

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**

**Avaliação molecular do perfil anti-inflamatório de derivados fenólicos extraídos do
Líquido da Castanha de Caju (LCC) em modelo *in vitro***

Marilen Queiroz de Souza Pereira Gomes

Brasília-DF

2018

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Avaliação molecular do perfil anti-inflamatório de derivados fenólicos extraídos do Líquido da Castanha de Caju (LCC) em modelo *in vitro*

Versão preliminar da Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aluna: Marilen Queiroz de Souza Pereira Gomes

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi

Brasília-DF

2018

MARILEN QUEIROZ DE SOUZA PEREIRA GOMES

**AVALIAÇÃO MOLECULAR DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO DE
DERIVADOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DO LÍQUIDO DA CASTANHA DE
CAJU (LCC) EM MODELO *IN VITRO***

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas,
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Riccardo Pratesi (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof^a. Dr^a. Mariana Machado Hecht
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Lucas Malta Almeida
Secretaria de Educação - DF

Prof. Dr. Rafael Trindade Burtet
Faculdade LS - DF

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Olegário (*in memoriam*) e Maria (*in memoriam*), pelo exemplo de garra, persistência, amor e fé que me ensinaram e foram fundamentais durante os anos de desenvolvimento desde trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um privilégio! Não importa o quão duro foi, nem pelo término que se aproxima, mas valeu por cada passo e cada minuto vivido. Por isso agradeço:

A Deus, pelas oportunidades e por Sua presença sempre me dando forças que permitiu que eu seguisse em frente para a conclusão desse trabalho.

Ao meu amado esposo Luiz Octávio por todo apoio, compreensão, dedicação, carinho e paciências nos momentos de angústia e ansiedade.

Aos meus pais, que amo incondicionalmente, Rauflin e Célia. Agradeço pelo exemplo que são para mim, com a garra que possuem. Pelo carinho, compreensão, paciência, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Wanessa e Rodrigo, pelo carinho, incentivo e ensinamentos que me foram muito úteis nesta caminhada.

Ao professor Riccardo Pratesi pela oportunidade, apoio, incentivo, confiança e, principalmente pela orientação e ensinamentos que levarei sempre comigo em minha vida profissional e pessoal.

Aos amigos do laboratório que me auxiliaram nesta caminhada compartilhando de suas experiências ou me ajudando diretamente nos experimentos, em especial à Isabella, Fernanda, Nicole, Patrícia, Eduardo, Lucas, Zita, Rosa, Gabriel, Laís, Cida que estiveram ao meu lado em vários momentos. Vocês foram grandes companheiros nesta interminável jornada em busca do conhecimento.

À Cláudia Pratesi, sempre prestativa, imediata e concreta, que me ofereceu ajuda nas traduções para o inglês.

A todos os integrantes do Laboratório Interdisciplinar de Biociências.

À professora Yanna Karla, que sempre acreditou na minha capacidade, incentivando-me na caminhada do doutorado, contribuindo de forma decisiva em meu crescimento científico e intelectual.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER), de modo particular ao Prof. Luiz Antônio Soares Romeiro, que me cedeu gentilmente as moléculas utilizadas nos ensaios, e suas alunas, Priscilla Alves e Gabriella Heyn, que participaram da fase inicial do projeto, na purificação e modificação dos derivados fenólicos.

À toda comunidade do Movimento dos Foculares, que por muitas vezes me inspiraram confiança e esperança para persistir diante das incertezas, iluminaram-me na escuridão e me fizeram mais luminosa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Tê-los comigo durante esta caminhada foi uma dádiva, o meu grande afeto a cada um e o meu MUITO OBRIGADA!

“Para se conhecer a sabedoria e a instrução; para se entenderem, as palavras da prudência. Para se receber a instrução do entendimento, a justiça, o juízo e a equidade; Para dar aos simples, prudência, e aos moços, conhecimento e bom siso; O sábio ouvirá e crescerá em conhecimento, e o entendido adquirirá sábios conselhos.”

Provérbios 1:2-5

RESUMO

Souza-PG, Marilen Queiroz de. Avaliação molecular em modelo *in vitro* do perfil anti-inflamatório de derivados fenólicos extraídos do Líquido da Castanha de Caju (LCC). Tese (Doutorado em Ciências Médicas). 2018. Faculdade de Medicina. Universidade de Brasília.

A inflamação é um processo biológico complexo, altamente regulado definido como uma resposta de defesa do organismo frente a um agente agressor. Tem por objetivo recompor a homeostase do tecido lesado. Assim, a resposta inflamatória aguda é benéfica ao hospedeiro, reestabelecendo em pouco tempo a estrutura e função do tecido e/ou órgão. Entretanto, a resposta inflamatória crônica pode promover perda da função do órgão ou tecido levando ao desenvolvimento de doenças. Na indústria de processamento da castanha de caju, são obtidos a amêndoa e o óleo, tradicionalmente conhecido como Líquido da Castanha de Caju (LCC). Estudos mostram que os derivados do LCC possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória. No entanto, o elevado desperdício do LCC no Brasil faz com que este subproduto da indústria alimentícia seja pouco explorado.

O perfil farmacológico multi-alvo de ácido anacárdico encontrado no LCC o torna um alvo potencial para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios. O presente trabalho propõe avaliar o efeito imunoprotetor e o efeito anti-inflamatório de dois derivados semisintéticos, extraídos a partir de lipídeos fenólicos de *Anacardium occidentale* L., denominados LDT11 e LDT13. A atividade biológica das moléculas foi avaliada em modelo celular *in vitro*. Foi avaliada a citotoxicidade dos compostos propostos, LDT11 e LDT13, na linhagem celular de macrófagos murinos, RAW264.7. Para avaliação do efeito protetor à inflamação, as células foram previamente tratadas com os derivados fenólicos e, em seguida, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), nos tempos de 6, 24 e 48 horas. Para a avaliação do efeito anti-inflamatório, as células foram primeiramente estimuladas com LPS e, em seguida, tratadas com as moléculas estudadas. Para comparação da atividade biológica, foram utilizados os fármacos comerciais, ácido acetilssalicílico (AAS) e dexametasona (DEXA). Foi realizada a análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios *TNF α* , *iNOS*, *COX-2*, *NF- κ B*, *IL-1 β* e *IL-6*, dosagem de óxido nítrico (NO) e citocina IL-6. Os resultados mostraram que o LDT11 e o LDT13 influenciaram na modulação gênica dos mediadores inflamatórios. A quantificação relativa dos transcritos gênicos mostrou que os derivados fenólicos propostos apresentaram potencial efeito anti-inflamatório pela diminuição da expressão gênica em comparação ao grupo controle, células estimuladas com LPS. As dosagens de NO e IL-6 confirmam os resultados encontrados na expressão gênica. Os derivados fenólicos mostraram ser potenciais agentes anti-inflamatórios, tendo um efeito rápido e mais eficaz que os fármacos comerciais.

Palavras chaves: Inflamação, Líquido da Castanha do Caju (LCC), ácido anacárdico, anti-inflamatório, expressão gênica.

ABSTRACT

Souza-PG, Marilen Queiroz de. Molecular evaluation in *in vitro* model of the anti-inflammatory profile of phenolic derivatives extracted cashew nut shell liquid (CNSL). Thesis (PhD candidate in Medicine Sciences). 2018. School of Medicine. University of Brasilia.

Inflammation is a complex, highly regulated biological process defined as a defense response of the organism to an aggressive agent. It aims to restore the homeostasis of the damaged tissue. Thus, the acute inflammatory response is beneficial to the host, reestablishing in a short time the structure and function of the tissue and / or organ. However, the chronic inflammatory response may promote loss of organ or tissue function leading to disease development. In the cashew processing industry, almonds and oil are traditionally known as Cashew Nut Shell Liquid (CNSL). Studies show that the derivatives of CNSL have antioxidant and anti-inflammatory activity. However, the high waste of the CNSL in Brazil makes this by-product of the food industry little explored. The multi-target pharmacological profile of anacardic acid found in CNSL makes it a potential target for the development of novel anti-inflammatory agents. This study proposes to evaluate the immunoprotective effect and the anti-inflammatory effect of two semisynthetic derivatives, extracted from phenolic lipids of *Anacardium occidentale* L., called LDT11 and LDT13. The biological activity of the molecules were evaluated in cellular model *in vitro*. The cytotoxicity of the proposed compounds, LDT11 and LDT13, in the murine macrophages cell line, RAW264.7, was evaluated. To evaluate the protective effect on inflammation, the cells were previously treated with the phenolic derivatives and then the cells were stimulated with lipopolysaccharide (LPS), at the times of 6, 24 and 48 hours. For the evaluation of the anti-inflammatory effect the cells were first stimulated with LPS, and then treated with the molecules studied. To compare the biological activity, commercial drugs, acetylsalicylic acid (ASA) and dexamethasone (DEXA) were used. The gene expression of inflammatory markers TNF α , iNOS, COX-2, NF- κ B, IL-1 β and IL-6, nitric oxide (NO) and IL-6 cytokine were analyzed. The results showed that LDT11 and LDT13 influenced the gene modulation of inflammatory mediators. The relative quantification of the gene transcripts showed that the proposed phenolic derivatives showed a potential anti-inflammatory effect due to the decrease of the gene expression in comparison to the control group, cells stimulated with LPS. The dosages of NO and IL-6 confirm the results found in the gene expression. Phenolic derivatives have been shown to be potential anti-inflammatory agents, having a rapid and more effective effect than commercial drugs.

Key words: Inflammation, cashew nut shell liquid (CNSL), anacardic acid, anti-inflammatory, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Vias de ativação do fator de transcrição NF-κB estimuladas por citocinas, LPS ou outros fatores que ativam uma cascata de sinalização intracelular que desencadeiam a transcrição de genes responsivos de NF-κB. A) Via clássica (canônica); B) Via alternativa (não-canônica). Fonte: Adaptado de (FRANCO, 2010)..... 8
- Figura 2 - Lipídeos fenólicos não isoprenóides constituintes do LCC. Fonte: Adaptado de MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009 12
- Figura 3 – Sequência de testes realizados para o desenvolvimento do projeto. 16
- Figura 4 - Representação gráfica dos tratamentos realizados nas culturas de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação do efeito imunoprotetor dos derivados fenólicos, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. 23
- Figura 5 - Representação gráfica dos tratamentos realizados nas culturas de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação do efeito anti-inflamatório dos derivados fenólicos, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. 25
- Figura 6 – Representação gráfica dos controles utilizados nos tratamentos realizados nas culturas de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação dos efeitos imunoprotetor e anti-inflamatório dos derivados fenólicos, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT – células não tratadas e LPS – Células tratadas com o estímulo inflamatório LPS. 26
- Figura 7 - Teste de interação química do reagente de WST-8 e as diferentes concentrações de LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3)..... 33
- Figura 8 - Teste de viabilidade celular pelo método WST-8, em linhagem celular RAW264.7, utilizando diferentes concentrações dos derivados de ácido fenólicos, LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3). 33
- Figura 9 - Teste de interação química dos reagentes de e as diferentes concentrações de LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3)..... 34
- Figura 10 - Teste de viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro, em linhagem celular RAW 264.7, utilizando diferentes concentrações dos derivados de ácido fenólicos, LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3). 35

Figura 11 - Quantidade relativa de transcritos do gene *TNF- α* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....37

Figura 12 - Quantidade relativa de transcritos do gene *COX-2* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....38

Figura 13 - Quantidade relativa de transcritos do gene *iNOS* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....40

Figura 14 - Quantidade relativa de transcritos do gene *NF- κ B* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....41

Figura 15 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-1 β* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....43

Figura 16 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-6* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....44

Figura 17 - Quantidade relativa de transcritos do gene *TNF- α* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....45

Figura 18 - Quantidade relativa de transcritos do gene *COX-2* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....47

Figura 19 - Quantidade relativa de transcritos do gene *iNOS* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....48

Figura 20 - Quantidade relativa de transcritos do gene *NF- κ B* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).....49

Figura 21 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-1 β* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). 50

Figura 22 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-6* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). 51

Figura 23 - Avaliação do potencial efeito imunoprotetor dos derivados de LCC por dosagem dos níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). 53

Figura 24 - Avaliação do potencial efeito anti-inflamatório dos derivados de LCC por dosagem dos níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). 54

Figura 25 - Avaliação do potencial efeito imunoprotetor dos derivados de LCC por dosagem dos níveis de produção da citocina IL-6 no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$). 55

Figura 26 - Avaliação do potencial efeito anti-inflamatório dos derivados de LCC por dosagem dos níveis da citocina IL-6 no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamento Imunoprotetor das células RAW 264.7	21
Tabela 2 – Tratamento Anti-inflamatório das células RAW 264.7	23
Tabela 3 - Primers utilizados nas reações de qPCR.	28
Tabela 4 – <i>Threshold</i> , concentração de <i>primers</i> , concentração de cDNA e condições de termociclagem padronizadas para cada um dos <i>primers</i> a partir dos ensaios de curva padrão e otimização, para amplificação do qPCR.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS - ácido acetilsalicílico
- ANOVA - Análise de variância
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- cDNA - Sequência de DNA complementar
- CNSL - cashew nut shell liquid
- CO₂ - Dióxido de Carbono
- COX- 2 - Ciclooxygenase isoforma 2
- CT - *Crossing threshold* ou ciclo limiar
- D.O. - Densidade ótica
- DEXA - Dexametasona
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO - Dimetil sulfoxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DNase - Desoxirribonuclease
- dNTP - Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
- ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
- FC - *Fold-change*
- GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GSH - Glutathiona reduzida
- IL - Interleucina
- IL-1 - Interleucina-1
- IL-1 β - Interleucina-1 β
- IL-6 - Interleucina- 6
- iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
- LCC - Líquido da Castanha de Caju
- LDT11 – molécula semissintética 11 do Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
- LDT13 – molécula semissintética 13 do Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas
- LOX - Lipooxygenase
- LPS - Lipopolissacarídeo

MTT - 3- (4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol – sal de tetrazólio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NEED - *N- (1-Naphthyl) ethyl-enedinamine*
NF-κB - Fator de transcrição nuclear κB
NO - Óxido nítrico
NO₂ - Nitrito
p - Significância estatística
PBS - Salina fosfatada tamponada
PGE₂ - Prostaglandina E2
pH - Potencial hidrogeniônico
PMN - Polimorfonucleares
RNA - Ácido ribonucleico
RNAm - Ácido Ribonucleotídeo mensageiro
RNase - Ribonuclease
RT - Transcrição Reversa
SFB - Soro fetal bovino
SYBR *Green* ou *SyBrgreen* - Corante fluorescente que se liga a fita de DNA
TLR - *Toll like* receptor
T_m - *Melting temperature* ou temperatura de dissociação
TNF-α - Fator de Necrose Tumoral alfa (α)
TNF-α - Fator de necrose tumoral-alfa
TXA₂ - Tromboxano A₂
WST-8 - Sal monossódico de tetrazólio [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) 2H-tetrazólio].

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	I
AGRADECIMENTOS	II
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Inflamação.....	1
1.1.1 Aspectos moleculares da inflamação.....	3
1.1.1.1 Vias ativadas pelo LPS	4
1.1.1.2 Metabolismo do ácido araquidônico	5
1.1.1.3 Vias de sinalização do <i>NF-κB</i>	6
1.1.1.4 Estresse oxidativo	9
1.2 Líquido da Casca da Castanha de caju (LCC)	9
1.2.1 Uso terapêutico das moléculas derivadas do LCC	13
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Desenho experimental	16
4.2 Linhagem celular	16
4.3 Cultura de células <i>in vitro</i>	17

4.4	Síntese e caracterização dos candidatos a agentes anti-inflamatórios.....	17
4.5	Avaliação do grau de citotoxicidade após interação com os derivados fenólicos sintéticos	18
4.5.1	Ensaio de WST-8	18
4.5.2	Ensaio de Vermelho Neutro (VN)	19
4.6	Análise de expressão gênica	20
4.6.1	Tratamento diferencial da expressão gênica.....	20
4.6.2	Extração e purificação de RNA	26
4.6.3	Quantificação e análise do RNA extraído	27
4.6.4	Síntese de cDNA.....	27
4.6.5	Definição dos genes de interesse para o estudo.....	28
4.6.6	Padronização das concentrações dos <i>primers</i> específicos.....	28
4.6.6.1	Titulação dos <i>Primers</i>	29
4.6.6.2	Ensaio de eficiência	29
4.6.7	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real.....	30
4.6.8	Expressão gênica.....	30
4.7	Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	30
4.8	Dosagem de IL-6	31
4.9	Análise estatística.....	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Síntese e caracterização dos candidatos a agentes anti-inflamatórios.....	32
5.2	Viabilidade celular.....	32
5.2.1	Viabilidade celular pelo método utilizando o reagente WST-8.....	32
5.2.2	Viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro.	34
5.3	Expressão gênica.....	35
5.3.1	Quantificação relativa dos transcritos dos genes <i>TNF-α</i> , <i>COX-2</i> , <i>iNOS</i> , <i>NF-κB</i> , <i>IL-1β</i> e <i>IL-6</i> após tratamento com LDT11 e LDT13.....	35
5.4	Dosagem de óxido nítrico	52

5.5	Dosagem de citocina IL-6.....	54
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO.....	64
8	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é um processo biológico complexo e altamente regulado definido como uma resposta de defesa do organismo frente a um agente agressor físico, químico ou biológico. Tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação de mediadores da resposta imune (CARNEIRO, 2009; LEE et al., 2010).

A resposta inflamatória quando adequada é suficiente para conter a infecção e reparar o dano tecidual, sendo benéfica ao hospedeiro. Entretanto, em condições anormais, a resposta inflamatória pode promover perda da função do órgão ou tecido e cronicidade na resposta, levando ao desenvolvimento de doenças (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

As reações inflamatórias são caracterizadas por sinais cardinais como rubor (vermelhidão), tumor (edema), calor (aquecimento), dor e perda da função (ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010). O processo inflamatório pode ser desencadeado por diversos estímulos como infecções bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias, reações autoimunes ou hipersensibilidade, em que o sistema imunitário destrói os próprios tecidos do indivíduo; necrose tecidual em decorrência de isquemia, trauma ou lesões por agentes físicos e químicos (lesão térmica, irradiação e exposição a produtos químicos, etc.); hipóxia e, também estímulos como corpos estranhos e suturas cirúrgicas, que possuem a capacidade de causar lesão tecidual traumática ou de transportar micro-organismos (ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

O início da inflamação é caracterizado por uma sequência de eventos coordenados que envolvem mudanças fisiológicas, celulares e moleculares. A vasodilatação é uma das primeiras mudanças físicas em resposta ao estímulo inflamatório. Em condições fisiológicas as células endoteliais funcionam como uma barreira semipermeável, restringindo proteínas plasmáticas ao espaço intravascular. Como consequência da resposta inflamatória ocorre uma mudança conformacional do endotélio com consequente aumento do leito capilar, promovendo maior aporte sanguíneo (hiperemia), levando à vermelhidão (eritema) e ao calor no local. Há, também, aumento da permeabilidade vascular, o que permite a saída de fluido plasmático rico em proteínas plasmáticas (exsudato) no tecido lesado. A presença dessas proteínas no tecido aumenta pressão osmótica coloidal levando a um extravasamento de plasma e consequente aumento no volume local, caracterizando o edema (BUCKLEY et al., 2015; CARNEIRO, 2009; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). A compressão

das terminações nervosas causadas pelo edema provoca dor que é potencializada pela ação de algumas citocinas (SCHESCHOWITSCH, 2011).

Devido às mudanças morfoestruturais ocasionadas nas células endoteliais, suas membranas plasmáticas são rapidamente remodeladas gerando mediadores lipídicos biologicamente ativos. Os fosfolípidios da membrana são clivados gerando o ácido araquidônico. Este ácido araquidônico livre pode ser metabolizado pela enzima ciclooxigenase (COX), gerando os prostanóides (prostaglandinas, prostacilinas e tromboxanas), ou pela enzima lipoxigenase, gerando os leucotrienos e as lipoxinas. Estes metabólitos, conhecidos como eicosanóides, podem modular a resposta inflamatória (SCHESCHOWITSCH, 2011). Concomitantemente, ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas diversas que ativam vias de sinalização em células endoteliais e modulam a transcrição e a expressão de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos para que leucócitos e neutrófilos possam migrar até o sítio da lesão (CARNEIRO, 2009; OLIVEIRA; SOARES; SPOSITO, 2018).

A segunda etapa do processo inflamatório consiste na remoção do agente agressor e de tecidos mortos pelas células recém-infiltradas no local da injúria e na indução da reparação do epitélio (reepitalização), do estroma (cicatrização) e do parênquima (regeneração) (SCHESCHOWITSCH, 2011).

Embora a resposta inflamatória seja benéfica, as falhas na remoção do estímulo antigênico pelos neutrófilos e na eliminação dos estímulos apoptóticos resultam na permanência da inflamação, tornando-a crônica, podendo levar à perda da função do órgão (LANDSKRON et al., 2014; ROGERIO et al., 2015). Assim, a inflamação prolongada cessa o efeito benéfico da resposta inflamatória e contribui para a patogênese de muitas doenças como artrite reumatoide, bronquite crônica, asma, enfisema pulmonar, glomerulonefrite, infarto do miocárdio, aterosclerose, doença de Alzheimer, doença celíaca e câncer (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

A inflamação crônica pode ocorrer por diferentes estímulos que incluem infecção por micro-organismos de difícil erradicação, doenças autoimunes e exposição prolongada a agentes tóxicos (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). Estes fatores induzem a contínua produção de mediadores pró-inflamatórios. Os tecidos danificados e macrófagos necróticos não eliminados pela resposta inflamatória aguda podem amplificar a resposta inflamatória. A permanência da inflamação resulta na ativação da resposta imune adaptativa, cronificando o processo inflamatório (ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

Neste cenário, a resolução ou a prevenção dessa inflamação desregulada ou persistente representa um processo que pode proporcionar novas estratégias terapêuticas para o tratamento de uma variedade de doenças (HEADLAND; NORLING, 2015).

1.1.1 Aspectos moleculares da inflamação

A inflamação resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios que auxiliam no recrutamento de neutrófilos e de proteínas plasmáticas no local da inflamação. Células pró-inflamatórias, principalmente macrófagos ativados, medeiam a maior parte da fisiopatologia celular e molecular da inflamação através da produção de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias (CARNEIRO, 2009; ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010).

As citocinas e quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas durante a resposta imune e inflamatória. Sua secreção é transiente e estritamente regulada. Funcionam como mediadores da diferenciação celular, inflamação, doenças autoimunes e na regulação da resposta imunológicas (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014; VARELLA; FORTE, 2001). São proteínas pleiotrópicas podendo agir em diferentes tecidos e tipos celulares. Algumas destas citocinas têm efeito sinérgico, agindo na síntese uma da outra (CARNEIRO, 2009; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Entre as citocinas pró-inflamatórias de grande relevância no processo inflamatório estão o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6) (VOLP et al., 2008).

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. Um dos principais estímulos para a sua produção é a presença de lipopolissacarídeos (LPS) componente da membrana das bactérias gram-negativas (VITALE et al., 2011). Após ser produzido e liberado, o TNF- α liga-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R), cujo efeito biológico é estimular a apoptose. O principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção e ativá-los (VITALE; RIBEIRO, 2007). Para isto, o TNF- α provoca uma série de efeitos no organismo, promovendo vasodilatação e agindo nas células endoteliais, estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas, denominadas quimiocinas. Estas têm ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo, um processo inflamatório local que possibilita o combate efetivo do quadro infeccioso (VITALE; RIBEIRO, 2007). É também a citocina responsável pelo choque anafilático, inibe o apetite e induz a febre por meio da liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (GRIFFIN et al., 2012).

A família de citocinas interleucina-1 (IL-1) compreende várias citocinas pró-inflamatórias, envolvidas no processo de aterogênese. Liberada principalmente por monócitos e macrófagos, produzindo seu subtipo IL-1 β , enquanto os queratinócitos produzem a IL-1 α . A síntese de IL-1 pode ser induzida por TNF- α e LPS no processo inflamatório. A IL-1 β induz a ativação transcricional do gene *NF- κ B* para a expressão de moléculas de adesão endotelial e outras citocinas. O aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial facilita a agregação de outras células inflamatórias no endotélio lesado (VOLP et al., 2008).

A interleucina-6 (IL-6) pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo os monócitos, macrófagos e células dendríticas quem mais a produzem. Os estímulos indutores de sua síntese são IL-1, TNF- α e LPS. Esta citocina influencia respostas imunes antígeno-específicas e reações inflamatórias, sendo um dos principais mediadores da fase aguda da inflamação, tendo uma ação importante de quimiotaxia dos eosinófilos para o local da inflamação e na coagulação (VARELLA; FORTE, 2001; VOLP et al., 2008). É conhecida como citocina multifuncional, que além de suas funções pró-inflamatórias e agente esclerosante, também afeta a atividade das células neoplásicas, está envolvida na doença de Crohn e artrite reumatoide. (GRIFFIN et al., 2012).

Além de seus importantes efeitos locais, as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 apresentam efeitos à distância, que contribuem para a defesa do organismo. Um desses efeitos é a elevação da temperatura corporal. São denominados pirógenos endógenos, causando febre a partir de fonte endógena (HOTAMISLIGIL, 2017).

1.1.1.1 Vias ativadas pelo LPS

O lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina é uma molécula tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (CRUZ-MACHADO, 2010; TUIN et al., 2006). Possui grande capacidade de estimulação da resposta inflamatória. Desencadeia vias de sinalização intracelular através da sua ligação a receptores próprios, sendo reconhecido pelas células através de receptores da família *Toll-like* (TLR). Proteínas auxiliares são responsáveis por transferir o LPS para o receptor do tipo *Toll-like* 4 (TLR4). O receptor TLR4 reconhece o LPS e é ativado, iniciando uma cascata de sinalização para ativar o gene de transcrição *NF- κ B*. (Fator Nuclear kappa B) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

A sinalização intracelular induzida pela interação do LPS com seus receptores desencadeia o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, que ativam o complexo de

quinases IKKs, que, por sua vez, ativam a fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossômica da proteína I κ B- α . Essa proteína é responsável por manter o NF κ B retido no citoplasma e sua degradação permite a liberação do fator de transcrição, ainda sob a forma de dímeros, e sua translocação ao núcleo da célula para se ligar aos elementos responsivos no DNA (CRUZ-MACHADO, 2010; KAWAI; AKIRA, 2006).

1.1.1.2 Metabolismo do ácido araquidônico

O ácido araquidônico é um precursor endógeno comum na biossíntese de eicosanoides, é rapidamente convertido a vários mediadores lipídicos potentes como por exemplo ciclooxigenases, lipooxigenases e epoxigenases para produzir prostaglandinas, leucotrienos, e endoperóxidos, respectivamente. Quando induzido por estímulos inflamatórios, o ácido araquidônico é liberado da membrana fosfolipídica por meio da atuação de enzimas fosfolipases secretadas de forma rápida para produzir prostaglandinas e leucotrienos, que são mediadores lipídicos sinalizadores intra ou extracelulares em processos biológicos como inflamação e hemostasia (KAIN; PRABHU; HALADE, 2014).

A via das ciclooxigenases é composta por dois tipos de enzimas: COX-1, que é constitutivamente expressa por uma variedade de células e tecidos, responsável pelos níveis basais da síntese de prostaglandina e a COX-2, que é o produto de um gene de resposta precoce imediata em células inflamatórias. A expressão de COX-2 é induzida por endotoxinas, por citocinas como IL-1 e TNF- α e é regulada positivamente de forma significativa, como parte de várias condições inflamatórias agudas e crônicas (CAMARA-LEMARROY et al., 2012; GADEK-MICHALSKA et al., 2013a).

As prostaglandinas são divididas em dez subclasses das quais D, E, F, G, H e I são as mais importantes na inflamação. A prostaglandina E₂ é gerada via prostaglandina sintase E em leucócitos, enquanto que a prostaglandina I₂ é gerada pela via da prostaciclina sintase em células endoteliais, e tromboxanos, que são gerados pela via tromboxano sintase em plaquetas. A COX catalisa a conversão do ácido araquidônico a prostaglandina H₂, que é um precursor de mediadores com atividades biológicas como a prostaglandina E₂ (PGE₂), uma das prostaglandinas mais abundantes produzidas pelo organismo (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

A desregulação na síntese ou degradação da PGE₂ tem sido destacada em várias condições patológicas. Na inflamação, a PGE₂ desperta interesse particular por estar envolvida em todos os processos que levam aos sinais clássicos da inflamação.

As lipoxigenases catalisam a formação de ácidos hidroxieicosatetraenóicos do ácido araquidônico, levando a formação de leucotrienos e outros compostos biologicamente ativos. Os leucotrienos são predominantemente produzidos por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. O leucotrieno B₄ é o principal envolvido no processo inflamatório, sendo um potente regulador da quimiotaxia dos neutrófilos e adesão dos leucócitos às células endoteliais (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

1.1.1.3 Vias de sinalização do *NF-κB*

O fator de transcrição NF-κB foi descoberto primeiramente em linfócitos T (NABEL; BALTIMORE, 1987) como um regulador da transcrição da cadeia leve da κ-imunoglobulina. O papel mais bem conhecido e estudado desse fator de transcrição se dá na resposta imunológica, na qual modula a expressão de genes essenciais no processo inflamatório e na defesa contra parasitas. Atua, também, na sobrevivência e proliferação celular, apoptose e funcionamento do sistema nervoso central (JAEGER; PARYLAK; GAGE, 2017; XIAO, 2004).

A família do *NF-κB* (ou família Rel) consiste em cinco subunidades que incluem p65 (RelA), cRel, RelB, p50 e p52. Esta família é caracterizada por conter uma porção N-terminal bem conservada com cerca de 300 aminoácidos (Rel *homology domain* - RHD), que se subdivide em uma região ligante ao DNA e outra denominada de domínio de dimerização (FRANCO, 2010). A região C-terminal difere-se em cada subunidade. Nas subunidades p65, c-Rel e RelB contém um domínio de transativação (TAD), necessária para iniciar a atividade transcricional. As subunidades p50 e p52 são sintetizadas por processamento de seus precursores, p105 e p100, respectivamente (MEFFERT; BALTIMORE, 2005; WU et al., 2017).

As subunidades do NF-κB podem existir na forma de homo ou heterodímero, para formar dímeros ativadores da transcrição (p50-p65) ou repressores (p50-p50 e p52-p52). Estes dímeros encontram-se no citoplasma da maioria das células. Quando não estimulado, o NF-κB encontra-se complexado com as proteínas inibitórias da família kappa B, *Inhibitory kappa B* (IκB). Esta família de inibidores do NF-κB possui sete membros, IκBα, IκBβ, IκBε, IκB-R, IκBγ ou p105 (precursor de p50), IκBδ ou p100 (precursor de p52) e Bcl-3 (FRANCO, 2010; WU et al., 2017) O dímero mais comumente encontrado é o heterodímero formado pelas proteínas p65 e p50. Em condições normais, o NF-κB (p65/p50) permanece predominantemente no citoplasma ligado à sua proteína inibitória, o IκB, que o mantém em

estado inativo. As proteínas IκBs possuem repetições de aminoácidos que se posicionam próximos à sequência de localização nuclear (NLS) presente no domínio RHR (*Rel homology region*), e dessa forma, impedem a ligação com proteínas que transportam o NF-κB para o núcleo. O IκBα é a proteína inibitória mais abundante e mais estudada. Esta proteína pode migrar para o núcleo e transportar o NF-κB de volta ao citoplasma, inativando este fator de transcrição. As proteínas IκBγ, IκBδ e Bcl-3 atuam como co-ativadores do NF-κB no núcleo, ligando-se à homodímeros de p50 ou p52 para estimular a transcrição (LIU; CHEN, 2011; SCHESCHOWITSCH, 2011).

Existem duas vias descritas para a ativação do fator de transcrição nuclear *NF-κB*, a via clássica (canônica), (Figura 1A), e a via alternativa (não-canônica) (figura 1B). A via clássica é a mais comum e está associada à expressão de genes relacionados à inflamação, à resposta imunológica inata, à anti-apoptose e à sobrevivência celular (XIAO, 2004). Já a via alternativa está associada à expressão de genes que atuam no desenvolvimento e manutenção de órgãos linfóides secundários (FRANCO, 2010; ROTHSCILD et al., 2018).

A via clássica de ativação e translocação nuclear do *NF-κB*, envolvida na resposta inflamatória e nos mecanismos de sobrevivência, requer a remoção da proteína IκBα do complexo NF-κB/IκBα. Após um estímulo como, por exemplo, TNF-α, IL-1 ou LPS, um complexo de quinases de IκB, chamadas de IKK são fosforiladas e tornam-se ativas. Este complexo é formado por duas subunidades IKKα e IKKβ e uma subunidade reguladora não enzimática (IKKγ), também chamada NEMO (LIU; CHEN, 2011; SCHESCHOWITSCH, 2011). Essa fosforilação é o sinal que leva a ubiquitinação e posterior degradação do IκB pelo proteassoma. No momento em que o IκB é degradado o NLS do NF-κB fica exposto e é reconhecido pelas carioferinas (proteínas de transporte nucleocitoplasmático) e translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, o NF-κB se liga em sua região promotora do DNA e inicia a transcrição de inúmeros genes, particularmente genes relacionados à atividade pró-inflamatória, como *TNF-α*, *IL-1*, *IL-6*, a enzima óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxigenase (COX) (ROTHSCILD et al., 2018; XIAO, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004) Um segundo mecanismo que ocorre simultaneamente para interromper a atividade do *NF-κB* é a síntese de novas moléculas de IκBα que entram no núcleo e se ligam ao NF-κB fazendo com que este seja deslocado do seu sítio no DNA e o complexo NF-κB/IκBα retorne inativo para o citoplasma (LIU; CHEN, 2011; MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). Esse é um ponto importante de regulação da expressão de genes ativados pelo LPS, pois se não ocorrer a fosforilação e a degradação proteossômica do IκBα, o fator de transcrição NF-κBα não será translocado ao núcleo (ROTHSCILD et al., 2018; XIAO, 2004).

Algumas características desse mecanismo ainda precisam ser elucidadas, mas o que se sabe é que a ligação do NF κ B ao elemento responsivo no DNA promove a transcrição do I κ B α , tendo assim, uma retroalimentação negativa. Após sua tradução no citoplasma, a proteína I κ B α migra do citoplasma ao núcleo para sequestrar o fator de transcrição e inibir a cascata de ativação. Isto ocorre devido à maior afinidade do NF- κ B e esta proteína que ao DNA (CRUZ-MACHADO, 2010; MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016).

A via alternativa ou não-canônica é a via que regula o processamento da p100, precursora da subunidade p52 (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). Pode ser ativada por radiações ionizantes, agentes oxidantes, algumas citocinas e por fatores de crescimento. A ativação desta via ocorre lentamente e de maneira irreversível, sendo mediada por um complexo de quinases indutoras de NF- κ B (NIK) que ativa homodímeros de IKK α os quais, utilizando uma via independentes da subunidade NEMO (IKK γ), fosforilam a p100. Em seguida essa proteína é ubiquitinada e processada originando p52 (ROTHSCHILD et al., 2018). Assim, o heterodímero RelB-p52 migra para o núcleo onde ativa a transcrição gênica (SCHESCHOWITSCH, 2011; XIAO, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

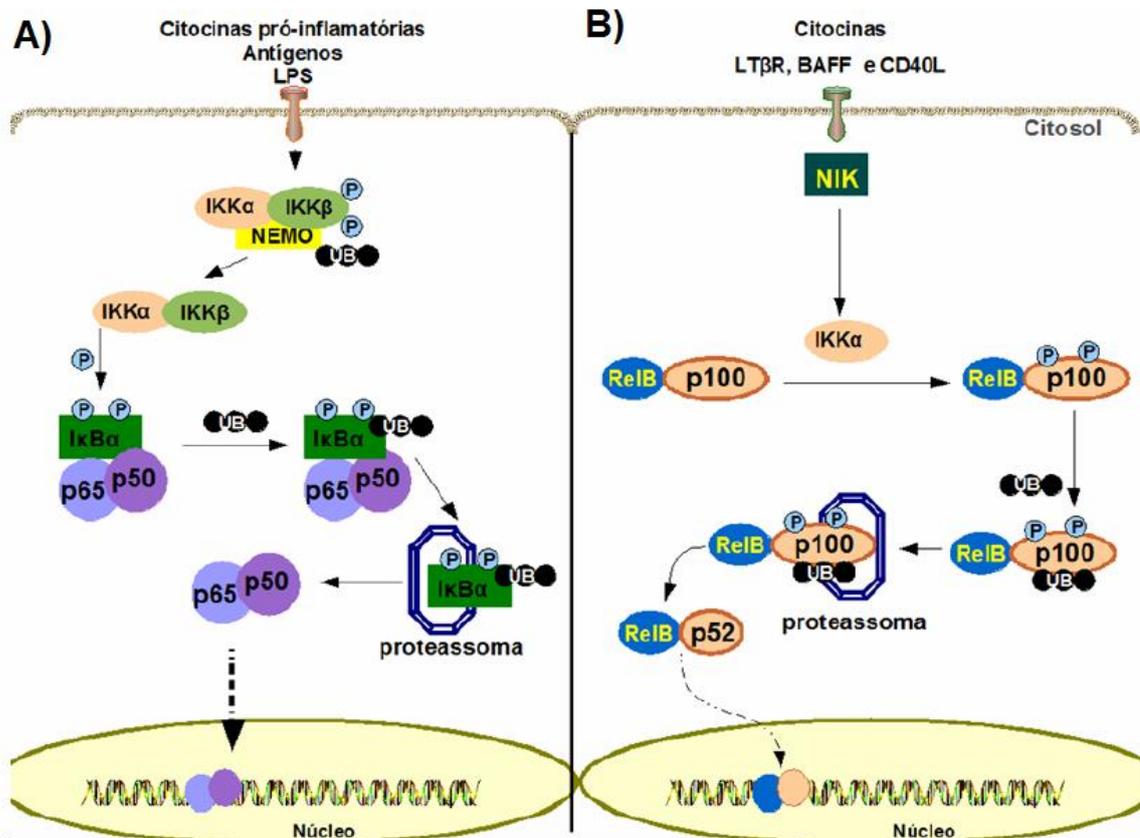


Figura 1 – Vias de ativação do fator de transcrição NF- κ B estimuladas por citocinas, LPS ou outros fatores que ativam uma cascata de sinalização intracelular que desencadeiam a

transcrição de genes responsivos de NF- κ B. A) Via clássica (canônica); B) Via alternativa (não-canônica). Fonte: Adaptado de (FRANCO, 2010).

1.1.1.4 Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são geradas a partir de várias reações intracelulares, como a cadeia respiratória e atuam como segundos mensageiros, participando da homeostase dos tecidos. No entanto, estímulos inflamatórios, como o LPS, podem aumentar a concentração dessas moléculas reativas. Com os níveis elevados de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, enzimas antioxidantes não são capazes de neutralizá-las, ocorrendo um processo chamado de estresse oxidativo. Durante condições de estresse oxidativo, as espécies reativas são citotóxicas e reagem com várias proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, causando danos, muitas vezes, irreversíveis às células. Além disso, iniciam ou intensificam a resposta inflamatória através da ativação de NF- κ B (LIU; CHEN, 2011; ROBINSON; BAUMGARDNER; OTTO, 2011).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula importante produzida através no processo de estresse oxidativo. Esta é uma importante molécula sinalizadora envolvida na regulação de vários mecanismos fisiopatológicos, sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Atua como um mediador biológico semelhante a neurotransmissores e pode regular os tons dos vasos sanguíneos. Por outro lado, é um radical livre de oxigênio que pode funcionar como um agente citotóxico em processos patológicos, principalmente nas doenças inflamatórias (AKTAN, 2004; COLEMAN, 2001; ROBINSON; BAUMGARDNER; OTTO, 2011).

A enzima NOS possui três isoformas, sendo, NOS neural (NOS-1 ou nNOS), NOS induzida (NOS-2 ou iNOS) e NOS endotelial (NOS-3 ou eNOS). Estímulos inflamatórios como o LPS desencadeiam a produção de NO e regula a expressão de *iNOS* através da via de sinalização do NF- κ B (MATTILA; THOMAS, 2014). A inibição da produção de NO tem sido uma estratégia importante no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias (MANCINO; LAWRENCE, 2010).

1.2 Tratamentos anti-inflamatórios

A inflamação, quando não controlada, perde seus efeitos benéficos de eliminar o agente agressor e passa a ser prejudicial ao hospedeiro (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Para evitar os efeitos danosos da inflamação recomenda-se o uso de drogas anti-inflamatórias. Existem dois tipos principais de anti-inflamatórios disponíveis, os anti-

inflamatórios esteróides (AIEs), também denominados de glicocorticoides e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (BATLOUNI, 2010).

1.2.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteroidais se diferem dos corticoides, principalmente, pelo seu mecanismo de ação. Enquanto os corticoides impedem a produção de hormônios e sinalizadores inflamatórios, os AINEs impedem a ativação dessas substâncias.

Os AINEs atuam sob a enzima chamada ciclo-oxigenase (COX), inibindo sua ação. O mecanismo de ação dessas moléculas consiste em ocupar o sítio de ligação das COX nos ácidos araquidônicos gerados no processo inflamatório. Este bloqueio feito pelos AINEs impede que os ácidos araquidônicos sejam oxidados pela COX e dê origem às prostaglandinas e tromboxanos, responsáveis pela vasodilatação típica do processo inflamatório, dor, febre e agregação plaquetária (CAMARA-LEMARROY et al., 2012; GADEK-MICHALSKA et al., 2013).

Os ácidos salicílicos (AAS) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) mais antigos inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2, com baixa seletividade sobre a COX-2, diferindo dos AINEs inibidores seletivos da COX-2 desenvolvidos mais recentemente. As ações anti-inflamatórias, analgésica e antipirética dos AINEs decorrem principalmente da ação inibitória sobre a COX-2, enquanto os efeitos colaterais são resultantes notadamente da inibição da COX-1 (VILETTI; SANCHES, 2008).

O efeito colateral mais comum consiste na tendência a induzir ulceração gástrica ou intestinal que, algumas vezes, pode ser acompanhada de anemia devido a consequente perda de sangue. O motivo de tal toxicidade é a inibição da atividade da isoforma COX-1, que produz as prostaglandinas responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa gástrica, reduzem a secreção de ácido, aumentam a secreção de bicarbonato e melhoram o fluxo sanguíneo na microcirculação da mucosa. O sangramento gastrointestinal relaciona-se também à inibição da atividade da COX-1 (BATLOUNI, 2010).

Outros efeitos colaterais, além dos problemas gastrointestinais, podem surgir em decorrência do uso de AINEs tais como diarreia, prisão de ventre, perda de apetite, dispepsia, vômitos, sonolência, dor de cabeça, tontura, retenção hídrica, irritação na pele, chiado no ouvido, visão turva, erupção cutânea, aumento da pressão sanguínea, danos renais, reações alérgicas, hepatite medicamentosa entre outros efeitos indesejados (BATLOUNI, 2010).

1.2.2 Anti-inflamatórios Esteroidais (AIEs)

Os anti-inflamatórios esteroidais são hormônios glicocorticoides, também denominados de cortisol. Este hormônio é conhecido como hormônio do estresse, pois em situação de estresse físico elevado, como traumas, cirurgias e infecções, a sua produção aumenta. Também é responsável por elevar a pressão arterial, disponibilizando em maior quantidade glicose e energia para que nosso organismo seja capaz de bater de frente com esses estresses físicos. Sendo assim, sua presença é essencial para regular e sustentar várias ações do organismo como funções metabólicas, cardiovasculares, imunológicas e homeostáticas. (VILETTI; SANCHES, 2008).

O cortisol age no organismo impedindo que mediadores inflamatórios sejam produzidos. Receptores de glicocorticoides podem inativar vários genes com efeitos inflamatórios. A explicação para este efeito é o bloqueio do fator de transcrição NF- κ B evitando, assim a transcrição de citocinas e quimiocinas (BARNES, 2014).

O uso de glicocorticoides também pode apresentar efeitos colaterais. Entre os efeitos indesejados mais comuns estão náuseas, vômitos, acne, sudorese, exantemas, pele fina, dores de cabeça, excitação, confusão, insônia e aumento de peso. Além de causar hiperglicemia, retardo no desenvolvimento infantil, síndrome de Cushing, aumento da pressão arterial, osteoporose, aumento da pressão ocular, redução da massa muscular e prejuízo do sistema nervoso central (BATLOUNI, 2010).

O dexametasona é um AIE bastante utilizado em estudos para elucidação do mecanismo de ação dos glicocorticoides (RAMESH; MEISNER; PHILIPP, 2015).

1.3 Líquido da Casca da Castanha de caju (LCC)

O cajueiro, *Anacardium occidentale* Linn, pertence ao gênero *Anacardium*, da família Anacardiaceae. É uma planta nativa do Brasil, tendo como habitat principal a região Nordeste, mas pode ser encontrado, também, na Amazônia e em regiões do cerrado brasileiro (GONZAGA, 2008). Atualmente, é encontrado em diversas regiões tropicais, as quais se destacam a Índia, Moçambique, Quênia, Tanzânia, Guiné Bissau, Indonésia, Tailândia e Vietnã (MITCHELL; SCOTT, 1987; PARAMASHIVAPPA et al., 2002).

O fruto do cajueiro é uma amêndoa, conhecida como castanha de caju, que se prende à extremidade do pseudofruto suculento, o caju. O sabor, o aroma e o formato do caju e da castanha tornaram a espécie *Anacardium occidentale* L. popular e com grande importância

econômica. Sendo o Brasil o terceiro maior produtor de castanha do mundo, seguindo a Índia com a segunda maior produção e o Vietnã em primeiro lugar (SOUZA FILHO, 2014).

Na indústria de processamento da castanha de caju, são obtidos a amêndoa e o óleo, tradicionalmente conhecido como líquido da casca da castanha (LCC), internacionalmente chamado de Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) (XAVIER; ARAÚJO; VIEIRA, 2008). Para a obtenção da amêndoa, isola-se o LCC, que se torna matéria-prima de grande interesse (GONZAGA, 2008; MITCHELL; SCOTT, 1987). No mercado internacional, o LCC tem sido adquirido para processamento do óleo e posteriormente revendido a preços elevados, para a fabricação de inseticidas, germicidas, antioxidantes, plastificantes, tintas vernizes, entre outros, como no caso da Cardolite Company nos Estados Unidos e da Satya Cashew Chemicals, na Índia. Os preços do LCC são muito variados, de US\$ 0,15 a 0,25/kg de LCC exportado. Valor médio irrisório quando se consideram suas potencialidades (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009).

O LCC, produzido no mesocarpo da casca da castanha, é um óleo viscoso e acre que compreende 25% do peso do fruto *in natura*, sendo uma das fontes mais ricas de lipídeos fenólicos não-isoprenóides, tais como ácidos anacárdicos, cardóis, cardanóis e metilcardóis (MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009) (figura 2), sendo o ácido anacárdico o principal componente do líquido da casca da castanha de caju (LCC) compreendendo cerca de 70% dos lipídeos fenólicos (VIEIRA, 2007).

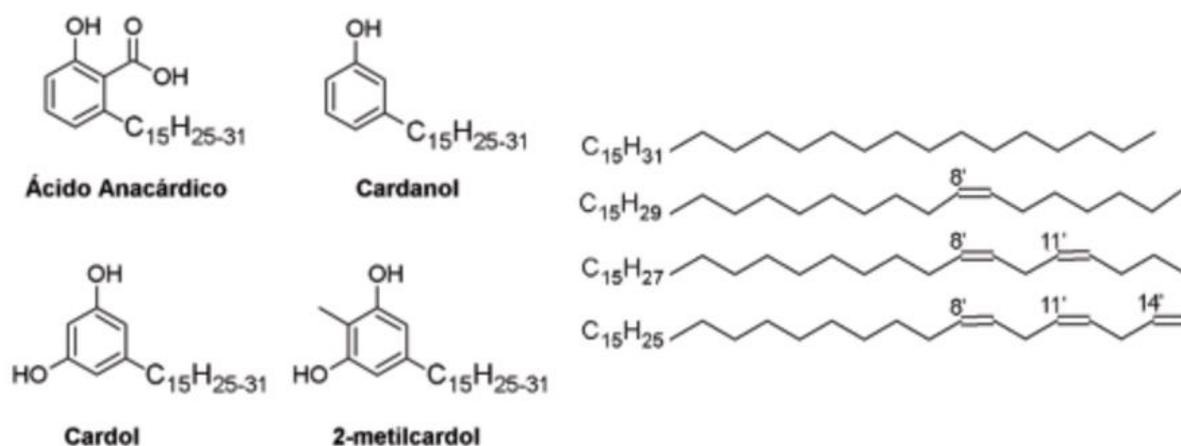


Figura 2 - Lipídeos fenólicos não isoprenóides constituintes do LCC. Fonte: Adaptado de MAZZETTO; LOMONACO; MELE, 2009

A extração do LCC pode ser feita a frio, por processo mecânico, através de prensagem ou por imersão em banho quente do próprio LCC a 185-190°C. Este último é o processo

utilizado pela indústria brasileira. Neste processo pode-se obter cerca de 50% do líquido. A extração a quente produz um LCC diferente do extraído a frio. Durante o aquecimento o ácido anacárdico sofre descarboxilação e é convertido em cardanol. O líquido extraído a quente é chamado de “LCC técnico”. O conteúdo de LCC na castanha crua varia entre 15 e 25%.

1.3.1 **Uso terapêutico das moléculas derivadas do LCC**

Os constituintes do LCC são definidos como compostos naturais não-isoprênicos por terem acetato como precursor biossintético. Estes compostos além de possuírem um núcleo aromático e diversos grupos funcionais distintos, apresentam uma cadeia lateral acíclica contendo múltiplas insaturações na cadeia alifática, o que lhes confere comportamento anfipático e também torna o LCC uma matéria-prima versátil, do ponto de vista sintético (HAMAD; MUBOFU, 2015; VIEIRA, 2007).

A importância industrial do LCC pode ser avaliada pela existência de centenas de patentes internacionais, em sua maioria norte-americana e inglesa, envolvendo sua utilização. A bibliografia cita mais de mil trabalhos publicados sobre o caju e derivados, sendo a maioria de pesquisadores da Inglaterra, Índia e de alguns países africanos. Neste contexto, derivados fenólicos do LCC e derivados sintéticos apresentam atividades biológicas (STASIUK; KOZUBEK, 2010), tais como, antibacteriana (GREEN et al., 2007, 2008), antioxidante (TREVISAN et al., 2006b) e farmacológicas, por exemplo, inibidores enzimáticos (PARAMASHIVAPPA et al., 2002; STASIUK; BARTOSIEWICZ; KOZUBEK, 2008), antiproliferativos (CHANDREGOWDA; KUSH; REDDY, 2009; PARAMASHIVAPPA et al., 2002) e anti-inflamatórios.

2 JUSTIFICATIVA

A alta incidência de efeitos colaterais relacionados aos anti-inflamatórios usuais, tanto esteroidais (glicocorticóides) como os não-esteroidais (AINEs) faz com que seja necessário pensar em fármacos alternativos para o tratamento do processo inflamatório.

Estudos mostram que os derivados do LCC possuem atividade antioxidante e anti-inflamatória através de mecanismos de ação envolvendo a redução de prostanóides e leucotrienos pela inibição de eicosanóides que induzem a produção de enzimas como fosfolipase A, Ciclooxigenase (COX) e Lipooxigenase (LOX), e inibição da indução e expressão de *iNOS* em diferentes modelos celulares (CAMMERER, 2012). No entanto, o elevado desperdício do LCC no Brasil faz com que este subproduto da indústria alimentícia seja pouco explorado (PINHO, 2009).

Numerosos estudos têm investigado novas estratégias terapêuticas, principalmente nos campos da biologia molecular com o aprofundamento dos estudos e análises de expressão de genes de interesse. O conhecimento da expressão gênica de mediadores inflamatórias tem sido essencial para o melhor entendimento e definição de alvos terapêuticos mais eficientes (WANG; QIN, 2018).

Visando aproveitar o LCC, que atualmente é resíduo da indústria alimentícia produtora da castanha de caju, como matéria-prima para a produção de fármaco anti-inflamatório, moléculas biossintéticas derivadas de LCC podem ser testadas para comprovar os efeitos anti-inflamatórios desse composto. O presente trabalho propõe o estudo da influência de derivados de LCC, semissintéticos, através do estudo da expressão de genes envolvidos no processo inflamatório.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil anti-inflamatório de derivados modificados a partir de lipídeos fenólicos de *Anacardium occidentale* L. em um modelo celular *in vitro* para inflamação.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a citotoxicidade dos derivados fenólicos selecionados. Estabelecer o papel preventivo e terapêutico dos derivados fenólicos através da avaliação dos efeitos imunoprotetor e anti-inflamatório. Avaliar a expressão de genes pró-inflamatórios (TNF α , COX-2, iNOS, NF κ B, IL-1 β , IL-6). Dosar a produção de óxido nítrico (NO) e da interleucina-6 (IL-6), em macrófagos murinos, RAW 264.7. Comparar a atividade anti-inflamatória dos derivados fenólicos com fármacos comerciais (AAS e Dexametasona).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

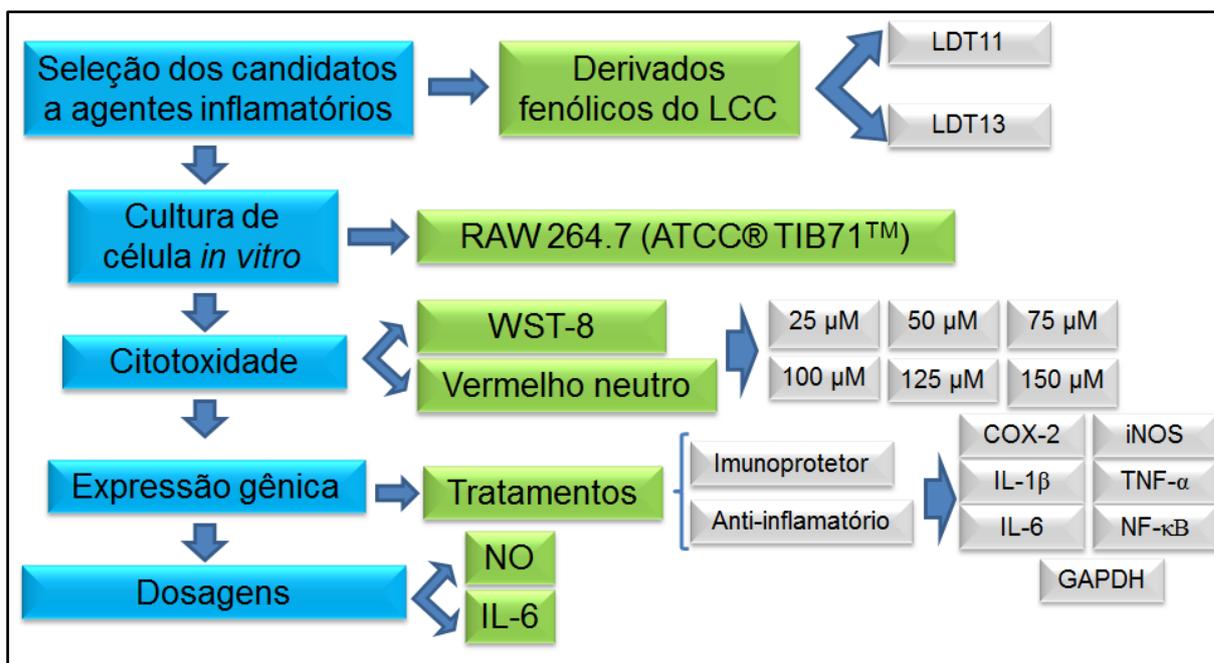


Figura 3 – Sequência de testes realizados para o desenvolvimento do projeto.

4.2 Linhagem celular

Para os experimentos deste trabalho, foi utilizada a linhagem celular: RAW 264.7 (figura 3).

As células RAW 264.7 (ATCC® TIB71™) são macrófagos originalmente identificados a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia Abelson (A-MuLV) em camundongo macho. Estes macrófagos murinos são de crescimento aderente e é o modelo *in vitro* mais aceito para a seleção de drogas anti-inflamatórias e subsequente avaliação de inibidores das vias de sinalização que levam a indução de enzimas inflamatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias (FENGYANG et al., 2012).

A linhagem celular utilizada neste estudo foi adquirida do banco de células do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP). As características dessa linhagem e orientações de cultivo estão descritas pela *American Type Culture Collection* ATCC® e foram seguidas neste estudo.

4.3 Cultura de células *in vitro*

As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento contendo 5 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 22 % de Soro Fetal Bovino (SFB). Para os ensaios de estimulação *in vitro*, as células foram descongeladas em banho maria a 37 °C por 2 minutos e foram transferidas para frasco de 75 cm² contendo meio *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB).

A linhagem celular foi mantida em garrafas de cultura de células de 75 cm² contendo meio *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM) com 4,5 g/L de glicose, 2 mM de L-glutamina, (DMEM high glucose ref 11965-092 *Life Technologies*, GIBCO); suplementado com piruvato de sódio 200 mM (SIGMA-Aldrich); 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (SIGMA-Aldrich) e 1% de aminoácidos não essenciais.

Para a suplementação do meio de cultivo, o SFB foi inativado à 65°C por 1h e para o cultivo da linhagem de RAW264.7 foi suplementado com 10% de SFB (GIBCO, *Life Technologies*), após a suplementação o meio foi denominado DMEM completo.

A cultura foi mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade com trocas regulares do meio de cultura (8 a 10 mL), a cada 3 a 4 dias. O subcultivo das células foi realizado a cada 5 a 7 dias, tempo suficiente para as culturas atingirem taxa de confluência de aproximadamente 90 %.

O subcultivo de RAW 264.7 foi realizado por descolamento das células da superfície de aderência do frasco com o uso de *cell scraper*. A contagem global de células foi realizada na câmara de Neubauer e para o subcultivo de manutenção das culturas, as células foram semeadas na concentração de 2 x 10⁶ para um novo frasco de 75 cm².

4.4 Síntese e caracterização dos candidatos a agentes anti-inflamatórios

Os derivados fenólicos utilizados nesta pesquisa fazem parte da quimioteca de derivados sintéticos e semissintéticos do Laboratório de Desenvolvimento de Estratégias Terapêuticas (LADETER) sob coordenação do Prof. Luiz Antônio Soares Romeiro, e foram cedidos para os ensaios.

As metodologias sintéticas empregadas nesta proposta envolveram reações clássicas em síntese orgânica como hidrogenação catalítica, SEAr, esterificação/amidação, redução, conversão a haletos de acila/anidrido misto, condensação com aminas substituídas, sob condições experimentais à temperatura ambiente, sob refluxo e radiação micro-ondas.

As misturas de ácidos anacárdicos ou cardanol, obtidas do Líquido da Castanha do Cajú (LCC) natural ou técnico, foram submetidas à hidrogenação catalítica aos derivados

saturados. Após conversão aos sistemas salicílicos, estes são transformados em ésteres e amidas análogos e homólogos compreendendo bioisómeros em ambas as séries de retroisômeros.

Em face da observação aos protocolos de sigilo e de confidencialidade exigidos para solicitação de pedido de privilégio intelectual, dados mais específicos sobre o desenvolvimento metodológico desta proposta não serão fornecidos.

A caracterização das estruturas de intermediários e produtos finais foi realizada por meio da análise de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13, no infravermelho e por espectrometria de massas.

Dentre as moléculas do ácido anacárdico sintetizadas e disponibilizadas, duas delas, LDT11 ($C_{22}H_{36}O_3$, massa molar 348,52 g) e LDT13 ($C_{23}H_{39}O_4$, massa molar 390,56 g), foram selecionadas para realização dos ensaios para avaliação dos efeitos anti-inflamatórios efeito de imunoproteção. Para avaliação e comparação da atividade biológica das moléculas sintéticas foram utilizados dois medicamentos comerciais para comparação: ácido acetilsalicílico (AAS), por possuir estrutura química semelhante às moléculas sintéticas, e Dexametasona (Dexa), anti-inflamatório glicocorticosteroide.

4.5 Avaliação do grau de citotoxicidade após interação com os derivados fenólicos sintéticos

Para avaliar a citotoxicidade dos derivados fenólicos hemissintéticos de ácidos anacárdicos e determinar as concentrações ideais a serem utilizadas nas análises *in vitro*, foram utilizados dois métodos colorimétricos: ensaio de captação do corante Tetrazólio WST-8 e o ensaio de incorporação do vermelho neutro (VN) (Figura 3).

4.5.1 Ensaio de WST-8

O ensaio é baseado na capacidade da enzima mitocondrial, desidrogenase succínica, presente somente em células viáveis, em clivar o sal monossódico de tetrazólio WST-8 [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) 2H-tetrazólio]. Esta quebra, resulta na produção de cristais de formazan violeta presentes nas membranas celulares. O número de células viáveis é quantificado por ser proporcional à quantidade de formazan medida por espectrofotometria (JAFARAIN; ASGHARI; GHASSAMI, 2014).

Para a realização do ensaio de citotoxicidade foi utilizado o *kit* comercial *Cell Counting kit-8* (Sigma-Aldrich, Saint Louis - USA) seguindo as instruções do fabricante. Os derivados do ácido anacárdico foram diluídos em PBS 1X. As células foram cultivadas em DMEM

completo numa concentração de 1×10^5 células por poço, em placas de 96 poços, incubadas a 37 °C em estufa mantida com 10 % CO₂, por um período de 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi trocado por 100 µL de meio DMEM sem suplementação incolor e 100 µL dos derivados LDT11 ou LDT13 foram adicionados aos poços, nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM, totalizando um volume total de 200 µL por poço. Para este ensaio, utilizamos todas as amostras e controles em triplicata técnica e duplicata biológica.

Depois da adição dos LDTs, a cultura de células foi homogeneizada e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições descritas. Após 48h, o meio foi descartado e acrescentado 100 µL de meio DMEM incolor sem suplementação, em seguida, foi adicionado 10 µL de WST-8 em cada poço. Para o controle positivo, foram utilizadas células sem nenhum tratamento. Para o controle de morte celular, foram usadas células estimuladas com DMSO 60 %. Para o branco, foi adicionado meio DMEM incolor em poços sem células.

Para avaliar a ausência de interação química entre os LDTs e o reagente do *kit* WST-8, foram colocados nos poços sem células, as mesmas concentrações de LDT e adicionado o WST-8. Após 3 horas de incubação com o WST-8, foi medida a absorvância das amostras em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) em comprimento de onda de 450 nm. Para descartar interação química entre o extrato e o reagente de WST-8, foi realizado um ensaio utilizando apenas os reagentes do kit WST-8 e cada uma das concentrações dos lipídeos fenólicos testados, sem a presença de células.

4.5.2 Ensaio de Vermelho Neutro (VN)

Vermelho neutro é um teste que avalia a sobrevivência e viabilidade celular baseado na capacidade de células viáveis incorporarem o vermelho neutro, um corante supravital, catiônico fraco que penetra facilmente nas membranas celulares, acumulando-se intracelularmente, onde se liga aos sítios de matriz lisossomal aniônica. Alterações na superfície celular ou na membrana do lisossomo levam a fragilidade lisossomal e outras alterações que gradualmente tornam-se irreversíveis. Essas modificações causadas pela ação de xenobióticos resultam numa redução da absorção e ligação do vermelho neutro, sendo possível distinguir células mortas ou danificadas (não viáveis), das células vivas (viáveis) (MATTANA et al., 2014), uma vez que o corante é absorvido pelas células viáveis e armazenado nos lisossomos, enquanto células não-viáveis não são capazes de absorver o corante (ZWOLAK, 2016).

Para avaliar a viabilidade das células frente aos LDTs foi realizado o ensaio do vermelho neutro conforme descrito por Taner et al., (2013), com algumas modificações. As células foram colocadas em placa de 96 poços numa concentração de 1×10^5 , em meio DMEM completo e foram mantidas a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM incolor suplementado com 5 % de SFB e foi adicionado aos poços, em triplicata, a diluição dos derivados LDT11 e LDT13 nas concentrações de 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM, totalizando um volume total de 200 µL por poço. Para controle positivo, foram utilizados poços com células sem nenhum tratamento (NT). Para controle negativo, foram utilizados poços com células tratadas com DMSO 60%.

Para avaliar a ausência de interação química entre os LDTs e os reagentes do teste Vermelho Neutro, foram colocados nos poços sem células, as mesmas concentrações de LDT e adicionado os reagentes.

A placa foi incubada por 48 horas nas mesmas condições já mencionadas. Após as 48 horas de incubação com os LDTs, o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com a solução tampão fosfato salino (PBS 1 X; pH 7,4) e 100 µL de meio DMEM suplementado com 50 µg/mL de vermelho neutro foram adicionados aos poços. A placa foi incubada, nas condições supracitadas, por 3 horas, em seguida, o meio foi descartado e as células foram lavadas por cinco vezes com PBS 1X a fim de remover o excesso de corante não incorporado pelas células.

Após a lavagem, foram adicionados 100 µL de solução de álcool-ácido (50 % de etanol, 1 % de ácido acético e 49 % de água destilada) em cada poço para fixar o vermelho neutro nas células. A placa foi agitada por 10 minutos e a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro de microplacas *TP-Reader* (*Thermoplate, Palm city, FL,USA*) com filtro de 492 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem. Sendo o valor obtido para o controle positivo, ou seja, células não-tratadas (NT), considerado 100 % de viabilidade. A equação utilizada foi: Viabilidade (%) = (n° de células viáveis/número total de células não tratadas) x 100.

4.6 Análise de expressão gênica

4.6.1 Tratamento diferencial da expressão gênica

Para avaliação da influência dos LDTs na expressão gênica da linhagem RAW 264.7, quando estimuladas com LPS, foram realizados experimentos de Reação em Cadeia de

polimerase quantitativa em Tempo Real (qPCR). Para isso, o RNA das células foi extraído, purificado e quantificado. A partir dos RNA obtidos, foi sintetizado o cDNA correspondente e, assim, preparado para a reação de qPCR, como descrito a seguir. Para este ensaio, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de seis poços na concentração de 5×10^6 células/poço, contendo 3 mL meio DMEM 10 % completo. As placas foram incubadas até atingirem confluência de aproximadamente 90 %, 24 horas após o semeio. Após esse período, o meio foi descartado e adicionado 3 mL de meio DMEM incolor sem suplementação com soro fetal bovino (SFB), para conter a taxa de crescimento celular. Em seguida, as células receberam tratamentos para análise de efeito imunoprotetor e efeito anti-inflamatório. Os tratamentos utilizados para análise do efeito imunoprotetor foram: 1- Células não tratadas; 2- Células inflamadas com LPS (figura 6); 3- Células tratadas com LDT11 antes de serem expostas ao agente inflamatório (LPS); 4- Células tratadas com LDT13 antes de serem expostas ao agente inflamatório (LPS); 5- Células tratadas com ASS antes de serem expostas ao agente inflamatório (LPS); 6- Células tratadas com Dexa antes de serem expostas ao agente inflamatório (LPS) (figura 4). Já os tratamentos utilizados para análise do efeito anti-inflamatório dos derivados do LCC foram: 1- Células não tratadas; 2- Células inflamadas com LPS (figura 6); 3- Células inflamadas com LPS e, em seguida, tratadas com LDT11; 4- Células inflamadas com LPS e, em seguida, tratadas com LDT13; 5- Células inflamadas com LPS e, em seguida, tratadas com AAS; 6- Células inflamadas com LPS e, em seguida, tratadas com Dexa (figura 5). Os tempos dos tratamentos foram de 6h, 24h e 48h, conforme exposto na tabela 1 e tabela 2.

Tabela 1 – Tratamento Imunoprotetor das células RAW 264.7

Tempo total	Forma de tratamento
6h	células não tratadas (NT), incubadas por 6 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 6 horas
	50 µM de LDT11, as células foram incubadas por 3 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas
	50 µM de LDT13, as células foram incubadas por 3 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas
	50 µM de AAS, as células foram incubadas por 3 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas
	50 µM de Dexa, as células foram incubadas por 3 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas

24h	células não tratadas (NT), incubadas por 24 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 24 horas
	50 µM de LDT11, as células foram incubadas por 6 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	50 µM de LDT13, as células foram incubadas por 6 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	50 µM de AAS, as células foram incubadas por 6 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
48h	50 µM de Dexa, as células foram incubadas por 6 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	células não tratadas (NT), incubadas por 48 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 48 horas
	50 µM de LDT11, as células foram incubadas por 24 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas
	50 µM de LDT13, as células foram incubadas por 24 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas
48h	50 µM de AAS, as células foram incubadas por 24 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas
	50 µM de Dexa, as células foram incubadas por 24 horas e, após este período, foi adicionado à cultura 1 µg/mL de LPS, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas

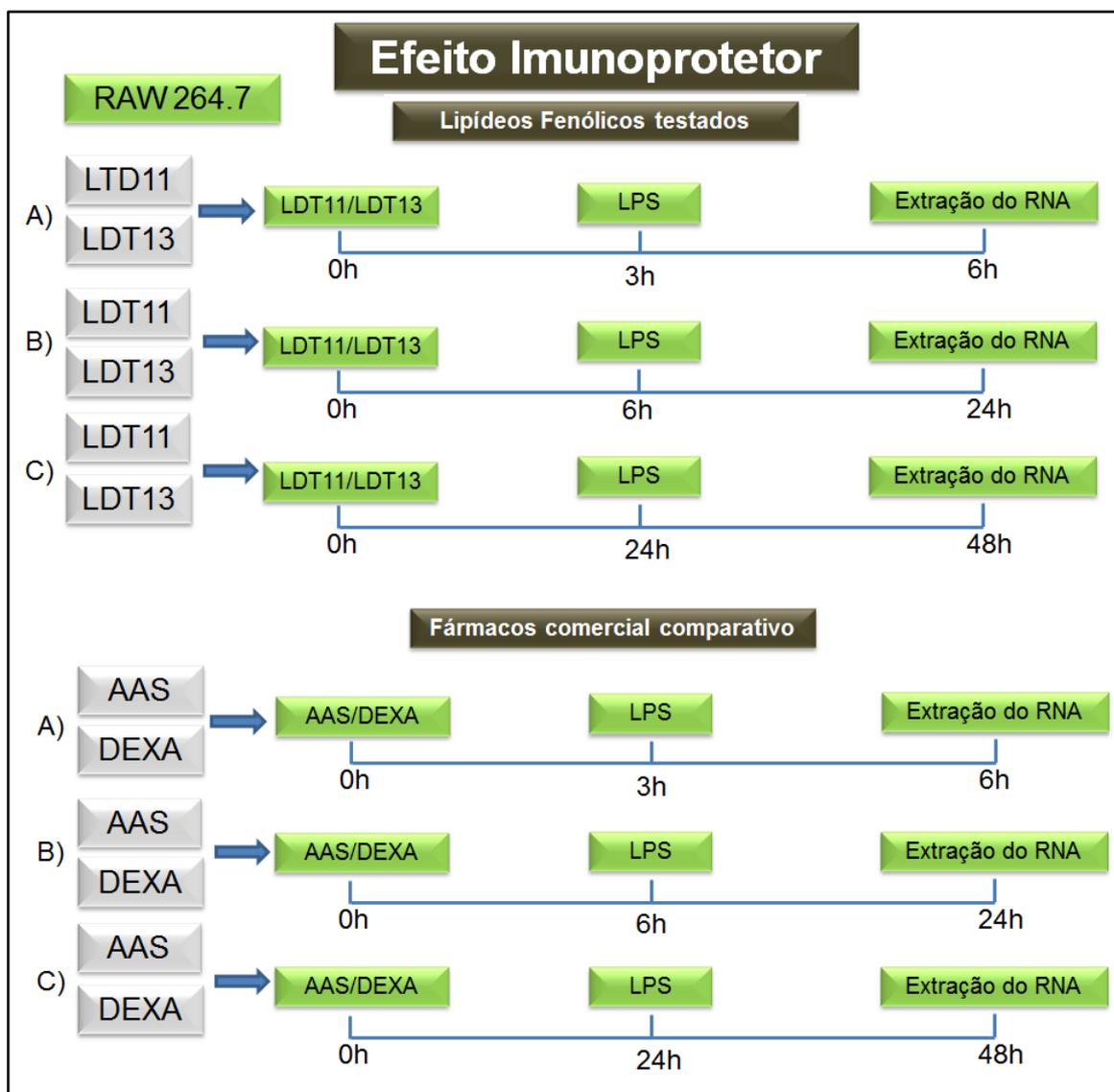


Figura 4 - Representação gráfica dos tratamentos realizados nas culturas de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação do efeito imunoprotetor dos derivados fenólicos, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS.

Tabela 2 – Tratamento Anti-inflamatório das células RAW 264.7

Tempo total	Forma de tratamento
6h	células não tratadas (NT), incubadas por 6 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 6 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 3 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de LDT11, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 3 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de LDT13, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas

	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 3 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de AAS, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 3 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de Dexa, em seguida, as células foram incubadas por mais 3 horas
	células não tratadas (NT), incubadas por 24 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 24 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 6 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de LDT11, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
24h	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 6 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de LDT13, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 6 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de AAS, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 6 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de Dexa, em seguida, as células foram incubadas por mais 18 horas
	células não tratadas (NT), incubadas por 48 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 48 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 24 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de LDT11, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas
48h	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 24 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de LDT13, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 24 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de AAS, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas
	1 µg/mL de LPS, as células foram incubadas por 24 horas, após este período, foi adicionado à cultura 50 µM de Dexa, em seguida, as células foram incubadas por mais 24 horas

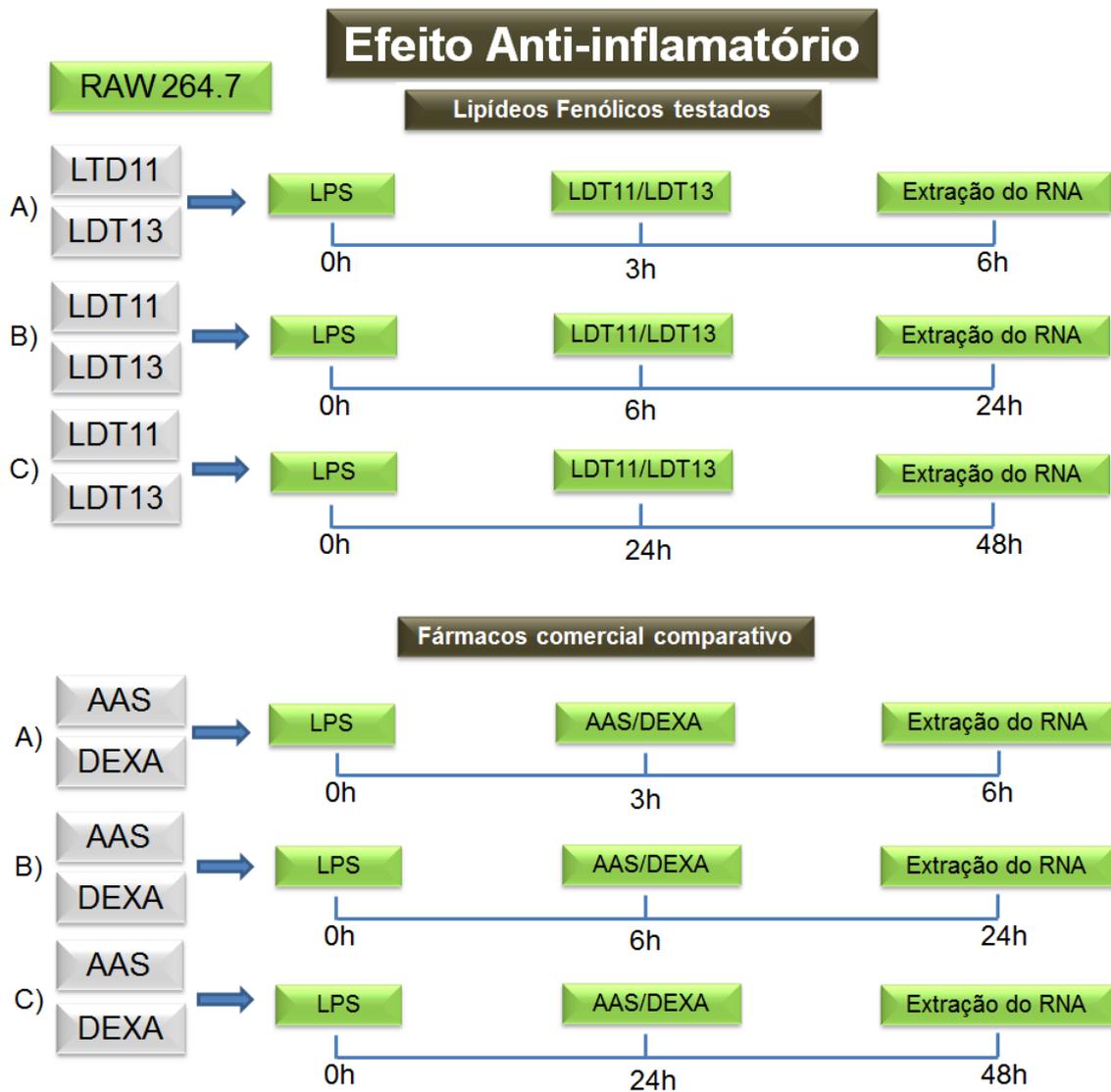


Figura 5 - Representação gráfica dos tratamentos realizados nas culturas de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação do efeito anti-inflamatório dos derivados fenólicos, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona.

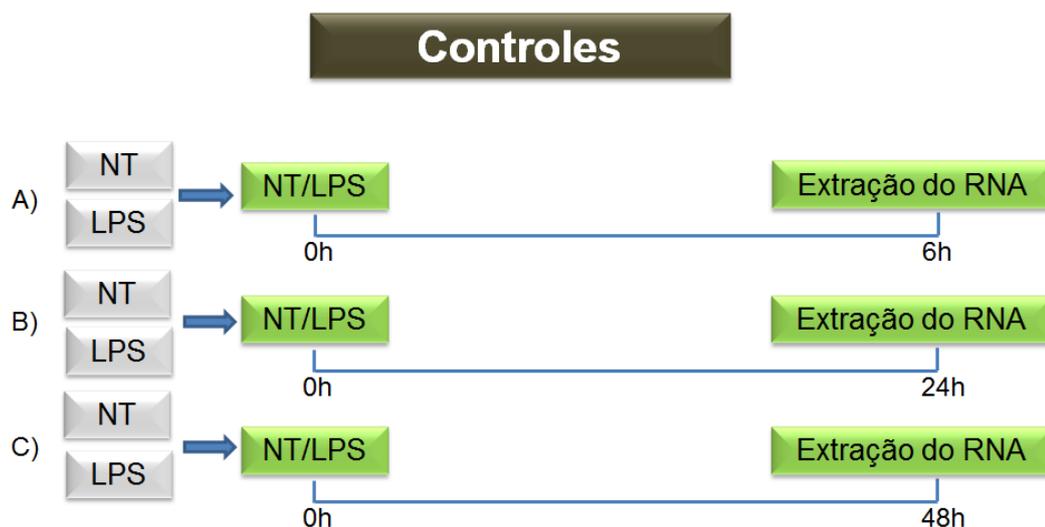


Figura 6 – Representação gráfica dos controles utilizados nos tratamentos realizados nas culturas de células da linhagem RAW 264.7 para avaliação dos efeitos imunoprotetor e anti-inflamatório dos derivados fenólicos, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT – células não tratadas e LPS – Células tratadas com o estímulo inflamatório LPS.

Após o devido tempo de tratamento, respectivo a cada amostra, o meio foi descartado e foi adicionado 1 mL do reagente *TRI Reagent*[®] (Sigma-Aldrich), à base de trizol, para lisar as células, mantendo a integridade do RNA total. Em seguida, o lisado foi transferido para microtubos de 2 mL e armazenados a -20°C. Para os ensaios de análise da expressão gênica, as amostras e controles foram utilizados em triplicata técnica e duplicata biológica.

4.6.2 Extração e purificação de RNA

A extração e purificação de RNA, foi realizada utilizando o *kit* comercial *Direct-zol*[™] *RNA Miniprep* (*Zymo Research, USA*), seguindo as instruções do fabricante, que inclui etapa de tratamento com DNase. O lisado celular (1 mL) em trizol foi descongelado por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Depois de descongelado, foi adicionado ao lisado celular 1 mL de etanol a 95 %, o conteúdo foi homogeneizado exaustivamente e agitado vigorosamente por 15 segundos. Após este procedimento, 700 µL do conteúdo foram transferidos para uma coluna de sílica do *kit* comercial e centrifugado a 11.000 g por 1 min, o filtrado foi descartado. Este passo foi repetido até que todo o conteúdo do lisado celular fosse filtrado pela coluna de sílica. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo onde foram adicionados 400 µL de solução de lavagem (*RNA Wash Buffer*), e uma nova centrifugação foi realizada a 11.000 g por 1 min. A coluna foi então transferida para novo tubo para dar início a purificação do RNA.

Para a purificação do RNA, foram adicionados à coluna 80 µL de DNase (*cocktel DNase*), aplicado diretamente no filtro, em seguida, os tubos e coluna foram incubados a 37 °C por 15 min, após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 11.000 g por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados à coluna 400 µL de solução pré-lavagem (RNA *pre-wash buffer*), e novamente centrifugado a 11.000 g por 1 min. O filtrado foi descartado e o passo de pré-lavagem foi repetido. Posteriormente, foram adicionados à coluna 700 µL de solução de lavagem (RNA *wash buffer*) e uma nova centrifugação a 11.000 g por 2 min. O filtrado foi descartado e, em seguida, foi repetida a centrifugação com a coluna vazia na mesma velocidade, por 1 min.

A coluna vazia foi transferida para novo microtubo de 1,5 mL livre de RNase. Foi adicionado à coluna de sílica 11 µL de água ultrapura (Invitrogen, *Life technologies*), para a liberação do RNA purificado, foi realizada uma centrifugação a 13.500 g por 2 min. Este passo, para a liberação do RNA da coluna de sílica foi repetido nas mesmas condições. O tubo contendo os 22 µL do filtrado de RNA foi devidamente identificado para seguir com a quantificação do RNA.

4.6.3 Quantificação e análise do RNA extraído

A quantificação do RNA extraído foi determinada através de espectrofotômetro *NanoDrop 2000 spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) que utiliza a leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Para avaliar o grau de pureza das amostras foi considerada a razão da absorbância em dois comprimentos de onda nas densidades óticas (DO) $A_{260/280}$ nm (que avalia contaminação com proteínas) e $A_{260/230}$ nm (que avalia contaminação por compostos orgânicos). Quando a razão entre as absorbâncias desses dois comprimentos de onda (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) ficou entre 1.8 e 2.0, o grau de pureza do RNA foi considerado adequado para a realização das análises. As amostras de RNA foram armazenadas a – 80 °C para síntese de DNA complementar (cDNA).

4.6.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *kit* comercial *Highcapacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA). A um tubo de 0,2 mL foi adicionada quantidade suficiente do filtrado de RNA de modo que totalizasse 2 µg de RNA por tubo. Em seguida, foram adicionados os reagentes do *kit* comercial, em suas devidas proporções de acordo com as instruções do fabricante. Os tubos foram colocados no termociclador (*BioNer – My Genie 96 Thermal Block*) e submetidos à transcrição reversa (RT). Posteriormente, os

microtubos contendo o cDNA foram armazenados em temperatura de - 20°C para futuras análises.

4.6.5 Definição dos genes de interesse para o estudo

Para esta etapa, foram selecionados genes envolvidos com a atividade inflamatória. Para um teste inicial, foram utilizados 6 *primers* para genes de interesse e 1 *primer* de gene constitutivo (GAPDH) como controle. Foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT), descritos a seguir na Tabela 3. Todos os pares de *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*) com base nas sequências obtidas da base de dados do transcriptoma de camundongo (<http://www.informatics.jax.org>).

Tabela 3 - Primers utilizados nas reações de qPCR.

<i>Primers</i>	Descrição	Sequências	T _m *
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	5'-CCGGTGCTGAGTATGTCG-3' 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCGTA-3'	85,72
COX-2	Ciclooxigenase 2	5'-TGAGTACCGCAAACGCTTCTC-3' 5'-TGGACGAGGTTTTCCACCAG-3'	80,35
IL-1β	Interleucina 1 beta	5'-TGAAATGCCACCTTTTGACAG-3' 5'-CCACAGCCACAATGAGTGATA-3'	54,80
IL-6	Interleucina 6	5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3' 5'-CAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'	73,48
iNOS	Sintase induzida do óxido nítrico	5'-GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3' 5'-GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'	77,81
NF-κB	Fator Nuclear kappa B	5'-AGCCAGCTTCCGTGTTTGTT-3' 5'-AGGGTTTCGGTTCCTAGTTTCC-3'	77,81
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa	5'-TCTTCTCATTCCTGCTTGTGG-3' 5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGA-3'	81,70

*T_m: Temperatura de *melting*

4.6.6 Padronização das concentrações dos *primers* específicos

Os experimentos de qPCR foram realizados no equipamento *StepOnePlus™* (*Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA*). A otimização do protocolo de reação é necessária para determinar o desempenho da reação de PCR quando comparada com diferentes reações e condições, tendo assim uma maior confiabilidade e reprodutibilidade.

Para uma avaliação criteriosa, vários fatores são levados em consideração para se obter maior precisão e confiança nos resultados: precisão determinada e passível de ser corrigida pela triplicata da reação; eficiência, indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão e de parâmetros como R² e Y-interceptor (ponto em que a curva corta o eixo Y), calculados pela

diluição seriada dos *primers*, demonstrando o quão fiel um valor é em predizer outro valor, estabelecendo uma boa confiança na correlação de dois valores; e sensibilidade da análise estatística, onde um grande número de replicatas é necessário para prover significância estatística.

4.6.6.1 Titulação dos *Primers*

A concentração de *primers* utilizadas na reação de qPCR deve ser a quantidade mínima necessária para a duplicação de todas as cópias do gene alvo, caso esteja presente na amostra. Dessa forma, utilizando a mesma quantidade de amostras estimuladas com LPS por 48 horas, foram feitas reações com a combinação de três diferentes concentrações de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 100, 300 e 600 nM. As reações foram realizadas em triplicatas para cada gene. Foi utilizado o método de *Quantification – Relative Standard Curve*. A concentração ótima foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor Ct e Δ RN maior que 1 e que não apresentou formação de dímeros. Na tabela 4, estão listadas as condições ótimas padronizadas para cada um dos *primers* a partir do ensaio de otimização/titulação.

Tabela 4 – *Threshold*, concentração de *primers*, concentração de cDNA e condições de termociclagem padronizadas para cada um dos *primers* a partir dos ensaios de curva padrão e otimização, para amplificação do qPCR.

<i>Primers</i>	Concentração de <i>primer</i> (nM)	Concentração de cDNA (ng)	Nº de ciclos para desnaturação
<i>GAPDH F</i>	300	100	40
<i>GAPDH R</i>	300	100	40
<i>COX-2 F</i>	300	100	40
<i>COX-2 R</i>	300	100	40
<i>IL-1β F</i>	300	100	40
<i>IL-1β R</i>	300	100	40
<i>IL-6 F</i>	600	100	40
<i>IL-IL-6 R</i>	100	100	40
<i>iNOS F</i>	300	100	40
<i>iNOS R</i>	300	100	40
<i>NF-κB F</i>	600	100	40
<i>NF-κB R</i>	600	100	40
<i>TNF- α F</i>	600	100	40
<i>TNF- α R</i>	300	100	40

4.6.6.2 Ensaio de eficiência

Estabelecida a melhor concentração de *primer* por reação, foi realizado o ensaio de eficiência. Foi utilizado cDNA de células estimuladas com LPS, que apresenta expressão dos genes alvos analisados. Foi feita uma diluição seriada da amostra usando água ultrapura

(Invitrogen, Life technologies). As concentrações obtidas após a diluição seriada foram: 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng. Todas as reações foram feitas em triplicatas por gene e o método utilizado foi *Quantification – Relative Standard Curve* ou quantificação relativa.

4.6.7 Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real (qPCR)

As reações de qPCR foram feitas pelo sistema *SYBR Green (Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix - Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania, USA)*, em um volume total de reação de 20 μL , contendo 50 ng de cDNA, 5 pmol/ μL de cada *primer forward* e *reverse* e q.s.p. de água ultrapura.

Os ensaios de amplificação foram realizados em placas de 96 poços no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied biosystems, USA)*, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação 95 °C por 15 seg, anelamento e extensão a 60 °C por 1 min e 72 °C por 30 seg. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene, sendo que o gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno e gene normalizador. Como controle negativo, foi utilizado poços com água substituindo o cDNA. A quantidade relativa de cada gene foi calculada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$). A curva de *melting* foi analisada como controle de qualidade dos produtos da amplificação.

4.6.8 Expressão gênica

Para a análise da expressão gênica dos transcritos que codificam os marcadores inflamatórios estudados, os dados de quantificação relativa (*Fold Change*) foram calculados pelo método $\Delta\Delta\text{Ct}$, que permite uma comparação relativa com o grupo que não recebeu tratamento ou grupo calibrador. Neste estudo, os calibradores foram o grupo 1, que não recebeu tratamento (NT), e o grupo 2, que foi estimulado com LPS (LPS).

4.7 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para análise do NO, foi utilizado o método de Griess, pela adição de 100 μL de reagente de Griess (1% [w/v] sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e 0,1% [w/v] de N-1-naftil-ethylendiamide-dicloridrato (NEED) em água). As amostras de sobrenadantes das culturas foram analisadas em leitora de microplacas (450nm), e os resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$ de NO_2^- comparando-se a densidade ótica (D.O.) obtida com uma curva padrão de NO_2^- (GREEN et al., 1981). A curva de referência foi preparada, fazendo uma diluição seriada de Nitrito de Sódio nas seguintes concentrações: 100 μM ; 50 μM ; 25 μM ; 12,5 μM ; 6,25 μM ; 3,13 μM e

1,56 μM . Foram colocados em todos os poços 50 μL de meio DMEM com 5% de SFB incolor. Aos poços da curva de referência foram adicionados, em triplicata, 50 μL da diluição de nitrito de sódio em cada uma das concentrações. Aos poços restantes foram adicionados 50 μL do sobrenadante de cada amostra com seus respectivos tratamentos.

Para avaliar o potencial efeito imunoprotetor as células foram tratadas com 50 μM de LDT11 e LDT13, por 3 horas e, em seguida, foi adicionado LPS por 48 horas. Para avaliar o efeito anti-inflamatório dos derivados do ácido anacárdico, foi feito tratamento com LPS, por 48 horas e, após este período, foram adicionados 50 μM de LDT11 e LDT13. As amostras foram coletadas, após adicionar os LDTs nos tempos de 3h, 24h e 48h. Para controle positivo, foi utilizado tratamento somente com LPS e para controle negativo foi utilizado células sem nenhum tratamento (NT).

Para a dosagem do NO, foram adicionados, a cada sobrenadante da cultura, 100 μL do reagente de *Griess*. Para o controle negativo, foram separados poços contendo apenas meio DMEM com 5 % de SFB, sem amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro empregando filtro de 450 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de NO_2^- comparando a densidade ótica (D.O.) obtida com a D.O da curva padrão de NO_2^- através de regressão linear.

4.8 Dosagem de IL-6

A quantificação de Interleucina-6 (IL-6) foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático de competição, conforme estabelecido no *kit* do fabricante (Mouse IL-6 Assay Kit – IBL, code no. 27768, Hamburg, Germany). Para este ensaio, foram utilizados os sobrenadantes das células RAW 264.7 tratadas com os derivados fenólicos sintéticos (LDT11 e LDT13) na concentração 50 μM , o mesmo tratamento feito para os ensaios de expressão gênica.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo método pós-teste (Bonferoni, *Dunnnett* e *t-teste*) quando aplicável, de acordo com o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Sendo consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Síntese e caracterização dos candidatos a agentes anti-inflamatórios

Para a seleção das moléculas semissintéticas do LCC foram feitos testes preliminares de citotoxicidade e análise de expressão gênica com mais de cinquenta moléculas. As moléculas que mostraram os melhores resultados preliminares foram o LDT11 e LDT13, dados não apresentados. Por este motivo, os experimentos posteriores foram realizados com as moléculas LDT11 e LDT13.

O LDT11 ($C_{22}H_{36}O_3$) consiste em uma molécula sólida branca, com ponto de fusão a 83 °C, massa molar de 348,519 g/mol, fator de retenção (eluente: hexano 80%, acetato de etila 20%) de 0,48.

O LDT13 ($C_{24}H_{39}O_4$) consiste em uma molécula sólida branca, com ponto de fusão a 67 °C, massa molar de 390,556 g/mol, fator de retenção (eluente: hexano 80%, acetato de etila 20%) de 0,2; sendo assim, mais polar que o LDT11.

5.2 Viabilidade celular

Para analisar o efeito citotóxico dos derivados fenólicos, LDT11 e LDT13, foram realizados ensaios de avaliação da viabilidade celular pelos métodos WST-8 e Vermelho Neutro. Para estes testes, foram utilizadas as concentrações de 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M e 150 μ M dos dois derivados do LCC. Para cálculo do resultado de viabilidade celular, o valor de DO_{450} do branco foi descontado e o valor de DO_{450} das células não tratadas foi considerado como sendo 100 % viável.

5.2.1 Viabilidade celular pelo método utilizando o reagente WST-8

No intuito de descartar a possibilidade de interação química cruzada entre os LDTs e o reagente WST-8 do *kit* comercial, foi realizado um ensaio sem células, apenas com os LDTs e o reagente em questão. Os resultados demonstraram que as concentrações testadas: 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M e 150 μ M obtiveram um valor de densidade ótica (DO_{450}) próximo ao valor do branco (apenas meio de cultura). Desta forma, pode-se inferir que os LDTs não interagem quimicamente com o reagente de WST-8 (Figura 7), podendo ser devidamente utilizados para os testes de viabilidade celular.

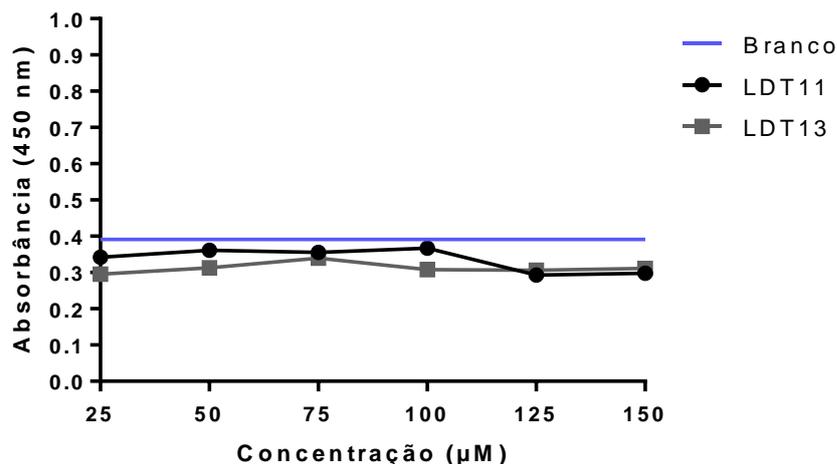


Figura 7 - Teste de interação química do reagente de WST-8 e as diferentes concentrações de LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3).

A figura 8 ilustra o ensaio de viabilidade celular pelo método WST-8. A concentração de 25 µM de LDT11 mostrou uma viabilidade celular de aproximadamente 100 % e de LDT13 foi de aproximadamente 90 %. A viabilidade na concentração de 50 µM de LDT11 foi de aproximadamente 90 % e de LDT13 foi de aproximadamente 80 %. A partir da concentração de 75 µM de LDT11 e de LDT13 a viabilidade celular mostrou-se igual ou inferior a 60%.

Para este estudo, as concentrações de LDT foram consideradas citotóxicas quando apresentaram resultados de viabilidade celular iguais ou inferiores a 60%.

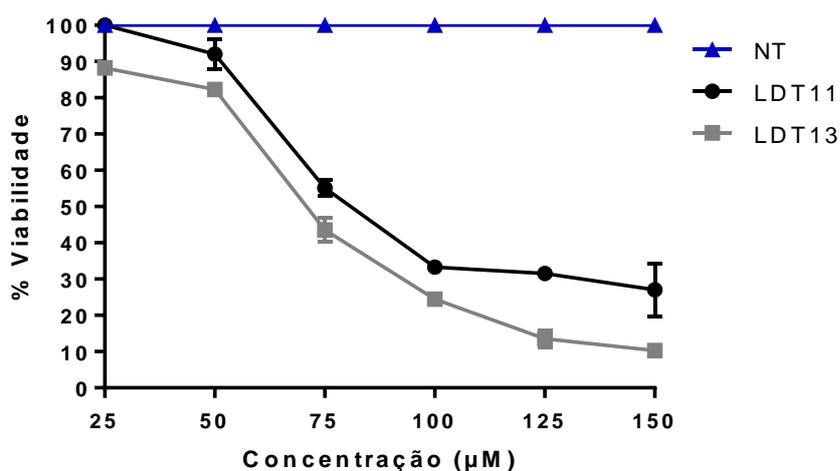


Figura 8 - Teste de viabilidade celular pelo método WST-8, em linhagem celular RAW264.7, utilizando diferentes concentrações dos derivados de ácido fenólicos, LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3).

5.2.2 Viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro

Para confirmar os resultados de viabilidade celular obtidos pelo ensaio WST-8, foi utilizado o método incorporação do vermelho neutro. Primeiramente, foi avaliado a interação química cruzada dos LDT11 e LDT13 com os reagentes do teste de vermelho neutro, figura 9. As concentrações utilizadas foram as mesmas do ensaio WST-8. Não foi verificada interação entre os LDTs e os reagentes do ensaio do vermelho neutro, sendo as OD₄₉₂ verificadas com as concentrações de LDTs similares às OD₄₉₂ do branco.

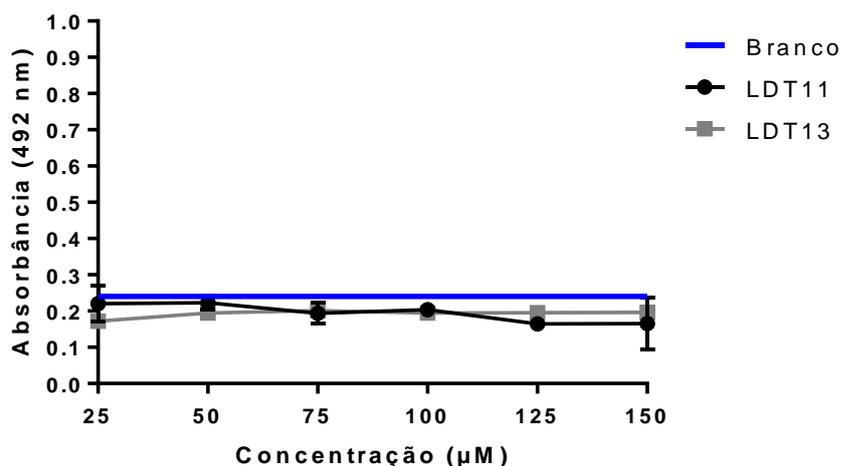


Figura 9 - Teste de interação química dos reagentes do ensaio de incorporação do Vermelho Neutro e as diferentes concentrações de LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3).

Em seguida, foi realizado o ensaio de incorporação do vermelho neutro utilizando a linhagem celular RAW264.7 nas concentrações supracitadas, para avaliação de citotoxicidade.

O ensaio mostrou resultados similares aos encontrados pelo método WST-8, figura 10. Os resultados encontrados para as diferentes concentrações de LDT11 e LDT13 foram estatisticamente coincidentes. A concentração de 25 µM mostrou viabilidade celular de 100% e na concentração de 50 µM de 80%, aproximadamente. A viabilidade celular nas concentrações de 75 µM e 100 µM foi de aproximadamente 60% e 40%, respectivamente. Nas concentrações de 125 µM e 150 µM a viabilidade foi de aproximadamente 20%. As concentrações de LDT foram consideradas citotóxicas quando apresentaram resultados igual ou inferior a 60 % de viabilidade celular.

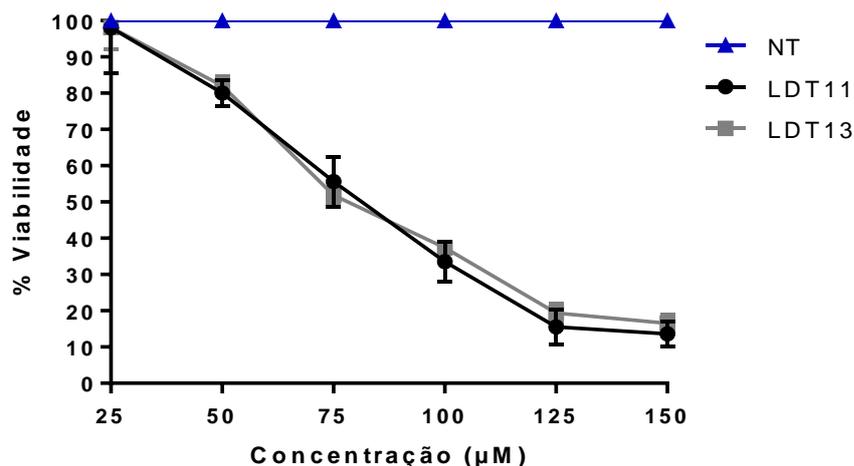


Figura 10 - Teste de viabilidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro, em linhagem celular RAW 264.7, utilizando diferentes concentrações dos derivados de ácido fenólicos, LDT11 e LDT13. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3).

A partir dos resultados dos ensaios de viabilidade celular, as concentrações tóxicas para as células RAW264.7 foram excluídas do estudo. A concentração padronizada para realização dos demais ensaios foi de 50 µM. Para padronizar a comparação entre os lipídeos fenólicos e os fármacos comerciais, a concentração de AAS e Dexametasona utilizada nos teste, também foi de 50 µM.

5.3 Expressão gênica

5.3.1 Quantificação relativa dos transcritos dos genes *TNF-α*, *COX-2*, *iNOS*, *NF-κB*, *IL-1β* e *IL-6* após tratamento com LDT11 e LDT13

Com o objetivo de analisar a modulação gênica das células RAW264.7, após interação com os derivados do ácido anacárdico LDT11 e LDT13, no processo inflamatório, a expressão gênica foi avaliada através da quantificação relativa dos transcritos dos genes *TNF-α*, *COX-2*, *iNOS*, *NF-κB*, *IL-1β* e *IL-6*. A inflamação foi induzida com 1 µg/mL de LPS, de acordo com resultados de ensaios anteriores (TEOTÔNIO, 2015). As células foram tratadas de acordo com os tratamentos descritos no item 4.6.1 e separadas por grupos de acordo com o tratamento utilizado, tratamento imunoprotetor e tratamento anti-inflamatório, como descrito nas tabelas 1 e 2. Os derivados LDT11 e LDT13 foram utilizados na concentração de 50 µM assim como os fármacos comerciais .

O grupo de tratamento imunoprotetor testou a hipótese dos derivados de LCC evitarem uma possível inflamação frente a um agente inflamatório. Foi adicionado LDT11 ou LDT13

ao meio de cultura antes do indutor de inflamação (LPS). A análise foi feita nos tempos de 6 horas, 24 horas e 48 horas de tratamento.

O gene *TNF- α* , cujo principal efeito fisiológico é promover a resposta imune inflamatória por meio do recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos, apresentou sua expressão reprimida, figura 11. Depois de 6h de estímulo, sendo 3 horas de tratamento com os LDT11 ou LDT13 e em seguida 3 horas de estímulo com LPS. A repressão gênica foi de 88% quando tratado com LDT11 e 53% quando tratada com LDT13, comparado ao grupo controle de inflamação (LPS). O AAS apresentou uma repressão de 33% enquanto que o anti-inflamatório comercial Dexametasona (DEXA) apresentou uma repressão de 50%. Estes resultados sugerem que LDT11 e LDT13 apresenta um possível efeito protetor à inflamação melhor que os anti-inflamatórios testados, figura 11A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou dados semelhantes aos anteriores, figura 11B. Os tratamentos com LDT11 e LDT13 antes de adicionar o LPS, apresentou uma repressão gênica de 91% e 56%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado com LPS. O tratamento com AAS apresentou uma repressão gênica de 55% e o tratamento com DEXA apresentou uma repressão de 64%. Os dados do tratamento por 24h também sugerem um possível efeito protetor à inflamação.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *TNF- α* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 11C. Para o LDT11 a repressão foi de 47%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 20%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 4% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene em 32%.

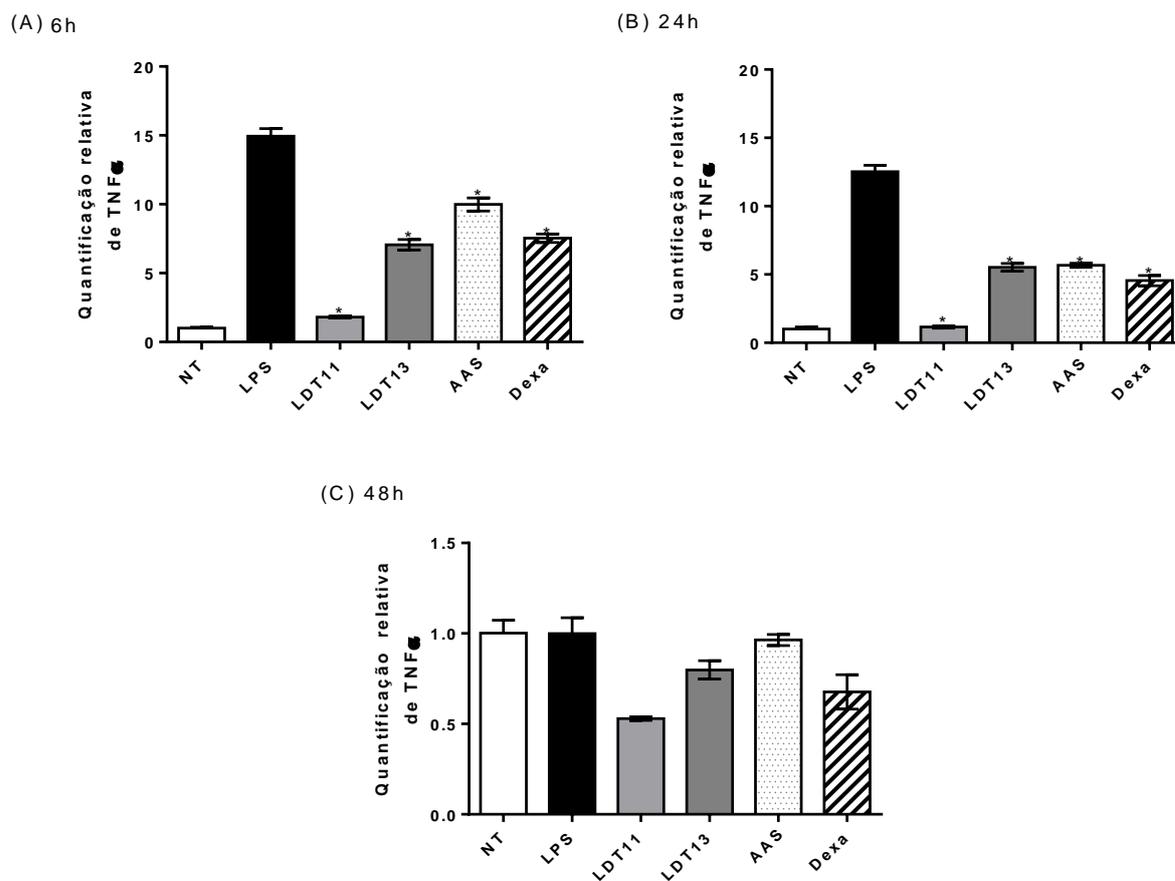


Figura 11 - Quantidade relativa de transcritos do gene *TNF-α* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

O segundo gene analisado no tempo de 6 horas foi o *COX-2*, que codifica a enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, nos processos inflamatórios. A figura 12 mostra a repressão da expressão gênica de *COX-2*, nos tratamentos de 6 horas e 24 horas e um aumento na expressão no tempo de tratamento de 48 horas.

Após 3 horas de tratamento com os LDT11 ou LDT13 e, em seguida, 3 horas de estímulo com LPS, figura 12A, o gene *COX-2* apresentou uma repressão gênica em relação ao grupo controle de inflamação (LPS), sendo 81% menos expressos, quando tratado com LDT11 e 43% menos expresso quando tratado com LDT13. O AAS apresentou uma repressão

de 1% enquanto que o anti-inflamatório comercial Dexametasona (DEXA) apresentou uma repressão de 74%.

No tratamento realizado por 24 horas, figura 12B, os tratamentos com LDT11 ou LDT13, antes de adicionar o LPS, apresentou uma repressão gênica de 84% e de 60%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado com LPS. O AAS apresentou uma repressão de 28% e DEXA apresentou uma repressão 38%. Os dados do tratamento por 24h também sugerem um possível efeito protetor à inflamação.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou um aumento na expressão gênica de *COX-2*, quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 12C. Para o LDT11 a expressão foi de aumentada 48%. Quando tratado com LDT13 a expressão foi aumentada em 22%. O tratamento com AAS apresentou uma maior expressão gênica de 71% e o tratamento com DEXA expressou o gene 23% mais, quando comparados com o grupo controle tratado com LPS. Mostrando que, para o gene da enzima *COX-2*, as moléculas de LCC testadas e os anti-inflamatórios comerciais podem perder o efeito.

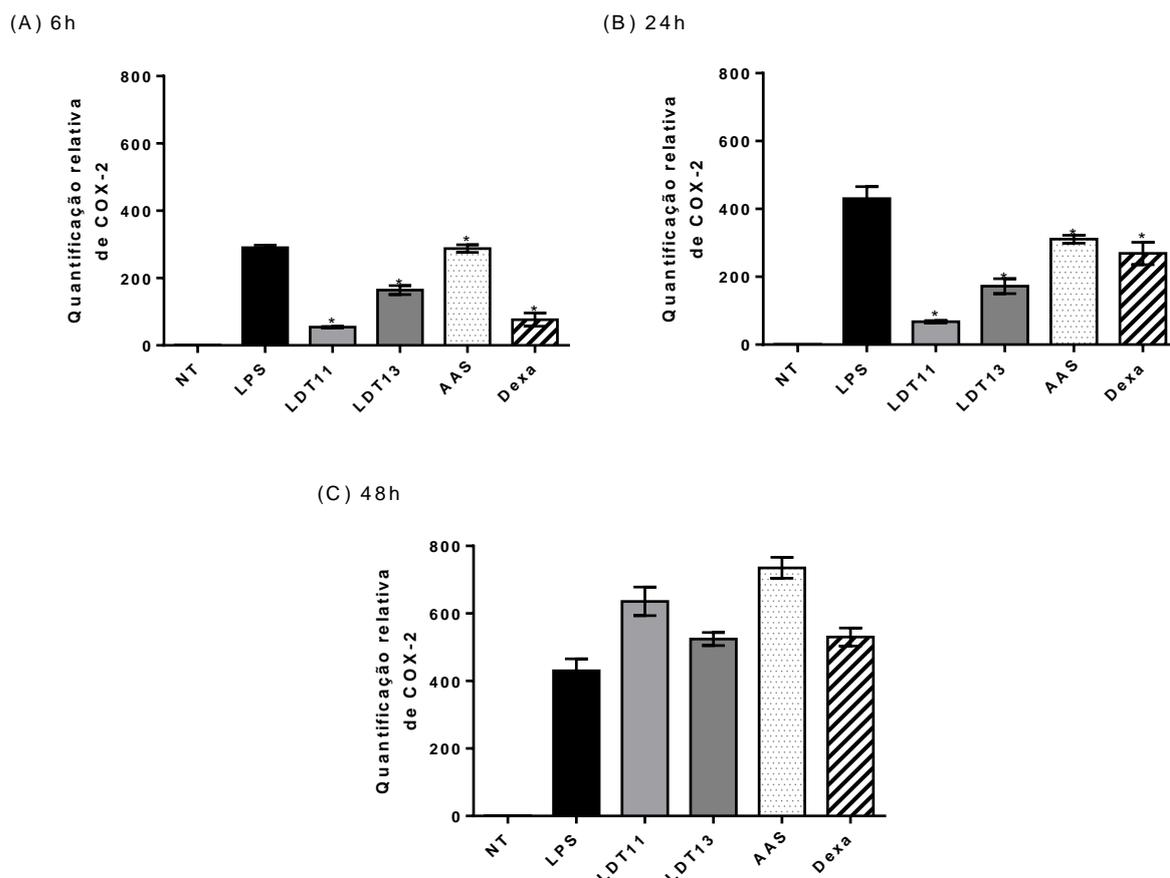


Figura 12 - Quantidade relativa de transcritos do gene *COX-2* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células

tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

O próximo gene analisado foi o *iNOS*, que codifica a enzima responsável pela síntese de óxido nítrico nas células. A figura 13 mostra a repressão da expressão gênica de *iNOS*, nas células RAW264.7, na maioria dos tratamentos analisados. No tratamento de 6 horas, figura 13A, com o ácido fenólico LDT11, o gene *iNOS* apresentou repressão de 100% em relação ao grupo estimulado com LPS. No tratamento com LDT13, o gene foi 99% menos expresso. O tratamento com AAS apresentou uma repressão de 95%. O anti-inflamatório comercial Dexametasona apresentou uma repressão de 98%.

No ensaio realizado por 24 horas, figura 13B, os tratamentos com LDT11 e LDT13 apresentaram uma repressão gênica de 41% e de 17%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado com LPS. O AAS apresentou uma repressão de 68% e DEXA apresentou uma repressão 56%.

O tratamento realizado por 48 horas apresentou repressão gênica para a maioria dos tratamentos excetuando o tratamento com o Dexametasona, figura 13C. Os tratamentos com LDT11 e LDT13 apresentaram uma repressão gênica de 18% e de 25%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado com LPS. O AAS apresentou uma repressão de 34% enquanto que o anti-inflamatório comercial apresentou um aumento na expressão gênica de 38%.

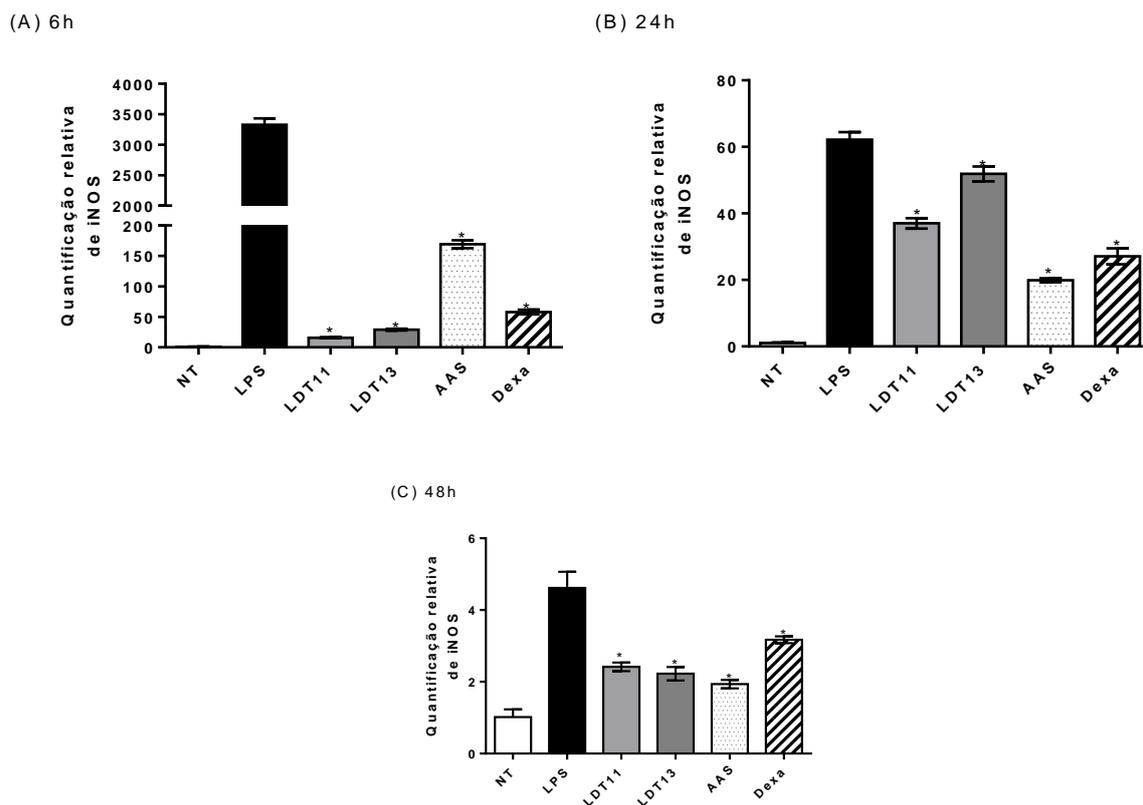


Figura 13 - Quantidade relativa de transcritos do gene *iNOS* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

A figura 14 apresenta as modulações do gene *NF- κ B*, fator de transcrição responsável pela regulação da expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B, pela regulação de genes ligados à resposta imuno-inflamatória, envolvidos na apoptose e na transformação neoplásica celular.

O possível efeito protetor à inflamação é verificado nos tratamentos com LDT11 e LDT13 por 3 horas e, em seguida, 3 horas de estímulo com LPS, figura 14A. A repressão gênica no tratamento com LDT11 foi de 88% e de 53% no tratamento com LDT13. O tratamento com AAS apresentou uma repressão de 33%, enquanto que o Dexametasona obteve uma repressão gênica de 50%.

O tratamento realizado por 24 horas também mostrou repressão gênica quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 14B. Os tratamentos com LDT11 ou LDT13 antes de adicionar o LPS, apresentaram uma repressão gênica de 56% e de 49%,

respectivamente. O AAS apresentou uma repressão de 54% e DEXA apresentou uma repressão de 18%.

O tratamento realizado por 48 horas apresentou resultado semelhante ao gene *iNOS*, tendo uma repressão gênica para a maioria dos tratamentos, excetuando o tratamento com o Dexametasona. Os tratamentos com LDT11 e LDT13, apresentaram uma repressão gênica de 74% e de 27%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado com LPS. O AAS apresentou uma repressão de 40% enquanto que o anti-inflamatório comercial apresentou um aumento na expressão gênica de 16%, figura 14C.

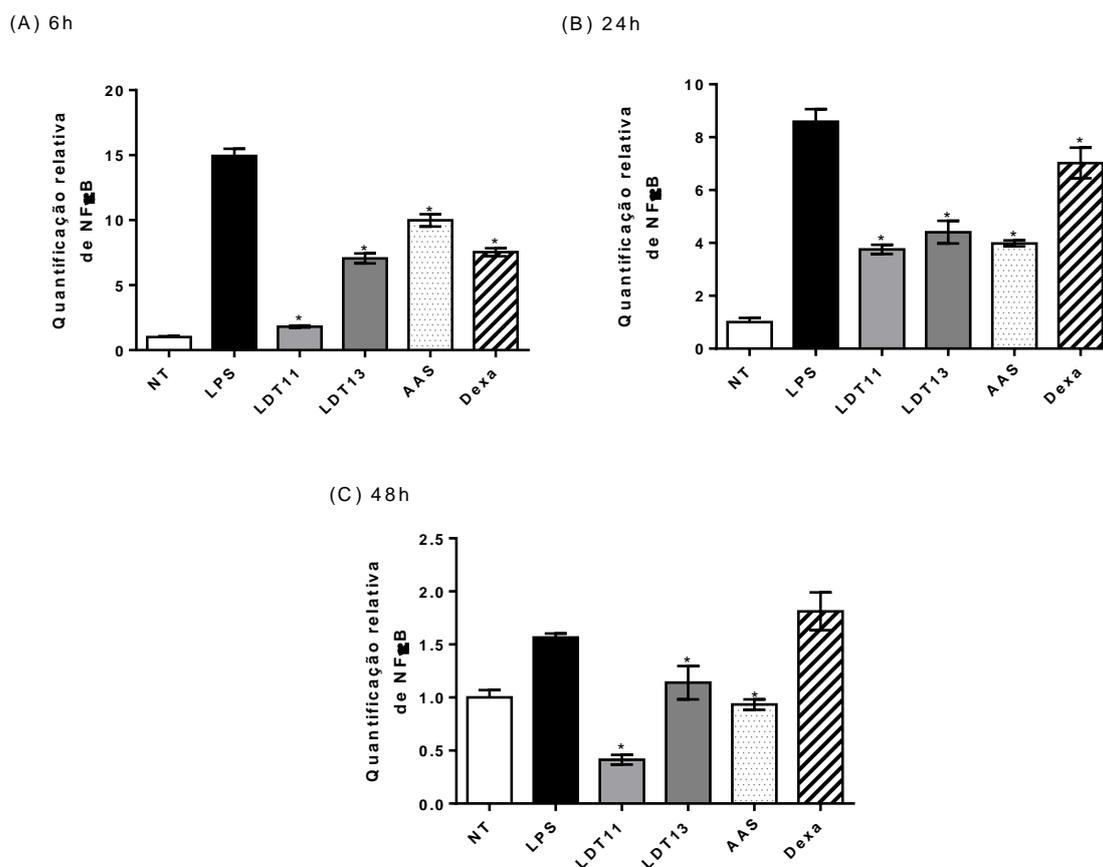


Figura 14 - Quantidade relativa de transcritos do gene *NF-κB* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorvâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

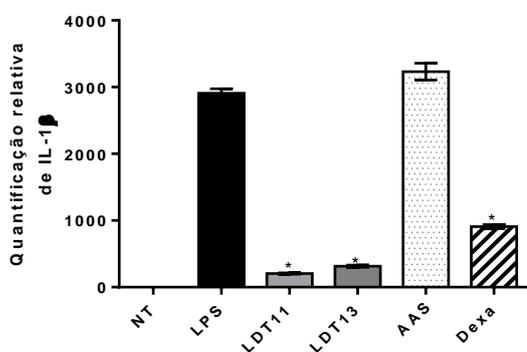
Foram analisados também os genes *IL-1 β* e o *IL-6*. Genes ligados ao processo inflamatório recrutando eosinófilos para o local da inflamação, sob influência do fator de transcrição *NF- κ B*.

O gene *IL-1 β* apresentou repressão nos tratamentos analisados, figura 15, sendo que no tratamento de 6 horas os derivados fenólicos LDT11 e LDT13 mostraram uma repressão de 93% e de 89%, respectivamente, quando comparado com o grupo estimulado com LPS. O tratamento com AAS apresentou um aumento na expressão de 11%. O tratamento com Dexametasona apresentou uma repressão de 69%, figura 15A.

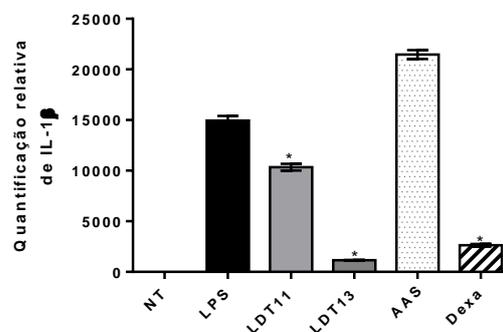
O tratamento realizado por 24 horas também mostrou repressão gênica quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 15B. O tratamento com LDT11 apresentou uma repressão gênica de 83% ao passo que o tratamento com o LDT13 apresentou uma repressão gênica de 92%. O AAS apresentou um aumento na expressão gênica de 44% e DEXA apresentou uma repressão de 82%.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *IL-1 β* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 15C. Para o LDT11 a repressão foi de 99%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 97%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 88% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 96%.

(A) 6 h



(B) 24 h



(C) 48 h

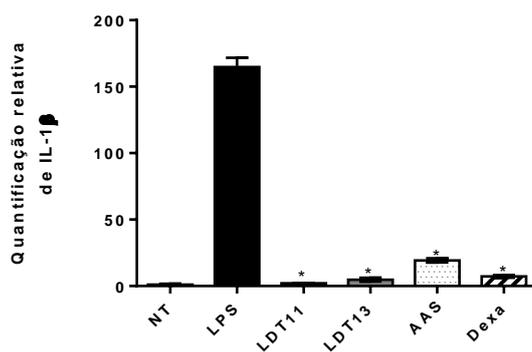


Figura 15 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-1 β* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

A figura 16 mostra repressão do gene *IL-6* nos tratamentos analisados. No tratamento de 6h, houve uma repressão de 98% quando tratado com LDT11 e de 97% quando tratado com LDT13, ao serem comparados com o grupo estimulado com LPS. O tratamento com AAS apresentou uma repressão de 88% e o Dexametasona mostrou uma repressão de 96%, figura 16A.

O tratamento realizado por 24 horas também mostrou repressão gênica quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 16B. O tratamento com LDT11 apresentou uma repressão de 79%. O tratamento com o LDT13 apresentou uma repressão gênica de 85%. O AAS apresentou uma repressão de 45% e DEXA apresentou uma repressão de 65%.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *IL-6*, para o LDT11 a repressão foi de 99%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 98%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 86% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 94%, figura 16C.

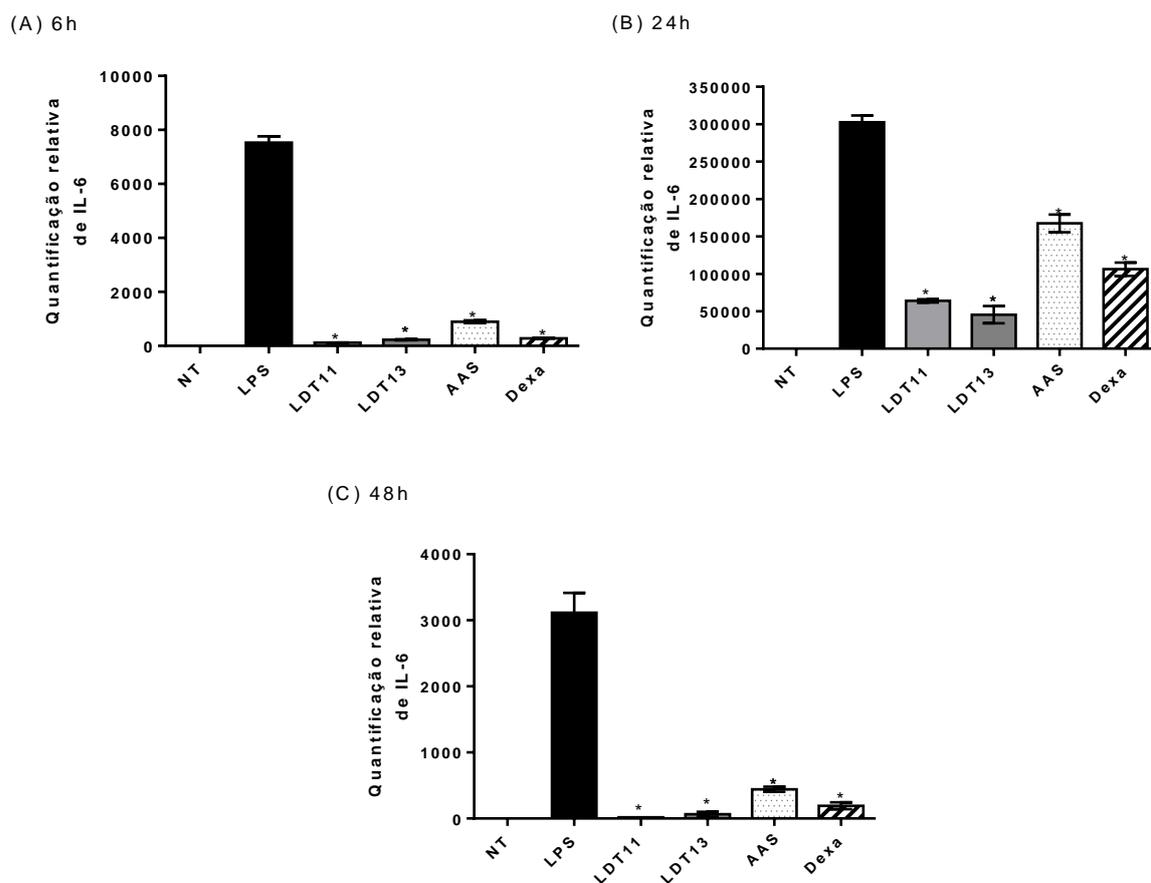


Figura 16 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-6* em células RAW 264.7 para o efeito protetor à inflamação, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

A segunda análise foi realizada com o grupo de tratamento anti-inflamatório, no qual as células RAW 264.7 receberam um primeiro estímulo com o agente inflamatório LPS e depois um tratamento com os derivados de LCC, LDT11 ou LDT13, além dos anti-inflamatórios comerciais usados para controle e comparação. Este grupo de tratamento testou a hipótese dos derivados de LCC agirem de forma terapêutica à inflamação previamente estabelecida.

Depois de 6h de estímulo, sendo 3 horas de estímulo com os LPS e, em seguida, 3 horas de tratamento com LDT11 ou LDT13, o gene *TNF- α* apresentou repressão gênica, quando comparado ao grupo controle de inflamação com LPS. No tratamento com LDT11 a

repressão foi de 66% e de 74% quando tratada com LDT13. O tratamento com AAS apresentou uma repressão de 55% enquanto que o anti-inflamatório Dexametasona apresentou uma repressão de 73%, figura 17A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou um aumento na expressão gênica, figura 17B. Os tratamentos com LDT11 e LDT13 após a adição de LPS apresentaram um aumento na expressão de 54% e de 99%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado. O tratamento com AAS apresentou um aumento na expressão de 36% e o tratamento com o DEXA apresentou um aumento na expressão de 100%.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *TNF- α* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 17C. Para o LDT11 a repressão foi de 12%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 33%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 44% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 4%.

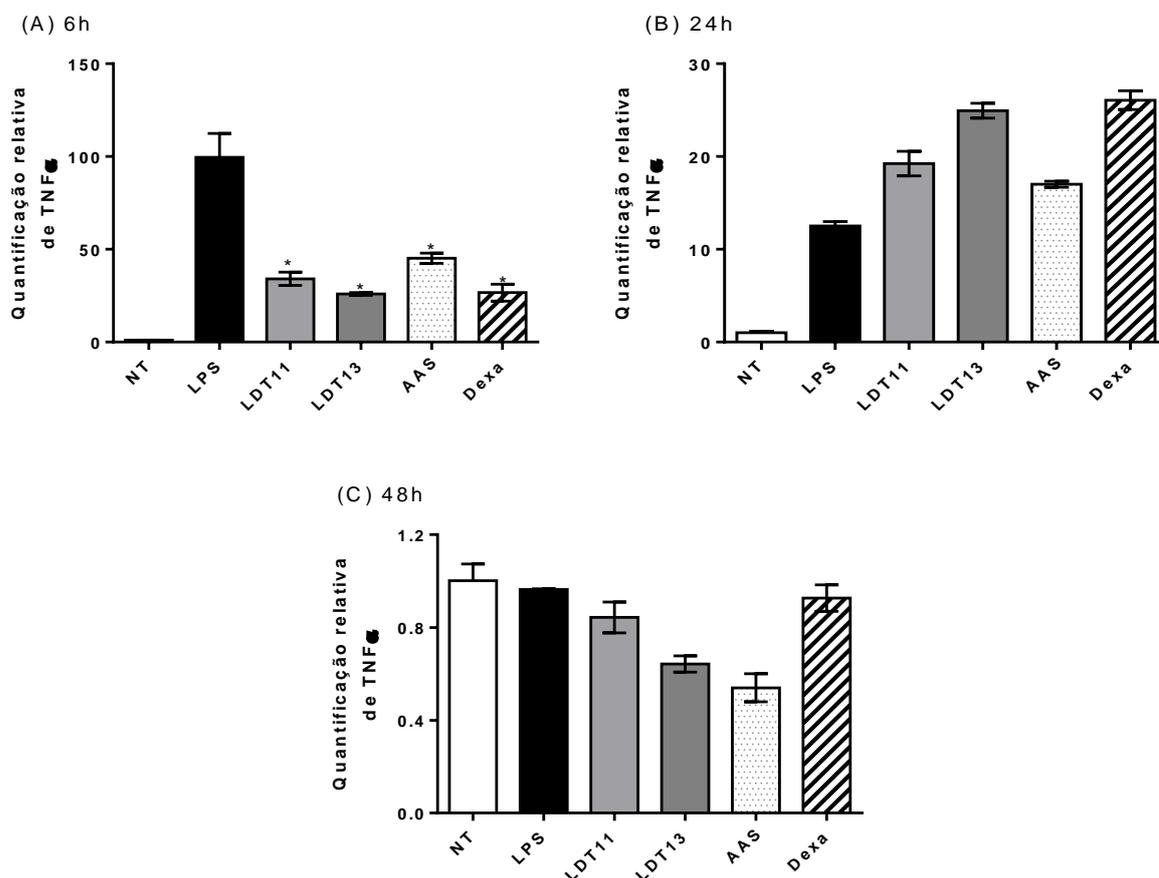


Figura 17 - Quantidade relativa de transcritos do gene *TNF- α* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas

amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

Para o gene *COX-2*, o tratamento de 6h apresentou uma repressão gênica de 19% quando tratado com LDT11. Porém, no tratamento com LDT13, o gene *COX-2* apresentou um aumento da expressão gênica de 27%, quando comparado ao grupo controle de inflamação com LPS. Também foi observado aumento da expressão gênica no tratamento com AAS, sendo de 87% mais expressão que o grupo estimulado com LPS. O tratamento com o anti-inflamatório comercial, Dexametasona, apresentou uma repressão gênica de 24%, figura 18A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou um aumento na expressão do gene *COX-2*, figura 18B. Os tratamentos com LDT11 e LDT13 após a adição de LPS apresentou um aumento na expressão de 48% e de 22%, respectivamente, quando comparado ao grupo inflamado com LPS. O tratamento com AAS apresentou um aumento na expressão de 71% e o tratamento com o DEXA apresentou um aumento na expressão de 23%.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *COX-2* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 18C. Para o LDT11 e para o LDT13 a repressão foi de 73%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 79% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 51%.

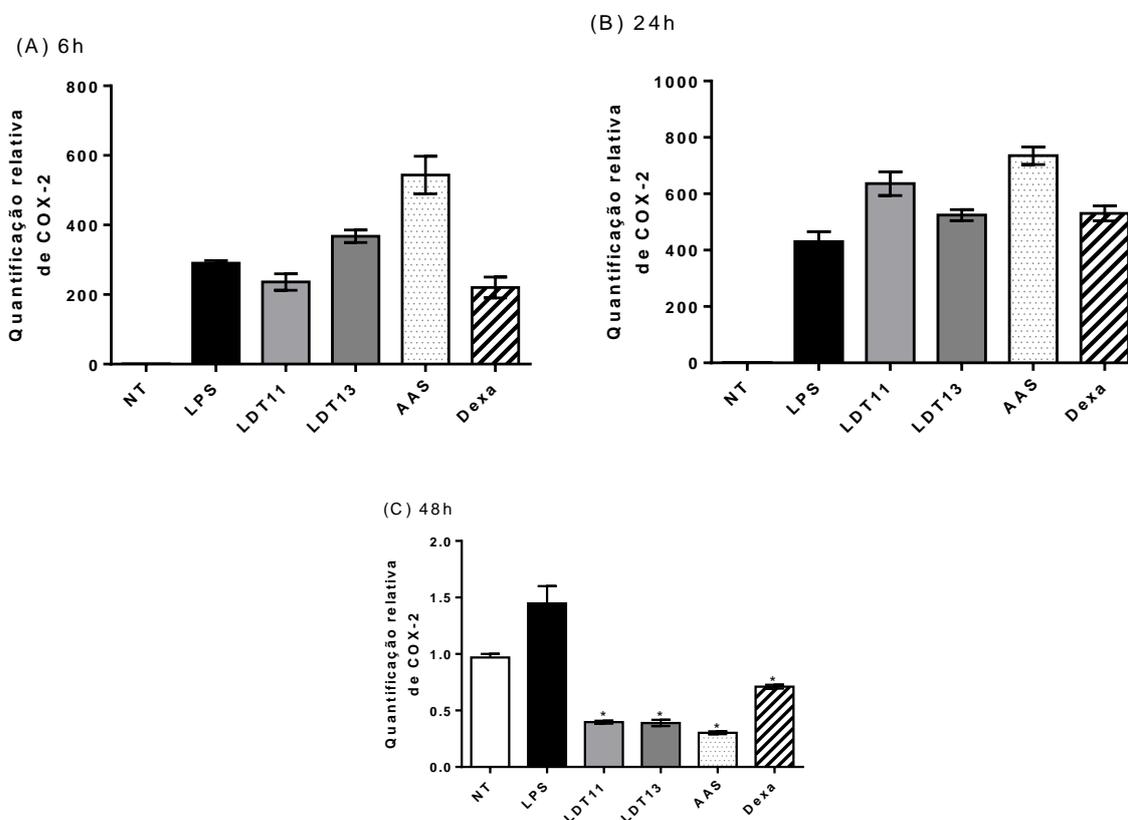


Figura 18 - Quantidade relativa de transcritos do gene *COX-2* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

Para o gene *iNOS*, a maioria dos tratamentos analisados apresentaram repressão gênica, figura 19. O tratamento de 6h apresentou uma repressão gênica de 77% quando tratado com LDT11. No tratamento com LDT13, o gene *iNOS* apresentou uma repressão gênica de 82%, quando comparado ao grupo controle de inflamação com LPS. No tratamento com AAS a repressão foi de 63% quando comparado ao grupo estimulado com LPS. O tratamento com Dexametasona apresentou uma repressão gênica de 66%, figura 19A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou uma repressão gênica de 43% no tratamento com LDT11 e de 86% no tratamento com LDT13, após a adição de LPS. O tratamento com AAS apresentou uma repressão gênica de 61%. Apenas o tratamento com o Dexametasona apresentou um aumento na expressão de *iNOS* de 26%, figura 19B.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *iNOS* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 19C. Para o LDT11 a repressão foi de 33%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 34%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 14% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 85%.

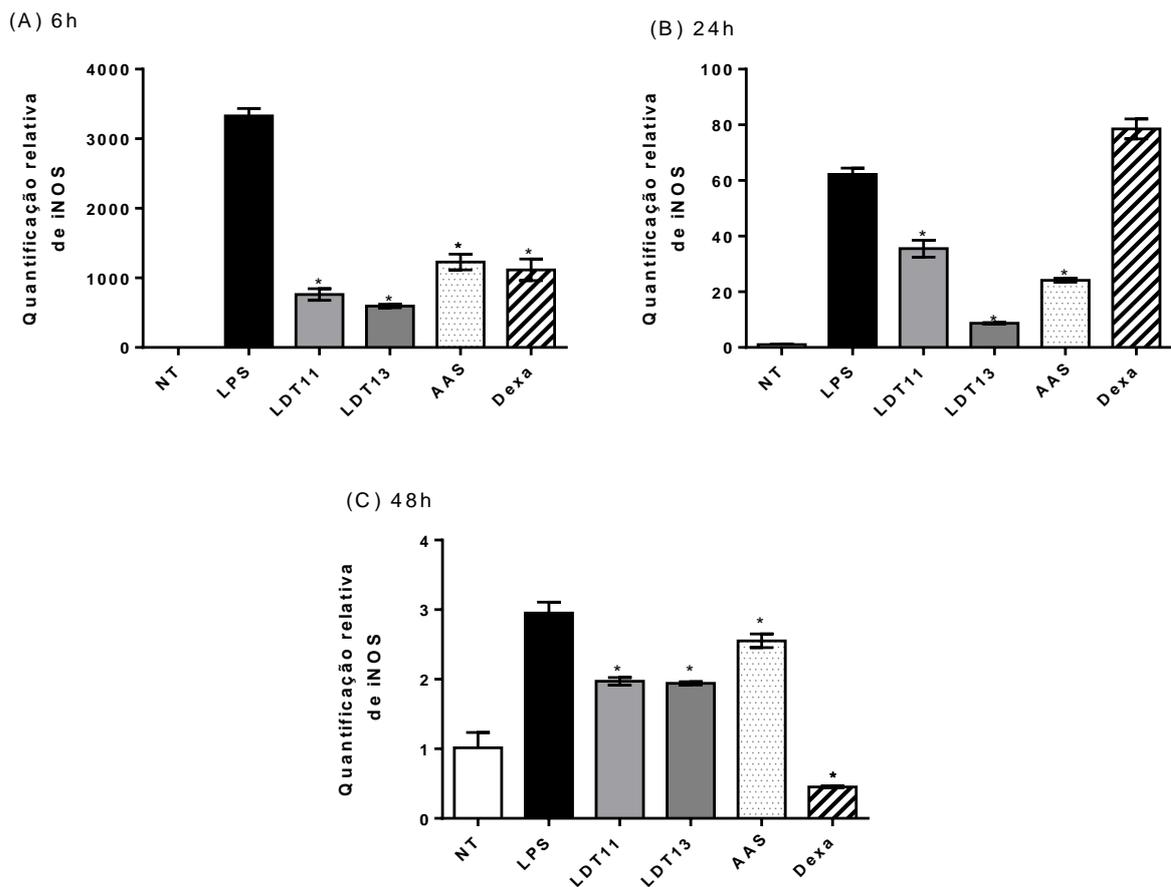


Figura 19 - Quantidade relativa de transcritos do gene *iNOS* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

O gene *NF- κ B* também sofreu repressão na maioria dos tratamentos analisados, figura 20. O tratamento de 6h apresentou uma repressão gênica de 65% quando tratado com LDT11. No tratamento com LDT13, o gene *NF- κ B* apresentou uma repressão gênica de 31%, quando comparado ao grupo controle de inflamação com LPS. No tratamento com AAS a repressão foi de 21% e o tratamento com Dexametasona apresentou uma repressão gênica de 37%, figura 20A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou uma repressão gênica de 13% no tratamento com LDT11 e de 65% no tratamento com LDT13. O tratamento com AAS apresentou uma repressão gênica de 39%. Apenas o tratamento com o Dexametasona apresentou um aumento na expressão de *NF- κ B* de 82%, figura 20B.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *NF-κB* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 20C. Para o LDT11 a repressão foi de 50%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 4%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 41% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 28%.

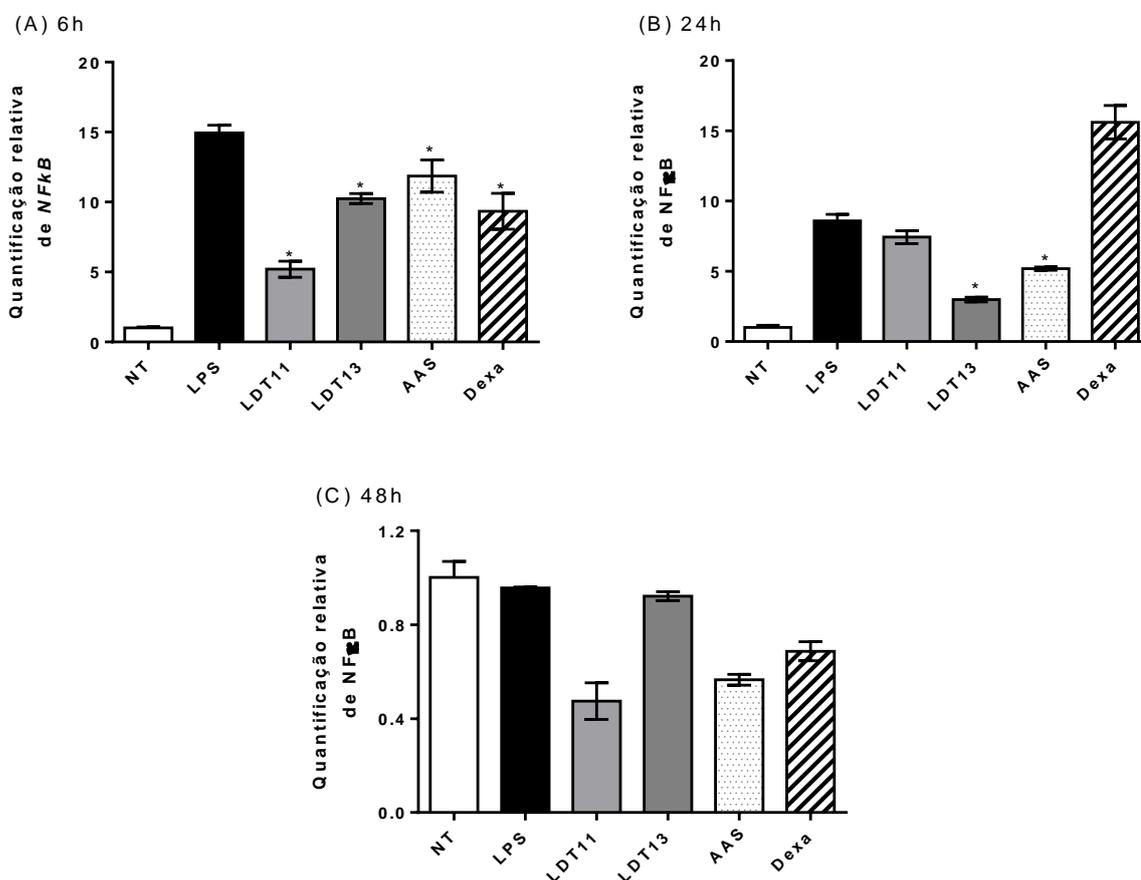


Figura 20 - Quantidade relativa de transcritos do gene *NF-κB* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

A figura 21 mostra a modulação do gene *IL-1β* nos tratamentos analisados. O tratamento de 6h apresentou uma repressão gênica de 70% quando tratado com LDT11 e de 55% no tratamento com LDT13, quando comparado ao grupo controle de inflamação com LPS. No tratamento com AAS houve um aumento na expressão gênica de 34%. O tratamento com Dexametasona apresentou uma repressão gênica de 62%, quando comparado com o grupo estimulado com LPS, figura 21A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou uma repressão gênica de 15% no tratamento com LDT11. O tratamento com LDT13 apresentou uma repressão gênica de 92%. O tratamento com AAS apresentou um aumento na expressão de 44% e o tratamento com o Dexametasona apresentou uma repressão do gene *IL-1 β* de 82%, figura 21B.

O tratamento realizado por 48 horas mostrou uma redução da expressão de *IL-1 β* quando comparado ao grupo estimulado com LPS, figura 21C. Para o LDT11 a repressão foi de 54%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 93%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 22% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 49%.

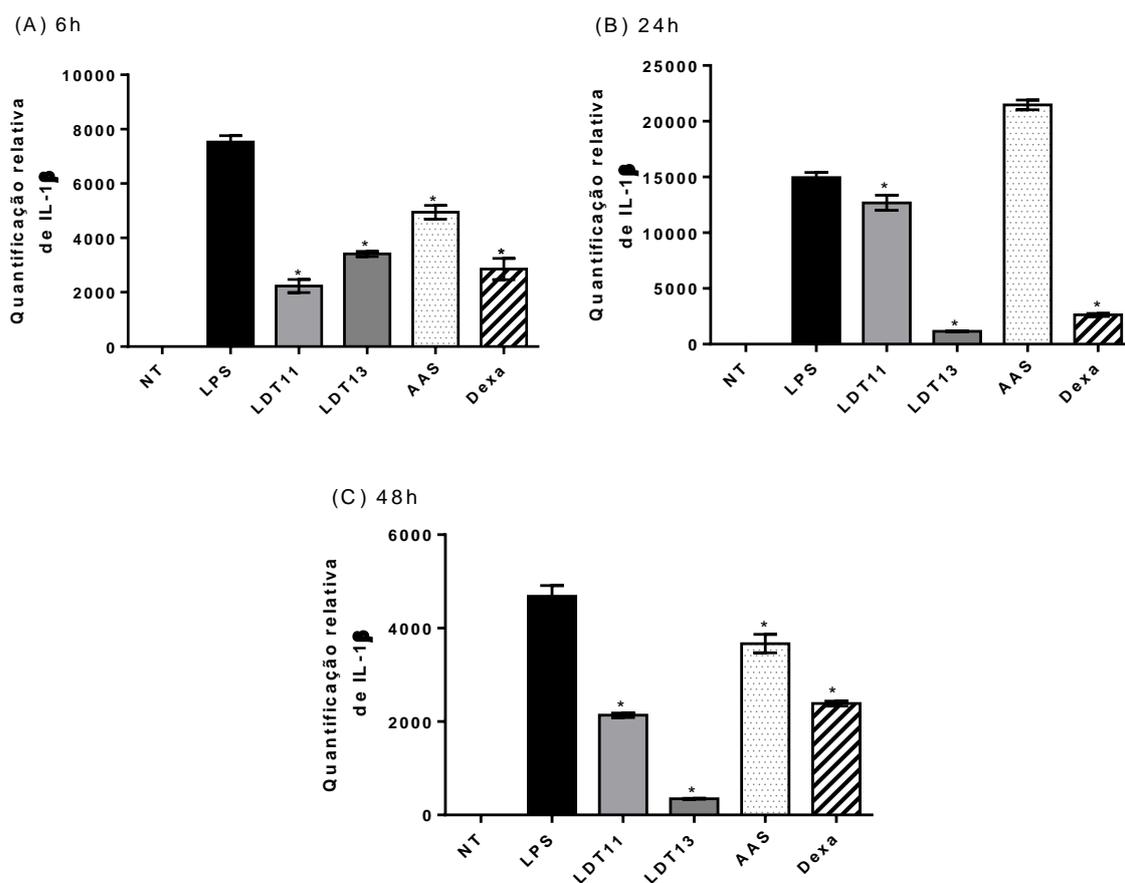


Figura 21 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-1 β* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

O gene *IL-6* sofreu repressão nos tratamentos analisados, figura 22. O tratamento de 6h apresentou uma repressão gênica de 70% quando tratado com LDT11. No tratamento com

LDT13, o gene *IL-6* apresentou uma repressão gênica de 55%, quando comparado ao grupo controle de inflamação com LPS. No tratamento com AAS a repressão foi de 34% e o tratamento com Dexametasona apresentou uma repressão gênica de 62%, figura 22A.

O tratamento realizado por 24 horas apresentou uma repressão gênica de 39% no tratamento com LDT11 e de 95% no tratamento com LDT13. O tratamento com AAS apresentou uma repressão gênica de 36%, assim como no tratamento com o Dexametasona que também apresentou uma repressão de 36%, figura 22B.

No tratamento realizado por 48 horas, para o LDT11 a repressão foi de 47%. Quando tratado com LDT13 a repressão foi de 20%. O tratamento com AAS apresentou repressão gênica de 4% e o tratamento com DEXA reprimiu o gene 32%, figura 22C.

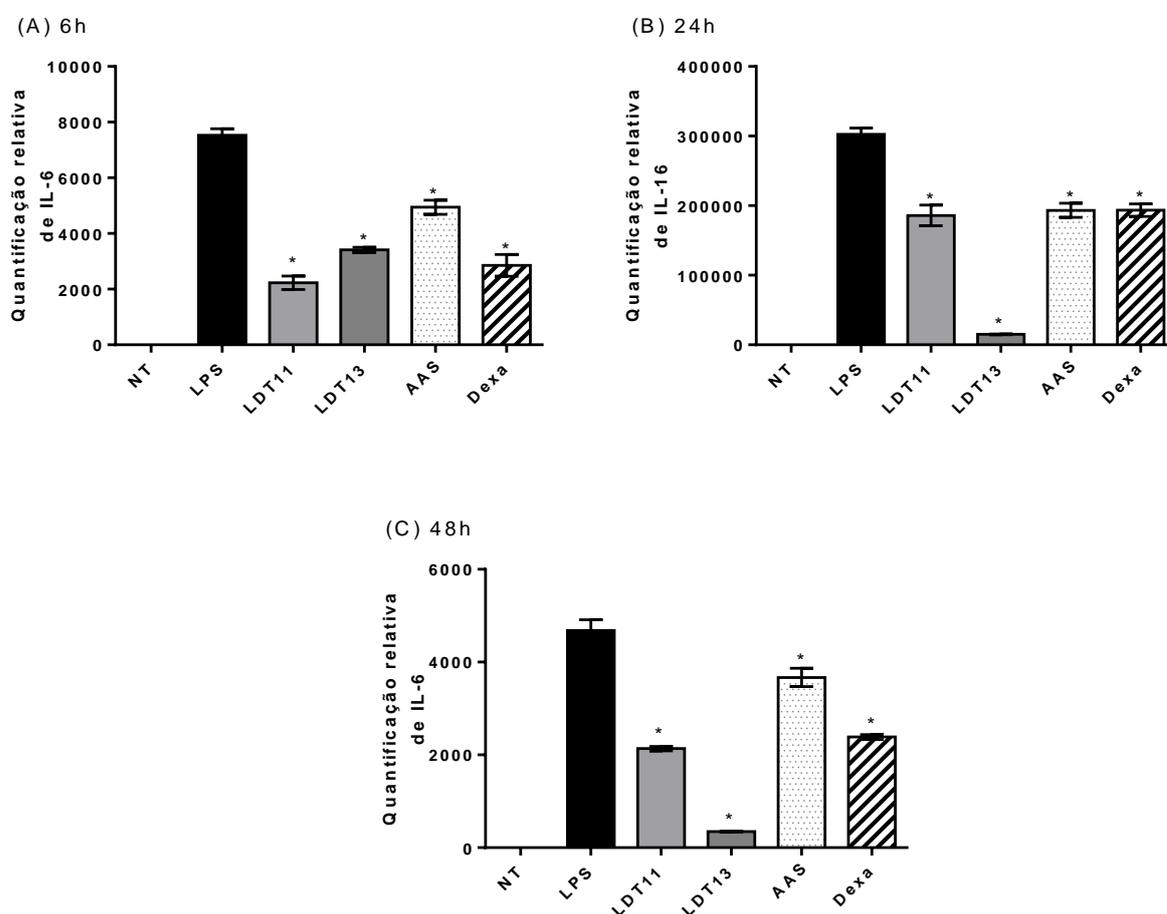


Figura 22 - Quantidade relativa de transcritos do gene *IL-6* em células RAW 264.7 para o efeito anti-inflamatório, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas

amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

5.4 Dosagem de óxido nítrico

Durante o processo inflamatório, os macrófagos produzem grandes quantidades de metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio, causando um aumento do estresse oxidativo nas células. A produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante das células RAW 264.7 foi mensurada para confirmar a influência na atividade pró-inflamatória dos derivados de ácido anacárdico LDT11 e LDT13. Para este experimento, foi utilizado o sobrenadante dos mesmos tratamentos utilizados nos experimentos de análise de expressão gênica, ou seja, nos tempos de 6h, 24h e 48h.

Para avaliar o efeito protetor à inflamação, as células foram tratadas com 50 μM de LDT11 ou de LDT13, em seguida, foi adicionado à cultura 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, como descritos no item 4.6.1. Ao final de cada tratamento, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de NO. Os resultados apresentados na figura 23 mostram que os derivados LDT11 e LDT13 foram capazes de proteger as células RAW264.7, reduzindo a produção de NO em todos os tempos de tratamento. A redução da produção de NO foi acima de 95% em praticamente todos os tratamentos em todos os tempos. Excetuando somente o tratamento com LDT13 no tempo de 48h (figura 23C), que a redução foi de 76%.

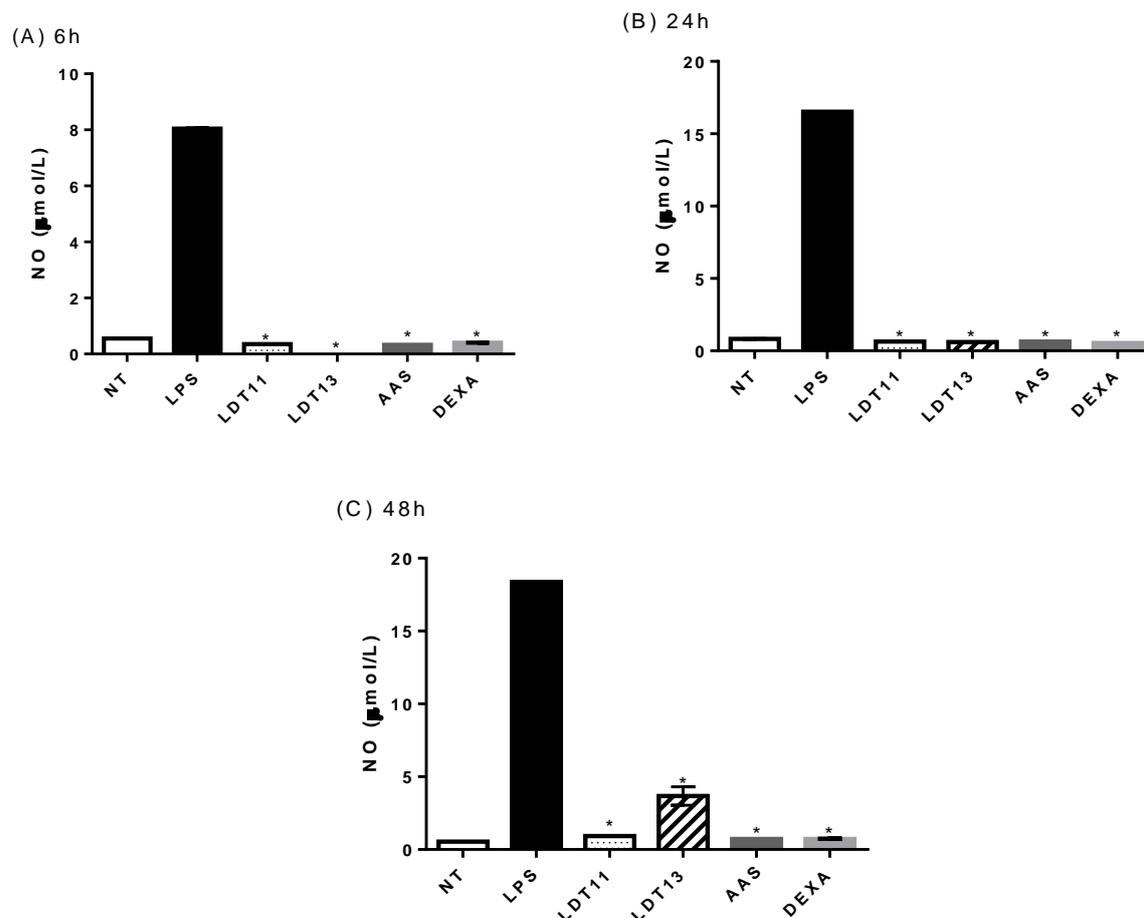


Figura 23 - Avaliação do potencial efeito imunoprotetor dos derivados de LCC por dosagem dos níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

Para avaliar o efeito anti-inflamatório, as células foram estimuladas, primeiramente com 1 µg/mL de LPS, após este período foram adicionados 50 µM de LDT11 ou de LDT13, variando os tempos de tratamento em 6h, 24, e 48h como descrito no item 4.6.1. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de NO. Os resultados apresentados na figura 24 mostram que o derivado fenólico LDT13 foi capaz de reduzir a produção de NO, nas células RAW264.7, mesmo após o estabelecimento da inflamação. Em alguns dos tratamentos, a redução da produção de NO não foi significativa. No tempo de 6h (figura 24A), o tratamento com LDT11 foi apenas de 4%, enquanto que o tratamento com LDT13 reduziu a produção de

NO em 96%. Os tratamentos com AAS e DEXA mostraram uma redução da produção de NO em 7% e 57%, respectivamente. No tempo de 24h, o tratamento com LDT11 reduziu a produção de NO em 51% os demais tratamentos mostraram uma redução de aproximadamente 95% na produção de NO, figura 24B. A análise feita após 48h mostrou uma redução aproximadamente de 95% para todos os tratamentos realizados, figura 24C.

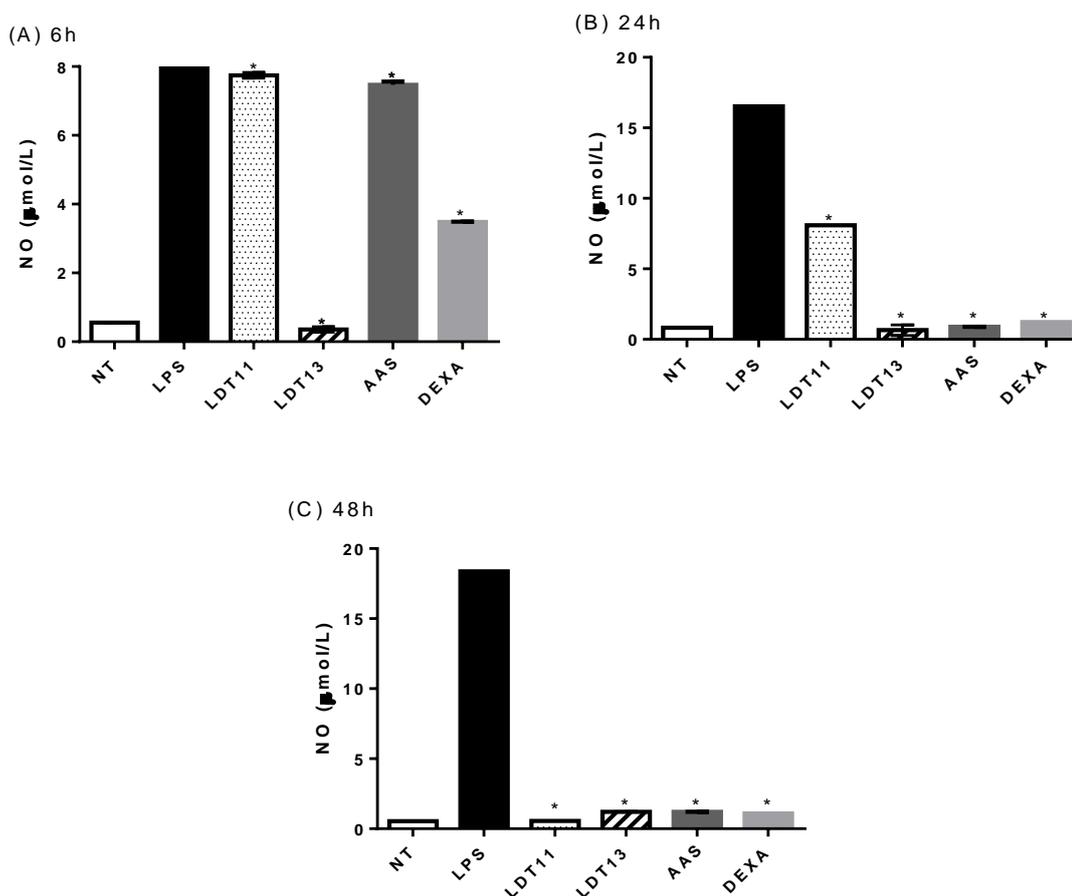


Figura 24 - Avaliação do potencial efeito anti-inflamatório dos derivados de LCC por dosagem dos níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

5.5 Dosagem de citocina IL-6

Ainda para confirmar os resultados observados nas análises de expressão gênica, foi feita a dosagem de IL-6. Esta foi a citocina que apresentou maior expressão gênica, quando

estimulada com LPS, nos três tempos analisados, como mostrado no item 5.3. Os resultados obtidos corroboraram os dados de expressão gênica. Os derivados fenólicos LDT11 e LDT13, mostrou o potencial efeito protetor à inflamação reduzindo a produção da interleucina IL-6, figura 25. No tempo de 6h, a redução da produção de IL-6 foi de praticamente 100% em todos os tratamentos realizados, figura 25A. No tempo de 24h a redução foi de aproximadamente 60% nos tratamentos com LDT11, LDT13 e DEXA, figura 25B. O tratamento com ASS apresentou uma redução de IL-6 menos efetiva, 17%. No tempo de 48h, a produção da citocina IL-6 foi reduzida em 73% com o pré-tratamento com LDT11, 69% no tratamento com LDT13, 52% no tratamento com AAS e 42% no tratamento com DEXA, figura 25C.

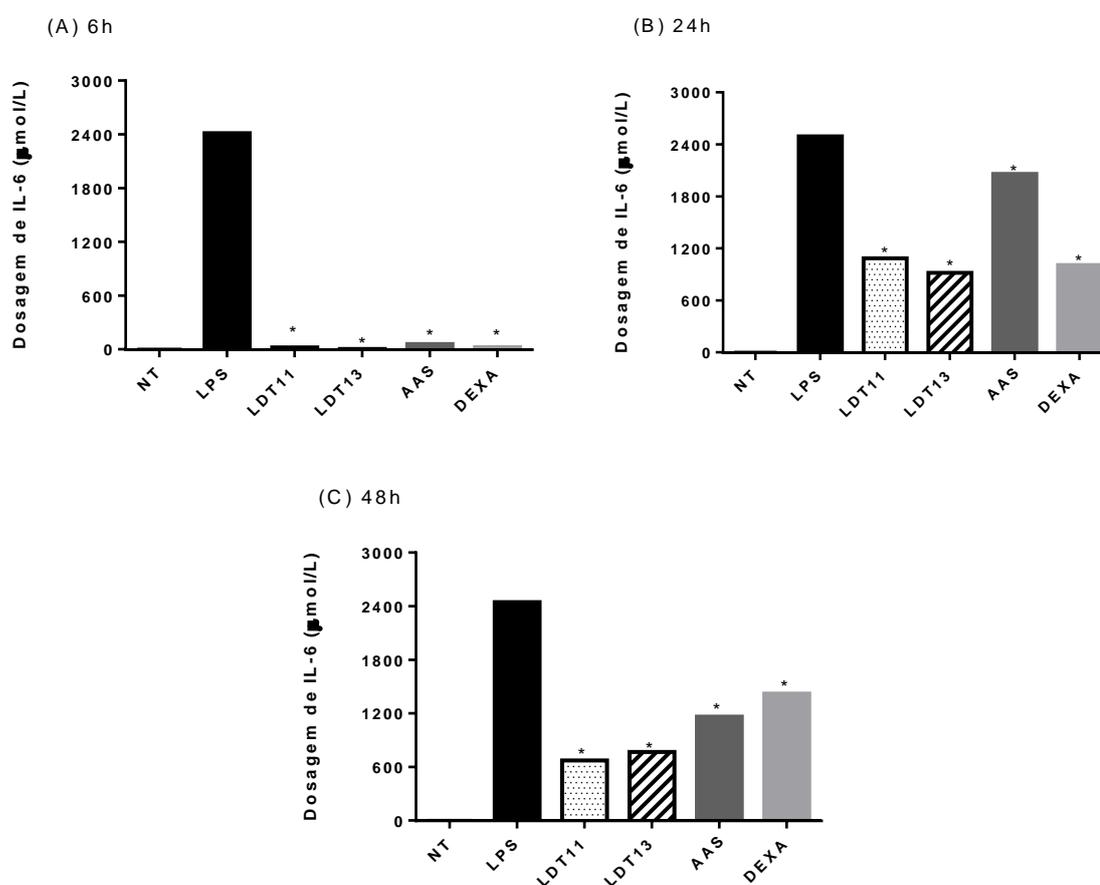


Figura 25 - Avaliação do potencial efeito imunoprotetor dos derivados de LCC por dosagem dos níveis de produção da citocina IL-6 no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células tratadas com LDT11 e em seguida com LPS; LDT13: células tratadas com LDT13 e em seguida com LPS; AAS: células tratadas com ácido acetilsalicílico comercial e em seguida com LPS; DEXA: células tratadas com o anti-inflamatório comercial Dexametasona e em seguida com LPS. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

A análise do efeito anti-inflamatório, pela dosagem da produção da citocina IL-6, também foi realizada. Os resultados apresentados na figura 26 mostram que os derivados do LCC, LDT11 e LDT13 foram capazes de reduzir a produção da citocina IL-6, nas células RAW264.7, mesmo após ter a inflamação já estabelecida. No tempo de 6h (figura 26A), o tratamento com LDT11 reduziu a produção de IL-6 em 22%, o tratamento com LDT13 reduziu IL-6 9%. Os tratamentos com AAS e DEXA mostraram uma redução da produção de IL-6 em 2% e 26%, respectivamente. Mesmo as porcentagens se mostrando mais baixas, a produção de IL-6 foi de 100 vezes a quase 1000 vezes menor que a produção observada no grupo controle (LPS). Nos tempo de 24h (figura 26B) e 48h (figura 26C), os resultados foram semelhantes. A redução da produção de IL-6 foi de aproximadamente 10%, 100 vezes menor que nas células tratadas com LPS, em todos os tratamentos realizados.

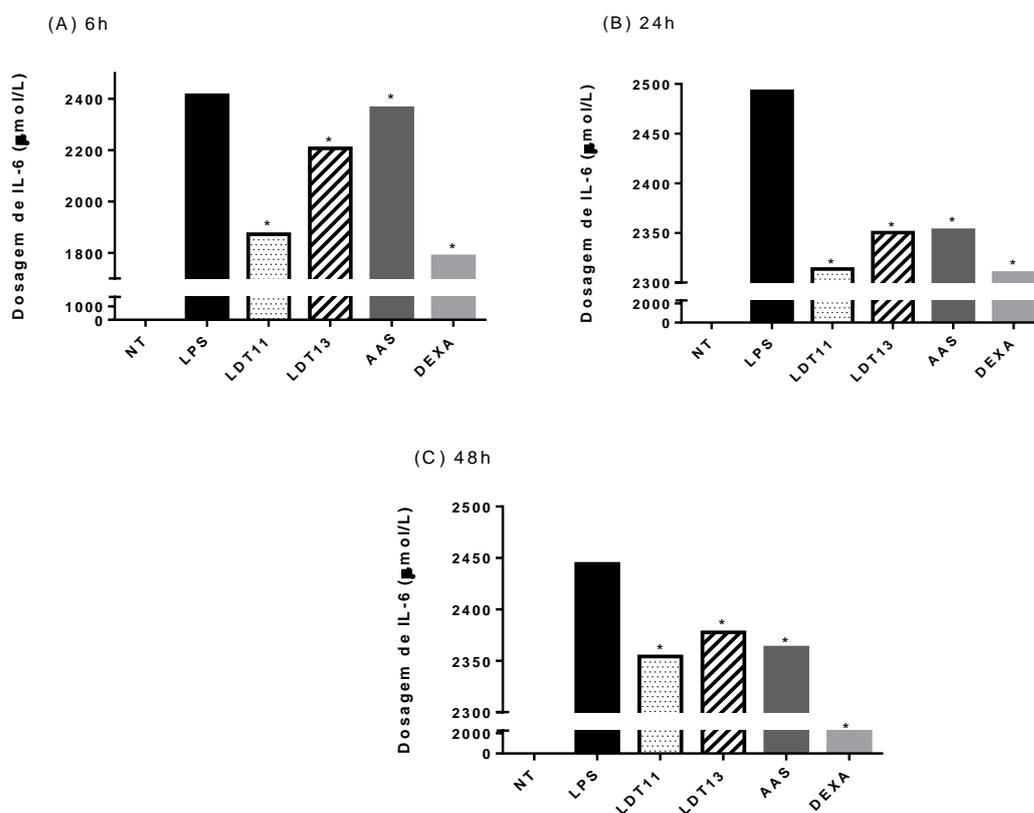


Figura 26 - Avaliação do potencial efeito anti-inflamatório dos derivados de LCC por dosagem dos níveis da citocina IL-6 no sobrenadante, nos tempos de 6h (A), 24h (B) e 48h (C). NT: células não tratadas; LPS: células estimuladas com LPS; LDT11: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT11; LDT13: células estimuladas com LPS e em seguida com LDT13; AAS: células estimuladas com LPS e em seguida com ácido acetilsalicílico comercial; DEXA: células estimuladas com LPS e em seguida com o anti-inflamatório comercial Dexametasona. Os valores para cada concentração correspondem à média das absorbâncias encontradas nas amostras (n=3). Asteriscos indicam diferença estatística significativa de acordo com o teste ANOVA ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta à perturbação da homeostase corporal, causada por infecções, lesões e traumas. Este processo é caracterizado por sua complexidade e é regulado por diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como, *TNF- α* , *COX-2*, *iNOS*, *NF- κ B*, *IL-1 β* e *IL-6* (SELL, 2001). A rápida liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativadas desempenham um papel crucial no desencadeamento da resposta imune local (PAVLOV, *et al.*, 2003). No entanto, a produção excessiva desses mediadores inflamatórios pode ser mais prejudicial do que o evento que desencadeou a resposta imune, podendo estar associada a doenças autoimunes, diabetes, sépsis, iniciar coagulação difusa, provocando lesões de tecidos e podendo levar a hipotensão e morte (PYEE *et al.*, 2014; DE FELICE *et al.*, 2014; HENEKA *et al.*, 2014; TALL *et al.*, 2015). A inibição de mediadores inflamatórios por meio de moduladores farmacológicos tem sido utilizada como uma efetiva estratégia terapêutica para reduzir reações inflamatórias (LEE *et al.*, 2011; CLARCK *et al.*, 2013). Pensando nessa estratégia, vários pesquisadores têm se esforçado para desenvolver mediadores anti-inflamatórios, com o mínimo de efeito adverso, para controle e/ou prevenção de doenças inflamatórias.

Estudos têm revelado vários compostos isolados de plantas como forte potencial para serem usados como agentes anti-inflamatórios (SUHR *et al.*, 2001; LI e VERMA, 2002; NAM, 2006; KIM *et al.*, 2013). Os derivados fenólicos de LCC e derivados sintéticos apresentam várias atividades biológicas terapêuticas. Por se tratar de um resíduo da indústria alimentícia pouco explorado, os derivados do LCC tornam-se um interessante alvo de estudo.

No presente estudo, avaliou-se o efeito imunoprotetor e/ou anti-inflamatório de agentes planejados a partir do ácido anacárdico e cardanol retirados do LCC. A análise foi feita através de ensaios de dosagem da expressão gênica, produção de óxido nítrico (NO) e produção da citocina IL-6, em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. As células foram estimuladas com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) (MUELLER *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2014; TEOTÔNIO, 2015) e tratados com os derivados de LCC selecionados, LDT11 e LDT13. A estimulação de macrófagos com LPS simula a resposta inflamatória induzindo a alta produção citocinas. Portanto, um agente que previna a liberação desses mediadores ou regule a expressão dessas citocinas pode ser indicativo de sua atividade anti-inflamatória (JUNG *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2014) e ser alvo para potencial formulação fármacos.

Para pesquisas clínicas é necessário realizar testes pré-clínicos, evitando despesas desnecessárias. Assim, a utilização de culturas celulares em ensaios pré-clínicos de compostos terapêuticos tornou-se prática comum, podendo ser selecionados para a simulação de uma doença de interesse ou de anormalidades bioquímicas associadas. Neste sentido, o cultivo de células *in vitro* tem se destacado como uma alternativa ao uso de animais para obtenção de resultados confiáveis e precisos (TONDER *et al.*, 2015).

O ensaio de viabilidade celular *in vitro*, foi o ponto de partida deste estudo sendo útil, no rastreamento de químicos citotóxicos para a linhagem celular RAW 264.7, bem como na padronização da melhor dose a ser utilizada. Assim, ensaios colorimétricos de viabilidade celular, no qual as células são coradas diferentemente, permitem a distinção entre células vivas e células mortas pela detecção de membranas plasmáticas comprometidas. Além disso, outros ensaios de citotoxicidade colorimétricos tentam determinar o mecanismo da morte celular induzida (MOSSMAN *et al.*, 1983). Considerando a necessidade de avaliar se os derivados de LCC utilizados nos experimentos apresentam citotoxicidade, foram utilizados dois métodos colorimétricos diferentes. O ensaio permitiu determinar a melhor concentração capaz de desempenhar atividade biológica sem ser tóxica para as células *in vitro*. O primeiro teste utilizado foi o WST-8, baseado no MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), ensaio que tem sido considerado padrão-ouro para a determinação da viabilidade e proliferação celular desde seu desenvolvimento por Mosmann, na década de 1980. Este ensaio mede a viabilidade das células através da atividade redutora, com a conversão enzimática por desidrogenases do composto tetrazólio a cristais de formazan. Esta reação ocorre, de maneira mais significativa, na mitocôndria de células vivas, embora a redução por agentes e enzimas localizadas em outras organelas tais como o retículo endoplasmático também esteja envolvida (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988). O segundo teste colorimétrico realizado neste estudo foi o ensaio de incorporação do vermelho neutro, com o intuito de confirmar os resultados obtidos no teste WST-8. Este ensaio baseia-se na capacidade de células viáveis incorporarem e ligarem-se ao corante vermelho neutro. A integridade lisossomal, com a concomitante ligação do corante vermelho neutro, é um indicador sensível da viabilidade celular (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Os dois testes de viabilidade celular realizados não mostraram interação cruzada entre seus reagentes e as moléculas de LDT utilizadas nos testes. Os resultados de viabilidade celular, para os dois testes, mostraram valores semelhantes de viabilidade e citotoxicidade nas concentrações estudadas (25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 125 µM e 150 µM). As concentrações de 25 µM e 50 µM mostraram viabilidade celular acima de 80% para

as duas moléculas derivadas de LCC, LDT11 e LDT13. Enquanto, as concentrações de LDT11 e LDT 13 de 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M e 150 μ M apresentaram uma viabilidade celular menor que 60%, sendo, então, consideradas citotóxicas (figuras 8 e 10).

Nos testes que se seguiram para análise de expressão gênica, foi utilizada a concentração de 50 μ M de LDT11 e LDT13. Foi utilizado, também, o fármaco comercial ácido acetilsalicílico (AAS) por possuir uma estrutura molecular semelhante aos LDT11 e LDT13 e por ter reação anti-inflamatória conhecida (KELLER et al., 2013). Também foi utilizado o anti-inflamatório comercial Dexametasona (DEXA) para comparação com as moléculas testadas, anti-inflamatório utilizado em vários estudos da literatura para comparação com novos fármacos (RAMESH; MEISNER; PHILIPP, 2015). Os fármacos comerciais, AAS e DEXA, foram utilizados nas mesmas concentrações estabelecidas para o LDT11 e LDT13, 50 μ M, para que fosse possível estabelecer uma comparação de eficiência entre os derivados fenólicos estudados e os fármacos já comercializados.

O primeiro ensaio realizado foi para avaliar o potencial efeito protetor dos derivados fenólicos de LCC, LDT11 e LDT13. Para isso, as células foram previamente tratadas com LDT11 ou LDT13 e, em seguida, foi dado o estímulo inflamatório com LPS. O segundo ensaio avaliou o efeito anti-inflamatório dos LDT11 e LDT13, ou seja, após ter a inflamação já estabelecida.

Considerando a cinética de expressão gênica nos tempos de 6h, 24h e 48h, para o gene *TNF- α* , o grupo controle (células tratadas com LPS) apresentou um aumento na expressão nos tempos de 6h e 24h, voltando ao nível basal no tempo de 48h, expressão semelhante à obtida nas células não tratadas. Este resultado sugere que este gene tem ação rápida e uma retroalimentação negativa. O que corrobora outros estudos na literatura que mostram o importante papel de *TNF- α* na expressão de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. O aumento na expressão de IL-10 induz a redução da expressão de *TNF- α* (GANE; STOCKLEY; SAPEY, 2016). Sendo assim, a redução da expressão de *TNF- α* foi, naturalmente, mais expressiva nos tempos de 6h (nos dois ensaios, avaliação do efeito protetor e avaliação do efeito anti-inflamatório) e 24h (apenas no primeiro ensaio, avaliação do efeito protetor). O LDT11 mostrou o maior efeito protetor dentre as moléculas analisadas, enquanto que LDT13 e o fármaco comercial Dexametasona apresentaram uma redução na expressão de *TNF- α* estatisticamente similar (figuras 11 e 17).

O gene *COX-2* apresentou uma expressão gênica elevada nas células estimuladas com LPS em todos os tempos analisados. No entanto, a redução da expressão de *COX-2* só foi percebida nos tempos de 6h e 24h, para o efeito imunoprotetor (figura 12). Sugerindo que no

tempo de 48h as moléculas LDT11, LDT13 e AAS e DEXA podem ter sido consumidas ou degradadas. Para manter o efeito protetor à inflamação seria necessária uma segunda dosagem dos fármacos. Já na avaliação do efeito anti-inflamatório, figura 18, o gene *COX-2* só apresentou redução da expressão gênica no tempo de 48h, sugerindo que as moléculas precisam deste tempo para conseguir produzir efeito anti-inflamatório. Para este gene LDT11 foi o melhor agente protetor à inflamação e anti-inflamatório. Sendo o ASS a molécula que apresentou os resultados menos eficientes. Por ser um AINE, ou seja, anti-inflamatório cujo mecanismo de ação é bloquear as enzimas ciclooxigenases (*COX-1* e *COX-2*), poderia se esperar que o AAS diminuísse de forma bastante expressiva a expressão de *COX-2*. No entanto, os resultados encontrados corroboram com os dados da literatura que descrevem o mecanismo de ação de AAS como um agente que bloqueia o sítio de ligação das COX nos ácidos araquidônicos. Isto significa que a expressão dessas enzimas não sofre alteração e sim sua atuação na oxidação do ácido araquidônico, que fica bloqueada (BATLOUNI, 2010; MONTEIRO; DUARTE; CHAHADE, 2008; SABDOVAL et al., 2017).

O perfil de expressão de *NF-κB* foi semelhante ao perfil de expressão de *TNF-α*. As células tratadas com LPS apresentaram um aumento na expressão de *NF-κB* nos tempos de 6h e 24h, voltando praticamente ao nível basal no tempo de 48h. O LDT11 foi a molécula que, de modo geral, melhor reduziu a expressão do fator de transcrição nos ensaios de efeito protetor e efeito anti-inflamatório (figuras 14 e 20). A diminuição de *NF-κB* no tempo de 48h está de acordo com a literatura, uma vez que este gene é regulado por *TNF-α*, citocina com comprovada retroalimentação negativa (GANE; STOCKLEY; SAPEY, 2016; SABIO; DAVIS, 2014; WU et al., 2017). Além disso, os genes que codificam os inibidores de *NF-κB*, *IκBβ*, são diretamente regulados por *NF-κB*. Assim, também *NF-κB* possui retroalimentação negativa e rapidamente tem sua expressão normalizada (LAWRENCE, 2009; RULAND, 2011).

No ensaio de avaliação do efeito protetor, nos tempos de 6h e 24h para o gene *iNOS*, o LDT11 apresentou uma maior redução da expressão gênica quando comparado ao LDT13, figura 13. No entanto, no ensaio de avaliação do efeito anti-inflamatório a molécula LDT13 foi mais eficiente, apresentando maior redução do gene *iNOS* quando comparada ao LDT11, figura 19. No tempo de 48h, para os dois ensaios (protetor e anti-inflamatório) LDT11 e LDT13 apresentaram resultados estatisticamente coincidentes. Estes resultados sugerem que o LDT11 é um agente anti-inflamatório que pode ser usado na proteção da inflamação e estresse oxidativo, enquanto que o LDT13 seria melhor empregado para tratamento de uma inflamação já estabelecida.

A interleucina-1 β apresentou perfil de expressão gênica bastante elevada nas células estimuladas com LPS. No ensaio de avaliação do efeito protetor, no tempo de 6h os derivados do LCC apresentaram redução da expressão de *IL-1 β* em mais de 90%. Mostrando-se altamente eficaz na supressão deste gene. Nos tempos de 24h e 48h a expressão também foi reduzida, sendo o LDT13 o melhor agente na supressão de *IL-1 β* (figuras 15 e 21). No ensaio de avaliação do efeito anti-inflamatório, o LDT13 também mostrou melhor efeito, reduzindo bastante a expressão de *IL-1 β* e tendo o efeito mais duradouro, até o tempo de 48h.

Os resultados encontrados na expressão gênica de *IL-6* foram semelhantes aos encontrados para o gene *IL-1 β* (figuras 16 e 22). A semelhança nos resultados de *IL-6* e *IL-1 β* corroboram com os dados da literatura que mostram estas citocinas como produtos gênicos ativados pelo fator de transcrição *NF- κ B* (ROTHSCHILD et al., 2018, p. 6). As células inflamadas com LPS mostraram a maior expressão gênica para *IL-6*, comparando com os demais marcadores inflamatórios analisados. Sendo, então esta citocina altamente produzida nos processos inflamatórios. As quatro moléculas testadas, LDT11, LDT13, AAS e DEXA, diminuiram significativamente a expressão de *IL-6*. Na avaliação do efeito protetor, LDT11 e LDT13 mostraram os melhores resultados na redução da expressão gênica. Enquanto que na avaliação de efeito anti-inflamatório a LDT13 apresentou os melhores resultados, reduzindo a expressão de *IL-6* mais eficientemente. Os elevados níveis de *IL-6* observados nos tempos de 48h, na avaliação dos efeitos protetor e anti-inflamatório, contrapõem-se com os resultados de expressão de *NF- κ B*. No entanto, esta diferença de expressão pode ser compreendida pela diferença na inativação dessas vias. A citocina *IL-6* é inativada por degradação de seu mRNA. Esta degradação é ativada pelo complexo de quinases de inibidores de *NF- κ B* (IKK). Enquanto que o *NF- κ B* é inativado por desligamento direto do DNA, quando sequestrado pela proteína inibidora *I κ B*. Sendo assim, a inativação do gene de *IL-6* é tardia quando comparada com a desativação do fator de transcrição (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

A expressão das citocinas *IL-1 β* e *IL-6*, assim como, *COX-2*, *iNOs* e vários outros mediadores inflamatórios, é regulada pelo fator de transcrição *NF- κ B* (JOUNG et al., 2012; LIBERMANN; BALTIMORE, 1990; MARKS-KONCZALIK; CHU; MOSS, 1998). Quando esse fator de transcrição não está ativado, encontra-se localizado no citoplasma como um complexo de ligação inativo ao inibidor de *KappaB* e *I κ B- α* . O tratamento com LPS ativa o complexo *I κ B- α* kinase (IKK), resultando na fosforilação, ubiquitinação e degradação de *I κ B α* , induzindo a translocação do *NF- κ B* para o núcleo e assim, resultando na transcrição de uma variedade de genes inflamatórios (MAKAROV, 2001). Consequentemente, substâncias

que inibam a ativação de NF- κ B, são consideradas como potenciais agentes anti-inflamatórios (JOUNG et al., 2012).

Recentemente, Sung e colaboradores (2008) demonstraram que o ácido anacárdico inibiu a ativação do *NF- κ B* induzido e constitutivo bem como da proteína quinase I κ B α (SUNG et al., 2008). Recente revisão de Hemshekhar e colaboradores (2011) reforçam o perfil farmacológico multialvo para o ácido anacárdico e seu potencial no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios (HEMSHEKHAR et al., 2012).

Os resultados do presente estudo demonstraram a redução da expressão de *NF- κ B* e também de vários mediadores inflamatórios influenciados por este fator de transcrição quando comparado ao grupo controle, células inflamadas com LPS. Assim, pode-se inferir que os derivados de LCC testados, LDT11 e LDT13, apresentam mecanismos de ação anti-inflamatória e imunoprotetora, sendo potenciais agentes terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias. A inibição da expressão dos genes utilizados nesse estudo (*COX-2*, *iNOS* e *TNF- α* , *IL-6* e *IL-1 β*) pelos derivados de LCC provavelmente está associada a redução da transcrição do *NF- κ B*, ativador transcricional desses genes (LAWRENCE, 2009).

O estímulo com LPS induz a produção de óxido nítrico (NO), pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (*iNOS*). O NO é reconhecido como um mediador de respostas inflamatórias (TONG et al., 2014). Portanto, um agente capaz de reduzir esta produção pode possuir atividade anti-oxidante e/ou anti-inflamatória (AKTAN, 2004; COLEMAN, 2001; JUNG et al., 2009; MARKS-KONCZALIK; CHU; MOSS, 1998; ROBINSON; BAUMGARDNER; OTTO, 2011).

Neste estudo, o óxido nítrico foi medido para confirmar os resultados obtidos pela análise dos transcritos por qPCR. Para isso, foram usados os sobrenadantes das mesmas culturas de RAW 264.7 utilizadas nos testes de quantificação da expressão gênica, de acordo com seus tratamentos, descritos nas tabelas 1 e 2.

A primeira análise feita pelo teste do óxido nítrico foi para verificar o efeito imunoprotetor dos derivados fenólicos. Os resultados observados mostraram o potencial efeito imunoprotetor dos derivados de LCC por apresentar uma redução na produção de óxido nítrico quando comparados com o grupo controle (células inflamadas com LPS).

Para avaliar o efeito anti-inflamatório, as células foram estimuladas com LPS e, em seguida, tratadas com os derivados de LCC, LDT11 e LDT13. Os resultados obtidos mostraram que para todos os tempos houve uma redução na produção de NO, apresentando, portanto, potencial efeito anti-inflamatório, figuras 23 e 24.

A interleucina-6 (IL-6), citocina liberada por monócitos, desempenha papel crucial na resposta imune. Sua produção pode ser induzida em algumas células T, células B, células endoteliais, fibroblastos, entre outras, em resposta a uma variedade de estímulos, LPS, NF- κ B, TNF- α , IL-1. Assim, a expressão do gene da IL-6 é altamente regulada por várias substâncias que desencadeiam a inflamação. (LIBERMANN; BALTIMORE, 1990; VARELLA; FORTE, 2001; VOLP et al., 2008). Nos ensaios de avaliação da expressão gênica, o gene da IL-6 foi o que apresentou expressão mais elevada, nas células inflamadas. Assim, mostrou-se um importante produto gênico, resultante do estímulo inflamatório, a ser dosado para confirmar os resultados de quantificação da expressão gênica, figuras 25 e 26.

O efeito imunoprotetor e anti-inflamatório puderam ser observados pelos resultados obtidos, mostrando uma redução da expressão desta citocina em todos os tempos analisados. O LDT11 foi a molécula em que os melhores resultados puderam ser observados.

7 CONCLUSÃO

Os testes de citotoxicidade realizado neste estudo mostraram que LDT11 e LDT13 não são citotóxicos até uma concentração de 75 μ M. A partir desta concentração as células RAW264.7 apresentaram viabilidade menos que 60%, sendo então consideradas concentrações citotóxicas.

Os efeitos imunoprotetor e anti-inflamatório dos derivados fenólicos LDT11 e LDT13, foram confirmados através da análise da expressão dos genes *TNF- α* , *COX-2*, *iNOS*, *NF- κ B*, *IL-1 β* e *IL-6* nos tempo de 6, 24 e 48 horas. Foi evidenciado que os derivados do LCC são efetivos na redução do processo inflamatório. Além disso, os derivados fenólicos mostraram resultados mais eficientes quando comparados com a droga comercial, Dexametasona, para alguns dos marcadores inflamatórios analisados como *COX-2*, *iNOS*, *NF- κ B*, *IL-6*.

Além de uma redução significativa na expressão de genes inflamatórios, o LDT11 e o LDT13 também apresentaram ação anti-inflamatória mais rápida que os fármacos comerciais, mostrando uma resposta já evidente nos testes realizados em seis horas após o tratamento das células com os derivados fenólicos.

A redução do processo inflamatório teve seus dados consistentemente confirmados pela avaliação da redução de óxido nítrico e da citocina IL-6. A dosagem destes mediadores inflamatórios foi reduzida quando as células foram tratadas com LDT11 e LDT13. Este resultado sugere que não há outras vias metabólicas contornando a proteção conferida pelos derivados fenólicos do LCC. Ou seja, a proteção à inflamação é efetiva.

8 REFERÊNCIAS

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653, jun. 2004.

BARNES, P. J. Glucocorticoids. In: BERGMANN, K.-C.; RING, J. (Eds.). . **Chemical Immunology and Allergy**. Basel: S. KARGER AG, 2014. v. 100p. 311–316.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556–563, abr. 2010.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n. 1, p. 1–6, jan. 1988.

BUCKLEY, C. D. et al. Stromal Cells in Chronic Inflammation and Tertiary Lymphoid Organ Formation. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 715–745, 21 mar. 2015.

CAMARA-LEMARROY, C. R. et al. Arachidonic Acid Derivatives and Their Role in Peripheral Nerve Degeneration and Regeneration. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

CAMMERER, M. A. **Efeitos de uma dieta rica em flavonoides sobre o estresse oxidativo, inflamação e perfil lipídico em pacientes submetidos à angioplastia coronária com implante de stent: ensaio clínico randomizado.** [s.l: s.n.].

CARNEIRO, P. DOS S. **Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** Doutorado—Instituto de Ciências Biomédicas: Universidade de São Paulo, 2009.

CHANDREGOWDA, V.; KUSH, A.; REDDY, G. C. Synthesis of benzamide derivatives of anacardic acid and their cytotoxic activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 2711–2719, jun. 2009.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397–1406, 2001.

CRUZ-MACHADO, S. DA S. **LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS): ATIVADOR E REGULADOR DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA VIA FATOR DE TRANSCRIÇÃO NFκB.** **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, jun. 2010.

FENGYANG, L. et al. Stevioside Suppressed Inflammatory Cytokine Secretion by Downregulation of NF-κB and MAPK Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. **Inflammation**, v. 35, n. 5, p. 1669–1675, out. 2012.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. Suppl 1, p. S4–S9, 1 jun. 2014.

FRANCO, D. G. Fator de transcrição Nuclear Kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, 2010.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** **2000**, v. 63, n. 1, p. 149–164, out. 2013.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013a.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013b.

GANE, J. M.; STOCKLEY, R. A.; SAPEY, E. TNF- α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF- α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade *In Vivo*. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

GONZAGA, W. A. Preparação e avaliação farmacológica de derivados dos lipídios fenólicos do Líquido da Casca da Castanha de Caju. 2008.

GREEN, I. R. et al. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6236–6241, set. 2007.

GREEN, I. R. et al. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 6, p. 1315–1320, jun. 2008.

GREEN, L. C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7764–7768, 1 dez. 1981.

GRIFFIN, G. K. et al. IL-17 and TNF- Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6287–6299, 15 jun. 2012.

HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential Biological Applications of Bio-Based Anacardic Acids and Their Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 16 abr. 2015.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, maio 2015.

HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging Roles of Anacardic Acid and Its Derivatives: A Pharmacological Overview: PHARMACOLOGICAL ROLES OF AA AND ITS DERIVATIVES. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122–132, fev. 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 8 fev. 2017.

JAEGER, B. N.; PARYLAK, S. L.; GAGE, F. H. Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation. **Molecular Aspects of Medicine**, nov. 2017.

JAFARAIN, A.; ASGHARI, G.; GHASSAMI, E. Evaluation of cytotoxicity of *Moringa oleifera* Lam. callus and leaf extracts on Hela cells. p. 5, 2014.

JOUNG, E.-J. et al. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Myagropsis myagroides* on murine macrophages and mouse ear edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, dez. 2012.

JUNG, H. W. et al. Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1190–1197, jun. 2009.

KAIN, V.; PRABHU, S. D.; HALADE, G. V. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. **Basic Research in Cardiology**, v. 109, n. 6, nov. 2014.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell death and differentiation**, v. 13, n. 5, p. 816, 2006.

KELLER, W. R. et al. A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 337–342, abr. 2013.

LANDSKRON, G. et al. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–19, 2014.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001651–a001651, 1 dez. 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787–795, out. 2002.

LEE, H.-J. et al. Ninjurin1: a potential adhesion molecule and its role in inflammation and tissue remodeling. **Molecules and Cells**, v. 29, n. 3, p. 223–227, mar. 2010.

LIBERMANN, T. A.; BALTIMORE, D. Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF-KB Transcription Factor. **MOL. CELL. BIOL.**, p. 8, 1990.

LIU, S.; CHEN, Z. J. Expanding role of ubiquitination in NF-κB signaling. **Cell research**, v. 21, n. 1, p. 6, 2011.

MAKAROV, S. S. NF-κB in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. v. 3, n. 4, p. 7, 2001.

MANCINO, A.; LAWRENCE, T. Nuclear Factor- B and Tumor-Associated Macrophages. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. 784–789, 1 fev. 2010.

MARKS-KONCZALIK, J.; CHU, S. C.; MOSS, J. Cytokine-mediated Transcriptional Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Requires Both Activator Protein 1 and Nuclear Factor κB-binding Sites. p. 9, 1998.

MATTANA, C. M. et al. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Acacia aroma* Leaf Extracts. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric Oxide Synthase: Non-Canonical Expression Patterns. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 9 out. 2014.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Cashew nut oil: opportunities and challenges in the context of sustainable industrial development. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 732–741, 2009.

MEFFERT, M. K.; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF- κ B. **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 1, p. 37–43, jan. 2005.

MITCHELL, J. D.; SCOTT, M. A. **The Cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae)**. [s.l: s.n.]. v. 42

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NF κ B system: Signaling via the NF κ B system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 227–241, maio 2016.

MONTEIRO, E. C. A.; DUARTE, Â. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES). **TEMAS DE REUMATOLOGIA CLÍNICA**, v. 9, p. 11, 2008.

NABEL, G.; BALTIMORE, D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. **Nature**, v. 326, p. 711–713, abr. 1987.

OLIVEIRA, J. B.; SOARES, A. A. S. M.; SPOSITO, A. C. Inflammatory Response During Myocardial Infarction. In: **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 84p. 39–79.

PARAMASHIVAPPA, R. et al. Synthesis of Sildenafil Analogues from Anacardic Acid and Their Phosphodiesterase-5 Inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7709–7713, dez. 2002.

PINHO, L. X. APROVEITAMENTO DO RESÍDUO DO PEDÚNCULO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.) PARA ALIMENTAÇÃO HUMANA. p. 99, 2009.

RAMESH, G.; MEISNER, O. C.; PHILIPP, M. T. Anti-inflammatory effects of dexamethasone and meloxicam on *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation in neuronal cultures of dorsal root ganglia and myelinating cells of the peripheral nervous system. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, dez. 2015.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, jul. 2008.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 1 maio 2011.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. (EDS.). **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8th ed ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2010.

ROBINSON, M. A.; BAUMGARDNER, J. E.; OTTO, C. M. Oxygen-dependent regulation of nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 11, p. 1952–1965, dez. 2011.

ROGERIO, A. DE P. et al. The Role of Lipids Mediators in Inflammation and Resolution. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–2, 2015.

- ROTHSCHILD, D. E. et al. Modulating inflammation through the negative regulation of NF- κ B signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, 1 fev. 2018.
- RULAND, J. Return to homeostasis: downregulation of NF- κ B responses. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 709–714, 19 jun. 2011.
- SABDOVAL, A. C. et al. O USO INDISCRIMINADO DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES). **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 8, 2017.
- SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 237–245, jun. 2014.
- SCHESCHOWITSCH, K. Translocação nuclear de NF-KB e de receptores de glicocorticoides em células musculares lisas: envolvimento do óxido nítrico e do peroxinitrito. 2011.
- SOUZA FILHO, R. Y. DE. Estudos visando à síntese de heterociclos de 5-membros a partir dos lipídios fenólicos do LCC: isobenzofuranonas e indolinonas em foco. 2014.
- STASIUK, M.; BARTOSIEWICZ, D.; KOZUBEK, A. Inhibitory effect of some natural and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 996–1001, jun. 2008.
- STASIUK, M.; KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 6, p. 841–860, mar. 2010.
- SUNG, B. et al. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor- κ B-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor- κ B kinase, leading to potentiation of apoptosis. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4880–4891, 15 maio 2008.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, p. a016295–a016295, 1 out. 2014.
- TANER, G. et al. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic potential of Pycnogenol® in in vitro mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 203–208, nov. 2013.
- TEOTÔNIO, I. M. S. N. Efeitos anti-inflamatórios de espécies de Pouteria spp. sobre macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com LPS. 2016.
- TONG, L. et al. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from Radix Toddaliae Asiaticae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1553–1560, set. 2014.
- TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188–197, fev. 2006a.

- TREVISAN, M. T. S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 188–197, fev. 2006b.
- TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, p. G377–G385, fev. 2006.
- VARELLA, P. P.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146–154, 2001.
- VIEIRA, T. DA S. Estudos visando à síntese de novos derivados do LCC com potencial atividade no tratamento da doença de Alzheimer. 2007.
- VILETTI, F.; SANCHES, A. C. C. INDISCRIMINATE USE AND/OR THE IRRATIONAL NON-STEROIDAL ANTI- INFLAMMATORY (NSAID) OBSERVED IN A PHARMACY OF DISPENSING. **Visão Acadêmica**, p. 8, 2008.
- VITALE, R. F. et al. TNF-R2 expression in acquired middle ear cholesteatoma. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 4. v. 77, p. 531–536, ago. 2011.
- VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. DE A. Q. Section: Artigo de Revisão Pages: 123 to 127. 2007.
- VOLP, A. C. P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537–549, 2008.
- WANG, S.-Z.; QIN, Z.-H. Anti-Inflammatory and Immune Regulatory Actions of *Naja naja* atra Venom. **Toxins**, v. 10, n. 3, p. 100, 28 fev. 2018.
- WU, G.-R. et al. Prion protein is required for tumor necrosis factor α (TNF α)-triggered nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling and cytokine production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 46, p. 18747–18759, 17 nov. 2017.
- XAVIER, J. E.; ARAÚJO, F. J.; VIEIRA, P. B. Solventes para extração do líquido da castanha de caju (LCC) e compatibilidade ambiental. v. 29, n. 1, p. 9, 2008.
- XIAO, W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n. 6, p. 425–435, 2004.
- YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 72–79, fev. 2004.
- ZWOLAK, I. Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 6, p. 1013–1025, jun. 2016.