálcoois lipofílicos <b>4a</b> e <b>4b</b> na produção de IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ em linhagem de macrófago peritoneais primários estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .....	40
5.4 Efeito dos aminoálcoois <b>4a</b> e <b>4b</b> no edema em pata de camundongo induzido pela carragenina.....	42
5.5 Composto <b>4b</b> reduziu IL-1 $\beta$ e TNF- $\alpha$ no macerado do coxim plantar de camundongos após indução do edema pela carragenina.....	44
5.6 Aminoálcoois <b>4a</b> e <b>4b</b> reduziram a reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina.....	45
6 Discussão.....	48
7 Conclusão.....	52
Referências bibliográficas.....	53
ANEXO – Artigo publicado.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são constituídos pela imunidade inata, responsável pela proteção inicial contra infecções, e pela imunidade adquirida, que se desenvolve mais lentamente e é responsável pela defesa tardia e específica contra as infecções (RASMUSSEN, REINERT & PALUDAN, 2009). Células do sistema imune inato usam receptores de padrões para detectar e sinalizar a ocorrência de infecção microbiana, reconhecendo estruturas que são comuns a diversas classes de microrganismos e que não estão presentes nas células do hospedeiro (FOLCIK, AN & OROSZ, 2007). Estes sinais apresentam duas funções principais: iniciação de uma cascata inflamatória que ajuda a conter a infecção e ativação da resposta imune adaptativa. A resposta imune adaptativa consiste da expansão de clones de linfócitos antígenos-específicos, sendo um processo altamente eficiente e específico, mas que demora dias para o desenvolvimento completo (BARTON, 2008).

A inflamação ou processo inflamatório é uma resposta coordenada do organismo às infecções e danos teciduais. As principais células envolvidas na resposta inflamatória são representadas por basófilos, mastócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos e também pelos linfócitos B e T, principalmente T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2) e T helper 17 (Th17) (GALLEY & WEBSTER, 1996; BRUGIOLO et al., 2011; CASTRO et al., 2012). O macrófago é uma importante célula da resposta imune inata que participa do processo inflamatório, por meio da produção de mediadores inflamatórios, tais como, interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO), que estão relacionados com a ativação de células endoteliais, adesão, rolamento e extravasamento de leucócitos (BEUTLER, 1989; CASTELLHEIM, 2009; CASTRO et al., 2012).

A resposta imunológica insuficiente ocasiona risco de infecções graves (CASTARDO et al., 2008). Por outro lado, a reação inflamatória exagerada pode causar superprodução de mediadores inflamatórios que ocasionam danos e disfunções orgânicas, que envolvem febre intensa, erupção cutânea, risco de septicemia, falência múltipla dos órgãos e morte (NATHAN, 2002; SUNDERKOTTER, 2003; BARTON, 2008; DINARELLO, 2009; SIMS, 2010). Esta ampla intensidade da resposta inflamatória, além da morbidade e mortalidade, pode

ocasionar também doenças crônicas, como a artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn e Alzheimer (SEGAL et al., 2000; SAKAGUSHI, 2004; PARK, 2009). Desta forma ao mesmo tempo em que a resposta inflamatória deve ser rápida e destrutiva, ela também precisa ser controlada e auto limitada, sendo, portanto, necessário mecanismos capazes de regular esta resposta.

A inibição de mediadores inflamatórios e a regulação da resposta imune, através da atividade imunomoduladora, têm sido mostradas como resultados de tratamentos com aminoácidos (OLMO et al., 2006). Estudos anteriores mostraram, *in vitro*, que o tratamento com aminoácidos lipofílicos e aminoácidos ligados a carboidratos inibiram a produção de NO sem efeitos na viabilidade celular em linhagem de macrófagos J774.1 (REIS et al., 2008; CORREA et al., 2012;). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos imunomoduladores dos aminoácidos lipofílicos de cadeias longas em macrófagos primários inflamados de camundongos BALB/c e em macrófagos da linhagem RAW 264.7, ambos ativados, e *in vivo* nos modelos de edema em pata de camundongo BALB/c induzido por carragenina, e de reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESPOSTA IMUNE

O sistema imunológico é o sistema de defesa do organismo contra diferentes patógenos, e é composto pela resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra a invasão microbiana e representa uma resposta que pode ser ativada rapidamente (ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006). O sistema imunológico inato é formado pelo epitélio, que fornece barreiras físicas e químicas às infecções, pelas células presentes na circulação e nos tecidos, e por diversas proteínas plasmáticas (WOLOWCZUK et al., 2008). A resposta inflamatória inicial é usualmente aguda sendo caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular e infiltrado de células levando a formação de edema, resultando no extravasamento de fluidos e proteínas, e acúmulo de leucócitos no local da inflamação (POSADAS et al., 2004).

Células efectoras do sistema imune inato, como os neutrófilos, macrófagos, células natural killer (NK), e células dendríticas (DCs), possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem padrões estruturais que se repetem nos patógenos, e são chamados de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006; HALMAN, RAMET & EZEKOWITZ, 2001). Dentre os PRRs, os receptores do tipo "Toll-like" (TLR) se destacam pelo seu papel central na ligação de patógenos e iniciação da resposta inflamatória, esses receptores são específicos para diferentes componentes dos microrganismos (HALMAN, RAMET & EZEKOWITZ, 2001; IWASAKI & MEDIZHITOV, 2004). Um exemplo dos PAMPs são os lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina presente na parede celular das bactérias gram-negativas que são reconhecidas pelo TLR4, um dos tipos de TLR (HALMAN, RAMET & EZEKOWITZ, 2001; IWASAKI & MEDIZHITOV, 2004; ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006). A ativação dos PRRs por PAMPs induz a fagocitose, a liberação de citocinas inflamatórias e mediadores químicos, que levam à iniciação da resposta inflamatória, na tentativa de conter a infecção, e ativação da resposta imune adaptativa (HALMAN, RAMET & EZEKOWITZ, 2001).

Os macrófagos, assim como as células dendríticas e os linfócitos B, são potentes células apresentadoras de antígenos (APC) e grandes responsáveis pela modulação da resposta inflamatória, que ocorre por meio de fagocitose, lise intracelular, apresentação para as células efectoras e ativação da resposta imune (SCHEPETKIN & QUINN, 2006). Os monócitos que migram para os tecidos através do fluxo sanguíneo diferenciam-se em macrófagos, e sob influência das citocinas dependendo do tecido de fixação, recebem um nome específico, como osteoclastos no tecido ósseo, células de Kupffer no fígado, micróglia no sistema nervoso central, macrófagos alveolares nos pulmões e outros (SEBASTIAN et al., 2005).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental na iniciação da resposta imunológica através da sua capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, entre elas podemos destacar o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (WYNN, CHAWLA & POLLARD, 2013). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são citocinas envolvidas no desencadeamento de doenças inflamatórias tais como esclerose múltipla e o Parkinson, que são doenças neuro-degenerativas (LEAL et al., 2013).

O TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos ativados, e é um importante mediador inflamatório da resposta imune inata, promovendo o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para os locais da infecção atuando na estimulação das células endoteliais, estimulando a expressão de moléculas de adesão e a produção de quimiocinas (NIU, GUO & ZHOU, 2009). Com isso a inibição deste mediador é objetivo de vários estudos que utilizam novos compostos com potencial ação moduladora da resposta inflamatória (NIU, GUO & ZHOU, 2009). Entre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- $\alpha$  tem um importante papel na inibição da proliferação tumoral, uma vez que sua produção pode ser local ou sistêmica, afetando diretamente tanto o tumor em crescimento quanto em metástase, aumentando também respostas imunitárias contra células tumorais (KUNINAKA et al., 2000).

Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  também tem um importante papel em inúmeras doenças inflamatórias, incluindo doenças auto-imunes, onde a IL-1 $\beta$  é produzida na forma inativa denominada pro-IL-1 $\beta$ , e é ativada após a sua clivagem por proteases, onde uma das mais importantes é chamada caspase-1 (JOOSTEN et al., 2009).

Corrêa e colaboradores (2013) mostraram que derivados da 1,4-antraceno-9,10-diona, análogos da mitoxantrona, inibiram a produção da IL-1 $\beta$ , mas não inibiram a produção de TNF- $\alpha$ . Tais resultados sugeriram uma inibição da sinalização de IL-1 $\beta$  específico por uma via independente de NF- $\kappa$ B por estes

compostos, mostrando que apesar da via de sinalização intracelular e ação na resposta inflamatória serem similares, os mecanismos de síntese e regulação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  podem ser completamente diferentes.

Outro importante mediador na inflamação aguda é o óxido nítrico (NO), que é o principal mediador citotóxico das células imunes efetoras ativadas. É uma importante molécula reguladora do sistema imune, já que macrófagos e outros tipos celulares produzem ou respondem ao NO (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003). O NO é sintetizado pela ação de uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS), à partir do aminoácido L-arginina, que produz óxido nítrico e L-citrulina (GUZIK, KORBUT & ADAMEK-GUZIK, 2003), necessitando de dois cofatores, o oxigênio e o fosfato dinucleotídico adenina nicotinamida (NADPH) (ROBBINS & GRISHAM, 1997). O NO em condições fisiopatológicas se apresenta em três isoformas distintas de óxido nítrico sintase (NOS): endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) (POSADAS et al., 2004; HANDY & MOORE, 1998). Essas enzimas são ativadas de duas maneiras: eNOS e nNOS, que se apresentam em baixos níveis e são ativadas pelo aumento do influxo de cálcio, o que aumenta rapidamente a produção de NO. Entretanto, a enzima iNOS, que é ativada pelos macrófagos induzidos por citocinas, como por exemplo o TNF- $\alpha$  e interferon (IFN- $\gamma$ ) (MONCADA & HIGGS, 1991; HANDY & MOORE, 1998). A isoforma iNOS é a principal isoforma envolvida nas reações inflamatórias (COLEMAN, 2001).

Os principais efeitos do NO na fase inflamatória são: vasodilatação, atividade antimicrobiana, efeitos antiplaquetários e aumento da permeabilidade vascular (SCHWENTKER et al., 2002). O NO, além de desempenhar funções pró-inflamatórias como a vasodilatação, também possui ações antiinflamatórias regulando a inflamação, através da regulação da atividade funcional, desenvolvimento e destruição de muitos tipos celulares envolvidos na inflamação e imunidade, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células natural killer (BOGDAN, 2001).

O NO sob condições patológicas age na modulação tanto das reações agudas como crônicas da inflamação, ele também participa da defesa do organismo, e ainda atua como agente citotóxico às células tumorais (WILLEY, 2007; BOVE & VLIET, 2006). Sua citotoxicidade resulta da sua ação direta ou da reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório, o que pode causar em parte um dano tecidual (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003; TRIPATHI et al., 2007).

Os macrófagos e as células dendríticas também expressam receptores para IFN- $\gamma$ , que são produzidos primariamente pela ativação de linfócitos T CD4 ou CD8 e células natural killer (NK), sendo assim reconhecido como mediador da resposta imunológica inata e da adquirida (TAU & ROTHMAN, 1999).

Entre as atividades biológicas do IFN- $\gamma$ , a ativação dos macrófagos é uma das principais funções, tornando-os mais eficazes na destruição dos microrganismos fagocitados (MÜHL & PFEILSCHIFTER, 2003). O IFN- $\gamma$  induz a produção de várias substâncias pró-inflamatórias, como IL-12, IL-15, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e outros. De acordo com suas características funcionais e biológicas o IFN- $\gamma$  tem se mostrado importante em vários modelos de doenças inflamatórias e autoimunes, como por exemplo, diabetes mellitus, miastenia graves, glomerulonefrite, entre outras (MÜHL & PFEILSCHIFTER, 2003).

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente de parede celular de bactérias gram-negativas, que assim como o IFN- $\gamma$ , pode ativar diretamente as células inflamatórias (SOHN et al., 2012). O mecanismo de ativação dos macrófagos pelo LPS leva à biossíntese de diversos mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  e a IL-6 e co-estimula a produção de algumas moléculas necessárias para a resposta imune adaptativa (SMEDEGARD, CUI & HUGLIT, 1989).

A resposta imune inata é fundamental no desenvolvimento da resposta imune adaptativa subsequente (BARTON & MEDZHITOV, 2002). A resposta imune adaptativa é específica na defesa do hospedeiro contra patógenos, sendo necessária uma exposição prévia ao mesmo para desenvolver esta resposta. Neste tipo de imunidade estão envolvidos mecanismos celulares e moleculares (linfócitos T, linfócitos B, anticorpos/Imunoglobulinas) para reconhecimento específico do agente invasor, levando a geração da memória imunológica, que é a propriedade individual depois do contato com o antígeno pela primeira vez, conferindo a capacidade de responder melhor e mais rapidamente quando re-exposto a este mesmo antígeno (RASMUSSEN, REINERT & PALUDAN, 2009; ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006). O reconhecimento específico do agente invasor é baseado no rearranjo e expansão clonal de vasto repertório de receptores antígeno-específico expressos nos linfócitos B, responsáveis pela resposta humoral, através do reconhecimento de células B (BCR), e linfócitos T responsáveis pela resposta celular através do reconhecimento de células T (TCR). As respostas humorais mediadas pelas células B podem ser geradas contra vários tipos de antígenos da membrana



celular dos microrganismos e antígenos solúveis, já a maioria dos linfócitos T reconhece antígenos peptídicos dos microrganismos que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) às células do hospedeiro juntamente com as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (BARTON, 2008).

Vale ressaltar que os mecanismos de resposta imune inata e adaptativa são baseados no processo geral de reconhecimento antigênico, existindo diferença na natureza genética dos receptores e distinção do envolvimento dos dois tipos de respostas nos mecanismos de reconhecimento antigênico (WOLOWCZUK et al., 2008).

## **2.2 MODELOS ANIMAIS DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

### **2.2.1 MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGO BALB/C**

A caragenina é um polissacarídeo obtido de algas vermelhas da família das Rhodophyceae que possui aplicações farmacêuticas e são utilizadas freqüentemente na medicina experimental para testar agentes anti-inflamatórios (Zacharopoulos & Philips, 1997).

Em 1962 Winter e colaboradores descreveram inicialmente o modelo da indução de edema em pata utilizando ratos, e posteriormente outros autores passaram a utilizar também patas de camundongos (LEVY, 1969; DI ROSA, GIROUD & WILLOUGHBY, 1971). Desde então, o modelo de edema em patas de camundongos tem sido cada vez mais utilizado para testar novos compostos anti-inflamatórios, assim como os mecanismos envolvidos na inflamação (POSADAS et al., 2004).

O edema de pata de camundongo induzido por carragenina é um modelo de inflamação aguda que consiste de duas fases: a primeira, detectada em torno de uma hora, é chamada de fase rápida, com liberação de histamina, serotonina e bradicinina, a segunda fase é chamada de tardia, com os mediadores, cininas e prostaglandinas, liberados após duas e três horas respectivamente (VINEGAR, SHREIBER & HOGO, 1969; DI ROSA, GIROUD & WILLOUGHBY, 1971).

A resposta inflamatória aguda é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e infiltrado celular levando à formação do edema, como resultado do extravasamento de fluidos e proteínas, e acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório. A indução de edema em patas de camundongos pela carragenina é um modelo amplamente utilizado para testar a atividade antiinflamatória (POSADAS et al., 2004), onde a inflamação local ou sistêmica é associada com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (CUZZOCREA et al., 1999).

Bhattacharyya e colaboradores (2008) mostraram que a carragenina induz a ativação de NF- $\kappa$ B e a interleucina 8 (IL-8) em células epiteliais do intestinal humano, através de uma via de imunidade inata mediada pela proteína BCL10. Identificaram também que o receptor Toll-like 4 (TLR4) é um receptor de membrana que interage com carragenina, o que reforça a hipótese de que os efeitos da carragenina são atribuíveis a ativação de uma resposta inflamatória inata, imunomediada em colonócitos humanos.

Recentemente Liao e colaboradores (2013) apresentaram em seus estudos a importância do modelo de edema em patas de camundongos induzido pela carragenina para avaliar a atividade anti-inflamatória de novos compostos, como o *N*-(3-Fluorofenil) etilcafeamida, um composto sintético que foi capaz de modular a produção de COX-2, NO e TNF- $\alpha$  nos tecidos inflamados.

### **2.2.2 MODELO DE REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (RHT)**

O termo hipersensibilidade é usado para designar uma resposta imune adaptativa que ocorre de forma exagerada ou inapropriada. Essas reações de hipersensibilidade são expressões inadequadas de respostas imunes protetoras que algumas vezes resultam em reações inflamatórias e dano tecidual. As reações de hipersensibilidade podem ser de quatro tipos (I, II, III, IV), sendo que nenhum dos tipos se manifesta no primeiro contato com o antígeno. As do tipo I, II e III apresentam mecanismo humoral enquanto a do tipo IV apresenta mecanismo celular (ENSINA et al., 2009).

A hipersensibilidade tipo I ou imediata é um tipo de reação patológica causada pela liberação de mediadores liberados por mastócitos. A reação imediata é uma reação desencadeada pela produção de anticorpos IgE contra antígenos

ambientais inócuos e que se ligam nos mastócitos em diversos tecidos. A hipersensibilidade tipo II ou mediada por anticorpos citotóxicos, participam diretamente na lesão dos antígenos celulares ou teciduais predispondo-os a fagocitose ou lise. A hipersensibilidade tipo III ou mediada por imunocomplexo ocorre pela ligação de anticorpos humorais a antígenos solúveis, formando imunocomplexos, que podem depositar-se nos vasos sanguíneos em vários tecidos, atraindo neutrófilos, que produzem os danos ao tecido através da liberação de enzimas lisossomais e gerando radicais livres tóxicos. A hipersensibilidade Tipo IV ou tardia (RHT) são reações mediadas por linfócitos T, normalmente contra antígenos próprios ou antígenos exógenos associados a células e tecidos. É uma resposta imunológica não só à variedade de agentes microbiológicos intracelulares, particularmente *Mycobacterium tuberculosis*, mas também para muitos vírus, fungos, protozoários e parasitas. As dermatites de contato alérgicas e rejeição do enxerto também são exemplos de reação mediada por células (KOBAYASHI, KANEDA & KASAMA, 2001; ENSINA et al., 2009).

A RHT ou tipo IV é chamada tardia por ocorrer de 24 a 48 horas após o indivíduo imunizado ser desafiado com a proteína indutora. Este é o tempo gasto para as células T efetoras voltarem ao local de teste do antígeno, responderem ao antígeno neste local e induzirem uma reação detectável através da liberação de citocinas inflamatórias (DANNENBERG, 1991).

Em 1890, Robert Koch definiu a “reação tuberculínica”, como um tipo de Reação de Hipersensibilidade tardia (RHT), observando que os indivíduos infectados previamente com o *Mycobacterium tuberculosis*, ou vacinados, desenvolviam a resposta inflamatória localizada quando o filtrado derivado de cultura de micobactéria (PPD, proteína purificada derivada) era injetado intradermicamente (BARRETO, PEREIRA & FERREIRA, 2006) A inflamação granulomatosa é uma forma de hipersensibilidade do tipo tardia crônica, geralmente em resposta aos microrganismos persistentes, como o *Mycobacterium tuberculosis* (KOBAYASHI, KANEDA & KASAMA, 2001).

Faquim-Mauro e Macedo (1998) mostraram que proteínas de alto peso molecular extraídas do helminto *Ascaris suum* inibiu as RHT à OVA, além da proliferação celular e produção de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) e anticorpos (IgG, IgM, IgE), mostrando ações tanto em respostas imunes celulares, quanto humorais.

A reação de hipersensibilidade tardia é mediada por células e ocorre pela habilidade dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> da subpopulação T Helper 1 (T<sub>H</sub>1) de ativarem os macrófagos. (SPRINGER, 1995) Os macrófagos em conjunto com as células endoteliais, recrutam células inflamatórias e ativam a resposta imune adaptativa para reparar o dano tecidual causado, com infiltrado de células T e monócitos nos tecidos, edema e aumento da permeabilidade vascular em resposta às citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup>, desencadeando assim a RHT (APOSTOLOPOULOS et al., 2008, SUN et al., 2006). No processo inflamatório, as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , desempenham um importante papel, por estimularem a produção de quimiocinas e atração de células inflamatórias, incluindo macrófagos (TRINCHIERI, 1995).

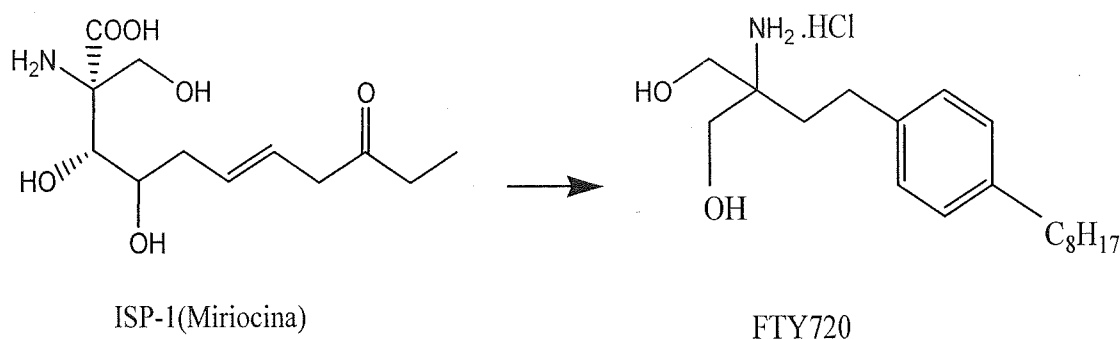
A RHT pode ser demonstrada na patogênese de muitas doenças infecciosas, tais como a tuberculose, lepra, toxoplasmose, leishmaniose, e outras, ocorrendo à presença de inflamação granulomatosa, calcificação, necrose, caseificação e formação de cavidades (DANNENBERG, 1991; PELLETIER et al., 2002).

### **2.3 OS AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS COMO POTENCIAIS AGENTES ANTI-INFLAMATÓRIOS**

Em 1991, GILMAN e colaboradores observaram que diferentes agentes farmacológicos poderiam ter uma importância terapêutica para várias patologias, pois apresentavam o potencial de interferir nas funções da resposta imune. Desde então as drogas anti-inflamatórias vêm sendo amplamente estudadas e empregadas ao longo de várias décadas no tratamento de várias patologias, o que tem despertado interesse também na elucidação dos efeitos farmacodinâmicos destas substâncias. Sabe-se que a reação inflamatória está presente em várias lesões produzidas no organismo humano, sejam por traumas, infecções, reações imunológicas e agentes externos, além dos processos auto-imunes que, em maior ou menor grau, são acompanhados de reações inflamatórias. (MEAGHER, WINES & COOPER, 2002).

Fujita e colaboradores, em 1989, isolaram um metabólito do caldo do fungo *Isaria sinclairii* chamado miriocina (ISP-1) (Figura 1) (HIROSE et al., 1996) e descreveram sua atividade imunossupressora, que era cinco vezes mais potente e

menos tóxico que a ciclosporina A, já utilizada comercialmente como droga imunossupressora em transplantes (FUJITA et al., 1995-A). Na continuidade dos trabalhos, Fujita e colaboradores (1995-B) estudaram a relação estrutura-atividade do ISP-1, concluindo que a presença de um grupo aminoálcool 2-alkil-2-aminoetanol e de uma cadeia longa de carbono eram necessários para a manutenção da atividade imunossupressora, desenvolvendo-se assim o composto FTY720 {Cloridrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]1,3-propanodiol} (ADACHI et al., 1995), que é atualmente comercializado como Gylena (Figura 1). O FTY720 possui uma porção alifática análoga aos aminoálcoois estudados neste trabalho.



**Figura 1.** Estruturas químicas do ISP-1 (miriocina) e do FTY720

(Fonte: DEL OLMO et al., 2006).

A lipofilicidade é uma característica importante para atividade de uma substância por promover maior difusão através das membranas biológicas aumentando assim a concentração intracelular do composto (POLKOWSKI et al., 2004). Com isso, novos aminoálcoois lipofílicos têm sido descritos como uma classe promissora de compostos com diferentes propriedades farmacológicas (SAIBABU KOTTI, TIMMONS & LI, 2006), antiparasitárias (GIORDANI et al., 2008; COSTA et al., 2009), antimicrobianas (TAVEIRA et al., 2007) e imunomoduladoras (OLMO et al., 2006; REIS et al., 2008). Estes trabalhos despertaram o interesse em avaliar a atividade anti-inflamatória de aminoálcoois lipofílicos de cadeia alifática longa, assim como a relação estrutura atividade baseada em modificações estruturais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a potencial atividade dos seis aminoálcoois lipofílicos de cadeia longa na modulação da resposta imune *in vitro* em macrófagos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos peritoneais primários inflamados de camundongos BALB/c, além da modulação da resposta imune *in vivo* nos modelos de indução de edema em pata de camundongos pela carragenina e reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com os aminoálcoois lipofílicos (**4a**, **4b**, **5**, **6**, **9** e **10**) na viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7;

- Quantificar a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em sobrenadantes de cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ , e tratados com os aminoálcoois lipofílicos (**4a**, **4b**, **5**, **6**, **9** e **10**);

- Avaliar o efeito do tratamento com os aminoálcoois (**4a** e **4b**) na viabilidade em macrófagos peritoneais primários inflamados de camundongos BALB/c;

- Quantificar a produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais primários inflamados estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ , e tratados com os aminoálcoois lipofílicos (**4a** e **4b**);

- Avaliar o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos BALB/c tratados com os aminoálcoois lipofílicos **4a** e **4b**;

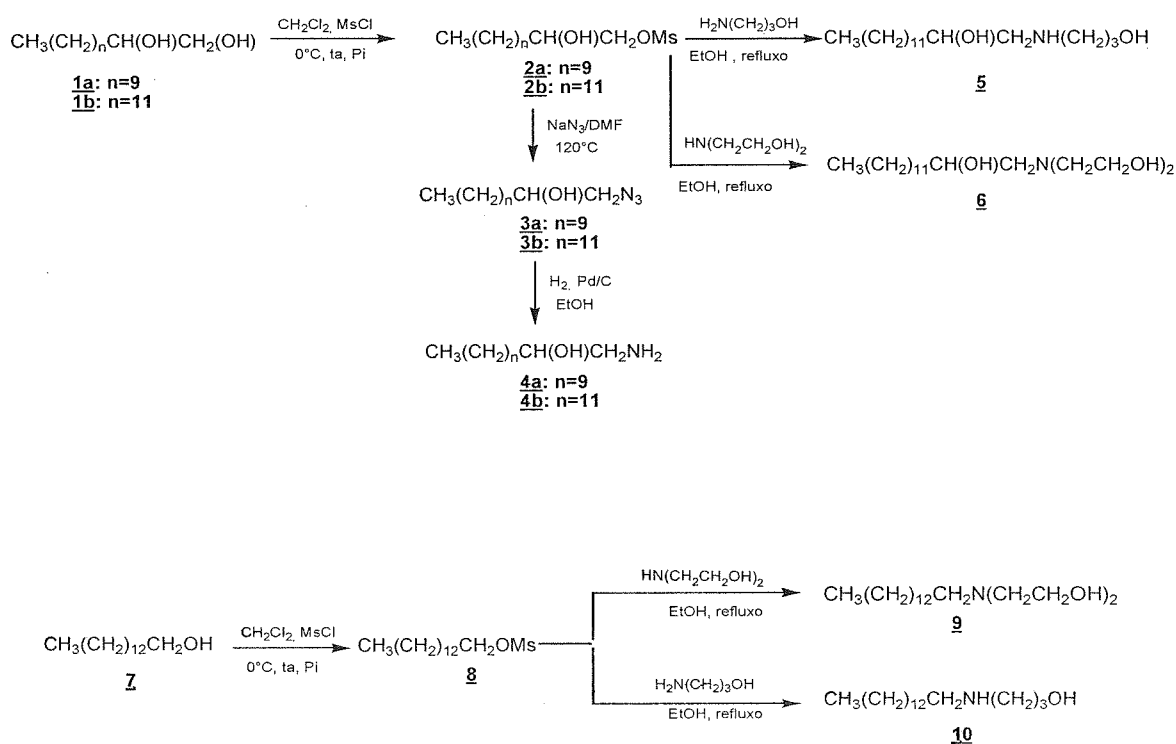
- Quantificar os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em macerado de coxim plantar de camundongos BALB/c, através da técnica de ELISA;

- Avaliar a reação de hipersensibilidade tardia à OVA em camundongos BALB/c tratados com os aminoálcoois lipofílicos **4a** e **4b**.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS AMINOÁLCOOS LIPOFÍLICOS

Os compostos foram sintetizados no Departamento de Química, no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como descrito previamente (REIS et al., 2008). A síntese dos aminoálcoois lipofílicos **4a**, **4b**, **5**, **6**, **9** e **10**, iniciou-se com a mesilação dos alcoóis **1a**, **1b** e **7** em piridina a 0°C, formando os intermediários **2a**, **2b** e **8** (esquema 1). Os compostos mesilados **2a** e **2b** foram tratados com azida de sódio em DMF (dimetilformamida) a 120°C, levando as monoazidas **3a** e **3b**, que foram hidrogenadas resultando nos aminoálcoois **4a** e **4b**. Os aminoálcoois **5**, **6**, **9** e **10** foram preparados pela reação dos intermediários **2** e **8** com dietanolamina e 3- amino- 1 – propanol, em etanol e refluxo por 24h sob agitação magnética. Todos os compostos foram purificados e caracterizados pela espectroscopia de Infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN de <sup>13</sup>C).



Esquema 1 – Síntese dos aminoálcoois lipofílicos **4a**, **4b**, **5**, **6**, **9** e **10**.

## 4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 E MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- $\gamma$

### 4.2.1 PREPARAÇÃO E DILUIÇÃO DOS AMINOÁLCOOIS PARA TESTES *IN VITRO*

Os compostos **4a**, **4b**, **5**, **6**, **9** e **10** sintetizados foram avaliados *in vitro*. Os mesmos foram diluídos inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO), e as diluições sucessivas foram feitas em meio RPMI – 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos essenciais e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco – Invitrogen, CA, USA). Os compostos foram testados nas concentrações finais de 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 0,05  $\mu\text{g/mL}$  e 0,005  $\mu\text{g/mL}$ .

### 4.2.2 LINHAGEM CELULAR E CULTURA MACRÓFAGOS RAW 264.7

Macrófagos RAW 264.7 ( $2 \times 10^5$  células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado com 2mM L-glutamina, 100  $\mu\text{g/mL}$  de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino (SFB), mantido a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos foram cultivados por 24 e 48 horas na presença ou ausência de aminoálcoois nas concentrações de 1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  e 0,005  $\mu\text{g/mL}$  e estimulados ou não com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$ ) e IFN- $\gamma$  (9 ng/mL) em triplicata. Foram realizadas culturas de: células estimuladas que não receberam tratamento com aminoálcoois lipofílicos, células estimuladas e tratadas com aminoálcoois lipofílicos, células não estimuladas e tratadas com aminoálcoois lipofílicos, células não estimuladas e não tratadas com aminoálcoois lipofílicos, e células não estimuladas tratadas com DMSO 1% (dilúente utilizado na dissolução dos aminoálcoois lipofílicos).

### 4.2.3 LINHAGEM CELULAR E CULTURA MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS

Macrófagos peritoneais primários inflamados de camundongos BALB/c foram adquiridos pela injeção intraperitoneal (i.p.) de 2,0 mL de tioglicolato (3%) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). Após três dias, os camundongos foram

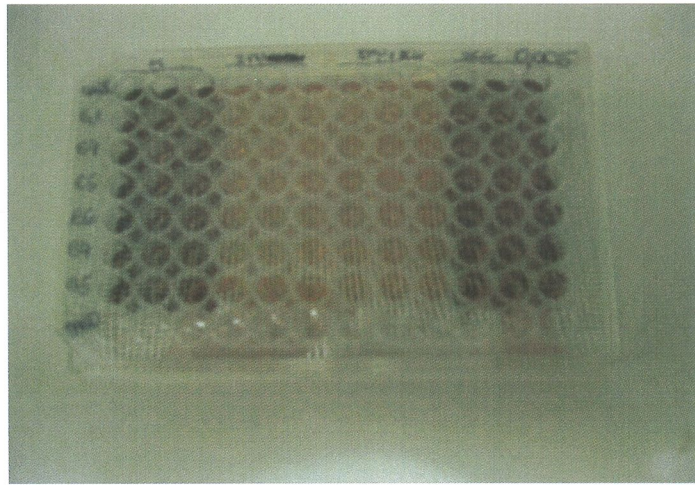


eutanasiados, a cavidade peritoneal lavada com 5 mL de solução salina tamponada gelada contendo 0,1% de soro albumina bovina e 20  $\mu\text{mol/L}$  de EDTA, o líquido foi coletado e procedeu a contagem das células obtidas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão por azul de trypan 0,4%. As células foram distribuídas ( $5 \times 10^5$  células/mL) em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado e mantidas a 37 °C em 5% de  $\text{CO}_2$ . Os macrófagos foram cultivados por 48 horas na presença ou ausência dos aminoácidos lipofílicos **4a** e **4b** nas concentrações de 1; 0,5; 0,05 e 0,005  $\mu\text{g/mL}$  e estimulados ou não com LPS (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e IFN- $\gamma$  (9 ng/mL) em quadruplicata. Foram testados apenas os compostos **4a** e **4b**, pois apresentaram melhor resultado na inibição de NO e TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos RAW 264.7.

Foram cultivadas: células estimuladas que não receberam tratamento com aminoácidos lipofílicos, células estimuladas e tratadas com aminoácidos lipofílicos **4a** e **4b**, células não estimuladas e tratadas com aminoácidos lipofílicos **4a** e **4b**, células não estimuladas e não tratadas com aminoácidos lipofílicos **4a** e **4b**, e células não estimuladas tratadas com DMSO 1% (dilúente utilizado na dissolução dos aminoácidos lipofílicos).

#### 4.2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS AMINOÁCIDOS LIPOFÍLICOS

A viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 e dos macrófagos primários foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (corante *Thiazol Blue Brometo de tetrazólio* - Sigma, St. Louis, MO, USA). Para o teste, após o tempo de cultura de 48 horas, os sobrenadantes da cultura celular não estimulada tratados com aminoácidos lipofílicos foram descartados e a seguir 100  $\mu\text{L}$  de RPMI foram adicionados em todos os poços contendo as células cultivadas por 48 horas, e posteriormente também foram acrescentados a cada poço 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL). A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ . Transcorrido o período de 4 horas a reação foi finalizada com o acréscimo de 100  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico acidificado com HCL 0,4% (Figura 2). A absorbância foi lida após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente a 570 nm (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (TEIXEIRA et al., 2005; ALVES et al., 2012). A viabilidade celular foi obtida em porcentagem em relação às células controle, pela fórmula (MAZZACCOLI, 2012): % viabilidade celular:  $100 \times (\text{OD cells+ compound} / \text{OD cells})$ .



**Figura 2.** Ensaio da viabilidade celular através do Método MTT.

#### 4.2.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pelo Método de Griess, no sobrenadante de 48 horas de cultura de macrófagos estimulados com LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IFN- $\gamma$  (9 ng/mL). Para realização do teste 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços, posteriormente foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de cloridrato de *N*-(1-naftil)-etilenodiamina, 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração de NO foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio. A absorbância medida a 540 nm. O *N*<sup>G</sup>-monometil-*L*-arginina (L-NMMA) foi utilizado como padrão positivo do controle da inibição. A porcentagem de inibição foi calculada em relação à inibição do L-NMMA e células apenas estimuladas.

#### 4.2.6 DOSAGEM DE CITOCINAS

As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram quantificadas pelo método de ELISA utilizando anticorpos e concentrações comercialmente disponíveis de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BD Biosciences

Pharmingen, San Diego, EUA). As dosagens de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram realizadas em sobrenadante após 24 horas de cultura. A leitura da reação foi feita a 450 nm.

### **4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AMINOÁLCOIS LIPOFÍLICOS NO MODELO *IN VIVO* DA INDUÇÃO DE EDEMA DE PATAS DE CAMUNDONGOS PELA CARRAGENINA**

#### **4.3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, com peso médio de 25 gramas, 06-08 semanas de idade e fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB/ UFJF, em estantes ventiladas (temperatura de 19-25°C). Os animais tiveram água e alimento "ad libitum". Todo experimento foi conduzido de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a Utilização de Animais de Laboratório". Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (Protocolo 012/2013).

#### **4.3.2 PREPARAÇÃO E UTILIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PARA TESTES *IN VIVO***

Os compostos **4a** e **4b** sintetizados no NUPEQ e a Dexametasona 2 mg comprimido, foram diluídos inicialmente em DMSO, e as diluições sucessivas foram feitas em PBS. Os compostos foram testados nas concentrações finais de 0,5 mg /Kg/dia (REIS et al., 2008).

#### **4.3.3 INDUÇÃO DO EDEMA EM PATA DE CAMUNDONGO ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO DE CARRAGENINA E O TRATAMENTO COM AMINOÁLCOIS LIPOFÍLICOS**

Inicialmente os camundongos foram pesados (26,57 $\pm$ 0,3 g), divididos em quatro grupos (n= 6 animais/grupo) e suas patas foram medidas com paquímetro (0h). Animais tratados com a dexametasona foram utilizados como controle positivo, pela conhecida atividade antiinflamatória (ABRAHAM et al., 2006). Trinta minutos antes da indução do edema nas patas dos camundongos os mesmos foram tratados

com PBS, dexametasona (0,5 mg/kg) ou aminoálcoois **4a** e **4b** (0,5 mg/kg) intraperitonealmente (100 µL). A carragenina (2,5%) foi dissolvida em PBS, e 20 µL injetado na pata esquerda, e 20 µL de PBS na pata direita de todo o grupo. As patas direitas e esquerdas foram medidas 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina, e a diferença entre as patas foi calculada. O edema induzido nas patas dos camundongos pela carragenina foi determinado pela fórmula:

[edema pata (mm)] = [medida pata injetada carragenina (mm) – medida pata de PBS (mm)].

Os camundongos foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6 animais/grupo):

- Grupo I: Induzido com carragenina e tratado com dexametasona
- Grupo II: Induzido com carragenina e tratado com aminoálcool **4a**
- Grupo III: Induzido com carragenina e tratado aminoálcool **4b**
- Grupo IV: Induzido com carragenina e sem tratamento

#### **4.3.4 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS DOS ANIMAIS**

Os camundongos foram eutanasiados sob anestesia e os coxins plantares das patas foram retirados e pesados. Os coxins plantares foram macerados como procede a seguir: 100 mg de tecidos foram homogeneizados em 1 mL de 0,4 M NaCl, 0,05% Tween20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA), contendo 0,5% de soro-albumina bovina - (BAS), 0,1M fluoreto de fenil-metanossulfonila - PMSF (Sigma), 0,1 M de cloreto de benzetônio - BC (Sigma), 10 mM de ácido etileno diamino tetracético - EDTA (Sigma) e 20 pM de aprotinina - AP (Sigma). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C e os sobrenadantes foram coletados e congelados a -70 °C.

#### **4.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA**

As concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram determinadas nos sobrenadantes dos macerados dos coxins plantares pelo método ELISA. Placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído em tampão específico conforme especificado no protocolo de instrução (BD Biosciences, Pharmigen, San Diego,

USA), incubadas “*over night*”, em seguida lavadas com PBS-Tween quatro vezes e bloqueadas com PBS-Soro Fetal por 1 hora. Após este período, as placas foram lavadas novamente e, em seguida, as amostras e os padrões de citocinas foram adicionados nos poços das placas. As placas foram então incubadas por 24 horas a 4°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o 2° anticorpo biotinilado acrescentado. A placa foi incubada por mais 1 hora à temperatura ambiente e mais quatro lavagens foram feitas e, após a colocação do conjugado enzimático, as placas foram incubadas por mais 1 hora. Transcorrido o tempo de 1 hora, a reação foi revelada pela adição do substrato e por fim bloqueada com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita em leitor de microplacas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas padrão, obtidas pelas diferentes concentrações dos respectivos recombinantes para IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA).

#### **4.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS AMINOÁLCOIS LIPOFÍLICOS NO MODELO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA (RHT) À OVA**

##### **4.4.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c (n=6), com peso médio de 25 gramas, 06-08 semanas de idade e fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB/ UFJF, em estantes ventiladas (temperatura de 19-25°C). Os animais tiveram água e alimento “*ad libitum*”. Todo experimento foi conduzido de acordo com os princípios do Código Brasileiro para a utilização de Animais de Laboratório. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da UFJF (Protocolo 020/2010).

#### 4.4.2 REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA E TRATAMENTO COM AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS

Cada animal foi imunizado com 0,2 mL de uma suspensão contendo Adjuvante de Freund (CFA) (Sigma Co., St Louis) e Ovalbumina (0,2 mg/ mL) (Grau V) (Sigma) emulsificados na base da cauda por via subcutânea (s.c.). A reação de hipersensibilidade tardia foi induzida no coxim plantar posterior esquerdo de todos os grupos de camundongos no oitavo dia após a imunização, através da inoculação de 30  $\mu$ L de suspensão contendo 600  $\mu$ g de OA agregada (Grau II) (Sigma). O controle de fidelidade foi feito administrando-se de maneira similar 30  $\mu$ L de salina no coxim plantar posterior direito.

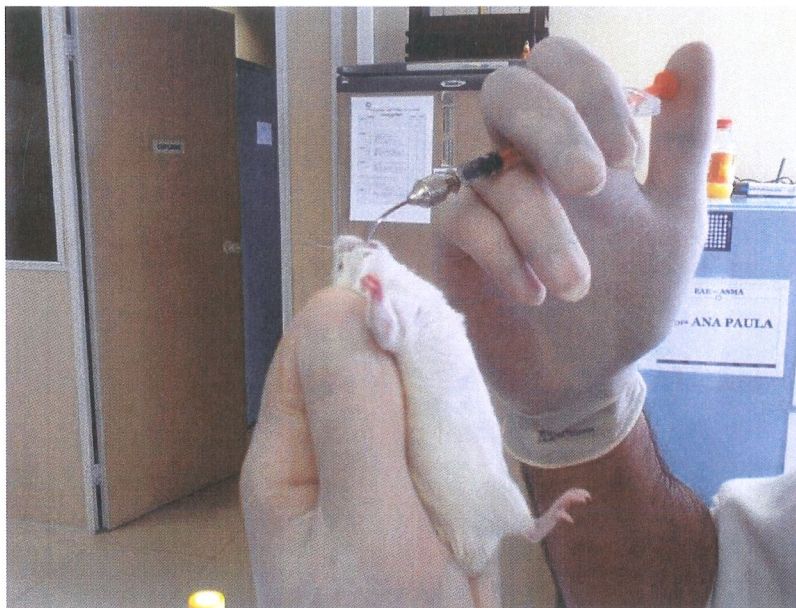
Os camundongos foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6 animais/grupo):

- Grupo I: Imunizado OVA e tratado com dexametasona
- Grupo II: Imunizado OVA e tratado com o aminoálcool **4b**
- Grupo III: Imunizado OVA e tratado com o aminoálcool **4a**
- Grupo IV: Imunizado OVA e não- tratado

O tratamento foi iniciado no dia seguinte à indução da RHT, por gavagem, e se estendeu até o 6º dia após a indução, considerando-se o dia da indução como dia 0 (Figura 3). A dexametasona e os aminoálcoois foram diluídos em PBS na concentração inicial de 0,1mg/mL. As gavagens foram feitas na concentração de 0,5mg/kg/dia em 100 $\mu$ L (Reis et al., 2008).

A intensidade da RHT foi expressa pela diferença de espessura das patas posteriores, medida em 24 e 48 horas após o desafio, com o auxílio do especímetro (Starret, Athol, MA) (Figura 4). Os resultados representaram a média de 6 animais por grupo mais ou menos erro padrão, expressos em unidades RHT, definida como a diferença de 0,01 mm na espessura das patas direita e esquerda de cada animal.





**Figura 3** Tratamento dos camundongos por gavagem.



**Figura 4** Medida da pata posterior do camundongo utilizando o especímetro.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados são representativos da média  $\pm$  erro-padrão de três experimentos independentes. A significância entre os grupos foi analisada utilizando Test "t" de Student, teste não paramétrico de Mann-Whitney ou twoway ANOVA (GraphPad Prism 5.00). As diferenças serão consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS NA VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE NO EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 E MACRÓFAGOS PERITONEAIS PRIMÁRIOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- $\gamma$

Os resultados obtidos nos experimentos *in vitro*, são representativos de três experimentos independentes. A verificação dos efeitos dos derivados na viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico de MTT após cultivo dos macrófagos por 48 horas. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que 100% dos compostos testados não foram citotóxicos nas linhagens de macrófagos RAW 264.7.

A avaliação do efeito dos aminoálcoois na liberação de NO por macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ , mostra que todos os compostos testados foram capazes de inibir a produção de NO pelos macrófagos RAW 264.7 em níveis semelhantes ao observado pelo padrão de inibição – LNMMA (Tabela 2).

Os macrófagos peritoneais primários tratados com os compostos **4a** e **4b** não apresentaram alteração na viabilidade celular (Tabela 3). Entretanto, quando os foram avaliados quanto à capacidade de inibição da liberação de NO nos macrófagos peritoneais, não houve uma inibição significativa em nenhuma das concentrações testadas (1  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,05  $\mu\text{g/mL}$  e 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 4).



**Tabela 1.** Porcentagem da inibição da viabilidade celular pelos aminoálcoois em macrófagos RAW 264.7 estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.

	Viabilidade Celular (%)			
	Concentrações			
Compostos	0,005 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
4 <sup>a</sup>	100	100	100	100
4b	100	100	100	100
5	100	100	100	86
6	100	100	100	87
9	100	100	100	85
10	100	100	100	100

<sup>b</sup> Concentração das drogas ( $\mu\text{g/mL}$ )

**Tabela 2.** Porcentagem da inibição da produção de óxido nítrico pelos aminoálcoois em macrófagos RAW 264.7 estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.

	Inibição de NO (%) <sup>a</sup>			
	Concentrações			
Compostos	0,005 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
4a	100	100	100	100
4b	100	100	100	100
5	100	100	100	86
6	100	100	100	87
9	100	100	100	85
10	100	100	100	100
L-NMMA	100%			

<sup>a</sup> A porcentagem de inibição foi calculada em relação a inibição obtida pelo LNMMA e as células estimuladas não tratadas. Os resultados foram calculados usando a fórmula  $100 - ((x_1 - A) / (x_2 - A)) * 100$ , considerando  $x_1$  e  $x_2$  a média da concentração de NO ( $\mu\text{M}$ ) nos poços contendo os derivados e as células estimuladas não tratadas, respectivamente. "A" corresponde a concentração de NO no sobrenadante dos poços tratados com LNMMA (100% de inibição).

<sup>b</sup> Concentração das drogas ( $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 3.** Porcentagem da inibição da viabilidade celular pelos aminoácidos em macrófagos peritoneais primários estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.

	Viabilidade Celular (%)			
	Concentrações			
	0,005 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
Compostos				
4a	100	100	100	100
4b	100	100	100	100

<sup>b</sup> Concentração das drogas ( $\mu\text{g/mL}$ )

**Tabela 4.** Porcentagem da inibição da produção de NO pelos aminoácidos em macrófagos peritoneais primários estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS.

	Inibição de NO (%) <sup>a</sup>			
	Concentrações			
	0,005 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
Compostos				
4a	nd	nd	nd	nd
4b	nd	nd	nd	nd
L-NMMA		100%		

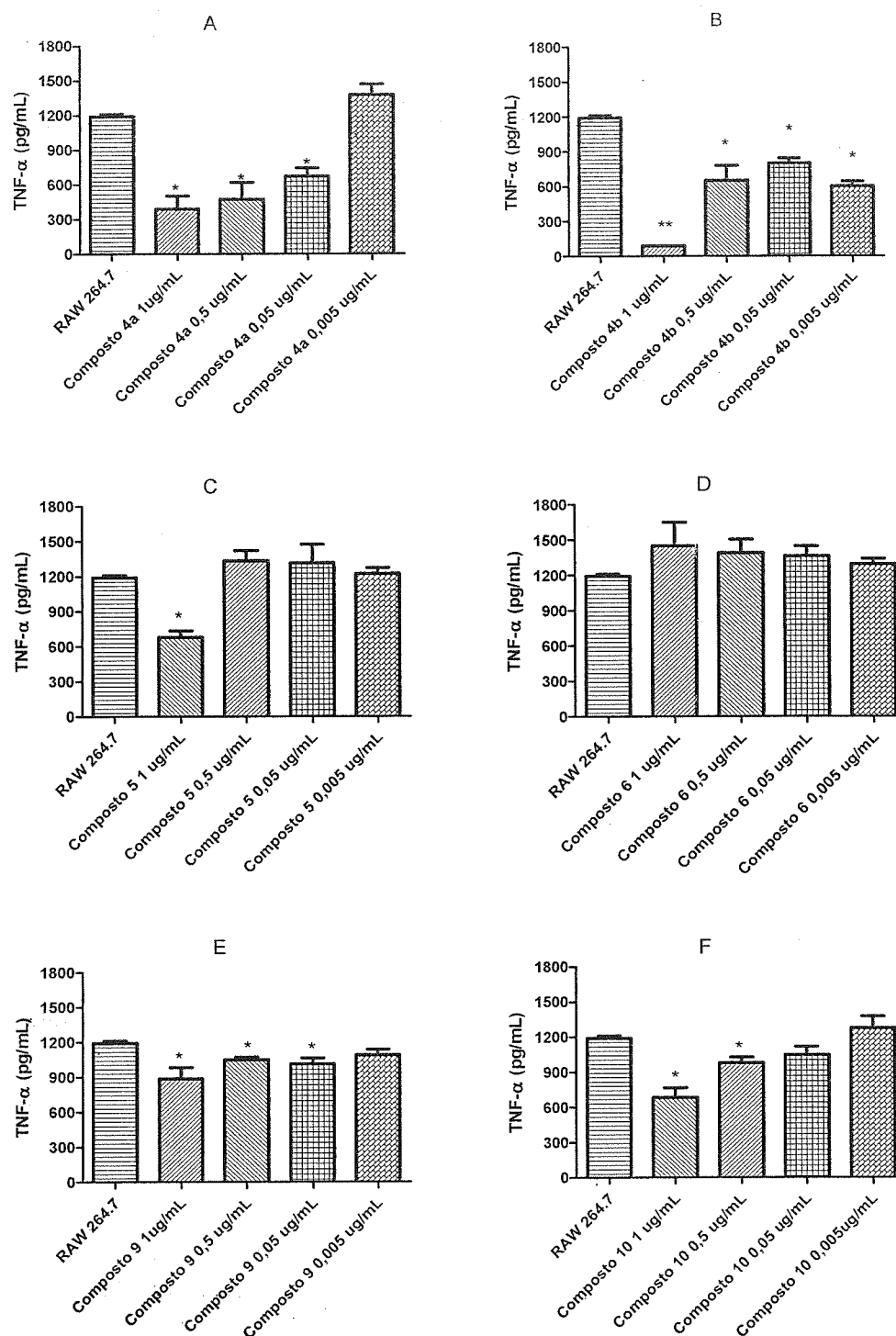
<sup>a</sup> A porcentagem de inibição foi calculada em relação a inibição obtida pelo LNMMA e as células estimuladas não tratadas. Os resultados foram calculados usando a fórmula  $100 - ((x_1 - A) / (x_2 - A)) * 100$ , considerando  $x_1$  e  $x_2$  a média da concentração de NO ( $\mu\text{M}$ ) nos poços contendo os derivados e as células estimuladas não tratadas, respectivamente. "A" corresponde a concentração de NO no sobrenadante dos poços tratados com LNMMA (100% de inibição).

nd, não diminuiu a produção de NO

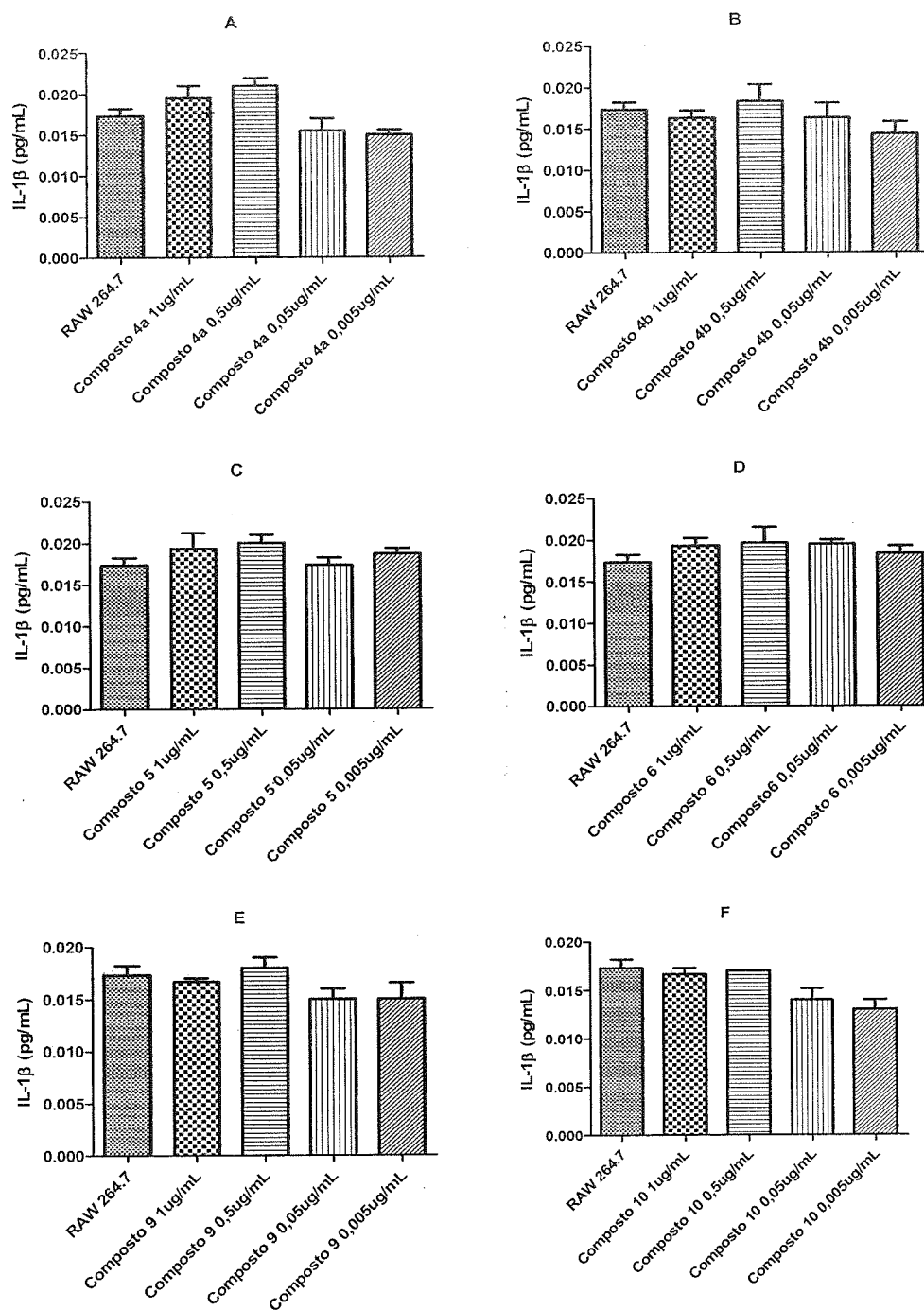
<sup>b</sup> Concentração das drogas ( $\mu\text{g/mL}$ ).

## 5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS DOS AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS NA PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ EM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS E IFN- $\gamma$

A avaliação do efeito modulatório dos aminoálcoois lipofílicos em IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  produzidos por macrófagos RAW 264.7, estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ , mostrou que o aminoálcool **4b** inibiu a produção de TNF- $\alpha$  em todas as concentrações testadas (1 $\mu$ g/mL; 0,5  $\mu$ g/mL; 0,05  $\mu$ g/mL e 0,005  $\mu$ g/mL) (Figura 5), assim como os aminoálcoois **4a** e **9** nas 3 maiores concentrações (1 $\mu$ g/mL; 0,5  $\mu$ g/mL e 0,05  $\mu$ g/mL). Entretanto, nenhum dos compostos testados foi eficiente na inibição de IL-1 $\beta$  (Figura 6).



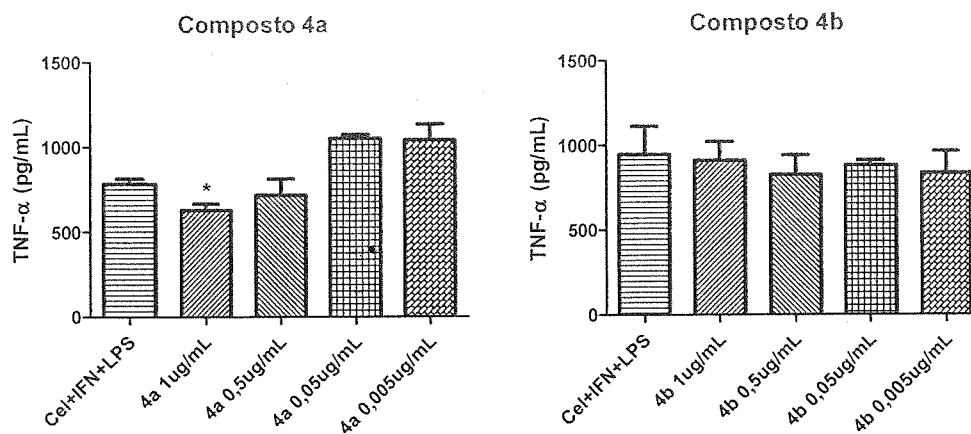
**Figura 5.** Produção de TNF- $\alpha$  por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos RAW 264.7 ativados com 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS e 9ng/mL IFN- $\gamma$ , cultivados por 24 horas na presença de uma série de diluições (1  $\mu\text{g/mL}$  a 0,005  $\mu\text{g/mL}$ ) de aminoálcoois lipofílicos: Composto 4a (A); composto 4b (B); composto 5 (C); composto 6 (D); composto 9 (E) e composto 10 (F). Sobrenadantes foram coletados para dosar a produção de TNF- $\alpha$ . \* $p < 0,05$  quando comparados a células estimuladas e não tratadas (RAW 264.7). Dados são representativos de três experimentos independentes.



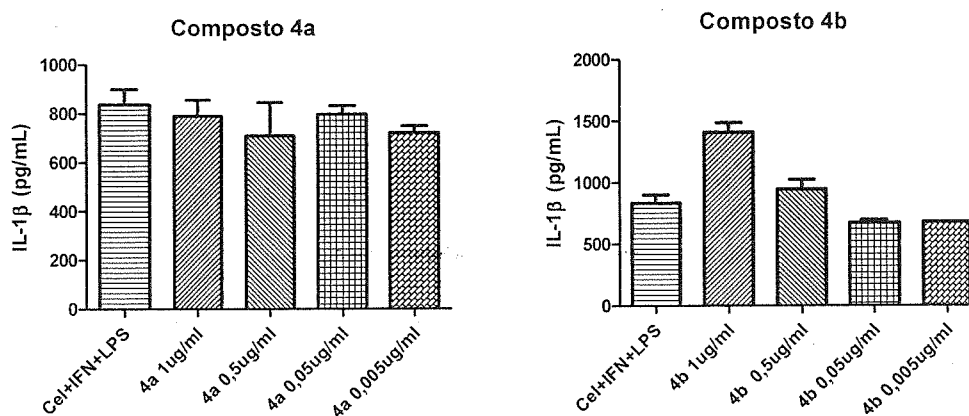
**Figura 6.** Produção de IL-1 $\beta$  por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos RAW 264.7 ativados com 10  $\mu$ g/mL de LPS e 9ng/mL IFN- $\gamma$ , cultivados por 24 horas na presença de uma série de diluições (1  $\mu$ g/mL a 0,005  $\mu$ g/mL) de aminoálcoois lipofílicos: Composto 4a (A); composto 4b (B); composto 5 (C); composto 6 (D); composto 9 (E) e composto 10 (F). Sobrenadantes foram coletados para dosar a produção de IL-1 $\beta$ . \* $p < 0,05$  quando comparados a células estimuladas e não tratadas (RAW 264.7). Dados são representativos de três experimentos independentes.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS DERIVADOS DOS AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS 4a e 4b NA PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ EM LINHAGEM DE MACRÓFAGO PERITONEAIS PRIMÁRIOS ESTIMULADOS COM LPS E IFN- $\gamma$

Os compostos **4a** e **4b** foram escolhidos para serem submetidos à avaliação do efeito modulatório em macrófagos primários por não terem apresentado citotoxicidade e por diminuírem a produção de NO e TNF- $\alpha$  em macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os resultados mostraram que apenas o composto **4a**, na concentração 1  $\mu\text{g/mL}$ , diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  (Figura 7). Entretanto, nenhum dos dois compostos foi eficiente na inibição de IL-1 $\beta$  em nenhuma das concentrações testadas (Figura 8).



**Figura 7.** Produção de TNF- $\alpha$  por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos primários ativados com 10  $\mu$ g/mL de LPS e 9ng/mL IFN- $\gamma$ , cultivados por 24 horas na presença de uma série de diluições (1  $\mu$ g/mL a 0,005  $\mu$ g/mL) dos aminoálcoois lipofílicos **4a** e **4b**. Sobrenadantes foram coletados para dosar a produção de TNF- $\alpha$ . \* $p < 0,05$  quando comparados a células estimuladas e não tratadas (RAW 264.7). Dados são representativos de três experimentos independentes.



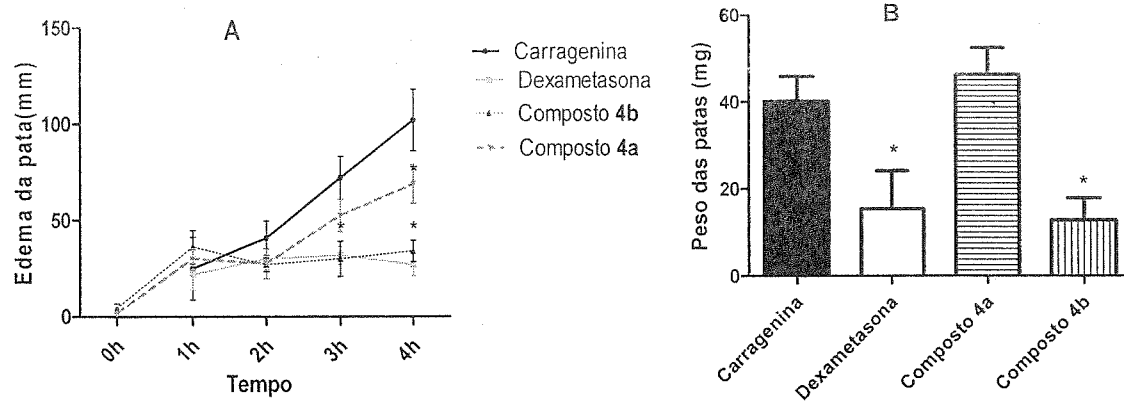
**Figura 8.** Produção de IL-1 $\beta$  por aminoálcoois lipofílicos em macrófagos primários ativados com 10  $\mu$ g/mL de LPS e 9ng/mL IFN- $\gamma$ , cultivados por 24 horas na presença de uma série de diluições (1  $\mu$ g/mL a 0,005  $\mu$ g/mL) de aminoálcoois lipofílicos: Composto 4a e composto 4b. Sobrenadantes foram coletados para dosar a produção de IL-1 $\beta$ . \* $p < 0,05$  quando comparados a células estimuladas e não tratadas. Dados são representativos de três experimentos independentes.

#### 5.4 EFEITO DOS AMINOÁLCOOIS 4a E 4b NO EDEMA EM PATA DE CAMUNDONGO INDUZIDO PELA CARRAGENINA

Os aminoálcoois **4a** e **4b** foram escolhidos para serem testados no edema de pata de camundongo induzido pela carragenina por não terem sido citotóxicos e terem apresentado inibição de NO e de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7. Sinais clínicos de toxicidade não foram observados imediatamente, durante ou pós- período de tratamento. Ambos compostos, na concentração de 0,5mg/Kg, mostraram efetiva redução no edema de patas de camundongos induzido pela carragenina comparado ao grupo que recebeu apenas PBS como tratamento. O aminoálcool **4b** mostrou redução no edema da pata similar ao grupo que recebeu dexametasona (0,5mg/Kg) (Figura 9-A).

Depois de 4 horas de indução do edema, os coxins plantares foram removidos e pesados. O grupo tratado com o aminoálcool **4b** mostrou redução do peso dos coxins plantares comparados ao grupo controle (carragenina), e redução similar quando comparado ao grupo que recebeu dexametasona (Figura 9-B).

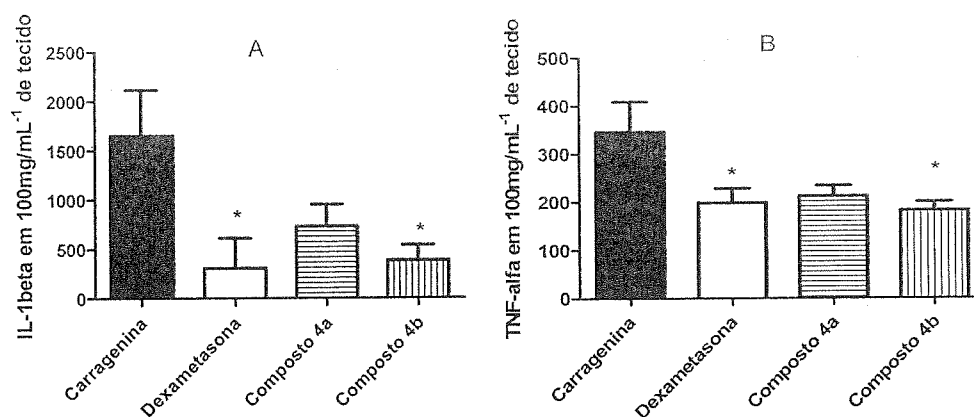




**Figura 9** Edema induzido pela carragenina em patas de camundongos Balb/c machos ( $n=6$ /grupo), tratados intraperitonealmente ( $100 \mu\text{L}$ ) com PBS (Grupo Carragenina), compostos **4a** e **4b** ( $0,5 \text{ mg/Kg}$ ) ou dexametasona ( $0,5 \text{ mg/Kg}$ ), 30 minutos antes da indução do edema da pata pela carragenina. [Pata edema (mm)] = [medida pata da carragenina (mm)] – [medida pata de PBS (mm)] foram monitoradas por 4 horas. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo carragenina (A). Após 4 horas, os camundongos foram eutanasiados, os coxins plantares foram removidos e pesados. Cada barra representa a média aritmética  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo da carragenina e ao grupo da dexametasona (B). Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

## 5.5 COMPOSTO 4b REDUZIU OS NÍVEIS DE IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ NO MACERADO DO COXIM PLANTAR DE CAMUNDONGOS APÓS INDUÇÃO DO EDEMA PELA CARRAGENINA

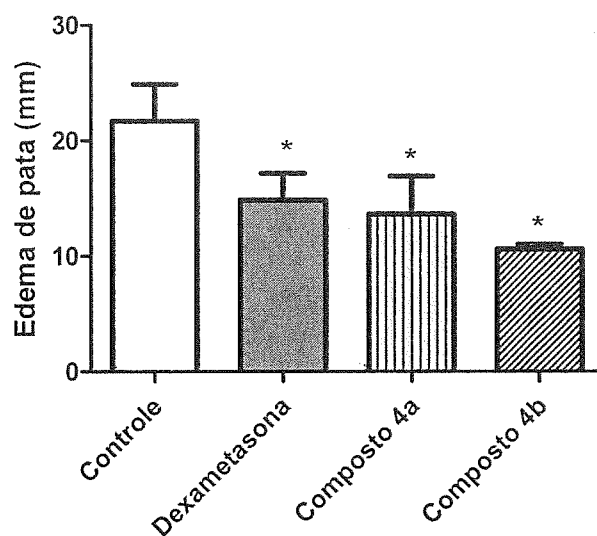
O grupo controle carragenina mostrou um aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias, IL-1 $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B), quantificadas no sobrenadante do macerado do coxim plantar de camundongos após 4 horas de indução do edema inflamatório. O aminoálcool **4a** não induziu a diminuição de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ . Os animais tratados com dexametasona apresentaram uma diminuição de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , quando comparados ao controle positivo de carragenina. O tratamento com o aminoálcool **4b** (0,5 mg/Kg) também mostrou efeito inibitório de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  comparado ao grupo da carragenina, e efeito similar quando comparado ao grupo da dexametasona (Figura 10).



**Figura 10** Avaliação das citocinas IL-1 $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) no sobrenadante do macerado de coxins plantares de camundongos após serem removidos e pesados. Cada barra representa a média aritmética  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo carragenina. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

## 5.6 AMINOÁLCOOIS 4a E 4b REDUZIRAM A REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA À OVALBUMINA

Foi avaliada a ação dos aminoálcoois **4a** e **4b** (0,5mg/mL) na reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina. A figura 11 mostra que os grupos tratados com os aminoálcoois **4a** e **4b**, assim como o grupo tratado com a dexametasona, reduziram a espessura da pata do camundongo quando comparados ao grupo controle (OVA) (Figura 11).



**Figura 11** Reação de hipersensibilidade tardia a ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c (n=6). Os camundongos foram imunizados com OVA grau V (dia 0) e desafiados com OVA grau II agregada após 6 dias da imunização (dia 7). Os camundongos foram tratados por gavagem (100  $\mu$ L), do dia 1 ao dia 6 após a imunização, com PBS (controle), compostos **4a** e **4b** (0,5 mg/Kg) ou dexametasona (0,5 mg/Kg). A RHT foi medida após 48h do desafio (dia 9). A amplitude da resposta RHT foi determinada pela fórmula: [Edema pata (mm) = [valor medida pata de OVA (mm)] - [valor medida pata de PBS (mm)]]. Cada barra representa a média aritmética  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo não tratado (controle). Dados são representativos de 3 experimentos independentes.

## 6 DISCUSSÃO

Os aminoálcoois lipofílicos são compostos cuja síntese vem sendo descrita por diversos autores em função das diferentes atividades biológicas que os mesmos têm apresentado, tais como: imunomossupressoras (OLMO et al., 2006; REIS et al., 2008), antiparasitárias (COIMBRA et al., 2010), antimicrobianas (TAVEIRA et al., 2007) dentre outras. Tripathi e colaboradores (2002) sintetizaram aminoálcoois derivados da D-galactose, cuja principal diferença entre os mesmos estava no tamanho da cadeia alifática. Estes compostos foram utilizados no tratamento contra várias espécies de *Mycobacterium*, inclusive o *M. tuberculosis*, e demonstraram possuir atividade antituberculose e antifúngica.

O fato dos aminoálcoois possuírem uma cadeia carbônica longa os tornam mais lipofílicos, e esta lipofilicidade é uma característica importante para atividade de um composto por promover maior difusão através das membranas biológicas aumentando a concentração intracelular do composto (POLKOWSKI et al., 2004). O presente estudo investigou os efeitos do tratamento com aminoálcoois lipofílicos de cadeia longa na modulação da resposta imune, através da avaliação em linhagens de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos primários, estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ , e também através dos modelos de edema de pata induzida pela carragenina e o modelo de RHT à OVA em camundongos.

Na resposta imune, os macrófagos atuam como APCs, potencializando a ativação de linfócitos T e linfócitos B pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas pro-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO) (SOHN et al., 2012).

Neste estudo inicialmente foram avaliados *in vitro* os efeitos dos seis aminoálcoois lipofílicos na viabilidade celular de células da linhagem RAW 264.7, sendo que nenhum dos compostos apresentou citotoxicidade. Avaliou-se também o efeito destes aminoálcoois na produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por macrófagos da linhagem RAW 264.7 e também em macrófagos primários (4a e 4b), ativados com LPS e IFN- $\gamma$ . Os resultados mostraram diferentes efeitos na produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Em macrófagos da linhagem RAW 264.7 houve inibição da produção de NO e de TNF- $\alpha$  na maioria dos aminoálcoois testados, em contraste com a IL-1  $\beta$  que

não sofreu nenhuma inibição. Já em macrófagos primários, não houve inibição da produção de NO e IL-1 $\beta$ , ocorrendo a inibição de TNF- $\alpha$  apenas na concentração 0,5  $\mu$ g/mL pelo aminoálcool **4a**. Este perfil de modulação diferente entre as citocinas envolvidas na inflamação tem sido relatado em vários trabalhos na literatura para outras substâncias com atividade anti-inflamatória (HART, 1988; WONG, 1998; BERG et al., 1999; KAWAI et al., 2000; WANG et al., 2001; CORRÊA et al., 2013).

Kawai e colaboradores (2000) compararam a produção de citocinas em macrófagos das linhagens J774.1, RAW 264.1 e macrófagos primários, estimulados com L-ornitina (OLs), L-serina-glicina (SGL) e LPS. O OLs e LPS induziram a ativação e produção de TNF- $\alpha$ , que é dependente da via CD14, mas não induziram a produção de IL-1 $\beta$  na linhagem de macrófagos J774.1. Isto sugere diferentes mecanismos de ativação de macrófagos entre a produção de TNF- $\alpha$  e de IL-1 $\beta$ , e que portanto, OL e LPS não foram capazes de ativar o sinal de transdução de geração de IL-1 $\beta$  nos macrófagos J774.1.

Wong e colaboradores (1998) estudaram *in vitro* uma micotoxina chamada vomitoxina (VT), avaliando sua capacidade de aumentar a expressão do gene de várias citocinas associadas com a ativação dos macrófagos RAW 264.7. Os autores observaram que ocorreu um aumento na produção de TNF- $\alpha$  na presença de VT quando estimulados ou não por LPS, entretanto houve um aumento de IL-6 apenas com o estímulo LPS. Por outro lado, não houve de IL-1 $\beta$  na presença ou ausência de LPS.

Derivados lipofílicos da genisteína também mostraram diferentes efeitos moduladores quando testados em macrófagos da linhagem J774.A1, onde ocorreu inibição da produção de IL-12 e NO, provavelmente pela via NF- $\kappa$ B, sem haver inibição de TNF- $\alpha$ , o que pode ter ocorrido por uma via independente da via NF- $\kappa$ B (CASTRO et al., 2012).

Neste trabalho, após os estudos *in vitro*, foi feita a escolha dos aminoálcoois **4a** e **4b** para o tratamento de camundongos Balb/c no modelo de indução de edema em pata de camundongo pela carragenina e também no modelo de reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina. Tal escolha ocorreu em função dos aminoálcoois **4a** e **4b** não terem apresentado citotoxicidade e terem diminuído a produção de NO e de TNF- $\alpha$ , na maioria das concentrações testadas.

O modelo da indução de edema em pata de camundongos induzido por carragenina é um teste amplamente utilizado para determinar a atividade anti-

inflamatória de diferentes compostos (POSADAS et al., 2004). A carragenina desencadeia uma reação inflamatória inicialmente aguda, acompanhada de vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteína (plasma) e migração das células, principalmente os neutrófilos, para o local da lesão, assim como aumento da produção de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido (FRANZOTTI et al., 2000; SOHN et al., 2012).

Liao e colaboradores (2012) mostraram a atividade anti-inflamatória de constituintes da *Cinnamomum cassia* em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e através do modelo de indução de edema em patas de camundongos pela carragenina, onde houve a inibição da produção de NO, TNF- $\alpha$ , e prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o tratamento com o aminoálcool **4b** inibiu o edema de pata em camundongo, induzido pela carragenina, quando comparados ao grupo controle (PBS), e apresentou redução similar ao grupo da dexametasona. A dexametasona é um anti-inflamatório esteroide que inibe a fosfolipase A e a consequente expressão dos mediadores derivados do metabolismo do ácido araquidônico, tanto os gerados pela via das ciclooxigenases, como os gerados pela via das lipoxigenase, tais como as prostaglandinas e os leucotrienos, respectivamente (BECKER et al., 2004).

Ainda neste modelo o aminoálcool **4b** além de ter reduzido o edema da pata de camundongo, mostrou também efeito modulador na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , no sobrenadante do macerado dos coxins plantares dos camundongos, após 4h da indução da inflamação pela carragenina. Com relação ao aminoálcool **4a**, este não induziu a diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sugerindo melhor efeito imunomodulador do composto **4b**, o que pode ter ocorrido por sua maior cadeia alifática, o que confere maior lipofilicidade ao composto. Corrêa e colaboradores (2010) mostraram que a capacidade de inibição da produção de NO por aminoálcoois lipofílicos ligados a carboidratos, está relacionada à característica lipofílica destes compostos.

Neste trabalho foi utilizado também o modelo de reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina para verificar a ação anti-inflamatória dos aminoálcoois **4a** e **4b**. A reação de hipersensibilidade tardia é desencadeada por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, nas quais podem ocorrer a lesão tecidual por macrófagos ativados e células inflamatórias, ou a lise celular mediada pelo linfócito T citolítico (CTLs). Desenvolve-



se uma reação do tipo IV, quando o antígeno ativa linfócitos T sensibilizados, e essas células que são, geralmente, uma subpopulação de Linfócitos T auxiliar, Th1, podendo as células T citotóxicas estarem envolvidas. A ativação das células T resulta na secreção de várias citocinas, como por exemplo a IL-2 e o TNF- $\alpha$  (ASKENASE & VAN LOVEREN, 1983; ALLEN, 2013).

Estudos anteriores demonstraram a capacidade de outros aminoálcoois lipofílicos, com estruturas químicas semelhantes, de reduzirem a inflamação na reação de hipersensibilidade do tipo tardia à OVA (REIS et al., 2008). Neste trabalho o tratamento com os aminoálcoois **4a** e **4b** mostrou agir reduzindo, assim como a dexametasona, a reação de hipersensibilidade tardia à ovalbumina, quando comparados aos grupos controle e tratados com a dexametasona, demonstrando a ação anti-inflamatória destes dois aminoálcoois.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem potencial atividade anti-inflamatória para os aminoálcoois **4a** e **4b**, com destaque para o aminoálcool **4b**, em função de sua maior atividade moduladora relacionada às citocinas e a redução do edema de patas nos modelos da carragenina e de reação de hipersensibilidade tardia, o que acredita-se ter relação com uma maior lipofilicidade deste composto. Porém estudos de mecanismos moleculares são necessários para esclarecer melhor as vias de ação destes aminoálcoois.

## 7 CONCLUSÃO

- Os aminoálcoois lipofílicos testados, **4a**, **4b**, **5**, **6**, **9** e **10**, não alteraram a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 e inibiram a produção de NO em sobrenadantes de cultura de macrófagos RAW 264.7, assim como o TNF- $\alpha$ , principalmente nas concentrações mais elevadas. Porém nenhum dos aminoálcoois inibiu a produção de IL- 1 $\beta$ ;

- Os aminoálcoois **4a** e **4b** não alteraram a viabilidade celular de macrófagos primários, e não inibiram a produção de NO e IL-1 $\beta$  em sobrenadantes de cultura de macrófagos primários. O aminoálcool **4a**, na maior concentração testada, 1  $\mu$ g/mL, inibiu a produção de TNF- $\alpha$ ;

- O aminoálcool **4b** apresentou ação semelhante à dexametasona na redução do edema de pata de camundongo BALB/c induzido pela carragenina, na redução do peso dos coxins plantares, e na indução à diminuição da produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL- 1 $\beta$  em sobrenadante de macerado de patas de camundongos;

- Os aminoálcoois **4a** e **4b** apresentaram diminuição da espessura da pata no modelo da reação de hipersensibilidade tardia.

Portanto os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o aminoálcool **4b** foi capaz de reduzir a produção de mediadores inflamatórios e foi promissor em conter a resposta inflamatória em ambos os modelos *in vivo*, com resultados semelhantes aos da dexametasona, o que sugere um possível potencial anti-inflamatório. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para completar a avaliação deste composto e confirmar o seu potencial terapêutico nas doenças inflamatórias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.M. et al. Anti-inflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specific city phosphatase 1. **Journal Experimental Medicine**, v.203, p. 1883-1889, 2006.

ADACHI, K. et al. Design, synthesis, and structure- activity relationships of 2-substituted- 2- amino- 1,3-propanediols: discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n.8, p. 853-856,1995.

ALLEN, I.C. Delayed-type hypersensitivity models in mice. **Methods in Molecular Biology**, v.1031, p. 101-107, 2013.

ALVES, C.C.S. et al. Anthraquinone derivative O, O'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. **International Immunopharmacology**, v.14, p.127-132, 2012.

APOSTOLOPOULOS, J. et al. The cytoplasmic domain of tissue factor in macrophages augments cutaneous delayed-type hypersensitivity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 902-911, 2008.

ASKENASE, P.W., VAN LOVEREN, M., Delayed type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen specific T-cell factors initiates cascade of cellular interactions. **Immunology Today** , v. 4, p. 259-264, 1983.

BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M.; FERRERIA, A.A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. S45-S54, 2006.

BARTON, G.M.; MEDZHITOV, R. Control of adaptative immune resposes by Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, Review. v. 14, p. 380-383, 2002.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413-420, 2008.

BECKER et al. Pantoprazole treatment does not invoke anti-inflammatory properties in vivo. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1051-1057, 2004.

BERG et al. Role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in experimental arthritis: separate activity of interleikin  $1\beta$  in chronicity and cartilage destruction. **Annals of the Diseases**, v. 58, p. 140-148, 1999.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 625-655, 1989.

BHATTACHARYYA, s. et al. Toll-like receptor 4 mediates induction of Bcl10-NF  $\kappa$ B-IL-8 inflammatory pathway by Carrageenan in human intestinal epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 16, p.10550-10558, 2008.

BOGDAN, C. Nitric Oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BOVE, P.F.; VLIET, A.V.D. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 515-527, 2006.

BRUGIOLO et al. Effects of aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* on the immune response in ovalbumin-induced pulmonary allergy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 106, p. 481-488, 2011.

CASTARDO, J.C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.

CASTELLHEIM, A. et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, p. 479-491, 2009.

CASTRO, S.B.R. et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- $\alpha$  in activated J774a.1 cells. **Chemical Biology & Drug design**, v. 79, p. 347-352, 2012.

CASTRO, S.B.R. et al. Immunomodulatory effects and improved prognosis of experimental autoimmune encephalomyelitis after O-tetradecanoyl-genistein treatment. **International Immunopharmacology**, v. 12, p. 465-470, 2012.

COIMBRA, E. et al. Synthesis and Antileishmanial Activity of Lipidic Aminoalcohols. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 75, p. 233-235, 2010.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1397-1406, 2001.

CORRÊA, T.A. et al. Preparation of amino alcohols condensed with carbohydrates: evaluation of cytotoxicity and inhibitory effect on NO production. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 76, p. 451-456, 2010.

CORRÊA, T.A. et al. Synthesis of 1,4-Anthracene-9,10-dione Derivatives and Their Regulation of Nitric Oxide, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in Activated RAW264.7 Cells. **Chemical Biology & Drug Design**, p.1-5, 2013.

COSTA, C.F. et al. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 40-42, 2009.

CUZZOCREA, S. et al. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 5094-5104, 1999.

DANNENBERG, A.M. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in pathogenesis of tuberculosis. **Immunology Today**, v. 12, p. 228-233, 1991.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519-550, 2009.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carragenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ENSINA, et al. Reações de hipersensibilidade a medicamentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 32, n. 2, p. 42-47, 2009.

FOLCIK, V.A.; AN, G.C.; OROSZ, C.G. The Basic Immune Simulator: Na agent-based model to study the interactions between innate and adaptive immunity. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 4, n. 39, p 1-18, 2007.

FAQUIM-MAURO, E.L.; MACEDO, M.S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 114, n. 2, p. 245-251, 1998.

FRANZOTTI, E.M. et al., Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 273-277, 2000.

FUJITA, T. et al. Simple compounds, 2- alkyl- 2- amino- 1,3- propanediols have potent immunosuppressive activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 8, p. 847-852, 1995.

FUJITA, T. et al. 2- substituted 2- aminoethanol: minimum essential structure for immunosuppressive activity of ISP-1 (Myriocin). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n.16, p. 1857-1860, 1995.

GALLEY, H.F.; WEBSTER, N.R. The immuno- inflammatory cascade. **British Journal of Anesthesia**, v. 77, p. 11-16, 1996.

GILMAN, A.G. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1232 p, 1991.

GIORDANI, R.B. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity IF synthetic lipophilic butanediamine and aminoalcohol derivates. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 63, n. 8, p. 613-617, 2008.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HALMAN, M; RAMET, M.; EZEKOWITZ, R. A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. **Pediatric Research**, v. 50, n. 3, p. 315-321, 2001.

HANDY, R.L.; MOORE, P.K. A comparison of the effects of L-NAME, 7NI, and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1119-1126, 1998.

HART et al. Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 5, p. 1516-1521, 1988.

HIROSE, R. et al. 2- aminoalcohol immunosuppressant: structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 22, p. 2647-2650, 1996.

IWASAKI, A; MEDZHITOV, R. Toll like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

KAWAI, Y. et al. Ornithine- containing lipids stimulate CD14-dependent TNF- $\alpha$  production from murine macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 cells. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 197-203, 2000.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of Delayed- Type Hypersensitivity. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, p. 241-245, 2001.

KUNINAKA S. et al. Direct influences of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha, IL-6) on the proliferation and cell-surface antigen expression of cancer cells. **Cytokine**, v. 12, p. 8-11, 2000.

JOOSTEN L.A., et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, p. 3651-3662, 2009.

LEAL M.C. et al. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? **Front Cell Neurosci**, v. 7, n. 53, p. 1-10, 2013.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.

LIAO, J.G. et al. Anti-Inflammatory Activity of N-(3-Fluorophenyl)ethylcaffeamide in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15199-15211, 2013.

MAZZOCOLI, L. et al. Novel thalidomide analogues from diamines inhibit proinflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, p. 323-329, 2012.

MEAGHER, L.J.; WINES, N.Y.; COOPER, A.J. Atopic dermatitis: Review of immunopathogenesis and advances in immunosuppressive therapy. **Australasian Journal Dermatology**, v. 43, p. 247-254, 2002.

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

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Endogenous nitric oxide: physiology pathology and clinical relevance. *European Journal Clinical Investigation*, v. 21, p. 361-374, 1991.

MÜHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *International Immunopharmacology*, v. 3, n. 9, p. 1247-1255, 2003.

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

NIU Y.L., GUO Z., ZHOU R.H. Up-regulation of TNF-alpha in neurons of dorsal root ganglia and spinal cord during coronary artery occlusion in rats. *Cytokine*, v. 47, p. 23-29, 2009.

OLMO, E.D. et al. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 8, p. 113-118, 2006.

PARK, M.Y.; KNOW, H.J.; SUNG, M.K. Evaluation of Aloin and Aloe-Emodin as anti-inflammatory agents in Aloe by using murine macrophages. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 73, p. 828-832, 2009.

PELLETIER, R.P. High Incidence of Donor-Reactive Delayed-Type Hypersensitivity Reactivity in Transplant Patients. *American Journal of Transplantation*, v. 2, p. 926-933, 2002.

POLKOWSKI, K. et al. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic genistein glycosides against human cancer cell lines. *Cancer Letters*, v. 203, p. 59-69, 2004.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 331-338, 2004.

RASMUSSEN, S.B.; REINERT, L.S.; PALUDAN, S.R. Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 117, n. 5-6, p. 323-337, 2009.

REIS, E.F.C. et al. Synthesis and immunosuppressive activity of lipophilic amino alcohols and diamines. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 72, p. 596-598, 2008.

ROBBINS, R.A.; GRISHAM, M.B. Nitric Oxide. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 29, n. 6, p. 857-860, 1997.

ROBERTSON, C.M.; COOPERSMITH, C.M. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes and Infection*, v. 8, p. 1382-1389, 2006.

SAIBABU KOTTI, S.R.S., TIMMONS, C.; LI, G. Vicinal diamino functionalities as privileged structural elements in biologically active compounds and exploitation of their synthetic chemistry. **Chemical Biology Drug Design**, v. 67, p. 101-114, 2006.

SAKAGUSHI, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 531-562, 2004.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317-333, 2006.

SEBASTIAN, C. et al. MacrophAging: A cellular and molecular review. **Immunobiology**, v. 20, p. 121-126, 2005.

SEGAL, B.H. et al. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. **Medicine**, v. 79, p. 170-200, 2000.

SCHWENTKER, A. et al. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric Oxide**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2002.

SIMS, J.E.; SMITH, D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 89-102, 2010.

SMEDEEGARD, G.; CUI, L.X.; HUGLI, T.E. Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. **American Journal of Pathology**, v. 135, n. 3, p. 489-497, 1989.

SOHN, K.H. et al. Bojesodok-eum, a herbal prescription, ameliorates acute inflammation in association with the inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated nitric oxide and proinflammatory cytokine production. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual Review Physiology**, v. 57, p. 827-872, 1995.

SUN, J.B. et al. Sublingual Tolerance Induction with Antigen Conjugated to Cholera Toxin B Subunit Induces Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells and Suppresses Delayed-Type Hypersensitivity Reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, p. 251-259, 2006.

TAU, G.; ROTHMAN, P. Biologic functions of the IFN- $\gamma$  receptors. **Allergy**, v. 54, p. 1233-1251, 1999.

TAVEIRA, A.F. et al. Preparation and antitubercular activities of alkylated aminoalcohol and their glycosylated derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7789-7794, 2007.

TEIXEIRA, M. et al. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. **Journal of Drug Targeting**, v. 13, p. 129-135, 2005.



TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 251-276, 1995.

TRIPATHI, R. P. et al. Synthesis of glycosylated  $\beta$ -amino acids as new class of antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 773-777, 2002.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammation reactions. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 443-452, 2007.

VINEGAR, R.; W. SHREIBER; HOGO, R. Biphasic development of carrageenin oedema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96-103, 1969.

ZACHAROPOULOS, V. R.; PHILLIPS, D. M. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.4, p. 465- 468, 1997.

WANG, H. et al. Differential regulation of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  RNA expression by MEK1 inhibitor after focal cerebral ischemia in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, p. 869-874, 2001.

WILLEY, J.W. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 9, p. 541-544, 2007.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOLOWCZUK, I. et al. Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2008, p. 1-19, 2008.

WONG, S.S. et al., Modulation of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  secretion and mRNA expression by the trichothecene vomitoxin in the RAW 264.7 murine macrophage cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 409-419, 1998.

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

## ANEXO

### ARTIGO PUBLICADO

LIPOPHILIC AMINO ALCOHOLS REDUCES CARRAGEENAN-INDUCED PAW EDEMA AND ANTI-OVA DTH IN BALB/C MICE.

REIS EFC, CASTRO SBR, ALVES CCS, OLIVEIRA EE, CORREIA TA, ALMEIDA MV, FERREIRA AP.

INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY 17, P 727-732. 2013.

DOI INFORMATION: 10.1016/J.INTIMP.2012.08.017



## Lipophilic amino alcohols reduces carrageenan-induced paw edema and anti-OVA DTH in BALB/c mice

Elaine F.C. Reis<sup>a</sup>, Sandra B.R. Castro<sup>b</sup>, Caio Cesar S. Alves<sup>b</sup>, Erick E. Oliveira<sup>b</sup>, Tais A. Corrêa<sup>a</sup>, Mauro V. Almeida<sup>a</sup>, Ana Paula Ferreira<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 May 2013

Received in revised form 12 August 2013

Accepted 27 August 2013

Available online 11 September 2013

#### Keywords:

Amino alcohol

Anti-inflammatory

TNF- $\alpha$

IL-1 $\beta$

Nitric oxide

Paw edema

### ABSTRACT

The inflammation process is a coordinated response of the organism related to immune response with release of pro-inflammatory substances, as nitric oxide, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In this work, a series of lipophilic amino alcohols were evaluated on RAW264.7 and primary macrophages for the modulation of nitric oxide and TNF- $\alpha$ . The most potent compounds were submitted to the treatment of BALB/c mice and evaluation of the carrageenan-induced paw edema and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  release in the paws and anti-OVA delayed type hypersensitivity reaction. RAW264.7 and primary macrophages were incubated in the presence of amino alcohols at different concentrations (1, 0.5, 0.05 and 0.005  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). All tested compounds were not cytotoxic, however the inhibition of NO and TNF- $\alpha$  were observed only in RAW264.7 cultures. The NO production were reduced in 100% for all compounds, but only the compounds 4a and 4b expressively reduced the TNF- $\alpha$  release (67% and 92% respectively). On the carrageenan-induced paw edema, the compound 4b treatment showed reduction of edema, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  as efficient as dexamethasone treatment. Meanwhile, the compound 4a treatment showed only slight reduction of paw edema. In the anti-OVA DTH reaction, both compounds showed reduction in the paw edema as effective as dexamethasone. In function of the observed results *in vitro* and in the acute and anti-OVA inflammation of mice paw edema compound 4b showed promissory anti-inflammatory properties.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The activation of macrophages is related to the production of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and nitric oxide, being major role in the establishment of inflammation [1]. Inflammatory processes are associated with the development of innumerable chronic diseases, such as rheumatoid arthritis, encephalomyelitis and inflammatory bowel disease [2]. Thence, the down-modulation of the inflammatory mediators can be valuable to prevent the beginning of these chronic diseases [3].

Nitric oxide (NO) is produced through the iNOS (inducible nitric oxide synthase) activity on L-arginine in macrophages activated by LPS and inflammatory cytokines like IFN- $\gamma$  [4]. Activated macrophages also produce IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and both cytokines are involved with the activation of endothelial cells, adhesion, rolling and extravasate of leucocytes [5,6]. However, overproductions of these inflammatory mediators are related with extensive fever, cutaneous eruption and arthritis [7,8].

The inhibition of inflammatory mediators and the immune response regulation, through immunosuppression activity, has been showed as

results of amino alcohols treatment [9–11]. Recent studies showed that *in vitro* treatment with lipophilic amino alcohols and their sugar derivatives inhibited the production of NO without cytotoxicity [9,11]. Taking into consideration the promising activity of these compounds, the aim of this study was evaluate the activity of long chains lipophilic amino alcohols on the carrageenan-induced paw edema and anti-OVA delayed type hypersensitivity.

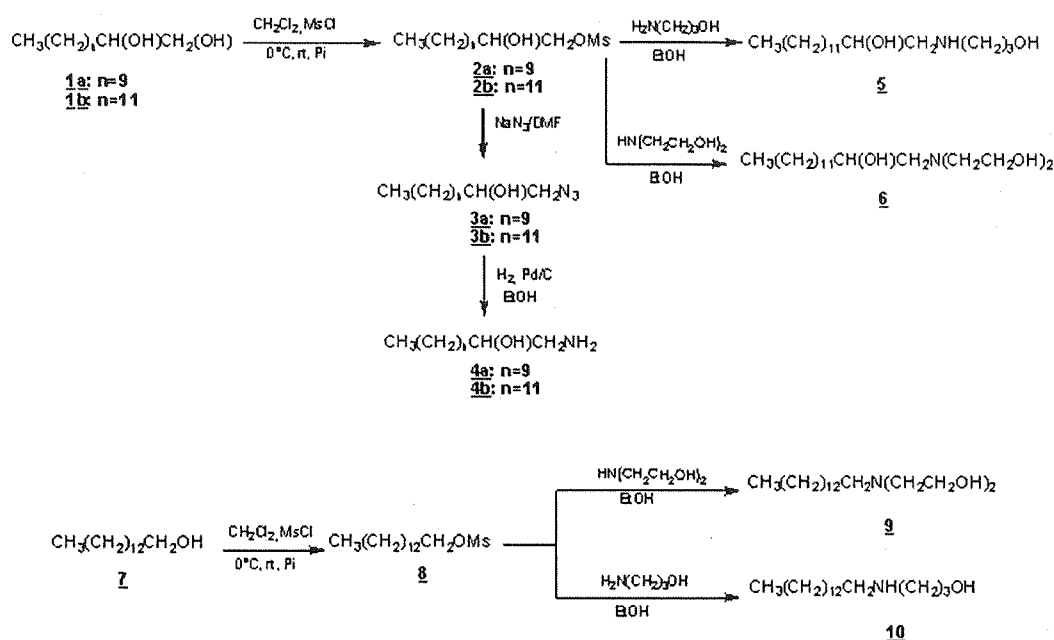
### 2. Materials and methods

#### 2.1. Chemical compounds

The tested compounds were prepared as previously described [11]. The synthesis of the lipophilic amino alcohols 4a, 4b, 5, 6, 9 and 10, initiated with the mesylation of alcohols 1a, 1b and 7 in pyridine at 0 °C, leading to intermediates 2a, 2b and 8 (Scheme 1). The mesylated compounds 2a and 2b were treated with sodium azide in DMF (dimethylformamide) at 120 °C, leading to monoazide 3a and 3b, which were hydrogenated giving the amino alcohols 4a and 4b. The amino alcohols 5, 6, 9 and 10 were prepared by reaction of the intermediates 2 or 8 with diethanolamine or 3-amino-1-propanol, in ethanol at reflux. All compounds were purified and characterized by Infrared, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy.

\* Corresponding author at: Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil. Tel./fax: +55 32 21023214.

E-mail address: [ana.paula@ufjf.edu.br](mailto:ana.paula@ufjf.edu.br) (A.P. Ferreira).



Scheme 1. Preparation of lipophilic amino alcohols [11].

## 2.2. Culture of RAW 264.7 and primary macrophages

RAW 264.7 cells were maintained in supplemented RPMI-1640 (2 mM L-glutamine, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of streptomycin and penicillin and 5% fetal bovine serum) at 37 °C in a humidified atmosphere in 5%  $\text{CO}_2$ . Peritoneal macrophages of naïve mice were isolated by intraperitoneal injection of 2.0 mL of sterile 3% thioglycollate (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA). After 3 days, mice were sacrificed; the peritoneal cavity was rinsed with 5 mL ice-cold PBS containing 0.1% BSA and 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  disodium EDTA. Cell viability, by trypan blue exclusion, was > 95%. Cells were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Cells were incubated at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$  in the presence of amino alcohols at different concentrations (1, 0.5, 0.05 and 0.005  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). After one hour of incubation, the cells were stimulated with 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  LPS (Sigma, 0111:B4 Chemical Co., St. Louis, MO) and 9 ng  $\text{mL}^{-1}$  IFN- $\gamma$ . After 24 or 48 hours, the supernatant were collected and frozen at -20 °C until assayed to analyze NO production (48 h) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (24 h).

## 2.3. Cell viability – MTT assay

Cell viability was measured using the MTT test [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] in non-stimulated cell cultures. After 48 hours of culture the supernatant was removed and the cells were incubated with 100  $\mu\text{L}$  of supplemented RPMI medium and 10  $\mu\text{L}$  of MTT (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) for 4 h at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ . The reaction was stopped by adding to each well 100  $\mu\text{L}$  of an acidic isopropanol solution (100 mL of isopropyl alcohol/0.4 mL of HCl 10 N). Following 10 min of incubation at room temperature, the optical density (OD) values at 570 nm were determined (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) [12,13]. The viable cell number was expressed as a percentage relative to control cells [14]: % viability:  $100 \times [1 - (\text{OD cells} + \text{compound} / \text{OD cells})]$ .

## 2.4. Griess method – NO production

Supernatants from 48 h of RAW 264.7 or primary macrophages culture were analyzed for the production of nitrites through the Griess

method. Aliquots of supernatants were plated 1:1 with 1% of sulfanilamide and 0.1% of *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine. The NO production was measured by comparing with a standard curve, made with different concentrations of  $\text{NaNO}_2$ . The reading was measured in the micro plate reader (Spectramax 190; Molecular Devices) at 540 nm wavelength [1]. The inhibition percentage was calculated in relation to control cell stimulated (LPS and IFN- $\gamma$ ). The results were calculated using the formula  $100 - ((x1 / x2) \times 100)$ , considering x1 and x2 the mean concentration of NO ( $\mu\text{M}$ ) in wells with treatment (x1) and with stimulated cells not treated (x2).

## 2.5. Animals

Male BALB/c mice 6–8 weeks old ( $n = 6$  per group) were obtained from the animal care facilities of the Federal University of Juiz de Fora (UFJF) and maintained in micro isolator cages. All procedures were in accordance with the principles of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals and were approved by the committee on the use of laboratory animals from UFJF (Protocol n° 019/2010, Protocol n° 012/2013). The mice were monitored for clinical signs of toxicity after the treatments.

## 2.6. Induction of acute response inflammatory by carrageenan-induced paw edema

Initially the mice ( $n = 6$  per group) were weighed ( $26.57 \pm 0.3$  g) and their right and left paws were measured with a pachymeter (0 h). Dexamethasone was used as positive control treatment due its anti-inflammatory activity [15]. 30 Minutes before induction of edema in the paw, PBS, dexamethasone (0.5 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) or the tested amino alcohols (0.5 mg  $\text{kg}^{-1}$ ) were administered intraperitoneally (100  $\mu\text{L}$ ). Carrageenan (2.5%) was dissolved in PBS, and 20  $\mu\text{L}$  injected into the left footpad, and 20  $\mu\text{L}$  of PBS into the right footpad of all groups. The left and the right paws were measured after 1, 2, 3 and 4 h after the injection of carrageenan and the difference were calculated. The magnitude of the carrageenan-induced paw edema was determined as follows: [Paw edema (mm)] = [footpad thickness of Carrageenan (mm)] – [footpad thickness of PBS (mm)].

After the last measurement time, the mice were euthanized under anesthesia (i.p.) and the paws were removed and weighed. The inflamed footpad tissue were macerated as following procedure; one hundred mg of tissues were homogenized in 1 mL of 0.4 M NaCl, 0.05% tween 20 (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, USA), containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), 0.1 M phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 0.1 M benzethonium chloride, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 20 kIU mL<sup>-1</sup> aprotinin (Sigma). The supernatants were collected to determine the concentration of TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$ .

### 2.7. Cytokine production

TNF- $\alpha$  level in the supernatants from 24 h of RAW 264.7 or primary macrophages culture and IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  level in the supernatants of macerated footpad tissue after induction of inflammation by carrageenan were determined by ELISA, as described by the manufacturer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The reaction was stopped with sulfuric acid (1 mol L<sup>-1</sup>). The plates were read at 450 nm using a microplate reader (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### 2.8. Induction of anti-OVA delayed-type hypersensitivity reaction

The DTH reaction used OVA, a protein that can be used with or without adjuvant as an antigen to sensitize laboratory animals. DTH was induced by immunization with OVA (Sigma). Briefly, mice ( $n = 6$  per group) were injected at the tail base with 200  $\mu$ L of 1 mg mL<sup>-1</sup> OVA grade V, emulsified 1:1 with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Sigma) (immunization). Mice were daily orally (100  $\mu$ L) treated with PBS (CONTROL), dexamethasone (0.5 mg kg<sup>-1</sup>) or the tested amino alcohols (0.5 mg kg<sup>-1</sup>) during 6 days. After treatment period, their footpads were injected with 30  $\mu$ L of 20 mg mL<sup>-1</sup> OVA grade II (challenge). Animals were injected with an equal volume of phosphate-buffered saline (PBS) into another footpad as a control. Forty-eight hours after challenge, footpad thickness was measured with a pachymeter (Starret). The magnitude of the DTH response was determined as follows: [Paw edema (mm) or DTH units] = [footpad thickness of OVA (mm)] – [footpad thickness of PBS (mm)].

### 2.9. Statistics

Results are representative of three independent experiments and were presented as the mean  $\pm$  SEM. The significance of differences between groups was analyzed using a Student's *t*-test, Mann-Whitney test, or two-way ANOVA (Graph Pad Prism 5.00) when appropriate. The differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Compounds 4a, 4b and 9 reduced TNF- $\alpha$ production in vitro

Cell viability of RAW 264.7 or primary macrophages cultures were evaluated by a MTT colorimetric assay for all compounds and none of the compounds displayed changes in the viability of cell in the tested concentrations (data not shown). In addition, all amino alcohols decreased the NO production (100% inhibition) in RAW 264.7 cultures, however in primary macrophages the inhibition were not observed (data not shown).

The supernatants of RAW 264.7 culture were analyzed for the quantification of TNF- $\alpha$  (Fig. 1A–F). The compounds 4a, 4b and 9 showed significant inhibitory effect on TNF- $\alpha$  production in the three highest concentrations (Fig. 1A, B and E). Only the compound 6 not reduced TNF- $\alpha$  production at least in the 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> concentration (Fig. 1D). In primary macrophages cultures were not observed inhibition of TNF- $\alpha$  production after treatment (data not shown).

### 3.2. Amino alcohols 4a and 4b reduced carrageenan-induced mice paw edema

The amino alcohols 4a and 4b were chosen to be used as treatment on carrageenan-induced mice paw edema due its better inhibition of TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cell cultures. Clinical signs of toxicity were not observed immediately or during the post treatment period. Both compounds showed effective reduction of paw edema of mice compared to Carrageenan group who received only PBS treatment (Fig. 2A). The amino alcohol 4b showed better reduction of edema, similar to dexamethasone (Fig. 2A).

After 4 h of induction of edema the paws were removed, weighed, and the treatment with amino alcohol 4b showed potent reduction of the paws weight compared to Carrageenan group, similar to dexamethasone (Fig. 2B).

### 3.3. Compound 4b reduced IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ in macerate paws of mice after carrageenan-induced edema

As shown in Fig. 2, the amino alcohol 4b showed significant inhibitory effect, compared to Carrageenan group, on the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  (Fig. 2C) and TNF- $\alpha$  (Fig. 2D) detected in the supernatants of macerated paws of mice after 4 h of induction of inflammatory edema by carrageenan.

### 3.4. Amino alcohols 4a and 4b reduced anti-OVA DTH

The amino alcohols 4a and 4b were chosen to be used as treatment on delayed-type hypersensitivity mice paw edema. Both compounds showed effective reduction of paw edema of mice compared to CONTROL who received only PBS treatment (Fig. 3).

## 4. Discussion

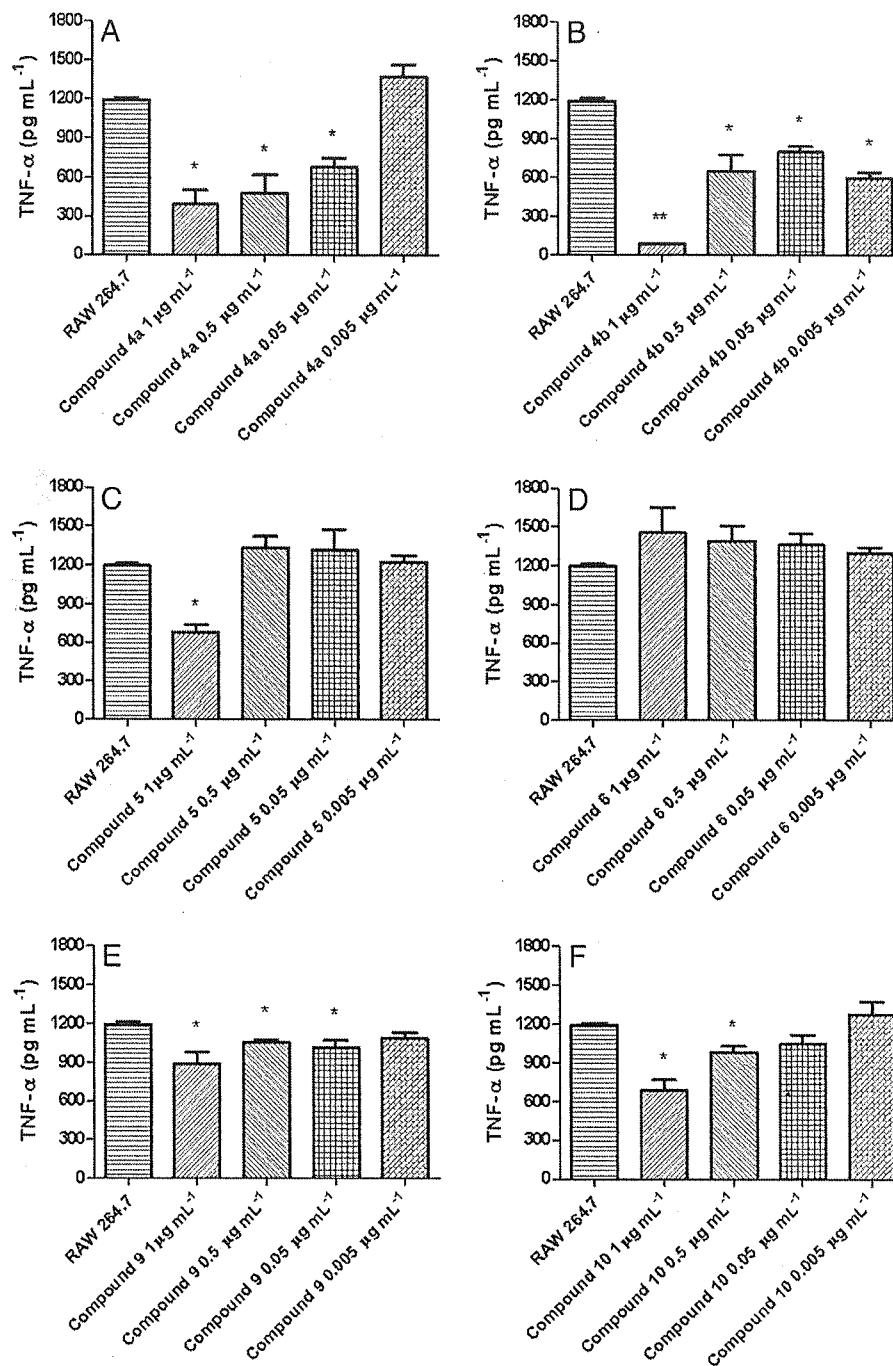
The Inflammatory response is mainly regulated by nitric oxide (NO), eicosanoids, and cytokines, all of which released by injured or infected cells and have important roles in progression of inflammatory states such as edema, intra/intercellular stress, and tissue necrosis [16].

The present study showed an immunomodulatory effect of the amino alcohols tested *in vitro* and *in vivo*. In the RAW 264.7 cells, the lipophilic amino alcohols were not cytotoxic and showed inhibition of nitric oxide (NO) and TNF- $\alpha$ . Moreover, in the carrageenan-induced paw edema were observed reduction of edema, with reduced detection of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  after treatment with compound 4b, which also reduced the edema in the DTH reaction, suggesting a down-regulation of inflammatory mediators by lipophilic amino alcohols.

Previous studies already showed the capability of lipophilic amino alcohols on the inhibition of NO production in J774 A.1 cell cultures and the reduction of the inflammation in the delayed-type hypersensitivity assay [11]. Moreover, lipophilic amino alcohols bearing a sugar moiety showed inhibition of NO production and the authors suggested a relation between the inhibition capacity and the lipophilic characteristic of these compounds [9]. NO is an important mediator in acute inflammation which is produced in pathophysiological conditions. At the site of inflammation is produced by a number of different cells, including leukocytes and endothelial cells [17].

TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine that stimulates phase reaction in acute inflammation, with great diversity of biological activities including inhibition of tumor growing and apoptosis induction [18]. In the present study compounds 4a and 4b showed better reduction of TNF- $\alpha$  production and were chosen to treating the carrageenan-induced and DTH paw edema.

Carrageenan-induced mice paw edema is a widely used test to determine the anti-inflammatory activity, and it has been fully characterized in the past showing acute inflammation by vasodilatation, exudation of protein-rich fluid (plasma) and cell migration, primarily

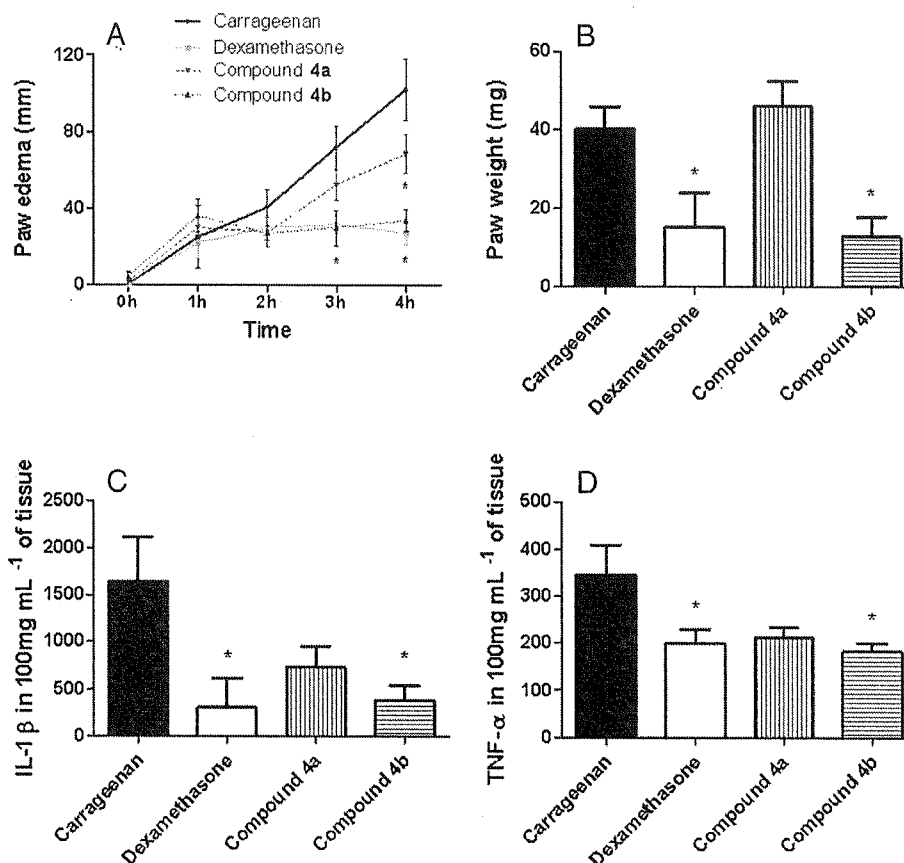


**Fig. 1.** TNF- $\alpha$  production by stimulated RAW264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were stimulated with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of LPS plus  $9 \text{ ng mL}^{-1}$  IFN- $\gamma$ , and cultured by 24hs in presence of serial dilutions ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $0.005 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of lipophilic amino alcohols: Compound 4a (A); Compound 4b (B); Compound 5 (C); Compound 6 (D); Compound 9 (E) and Compound 10 (F). Supernatants were collected to determine TNF- $\alpha$  production. Each bar represents the arithmetic mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  in comparison to stimulated and not treated cells (RAW 264.7). Data are representative of three independent experiments.

neutrophils, into the side of injury [19]. Mouse paw edema has been increasingly used to test new anti-inflammatory drugs [17] and studies showed that carrageenan injection causes the release of NO and induce the release of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the tissue [16]. In the present study, the compound 4b showed effective reduction of the inflammation in the paw edema with increased inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , which were not observed by the treatment with compound 4a, suggesting a better immunomodulatory effect of the compound 4b. Cytokines involved in the inflammatory response, released by injured or infected

cells, that are mediators of carrageenan-induced inflammatory incapacitation, activate vascular endothelial cells and upregulate key adhesion molecules that mediate tethering, rolling, cell adhesion, and extravasations of leucocytes. The leucocytes then migrate towards the site of tissue inflammation [20].

The delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction is also a useful approach for evaluating cell-mediated immune responses that migrates to the inflammation site. The experimental model of DTH to OVA allows an assessment of the T-cell immune response. It also allows a simulation of



**Fig. 2.** Carrageenan-induced paw edema. Male BALB/c mice ( $n = 6$  per group) were treated i.p. (100  $\mu$ L) with PBS (Carrageenan group), the compounds 4a or 4b (0.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) or dexamethasone (0.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ), 30 minutes before the induction of the carrageenan-induced paw edema. Paw edema [Paw edema (mm)] = [footpad thickness of carrageenan (mm)] – [footpad thickness of PBS (mm)] were monitored until 4 hours (A). After 4 hours, mice were euthanized and the paws were removed and weighted (B). The paws were dissected, the inflamed tissue macerated and the supernatants were analyzed to detect IL-1 $\beta$  (C) and TNF- $\alpha$  (D). Each bar represents the arithmetic mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs untreated group (Carrageenan). Data are representative of three independent experiments.

the course of certain autoimmune diseases [21]. In the present study, the treatment with compounds 4a or 4b showed reduction of the edema comparable to the observed with dexamethasone treatment.

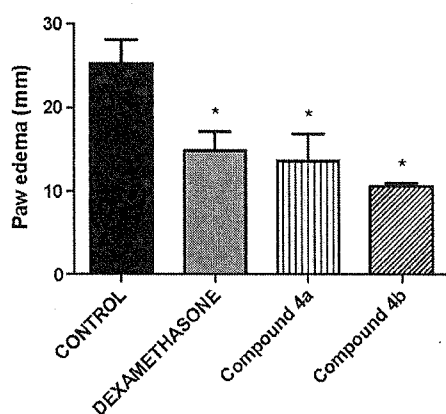
Thereby, the compound 4b showed significant anti-inflammatory properties, both *in vitro* and *in vivo*, and further studies of the molecular mechanisms are necessary to better explain its mechanism of action.

#### Acknowledgments

This work was supported in part by grants from CNPq (306575/2012-4; 503376/2012-4), CAPES (PNPD-2882/2011) and FAPEMIG.

#### References

- [1] Castro SBR, Junior COR, Alves CCS, Dias AT, Alves LL, Mazzoccoli L, et al. Synthesis of lipophilic genistein derivatives and their regulation of IL-12 and TNF- $\alpha$  in activated J774A.1 cells. *Chem Biol Drug Des* 2012;79:347–52.
- [2] Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531–62.
- [3] Park MY, Know HJ, Sung MK. Evaluation of Aloin and Aloe-Emodin as anti-inflammatory agents in Aloe by using murine macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:828–32.
- [4] Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets* 2005;4:471–9.
- [5] Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- $\alpha$  primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989;7:625–55.
- [6] Castellheim A, Brekke OL, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol* 2009;69:479–91.
- [7] Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin 1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–50.
- [8] Sims JE, Smith DE. The IL1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;10:89–102.
- [9] Corrêa TA, Reis EFC, Alves LL, Alves CCS, Castro SBR, Dias AT, et al. Preparation of amino alcohols condensed with carbohydrates: evaluation of



**Fig. 3.** Anti-OVA Delayed-type hypersensitivity. Male BALB/c mice ( $n = 6$  per group) were immunized with ovalbumin (OVA), daily treated i.p. (100  $\mu$ L) with PBS (CONTROL), the compounds 4a or 4b (0.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) or dexamethasone (0.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) and challenged with aggregated OVA 6 days after the immunization. DTH was measured after 48 h of the challenge. The magnitude of the DTH response was determined as follow: [Paw edema (mm) or DTH units] = [footpad thickness of OVA (mm)] – [footpad thickness of PBS (mm)]. Each bar represents the arithmetic mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared to untreated group (CONTROL). Data are representative of three independent experiments.

- cytotoxicity and inhibitory effect on NO production. *Chem Biol Drug Des* 2010;76:451–6.
- [10] Del Olmo E, Plaza A, Muro A, Martinez-Fernandez AR, Nogal-Ruiz JJ, Lopez-Perez JL, et al. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:6091–5.
- [11] Reis EFC, Junior COR, Alves LL, Ferreira AP, Almeida MV. Synthesis and immunosuppressive activity of lipophilic amino alcohols and diamines. *Chem Biol Drug Des* 2008;72:596–8.
- [12] Teixeira M, Cerqueira F, Barbosa CM, Nascimento MS, Pinto M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. *J Drug Target* 2005;13:129–35.
- [13] Alves CCS, Castro SBR, Costa CF, Dias AT, Alves CJ, Rodrigues MF, et al. Anthraquinone derivative O, O'-bis-(3'-iodopropyl)-1,4-dihydroxyanthraquinone modulates immune response and improves experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol* 2012;14:127–32.
- [14] Mazzoccoli L, Cadoso SH, Amarante GW, Souza MVN, Domingues R, Machado MA, et al. Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. *Biomed Pharmacother* 2012;66:323–9.
- [15] Abraham SM, Lawrence T, Kleiman A, Warden P, Medghalchi M, Tuckermann J, et al. Anti-inflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specific city phosphatase 1. *J Exp Med* 2006;203:1883–9.
- [16] Sohn KH, Jo MJ, Cho WJ, Lee JR, Cho IJ, Kim SC, et al. Bojesodok-eum, a herbal prescription, ameliorates acute inflammation in association with the inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated nitric oxide and proinflammatory cytokine production. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:457370.
- [17] Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Clin Pharmacol* 2004;142:331–8.
- [18] Childress B, Stechmiller JK. Role of nitric oxide in wound healing. *Biol Res Nurs* 2002;4:5–15.
- [19] Franzotti EM, Santos CV, Rodrigues HM, Mourao RH, Andrade MR, Antonioli AR. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J Ethnopharmacol* 2000;72:273–7.
- [20] de Brito TV, Prudêncio Rda S, Sales AB, Júnior Fd Vieira, Candeira S, Franco AX, et al. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:724–33.
- [21] Allen IC. Delayed-type hypersensitivity models in mice. *Methods Mol Biol* 2013;1031:101–7.