UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

LEONARDO AUGUSTO DE MELO

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO COMPOSTO TRITERPÊNICO 29-HIDROFRIEDELAN-3-ONA ISOLADO DO GALHO DE *MAYTENUS GONOCLADA* MART. (*MAYTENUS ROBUSTA* REISSEK) NA RESPOSTA IMUNE INATA E HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDAS POR LPS

Belo Horizonte

2023

LEONARDO AUGUSTO DE MELO

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO COMPOSTO TRITERPÊNICO 29-HIDROFRIEDELAN-3-ONA ISOLADO DO GALHO DE *MAYTENUS GONOCLADA* MART. (*MAYTENUS ROBUSTA* REISSEK) NA RESPOSTA IMUNE INATA E HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDAS POR LPS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Klein
Co-orientadora: Profª. Drª. Andrea de Castro Perez

Belo Horizonte

2023

043 Melo, Leonardo Augusto de.
Potencial farmacológico do composto triterpênico 29- hidrofriedelan-3-ona isolado do galho de maytenus gonoclada mart. (maytenus robusta reissek) na resposta imune inata e hiperalgesia mecânica induzidas por LPS [manuscrito] / Leonardo Augusto de Melo. – 2023.
69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: André Klein. Co-orientadora: Andrea de Castro Perez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Neutrófilos. 3. Citocinas. 4. Peroxidase. 5. Pulmão. I. Klein, André. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612

Ficha Catalográfica elaborada pelo bibliotecário Rafael Gonçalves Dias (CRB: 6 - 3277)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 379 DE LEONARDO AUGUSTO DE MELO

Às 13:00 horas do dia 01 do mês de dezembro de 2023, na Sala Wilson Beraldo- A4/175-ICB/UFMG, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Leonardo Augusto de Melo.** A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. André Klein,** orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Idania Rodeiro Guerra,** Universidade de Havana, e **Prof. Dr. André Klein,** ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO COMPOSTO TRITERPÊNICO 29-HIDROFRIEDELAN-3-ONA ISOLADO DO GALHO DE Maytenus gonoclada Mart. (Maytenus robusta Reissek) NA RESPOSTA IMUNE INATA E HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDAS POR LPS**".** Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 01 de dezembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Andre Klein**, **Professor do Magistério Superior**, em 10/01/2024, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Juliana Carvalho Tavares**, **Professora do Magistério Superior**, em 10/01/2024, às 15:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Idania Rodeiro Guerra**, **Usuária Externa**, em 09/02/2024, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2936696** e o código CRC **663AF640**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcus (*in memorium*) e Eny.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor André Klein agradeço a orientação e por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento acadêmico. Ademais, quero estender meus agradecimentos a todos os professores da Universidade Federal de Minas Gerais, cuja influência direta e indireta enriqueceu meu repertório de conhecimentos e moldou minha identidade como pesquisador ao longo dos anos. Expresso, também, minha gratidão aos doutores que integraram a banca de avaliação, cujo olhar criterioso e construtivo enriquece ainda mais esta pesquisa.

Não posso deixar de mencionar a imensa gratidão que sinto em relação à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, edital Universal processo número 238-18), e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, *edital 11/2020 CAPES*) pelos auxílios financeiros.

Aos nossos valorosos colaboradores, cujos esforços desempenharam um papel crucial na realização deste trabalho, expresso minha mais profunda gratidão. Gostaria de estender meus agradecimentos especiais à Profª. Lucienir Pains Duarte (Departamento de Química, UFMG), que generosamente disponibilizou o composto friedelânico objeto de estudo. À Profª. Jacqueline Isaura Alvarez Leite (Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG), agradeço a disponibilização dos recursos essenciais para a realização dos ensaios imunoenzimáticos. Aos Professores Igor Dimitri Gama Duarte (Departamento de Farmacologia, UFMG) e Thiago Roberto Lima Romero (Departamento de Farmacologia, UFMG), nossa sincera gratidão pela colaboração insubstituível nos experimentos relacionados à hiperalgesia mecânica.

Aos meus colegas pós-graduandos, Me. Janayne Luihan Silva e Me. Walace Cássio Pinto Barra, quero expressar minha profunda gratidão pelo apoio inestimável em momentos cruciais deste projeto. Em particular, gostaria de agradecer à Me. Sara Vergel e à Drª. Thamyris Moraes, minhas parceiras de trabalho, pelo comprometimento e colaboração excepcionais.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram, todo meu amor e gratidão. E a Pedro Lucas e Camilla Barbosa, meus companheiros de vida, agradeço

de coração por estarem ao meu lado, acreditando em mim e compartilhando essa jornada comigo.

"A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas."

Rosalind Franklin

RESUMO

O presente trabalho aborda o estudo do potencial farmacológico do composto 29-hidroxifriedelan-3-ona (29-HF), isolado do galho da espécie *Maytenus gonoclada* Mart. na resposta imune inata e hiperalgesia mecânica induzidas experimentalmente por LPS administrado, respectivamente, nos pulmões e patas de camundongos. Foram avaliados, através da coleta de lavado broncoalveolar, os efeitos do pré-tratamento com 29-HF, administrado pela via subcutânea, sobre o recrutamento leucocitário ao espaço broncoalveolar de camundongos desafiados com instilação intranasal de LPS. Além disso, avaliamos a liberação das citocinas IL-6, IL-1β e TNF-α e da atividade da mieloperoxidase no lavado broncoalveolar. Para investigar o potencial analgésico a nível sistêmico e local do 29-HF contra a hiperalgesia mecânica induzida por inflamação em resposta à injeção intraplantar de LPS, foi realizado o teste de Randall-Selitto modificado para camundongos. O pré-tratamento com 29-HF apresentou efeito anti-inflamatório em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida pela instilação intranasal de LPS, que foi caracterizado pela redução significativa do recrutamento neutrofílico ao espaço broncoalveolar, além de ter proporcionado redução significativa da liberação de IL-1β e IL-6 nesse mesmo modelo. O 29-HF também mostrou eficácia na redução da atividade da mieloperoxidase obtido em lavado broncoalveolar. No modelo de hiperalgesia mecânica induzida por injeção intraplantar de LPS, o tratamento com 29-HF, injetado pela via intraperitoneal e intraplantar, demonstrou aumento significativo do limiar nociceptivo de animais desafiados com injeção intraplantar de LPS. O efeito analgésico do 29-HF foi revalidado em teste para avaliar possíveis alterações neuromotoras em *Rotarod*, onde os animais tratados com 29-HF não apresentaram diferença no desempenho motor comparado ao grupo tratado com PBS. Em suma, nossos resultados sugerem que o 29-HF apresenta efeito farmacológico anti-inflamatório e analgésico em modelos de inflamação pulmonar aguda e hiperalgesia mecânica induzidos por LPS.

PALAVRAS-CHAVE: 29-hidroxifriedelan-3-ona; neutrófilos; citocinas; mieloperoxidase; lavado broncoalveolar; pulmão; pata; hiperalgesia mecânica.

ABSTRACT

The present work focuses on exploring the pharmacological potential of the compound 29-hydroxyfriedelan-3-one (29-HF), isolated from the branches of *Maytenus gonoclada* Mart., in relation to experimentally induced innate immune response and mechanical hyperalgesia by LPS administration in the lungs and paws of mice, respectively. To investigate the effects of pre-treatment with 29-HF, administered subcutaneously, on the LPS response, we collected bronchoalveolar lavage and assessed the recruitment of white blood cells in this space, along with the release of cytokines IL-6, IL-1β, and TNF-α, along with myeloperoxidase activity. Furthermore, to evaluate the analgesic potential of 29-HF in relation to inflammation-induced mechanical hyperalgesia in response to intraplantar LPS injection, we conducted the modified Randall-Selitto test in mice. The results demonstrated that pre-treatment with 29-HF exhibited significant anti-inflammatory effects in a model of acute pulmonary inflammation induced by intranasal LPS instillation. This was manifested by a significant reduction in neutrophil recruitment into the bronchoalveolar space, as well as a reduction in the release of IL-1β and IL-6 in this model. Additionally, 29-HF also showed efficacy in reducing myeloperoxidase activity in the bronchoalveolar lavage. In the model of mechanical hyperalgesia induced by intraplantar LPS injection, treatment with 29-HF, administered intraperitoneally and intraplantar, resulted in a significant increase in the nociceptive response threshold in animals challenged with intraplantar LPS injection. This analgesic effect of 29-HF was further confirmed in tests to assess potential neuromotor alterations on a Rotarod, where animals treated with 29-HF did not exhibit significant differences in motor performance compared to the PBS-treated group. In summary, our findings suggest that 29-HF possesses pharmacological anti-inflammatory and analgesic effects in models of acute pulmonary inflammation and LPS-induced mechanical hyperalgesia.

KEYWORDS: 29-hydroxyfriedelan-3-one; neutrophils; cytokines; myeloperoxidase; bronchoalveolar lavage; lungs; paws; mechanical hyperalgesia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Molécula de 29-hidroxifriedelan-3-ona 23
Figura 2: Delineamento da curva concentração-resposta de LPS para a indução de inflamação pulmonar aguda. 37
Figura 3: Delineamento da curva concentração-resposta do efeito anti-inflamatório do 29-HF em pulmão.....38
Figura 4: Delineamento da curva dose-resposta para modelo de hiperalgesia inflamatória.....40
Figura 5: Delineamento da curva tempo-resposta para modelo de hiperalgesia inflamatória.....40
Figura 6: Delineamento do teste de desempenho no Rotarod. 41
Figura 7: Delineamento para determinação do efeito analgésico sistêmico do 29-HF. 42
Figura 8: Delineamento para determinação do efeito analgésico local do 29-HF.....43
Figura 9: Contagem de neutrófilos em LBA de animais que receberam instilação *i.n* de LPS ou PBS. 46
Figura 10: Contagem de neutrófilos em LBA de camundongos pré-tratados com 29-HF *s.c* e desafiados com LPS *i.n*. 47
Figura 11: Dosagem das citocinas IL1β (A), IL-6 (B) e TNF-α (C) em amostras de LBA de camundongos C57BL/6 pré-tratados com 29-HF, dexametasona ou DMSO pela via s.c e desafiados com instilação i.n de LPS ou PBS. 49
Figura 12: Atividade da MPO em lavado broncoalveolar obtido de camundongos pré-tratados com injeção s.c de 29-HF, dexametasona ou DMSO e então desafiados com instilação i.n de LPS ou PBS.....50
Figura 13: Efeito hiperalgésico, expresso através do limiar nociceptivo (em g), provocado pela injeção *i.pl* de LPS em três concentrações (200, 20 ou 2 ng/20 µL) na pata traseira esquerda de camundongos *Swiss* machos. 51
Figura 14: Duração do efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF (20 mg/Kg, *i.p*)...52
Figura 15: Efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF (20, 10 e 5 mg/kg). 53
Figura 16: Efeito anti-nociceptivo local do 29-HF. 53
Figura 17: Avaliação do desempenho motor em camundongos *Swiss* machos tratados com 29-HF (20 mg/kg) *i.p*, xilazina (16 mg/kg) *s.c* ou veículo (DMSO 2,5%) *i.p*. 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos em LBA de animais que receberam instilação *i.n* de LPS ou PBS.....45

Tabela 2: Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos de LBA de camundongos pré-tratados com 29-HF *s.c* e desafiados com LPS *i.n*. 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

29-HF	29-hidroxifriedelan-3-ona
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
BICBIO-2	Biotério do Instituto de Ciências Biológicas-2
BLT	Receptor de LTB_4
C5a	Quinto componente do sistema complemento ativado
CCL2	Do inglês, *chemokine (C-C motif) ligand 2*
CEBIO	Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
CXCL8	Interleucina 8, do inglês, *CXC-chemokine ligand 8*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
E.P.M	Erro padrão da média
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, *enzyme-linked immunosorbant assay*
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
GCCs	Glicocorticoides
HTAB	Hexadeciltrimetilamonio bromídico
i.n	Intranasal
i.p	Intraperitoneal
i.pl	Intraplantar
ICAM1	Do inglês, *intracelular adhesion molecule 1*
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina-6
INF-γ	Interferon γ
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB_4	Leocutrieno B_4
LTC_4	Leucotrieno C_4

LTD_4	Leucotrieno D_4
LTE_4	Leucotrieno E_4
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês, *mitogen-activated protein kinases*
MMP-9	Metaloproteinase de matriz do tipo 9, do inglês, *matrix metalloproteinase 9*
MPO	Mieloperoxidase
NEPLAM	Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais
NF-κB	Do inglês, *nuclear factor κ B*
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide 2, do inglês, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
ONU	Organização das Nações Unidas
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno, do inglês, p*athogen-associated molecular patterns*
PBS	Solução salina tamponada, do inglês, *phosphate-buffered saline*
PGE_2	Prostaglandina E_2
PGI_2	Prostaglandina I_2 ou prostaciclina
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
ROR-γt	Receptor órfão para retinóide do subtipo gama, do inglês, *Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*
s.c	Subcutâneo
STAT3	Proteína STAT do tipo 3, do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*
TLR2	Receptor do tipo-*Toll* 2, do inglês, *Toll-like receptor* 2
TLR4	Do inglês, *Toll-like receptor* 4
TLRs	Receptores do tipo Toll, do inglês, *Toll-like receptors*
TMB	3',3'5,5'-tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α, do inglês, *tumor necrosis factor α*
TPs	Triterpenóides pentacíclicos
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UVB	Ultravioleta B
VCAM1	Do inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 17

1.1 Plantas medicinais e a descoberta de novos agentes farmacológicos 17

1.2 Medicamentos modernos derivados de produtos de origem natural 19

1.3 Maytenus sp. e os triterpenóides pentacíclicos 21

1.4 Aspectos do sistema imune inato e inflamação 24

1.5 Aspectos do manejo clínico da inflamação e a busca por novos agentes anti-inflamatórios 28

2 **OBJETIVOS** 31

2.1 Objetivo geral 31

2.2 Objetivos específicos 31

3 **MATERIAL E MÉTODOS** 32

3.1 Animais 32

3.2 Drogas e reagentes 32

3.3 Vias de administração 34

3.3.1 Via intraperitoneal 34

3.3.2 Via intranasal 35

3.3.3 Via intraplantar 35

3.3.4 Via subcutânea 35

3.4 Avaliação do efeito anti-inflamatório do 29-HF em pulmões de camundongos C57BL/6 35

3.4.1 Indução de inflamação pulmonar aguda por instilação intranasal de LPS 35

3.4.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório do 29-HF em pulmão 37

3.4.3 Dosagem de citocinas em amostras de lavado broncoalveolar 38

3.4.4 Atividade da mieloperoxidase em amostras de lavado broncoalveolar .38

3.5 Avaliação do efeito analgésico em pata 39
3.5.1 Indução da hiperalgesia inflamatória por LPS intraplantar 39
3.5.2 Determinação da duração do efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF 40
3.5.3 Teste de desempenho no Rotarod 41
3.5.4 Avaliação do efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF 41
3.5.5 Avaliação do efeito anti-nociceptivo local do 29-HF 42
3.6 Análises estatísticas 44
4 **RESULTADOS** 45
4.1 Efeito do 29-HF no modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por instilação intranasal de LPS 45
4.1.1 A instilação intranasal de LPS provoca infiltração neutrofílica nos alvéolos 45
4.1.2 A injeção subcutânea de 29-HF reduziu a infiltração neutrofílica nos alvéolos de animais desafiados com instilação intranasal de LPS 46
4.1.3 A injeção subcutânea de 29-HF reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias nos alvéolos de camundongos desafiados com instilação intranasal de LPS 48
4.1.4 A injeção subcutânea de 29-HF reduziu a atividade da mieloperoxidase nos alvéolos de camundongos desafiados com instilação intranasal de LPS 50
4.1 Efeito do 29-HF no modelo experimental de hiperalgesia mecânica induzida por injeção intraplantar de LPS 51
4.1.3 A injeção intraplantar de LPS provoca hiperalgesia mecânica camundongos Swiss machos 51
4.1.4 A injeção intraperitoneal de 29-HF apresenta efeito anti-nociceptivo em modelo de hiperalgesia mecânica induzida por LPS i.pl 52
5 **DISCUSSÃO** 55
6 **CONCLUSÃO** 61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 62

ANEXOS 69

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas medicinais e a descoberta de novos agentes farmacológicos

As pesquisas etnofarmacológicas relacionam a cultura popular do uso de plantas medicinais com suas propriedades farmacológicas e apresentam uma ampla gama de plantas ou outras fontes naturais com possível atividade terapêutica, sendo especialmente importantes em países com grande biodiversidade como o Brasil (Dutra *et al.*, 2016; Gurib-Fakim, 2006). Assim, considerando-se o valoroso respaldo histórico e científico no estudo e utilização de terapêutica à base de plantas, de fármacos derivados destas e de fármacos sintéticos baseados em moléculas de origem natural, o estudo de plantas medicinais pode contribuir de maneira relevante para a expansão do conhecimento acerca das propriedades terapêuticas e biotecnológicas que elas podem apresentar, contribuindo assim, não só para o benefício da população que as utilizam, mas também para a possível descoberta de agentes terapêuticos mais eficazes e/ou seguros.

Os produtos de origem natural compreendem um vasto grupo de substâncias heterogêneas que compartilham a característica de serem produzidas pelos processos metabólicos de seres vivos como plantas, fungos, microrganismos e animais. Esses compostos encontrados na natureza, possuem uma diversidade impressionante de estruturas químicas e de propriedades biológicas que são utilizadas para finalidades medicinais há milênios (Dzobo, 2022) e compreendem um gigantesco banco de moléculas com potencial terapêutico, oferecendo uma fonte rica e diversificada de candidatos farmacológicos para a pesquisa científica.

A história da medicina e da farmácia tem suas raízes no conhecimento ancestral do uso de preparações derivadas de plantas medicinais. Ao longo da história, povos de diferentes partes do mundo desenvolveram tradições curativas, aproveitando as fontes naturais disponíveis localmente. Um exemplo remonta aos mesopotâmios (2600 AC), que utilizavam o cipreste (*Cupressus* sp.) e mirra (*Commiphora* sp.) com fins medicinais, marcando o início da documentação escrita dessa prática (Cragg e Newman, 2005). Interessantemente, essas plantas continuam sendo amplamente utilizadas para o tratamento de distúrbios inflamatórios, tosses e

sintomas gripais (Cragg e Newman, 2005, apud Dias, Urban e Roessner, 2012). Ademais, independente da temporalidade e localização geográfica, a medicina tradicional reflete a rica e contínua tradição humana de transformar fontes naturais em produtos para a saúde. Afinal, vale destacar que o embasamento etnocultural para a busca por novos agentes terapêuticos é de fundamental importância, uma vez que cerca de 80% dos centenas de medicamentos derivados de plantas apresentam correlação terapêutica alinhada com o uso tradicional delas (Fabricant e Farnsworth, 2001).

O Brasil, graças às suas dimensões geográficas e variações climáticas, destaca-se como uma das maiores potências mundiais na descoberta de novos fármacos (Valli, Russo e Bolzani, 2018). A riqueza dos biomas brasileiros desperta um ímpeto na comunidade científica para explorar as diversas aplicações dos compostos encontrados na fauna e flora nativas. Atualmente, há um estímulo para a implementação de políticas para o melhor aproveitamento das plantas medicinais de uso popular no Brasil, alinhado à política da Organização das Nações Unidas (ONU), que vem incentivando os Estados-membros a adotarem políticas públicas para o uso racional e integrado de terapias alternativas e complementares, incluindo o uso de plantas medicinais (World Health Organization, 2013). Além disso, há um esforço em promover estudos científicos que proporcionem maior conhecimento sobre a eficácia, segurança e qualidade dessas plantas no contexto da saúde.

Uma das medidas adotadas pelo estado brasileiro foi a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) por meio da Portaria 2.960/2008. Essa política tem como objetivo principal promover o uso racional e seguro de fitoterápicos e plantas medicinais, bem como o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da cadeia produtiva e indústria nacional (Brasil, 2008). O objetivo é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso adequado de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos (Brasil, 2019). Mais recentemente, o governo brasileiro vem mostrando um interesse renovado na preservação do meio ambiente e na exploração científica das florestas para promover o desenvolvimento técnico-científico e econômico do país e da região amazônica.

1.2. Medicamentos modernos derivados de produtos de origem natural

Uma grande parte dos medicamentos modernos tem origem à partir de compostos naturais ou foram inspirados por eles, destacando a importância dessas substâncias como fonte de novos fármacos e terapias (Granchi, 2022). Apesar das diversas estratégias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, o grande arsenal químico disponível na natureza ainda representa uma alternativa de sucesso às pesquisas em farmacologia (Dutra *et al.*, 2016; Gurib-Fakim, 2006). Aliás, estima-se que 60% das moléculas comercializadas como medicamentos proveram direta ou indiretamente de fontes naturais (Eddershaw, Beresford e Bayliss, 2000, apud Mathur e Hoskins, 2017). Existem vários exemplos que reforçam a rica contribuição do estudo científico de compostos de origem natural.

Assim, a penicilina, isolada do fungo *Penicillium chrysogenum* por Fleming em 1929 é certamente o mais famoso exemplo de antimicrobianos de origem natural, mas não é o único, pois a descoberta da penicilina abriu caminho para ampliar a busca por antimicrobianos nas décadas seguintes, tendo contribuído para a descoberta de β-lactâmicos e a vancomicina, também obtidos a partir de microrganismos (Dias, Urban e Roessner, 2012).

A quinina, um alcaloide isolado da quina (*Cincho* sp.), é amplamente conhecida pelas propriedades antimaláricas (Ficko e Conan, 2023) e mais recentemente, a pesquisadora chinesa, Tu Youyou, se destoucou ao receber o prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina pela descoberta da artemisinina, um antimalárico obtido de *Artemesia* sp., com base em estudos de compêndios médicos da China antiga (Su e Miller, 2015).

A etnofarmacologia também desempenhou um papel crucial na descoberta de novos agentes antitumorais. O paclitaxel, isolado de *Taxus brevifolia*, é um dos fármacos mais usados para o tratamento do câncer de mama e outros tumores sólidos (Gallego-Jara *et al.*, 2020). Ainda, *Calanthus roseus* é fonte de um grupo de agentes antitumorais conhecidos como alcaloides de vinca, sendo o vinorelbina, um derivado da vincristina, amplamente usado no tratamento de vários tipos de tumores malignos (Goa e Faulds, 1994).

O ácido acetilsalicílico é derivado da salicina, obtido de *Salix alba*, e é principalmente indicado como medicamento antipirético e analgésico (Tawfeek *et al.*, 2021). Entre os analgésicos mais potentes e eficazes, destacam-se a morfina e codeina, estudadas desde o século XIX. Estes alcaloides foram extraídos do ópio, um fluido espesso obtido dos frutos de *Papaver* sp. e têm uso bem consolidado para o manejo de dores intensas, assim como os demais opioides derivados dos compostos naturais (revisado por Duarte, 2005). Aliás, a apomorfina, um produto da decomposição térmica da morfina em solução ácida, apresenta grande utilidade para o manejo da doença de Parkinson graças a seus efeitos como um potente agonista dopaminérgico (Carbone *et al.*, 2019).

Em 1844, Claude Bernarde, um fisiologista francês, estudou os efeitos do “curare”, uma preparação a base de ervas amazônicas usada por indígenas para recobrir as pontas das flechas para o uso na caça e defesa (Bernard, 1938, apud Black, 1999). Essas plantas são membras das Loganeáceas e Menispermáceas, sendo os principais agentes ativos na mistura os alcaloides, como a tubocurarina, que é um constituinte usado em anestésicos gerais pelo efeito como um potente bloqueador neuromuscular (Shafer, 2011).

No ramo da cardiologia, os medicamentos digitálicos são indispensáveis para o bom manejo de pacientes que apresentam um quadro de insuficiência cardíaca e/ou arritmias (Whayne, 2018). A digoxina, obtida da planta *Digitalis lunata*, é um glicosídeo cardiotônico cujo uso como um aliado contra as disfunções do miocárdio é substanciado desde o século XVI até os dias atuais (Whayne, 2018).

A metformina é um membro da classe das biguanidas, considerada um medicamento de primeira linha para o tratamento do diabete mellitus tipo II graças aos efeitos hipoglicemiantes (Dutta *et al.*, 2023). A metformina foi sintetizada a partir de biguanidas naturais obtidas de *Galega officinalis*, sendo que o uso dessa planta é descrito há séculos na Europa (Dutta *et al.*, 2023).

Por fim, o bevirimat é um agente antiviral derivado do ácido betulínico, um triterpenóide pentacíclico isolado inicialmente de *Syzygium claviflorum*. O bevirimat se encontra em fase de ensaio clínico (Smith *et al.*, 2007). Aliás, os triterpenóides pentacíclicos apresentam uma grande diversidade de efeitos biológicos de relevância médica, como será discutido adiante.

1.3. Maytenus sp. e os triterpenóides pentacíclicos

As espécies de *Maytenus* são frequentemente usadas na medicina popular brasileira, sendo a espinheira-santa uma das mais bem conhecidas e usadas tradicionalmente, e dentre estas, *Maytenus gonoclada* Mart. (sinônimos: *Monteverdia gonoclada* Mart. ex Biral e *Maytenus robusta* Reissek) é uma planta da família das Celastráceas (*Celastraceae*), com estrutura de arbustos ou árvores (Niero, Faloni De Andrade e Cechinel Filho, 2011). A espécie é endêmica ao Brasil, sendo mais comumente encontrada nos biomas do Cerrado e Mata Atlântica, bem como Caatinga e Amazônia (Niero, Faloni De Andrade e Cechinel Filho, 2011).

Dentre os usos tradicionais que então descritos para a espinheira-santa e espécimes relacionadas, o uso no tratamento de distúrbios gástricos e intestinais são os mais conhecidos e citados popularmente, sobretudo para o manejo de gastrites, úlceras gástricas e diarréia (Mees *et al.*, 2020 e Veloso *et al.*, 2017). Além dos usos tradicionais contra distúrbios gástricos, pesquisas recentes têm apontado propriedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antivirais, anti-inflamatórias, antialérgicas, antipruriginosas, diurética, abortiva, laxativa, cicatrizante, antiasmática, analgésica e emenagoga (Niero, Faloni De Andrade e Cechinel Filho, 2011; Veloso *et al.*, 2017 e Zhang *et al.*, 2020).

Assim como ocorre em outras espécies de plantas, os membros do gênero *Maytenus* sintetizam inúmeros compostos através do metabolismo secundário. Os triterpenos pentacíclicos e suas versões hidroxiladas – os triterpenóides pentacíclicos – são agliconas de saponinas que exibem grande diversidade estrutural, embora todas apresentem um arcabouço de esqualeno, um triterpenóide simples composto por 30 carbonos (Miranda *et al.*, 2022).

Os triterpenos e triterpenóides pentacíclicos (TPs) são agentes com importante potencial anti-inflamatório e antioxidante que vem atraindo a atenção da comunidade científica nas últimas décadas. Em modelo de lesão de isquemia-reperfusão, o ácido maslínico demonstrou capacidade apreciável de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias via inibição da via do (TLR)4, receptor do tipo *Toll* (do inglês *Toll Like Receptor*) (Li *et al.*, 2021), além de amortecer o estresse oxidativo através da indução

da via do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2, do inglês, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) e inibição da via do fator nuclear *kappa* B (NF-κB , do inglês *Nuclear Factor kappa B*) (Li *et al.*, 2021). Em outro estudo avaliando o dano oxidativo em células epiteliais humanas, foi demonstrado que o ácido maslínico apresentou efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por irradiação de luz ultravioleta (UV)B através da supressão da via do NF-κB, também reduzindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios (Cheng *et al.*, 2023).

A modulação de vias pró-inflamatórias e antioxidantes fundamenta os efeitos protetores de vários outros TPs. Avaliando o efeito do ácido betulínico contra a cardiotoxicidade do organofosforado clorpirifós em ratos, foi demostrado que o composto triterpênico é capaz de mitigar o estresse oxidativo e a resposta inflamatória através da via do fator de transcrição NF-κB (Alruhaimi, 2023). Extratos triterpênicos também apresentaram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em modelos de inflamação induzida por LPS, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 (Waghole *et al.*, 2022). O mesmo trabalho também apresentou dados mostrando redução significativa do edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina em modelo *in vivo* (Sousa *et al.*, 2017; Waghole *et al.*, 2022).

Em suma, nos últimos anos, houve um aumento expressivo de estudos prospectando os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de compostos triterpênicos. Pode-se dizer que esse interesse é sustentado por um montante crescente de evidências que apontam efeitos anti-inflamatórios promissores dos TPs em vários modelos incluindo artrite (Cheng *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2022), lesões do miocárdio (Li *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2023), lesões pulmonares (Kang *et al.*, 2022) e de pele (Kang *et al*., 2022).

Em revisão dos prováveis mecanismos anti-inflamatórios descritos para os compostos triterpênicos, Miranda e colaboradores (2022) estabelecem que existem três vias elucidadas no corpo literário científico. Primeiramente, a via da interleucina (IL)-10 inicia-se com a indução farmacológica de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. A IL-10, por sua vez, provoca redução da atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), bloqueando a conversão de ácido araquidônico para prostaglandinas. Além da inibição da COX-2, os TPs também modulam a expressão gênica de fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos

(MAPK, do inglês, *mitogen-activated protein kinases*), da Proteína STAT do tipo 3 (STAT3, do inglês, *signal transducer and activator of transcription 3*) e do receptor órfão para retinóide do subtipo gama (ROR-γt, do inglês, *Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*). A modulação das citocinas pró-inflamatórias, além de amenizar o estado inflamatório, também reduz o estresse oxidativo excessivo desencadeado durante a resposta inflamatória ao reduzir a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que porventura, também pode ser um efeito direto dos TPs por uma via diferente. Por fim, os compostos triterpênicos também inibem a ativação de TLR2 e TLR4 nos macrófagos, células dendríticas, leucócitos polimorfonucleares, células B e T. A inibição do TLR2 e TLR4 reduz a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1β, IL-6, o interferon (IFN)-γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α, do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) (Miranda *et al.*, 2022).

O 29-hidroxifriedelan-3-one (29-HF) é um triterpenóide pentaclíclico pertencente ao grupo dos compostos friedelânicos, apresentando um esqueleto de friedelina com um grupo hidroxila no carbono-29 (Shan *et al.*, 2013). Assim como os demais triterpenóides friedelânicos, o 29-HF pode ser encontrado em diversas estruturas vegetais, sendo que o presente trabalho contou com a obtenção do composto a partir do galho da *Maytenus gonoclada*.

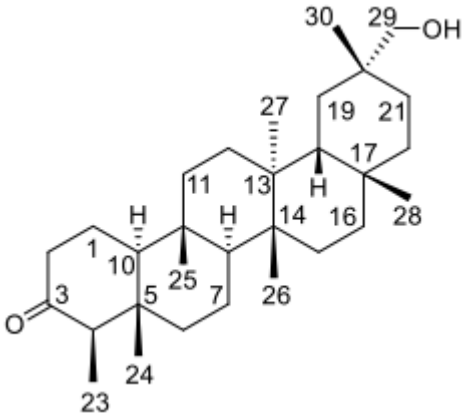


Figura 1: Molécula de 29-hidroxifriedelan-3-ona

Pesquisas recentes têm apresentado evidências consistentes para o potencial efeito anti-inflamatório dos compostos friedelânicos. Sousa e colaboradores (2017) demonstraram que a administração oral de 29-HF e de outros triterpenóides fiedelânicos foi capaz de reduzir o edema inflamatório induzido pela administração intraplantar de carragenina, com atividade antiedematogênica de até 71%, observada

4 horas após a injeção de carragenina, valor este, próximo à inibição de edema observado com indometacina, que alcançou redução de 79% do edema inflamatório (Sousa *et al.*, 2017). Avaliando os efeitos anti-inflamatórios do Friedelan-3β-ol, Waghole e colaboradores (2022) detectaram redução significativa de edema de pata induzido por carragenina, sendo compatível com dexametasona 5 horas após o tratamento (Waghole *et al.*, 2022).

Considerando o interesse crescente pelo potencial anti-inflamatório dos TPs, há fundamentos robustos que justificam ampliar essa pesquisa para incluir os compostos friedelânicos, sobre o qual ainda há poucos estudos que abordem os efeitos imunomodulatórios desse grupo de moléculas triterpênicas. No entanto, conforme foi discutido no parágrafo anterior, há resultados instigantes que implicam os compostos friedelânicos, dentre eles o 29-HF, como agente anti-inflamatórios potentes.

1.4. Aspectos do sistema imune inato e inflamação

A inflamação é um processo fisiológico muito importante para a defesa do hospedeiro e reparo tecidual após a instalação de lesões (Bennett *et al.*, 2018 e Chen *et al.*, 2017). No entanto, o descompasso entre defesa e danos provocados pela amplificação da resposta inflamatória é um aspecto agravante ou causador para inúmeros processos patológicos (Soliman e Barreda, 2023). De maneira geral, a inflamação é caracterizada como uma série de respostas que ocorrem nos tecidos frente a diferentes estímulos, tais como agentes infecciosos, físicos, mecânicos e químicos que perturbam a homeostase tecidual (Meizlish *et al.*, 2021). Assim, a ativação do sistema imune tipicamente é considerada como o gatilho inicial do processo inflamatório.

O primeiro “braço” do sistema imune envolvido com o reconhecimento e neutralização de agentes estranhos é o sistema imune inato, que é composto por várias camadas de defesa, como estruturas teciduais, proteínas de membrana e solúveis, além dos leucócitos em si (Korkmaz e Traber, 2023). Esses componentes do sistema imune inato contribuem para deflagrar uma resposta imune nos tecidos. O sistema imune inato é um dos mais conservados da escala evolutiva, pois vários

componentes moleculares podem ser encontrados em diversos seres vivos, inclusive invertebrados e plantas, sugerindo um papel fundamental do sistema imune inato para os mecanismos de defesa contra patógenos desde os primórdios da vida na Terra (Buchmann, 2014 e Flajnik e Kasahara, 2010).

Dentre os atores moleculares do sistema imune inato, vale destacar o papel dos receptores de reconhecimento de padrões, capazes de detectar substâncias tipicamente presentes em processos infecciosos e/ou em tecidos danificados. Os receptores do tipo *Toll* são uma classe de receptores de reconhecimento de padrões amplamente estudada e têm uma importância particular na resposta imunológica contra bactérias. Os TLRs são capazes de reconhecer componentes estruturais altamente conservados nos microrganismos, denominados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) (Korkmaz e Traber, 2023). Um exemplo notável de PAMP, considerando as bactérias Gram-negativas, são os lipopolissacarídeos (LPS), longas cadeias de açucares ancoradas à membrana externa destas bactérias através do lipídeo A (Bertani e Ruiz, 2018).

Uma vez presente no tecido de um hospedeiro, o LPS pode ser reconhecido por vários membros da família dos TLRs, embora o TLR4 seja um dos mais estudados e bem-caracterizados nesse contexto (Bertani e Ruiz, 2018). A interação do LPS com os TLRs resulta na ativação de cascatas de sinalização intracelulares em leucócitos residentes, como macrófagos, mastócitos e células dendríticas. As vias de sinalização ativadas por TLRs mais bem elucidadas são as vias do NF-κB, proteína ativadora-1 (AP-1) e as vias dos fatores ativadores de interferons (Chen *et al.*, 2017). Os fatores de transcrição dessas vias promovem a expressão gênica de várias citocinas pró-inflamatórias (Chen *et al.*, 2017 e Paludan *et al.*, 2021). Portanto, essas vias promovem a amplificação da resposta imunológica inata, até que se estabeleça um repertório de respostas teciduais capaz de sustentar e caracterizar a inflamação aguda no tecido acometido.

A deflagração de qualquer processo inflamatório agudo depende, inicialmente, da ativação de proteínas solúveis do sistema complemento e/ou de receptores de membrana em leucócitos e outros tipos celulares (Paludan *et al.*, 2021). Essas proteínas iniciam a produção de diversos elementos do sistema imune inato responsáveis pela amplificação da sinalização pró-inflamatória, e quando ativadas,

promovem recrutamento de neutrófilos da microcirculação adjacente para o tecido inflamado, além de outras ações pró-inflamatórias. Estes elementos sinalizadores podem ser citocinas, eicosanoides, enzimas, espécies reativas de oxigênio (EROs), aminas vasoativas e produtos da ativação do sistema complemento (Abdulkhaleq *et al.*, 2018 e Chen *et al.*, 2017). O montante dos vários efeitos locais e sistêmicos dessas moléculas sinalizadoras é uma modalidade de resposta tecidual que pode ser definida como inflamação.

As citocinas são mediadores inflamatórios bem caracterizados, capazes de desempenhar inúmeras funções moduladoras da resposta inflamatória. Apesar da diversidade estrutural e da grande complexidade quanto aos efeitos teciduais das citocinas, de grosso modo, elas podem ser classificadas como pró ou anti-inflamatórias, funcionalmente (Bennett *et al.*, 2018 e Kumar, 2020). As citocinas pró-inflamatórias orquestrarem respostas que amplificam ou sustentam o processo inflamatório e, por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias atuam de modo a favorecer mecanismos que suprimem a sinalização pró-inflamatória. O estudo do repertório de citocinas liberadas por leucócitos e outros tipos celulares é uma ferramenta importante que fornece informação sobre diversos aspectos da inflamação.

Uma vez consolidada, a sinalização inflamatória iniciada no tecido por leucócitos residentes ativados, desencadeia mecanismos de amplificação da resposta imune, resultando em alterações teciduais importantes, sobretudo com respeito às características microcirculatórias locais, que sustentam o processo inflamatório insipiente. O conjunto de respostas desencadeadas nas células endoteliais microvasculares compõem um processo denominado ativação endotelial, que é uma das primeiras alterações observadas a nível tecidual durante o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda (Pober e Sessa, 2007 e Xiao, Liu e Wang, 2014). A ativação endotelial se configura como uma extensa reconfiguração fenotípica das células endoteliais da microcirculação adjacente ao foco inflamatório, provocando mudanças funcionais importantes (Pober e Sessa, 2007 e Wautier e Wautier, 2021).

As alterações mais notáveis no fenótipo das células endoteliais ocorre nas proteínas de membrana presentes nessas células. Alguns dos mediadores pró-inflamatórios têm o efeito de induzir cascatas de sinalização que provocam um rápido aumento da concentração de cálcio intracelular nas células endoteliais (Dalal, Muller

e Sullivan, 2020 e Pober e Sessa, 2007). Esse cálcio intracelular, por sua vez, participa de muitas vias de sinalização pertinentes à resposta inflamatória.

Uma dessas vias inclui a internalização dos complexos de junções celulares que unem as células endoteliais (Pober e Sessa, 2007 e Reglero-Real *et al.*, 2016). Essa alteração tem como consequência um aumento notável da permeabilidade vascular, o que possibilita o extravasamento de exsudato, contribuindo para a instalação do edema tecidual (Pober e Sessa, 2007 e Reglero-Real *et al.*, 2016). Além disso, o acúmulo de edema pode ser acentuado por outros mediadores, como a prostaciclina, ou prostaglandina I_2 (PGI_2), que atua como um potente vasodilatador, aumentando o volume de sangue na microcirculação (Pober e Sessa, 2007).

Além da adesividade reduzida entre as células endoteliais, a ativação endotelial também se caracteriza pela expressão de proteínas de adesão na membrana celular (Wautier e Wautier, 2021), que interagem com receptores presentes na superfícies dos leucócitos circulantes, sobretudo neutrófilos, formando um “tapete” quimiotático que direciona os neutrófilos para o sítio inflamatório. Resumidamente, essas proteínas surgem, inicialmente, graças ao efeito de mediadores pró-inflamatórios que elevam a concentração intracelular de cálcio nas células endoteliais. O aumento de cálcio intracelular estimula a exocitose de corpos de Weibel-Palade, grânulos contendo P-selectinas, que chegam ao espaço luminal da membrana celular (Pober e Sessa, 2007 e Wautier e Wautier, 2021). Os neutrófilos aderidos à superfície luminal vascular então podem iniciar o processo de diapedese, adentrando o tecido onde ocorre o foco inflamatório. Apesar dos neutrófilos serem os primeiros leucócitos recrutados ao tecido na inflamação aguda, logo mais monócitos também se integram à população de leucócitos infiltrados (Chen *et al.*, 2017 e Pober e Sessa, 2007).

A adesividade celular se amplia através de alterações dependentes da expressão gênica de quimiocinas, um grande grupo de citocinas quimiotáticas, responsáveis por atuar na adesão leucocitária à superfície luminal da microcirculação (Muller, 2011; Pober e Sessa, 2007). Exemplos dessas quimiocinas inclui a CXCL8 (do inglês, *CXC-chemokine ligand 8*), também conhecida como IL-8. Ao longo do tempo, a contínua liberação de mediadores pró-inflamatórios promove a expressão de outras quimiocinas, como CCL2 (do inglês, *chemokine (C-C motif) ligand 2*), bem como moléculas as de adesão VCAM1 (do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*) e ICAM1 (do inglês, *intracelular adhesion molecule 1*) (Pober e Sessa, 2007).

Além das quimiocinas, os leucócitos circulantes são atraídos para o tecido inflamado graças à quimiotaxia gerada por um gradiente de substâncias quimioatraentes primárias, como peptídeos N-formil (Afonso *et al.*, 2012). Uma vez infiltrados, neutrófilos liberam quimioatraentes secundários e mais potentes, sendo um dos mais importantes o leucotrieno B_4 (LTB_4), um subproduto derivado do ácido araquidônico (Afonso *et al.*, 2012). O LTB_4 então atua como um poderoso quimioatraente secundário ao se ligar a receptores de leucotrienos B_4 (BLT)-1 e 2 nos neutrófilos circulantes, induzindo um estado de alta motilidade em direção ao aumento do gradiente de LTB_4 (Afonso *et al.*, 2012). Portanto, o resultado da expressão de quimiocinas e da liberação de mediadores quimioatraentes é uma infiltração leucocitária mais intensa ao tecido inflamado.

Os neutrófilos infiltrados se engajam na tarefa de ampliar a ofensiva do sistema imune inato contra agentes infecciosos e da remoção de *debris* celulares (Arora e Singh, 2023 e Pober e Sessa, 2007). A liberação de mieloperoxidase (MPO) é uma estratégia notável de neutrófilos para neutralizar muitos tipos de agentes patogênicos e serve como um marcador muito útil para o estudo da inflamação aguda induzida por LPS, por estar fortemente associada à ativação neutrofílica e estresse oxidativo (Frangie e Daher, 2022 e Filep, 2022). No entanto, apesar da clara importância dos neutrófilos na resposta imune contra patógenos, uma infiltração neutrofílica muito intensa pode ocasionar a liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, agravando o grau a extensão de dano colateral ao tecido do hospedeiro (Arora e Singh, 2023; Chen *et al.*, 2017 e Korkmaz e Traber, 2023). Portanto, estratégias capazes de mitigar a transmigração neutrofílica podem servir para reduzir os efeitos inflamatórios danosos à arquitetura e função tecidual.

1.5. Aspectos do manejo clínico da inflamação e a busca por novos agentes anti-inflamatórios

O manejo clínico da inflamação é uma estratégia de extrema importância em muitos casos, sobretudo ao se tratar de condições inflamatórias com alto grau de comprometimento à integridade funcional e estrutural de órgãos e tecidos inflamados. Embora seja crucial o uso de terapia anti-inflamatória em muitos casos, é preocupante

que, atualmente, existem apenas duas classes terapêuticas indicadas para o tratamento dos sinais e sintomas da inflamação: os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e os glicocorticoides (GCCs). Além da restrição de classes terapêuticas disponíveis para o tratamento de doenças de teor inflamatório, existem outros fatores que limitam consideravelmente o manejo adequado da inflamação, principalmente os efeitos adversos decorrentes do uso prolongado de AINEs e GCCs.

O uso estendido de GCCs eleva o risco de efeitos adversos sistêmicos, como a hipertensão, dislipidemia, alterações ósseas e hiperglicemia, que são especialmente preocupantes em pacientes debilitados e/ou com outros problemas de saúde (Timmermans, Souffriau e Libert, 2019). Além disso, embora os GCCs desempenhem um papel importante no tratamento de doenças inflamatórias, é importante destacar que os efeitos farmacológicos dessa classe de medicamentos nos pulmões não se limitam apenas à ação anti-inflamatória. Em muitos casos, o uso de GCCs no tratamento da inflamação pulmonar aguda requer uma abordagem cautelosa por parte da equipe clínica, sendo necessário monitorar minuciosamente a relação entre riscos e benefícios associados ao uso desses medicamentos. Isso se deve, em particular, por vezes contraditórios que os GCCs podem exercer sobre a atividade dos neutrófilos, bem como a imunossupressão, conforme será abordado adiante.

Um dos principais mecanismos pelos quais os GCCs exercem efeito anti-inflamatório é a inibição de fatores de transcrição que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Timmermans, Souffriau e Libert, 2019). No entanto, é importante destacar que esse efeito pode ser contrabalançado pela inibição concomitante de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de citocinas anti-inflamatórias e pró-resolutivas (Brattsand e Linden, 1996). Além disso, um efeito potencialmente problemático é a resistência à apoptose induzida por corticoides, tanto naturais quanto sintéticos, o que prolonga a sobrevivência dos neutrófilos e, consequentemente, retarda a ativação de mecanismos pró-resolutivos (Ronchetti *et al.*, 2018 e Saffar, Ashdown e Gounni, 2011). Por último, é crucial ressaltar um efeito adverso particularmente preocupante para pacientes com doenças pulmonares fazendo uso de GCCs. Este efeito está relacionado ao aumento da reatividade dos neutrófilos aos leucotrienos, resultante do aumento da expressão de receptores de superfície para leucotrienos induzidos pelos GCCs em neutrófilos (Obinata *et al.*, 2003). A resistência à apoptose e a maior reatividade aos leucotrienos têm o potencial

de prolongar a liberação de quimioatraentes secundários pelos neutrófilos infiltrados. Isso, por sua vez, pode intensificar ainda mais a infiltração, que quando combinada com a broncoconstrição associada aos leucotrienos, adiciona uma carga extra ao sistema respiratório.

Além de potencialmente influenciar a atividade dos neutrófilos, é crucial realizar um acompanhamento cuidadoso ao utilizar GCCs em casos de infecções pulmonares. Isso se deve à capacidade de doses elevadas e/ou uso prolongado desses fármacos de induzirem imunossupressão, interferindo na sinalização imunológica que é essencial para orquestrar uma resposta imune efetiva, capaz de neutralizar o agente infeccioso e promover um reparo tecidual adequado. (Yang *et al.*, 2019).

A inibição das enzimas COX pelos AINEs também apresenta uma extensa lista de efeitos adversos, destacando-se os distúrbios gástricos e renais, sendo que este último também está atrelado a complicações cardiovasculares e ao edema periférico (Frishman, 2002). Ademais, é importante destacar que a inibição das enzimas COX resulta no acúmulo do substrato dessas enzimas, o ácido araquidônico. Esse acúmulo tem uma implicação considerável, uma vez que se amplifica a produção de leucotrienos através da via das lipoxigenases, que também utiliza o ácido araquidônico como substrato (Gray *et al.*, 2002).

Os leucotrienos são substâncias pró-inflamatórias que desempenham um papel crucial na regulação da resposta imune e estão envolvidos em várias doenças inflamatórias. Essa consequência acarreta dois efeitos de grande relevância: em primeiro lugar, ocorre um aumento da broncoconstrição por acúmulo das cisteinil-leucotrienas LTC_4, LTD_4 e LTE_4, o que pode ser especialmente prejudicial para pacientes asmáticos (Gray *et al.*, 2002 e Woo, Luu e Park, 2020). Em segundo lugar, observa-se uma intensificação do recrutamento de leucócitos circulantes em algumas situações devido ao efeito quimiotático do LTB_4 (Yokomizo e Shimizu, 2023).

Os produtos naturais, como os compostos friedelânico, são aliados valiosos na busca por novos agentes farmacológicos com potencial anti-inflamatório que podem atuar através de vias alternativas àquelas dos GCCs e AINEs, potencialmente mitigando os efeitos adversos e ampliando o arsenal terapêutico disponível à prática clínica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos do triterpenóide pentacíclico 29-hidroxifriedelan-3-ona (29-HF), isolado do galho da *Maytenus gonoclada* Mart., na resposta imune inata e na hiperalgesia mecânica induzidas experimentalmente por LPS, em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do pré-tratamento de 29-HF sobre o acúmulo de leucócitos e de citocinas recuperados no lavado broncoalveolar após instilação intranasal de LPS frente ao pré-tratamento com 29-HF, em camundongos C57BL/6;

- Avaliar o efeito do pré-tratamento de 29-HF sobre a atividade da mieloperoxidase em lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6, em resposta à instilação intranasal de LPS;

- Investigar o potencial anti-nociceptivo do pré-tratamento com 29-HF sobre a hiperalgesia mecânica induzida experimentalmente pela injeção intraplantar de LPS em patas de camundongos *Swiss*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Nos experimentos comportamentais para avaliar os efeitos analgésicos do 29-HF, foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss* com 8 a 12 semanas de idade, pesando entre 35 a 40 g. Nos experimentos para determinar os efeitos anti-inflamatórios do 29-HF, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 com 8 a 12 semanas de idade, pesando entre 20 a 25 g. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas-2 (BICBIO-2). Os animais foram alocados em condições controladas de temperatura de 22,1 ± 1,5 °C e ciclo claro/escuro (12/12h), com humidade relativa de 65% e livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Ao longo dos experimentos, os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno contendo até 5 animais por caixa. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número de protocolo 33/2023.

3.2. Drogas e reagentes

29-hidroxifriedelan-3-ona (29-HF): composto do grupo dos triterpenóides pentacíclicos, gentilmente fornecido pela Professora Drª. Lucienir Pains Duarte do Núcleo de Estudos de Plantas Medicinais (NEPLAM) (Departamento de Química/UFMG). O composto foi suspendido em veículo de DMSO 2,5% para injeção intraplantar (doses usadas 5, 10 e 20 mg/Kg) ou intranasal (doses usadas: 0,3; 3 e 30 mg/Kg).

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Labsynth®/Brasil): solvente orgânico usado na concentração de 2,5% para suspender o 29-HF e possibilitar a injeção do composto.

Solução salina tamponada (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*) (pH = 7,4): usada para diluir amostras biológicas e como veículo para LPS, dexametasona e no preparo de anestésico. Preparada com fosfato de sódio bibásico (Dinâmica/Brasil) 8,1 mM, fosfato de potássio monobásico (Labsynth®/Brasil) 1,84 mM, clorato de sódio (Labsynth®/Brasil), 0,14 mM e cloreto de potássio (Labsynth®/Brasil) 2,68 mM em água destilada.

Lipopolissacarídeo de *E. coli* O111:B4 (LPS) (Sigma Aldrich/Brasil): agente imunogênico e hiperalgésico diluído em solução salina tamponada de fosfato (PBS) nas concentrações de 10, 100 e 1000 ng/20 µL, para administração pela via intranasal, ou em DMSO 2,5% em PBS nas concentrações de 2, 20 e 200 ng/20 µL, para administração pela via intraplantar.

Dexametasona (Decadron® Injetável, Aché/Brasil): formulação injetável de fosfato dissódico de dexametasona na concentração de 4 mg/mL, diluído para a dose de 0,5 mg/kg em PBS para administração intraperitoneal.

Xilazina (Anasedan®, Ceva Santé Animale/França): solução injetável de xilazina 2%, diluída para a dose de 2 mg/kg ou 10 mg/kg com PBS e administrada pela via intraperitoneal ou subcutânea, conforme protocolo experimental.

Cetamina (Cetamin®, Syntec/Brasil): solução injetável de cetamina 10%, diluída para 100 mg/kg e administrada pela via intraperitoneal ou subcutânea, conforme protocolo experimental.

Albumina de soro bovino (Calbiochem®/Alemanha): proteína sérica isolada de bovinos. Foi dissolvida em PBS usado na coleta do lavado broncoalveolar com a finalidade de temporariamente nutrir os leucócitos e também para o preparo da curva padrão para o ensaio de Bradford.

Heparina (**Parinex®**, Hipolabor/Brasil): glicosaminoglicano com atividade anticoagulante. Foi diluída em PBS usado na coleta do lavado broncoalveolar com a finalidade de impedir a formação de aglomerados celulares que poderiam afetar a qualidade da contagem de leucócitos.

Solução de contagem de leucócitos: preparada com 0,002% violeta Genciana (Labsynth®/Brasil) e 30% ácido acético glacial (Labsynth®/Brasil) em água destilada.

Tampão de fosfato de sódio: solução tampão usada para realizar a medida da atividade da mieloperoxidase. Foi preparada com fosfato de sódio monobásico (Êxodo Científica/Brasil) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Êxodo Científica/Brasil) em água destilada.

Tampão de hexadeciltrimetilamonio (**HTAB**): solução tampão usada para realizar a medida da atividade da mieloperoxidase. Foi preparada dissolvendo-se o HTAB (Sigma Aldrich/Brasil) em tampão de fosfato de sódio.

3',3'5,5'-tetrametilbenzidina (**TMB**, Scienco/Brasil): substrato cromogênico usado como indicador para a atividade da mieloperoxidase.

Acetato de sódio: foi usada em solução a 1,64 M para interromper a reação colorimétrica no ensaio da atividade da mieloperoxidase.

Reagente de Bradford (ACS Científica/Brasil): solução usada para a dosagem de proteínas totais em amostras biológicas.

3.3. Vias de administração

3.3.1. Via intraperitoneal

As injeções intraperitoneais (*i.p*) foram realizadas no quadrante inferior esquerdo do abdómen dos animais num volume de 10 mL/kg, atingindo o espaço existente entre os órgãos.

3.3.2. Via intranasal

A instilação intranasal (*i.n*) consiste no gotejamento lento de 20 µL de volume diretamente sobre as narinas do animal sob afeito de anestesia geral, favorecendo, assim, a aspiração do líquido.

3.3.3. Via intraplantar

As injeções intraplantares (*i.pl*) foram realizadas na superfície inferior das patas traseiras. Foi padronizado um volume de 20 µL por pata.

3.3.4. Via subcutânea

As injeções subcutâneas (*s.c*) consistem na administração de até 100 µL de volume na pele da região dorsal do pescoço do animal.

3.4. Avaliação do efeito anti-inflamatório do 29-HF em pulmões de camundongos C57BL/6

3.4.1. Indução de inflamação pulmonar aguda por instilação intranasal de LPS

O modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS foi utilizado em camundongos C57BL/6 machos, que receberam instilação intranasal de LPS suspendido em PBS autoclavado. Para tal, foi construída uma curva concentração-resposta para determinar a concentração de LPS para induzir uma resposta inflamatória de intensidade razoável. Com base em trabalho prévio publicado por nosso grupo, utilizamos 10, 100 e 1000 ng de LPS em 20 µL de PBS autoclavado (De

Almeida *et al.*, 2020). Assim, os animais foram submetidos à anestesia com cetamina e xilazina, nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. A anestesia foi administrada para permitir a instilação de LPS ou PBS, que foram cuidadosamente aplicados nas narinas dos animais por gotejamento (20 µL), possibilitando a aspiração dos líquidos. Em seguida, os camundongos foram posicionados em decúbito para se recuperarem do efeito do anestésico. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados para a coleta de amostras de tecido ou obtenção do lavado broncoalveolar (LBA).

No dia da coleta, os animais foram eutanasiados e posicionados em decúbito dorsal. Em seguida, foi feita uma incisão no pescoço do animal e a traqueia foi exposta após a excisão da tireoide e do esôfago. Um pequeno corte foi feito na porção superior da traqueia e um catéter intravenoso 18 g foi então cuidadosamente introduzido através do corte, inserido aproximadamente até a bifurcação na porção distal da traqueia. Com o catéter posicionado, os pulmões foram lavados com PBS gelado e o volume coletado de LBA foi transferido para microtubos.

O LBA foi centrifugado a 4 °C com rotação de 1000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante do LBA foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20 °C enquanto o *pellet* celular foi resuspendido em PBS suplementado com albumina de soro bovino (0,01% p/v) e heparina (5 U.I./mL). As células resuspendidas foram usadas para realizar a contagem total e diferencial de leucócitos.

A contagem total foi realizada imediatamente após a resuspenção das células. Uma alíquota das células resuspendidas foi diluída em solução para contagem de leucócitos (0,002% de violeta Genciana e 30% de ácido acético glacial em água destilada) na proporção de 1:10. Usando-se uma câmara de Neubauer e miscroscópio óptico no aumento de 40x, as células localizadas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer foram contadas e esse valor foi usado para calcular o número de leucócitos por amostra (10^6 células/mL) através da seguinte fórmula:

$$\frac{N * F}{4 * 10^{-4}}$$

Onde N corresponde ao número de células contadas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e F corresponde ao fato de diluição na solução para contagem de leucócitos. $4*10^{-4}$ corresponde ao volume de líquido que preenche a superfície dos

quatro quadrantes da câmara de Neubauer. Após determinar o número total de células (10^6/mL), foi calculado o volume necessário de LBA para se obter $1*10^4$ leucócitos por amostra. Esse volume de LBA foi transferido para uma citocentrífuga programada para girar a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, depositando as células em uma monocamada sobre lâminas para microscópio.

Após secar naturalmente por 24h, as lâminas foram fixadas e coradas usando kit Panótico Rápido (Laborclin, Brasil). Por fim, as lâminas coradas foram usadas para realizar a contagem diferencial de leucócitos em microscópio óptico no aumento de 100x. Para a contagem diferencial, ao todo 100 células foram contabilizadas, sendo elas quantificadas diferencialmente como macrófagos/monócitos ou neutrófilos, podendo ser distinguidas graças à morfologia celular aparente após a coloração com o kit panótico. A contagem diferencial forneceu a fração de macrófagos/monócitos e neutrófilos por 100 leucócitos e foi expressa em 10^5 células/mL.

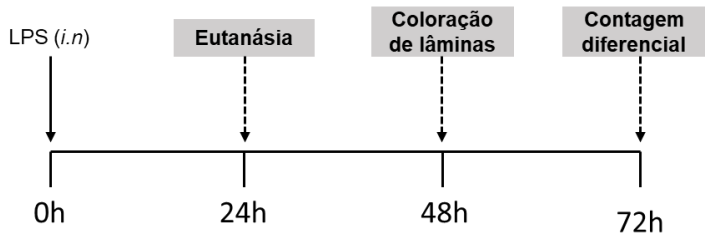


Figura 2: Delineamento da curva concentração-resposta de LPS para a indução de inflamação pulmonar aguda.

3.4.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do 29-HF em pulmão

Para determinar a dose mais adequada de 29-HF que seria capaz de gerar uma redução do recrutamento de leucócitos para os pulmões de camundongos, bem como reduzir a inflamação pulmonar em resposta à instilação intranasal de LPS, foi construída uma curva dose-resposta com três doses de 29-HF (0,3; 3 ou 30 mg/kg). As três doses de 29-HF, dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo de DMSO 2,5% foram injetados pela via subcutânea em volume de 100 µL 1 h antes da instilação intranasal do LPS (100 ng/20 µL) ou PBS (20 µL) e, 24 h após, os animais foram eutanasiados para a obtenção das amostras de LBA. O LBA foi então processado para realizar a

contagem total e diferencial dos leucócitos em microscópio óptico, expressas em 10^5 células/mL. A descrição para a coleta e processamento das amostras se encontra no item 3.4.1.

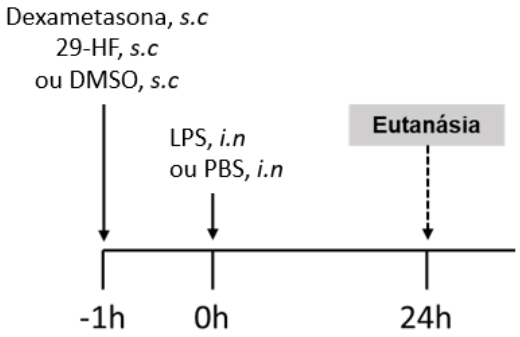


Figura 3: Delineamento da curva concentração-resposta do efeito anti-inflamatório do 29-HF em pulmão.

3.4.3. Dosagem de citocinas em amostras de lavado broncoalveolar

A dosagem de TNF-α, IL-6 e IL-1β em amostras de LBA foi medida através de ensaio imunoenzimático (ELISA), em duplicata, conforme recomendações do fabricante (BioLegend/EUA). Para tal, os animais foram pré-tratados com injeções subcutâneas de 29-HF (0,3 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou DMSO 2,5% e, após 1 hora, desafiados com instilação intranasal de LPS (100 ng/20 µL) ou PBS (20 µL). As amostras foram coletadas 2, 24 e 48 h após a instilação e mantidas a -20 °C até o dia do ensaio imunoenzimático. A concentração das citocinas, expressa em pg/mL, foi determinada em espectrofotômetro (ThermoFisher Scientific/Finlândia), em duplicata, através da leitura da densidade óptica de cada poço no comprimento de onda de 450 nm. O valor referente à média de cada duplicata por citocina nos tempos de 2, 24 e 48 h foram usados para as análises estatísticas subsequentes.

3.4.4. Atividade da mieloperoxidase em amostras de lavado broncoalveolar

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi mensurada em amostras de lavado broncoalveolar de camundongos C57BL/6 machos. Os animais receberam pré-

tratamento de 29-HF (0,3 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou DMSO 2,5% pela via subcutânea 1 h antes de ser realizada a instilação de 20 µL de suspensão de LPS ou PBS. 24 h após, os animais foram eutanasiados para a coleta do lavado broncoalveolar. As amostras foram centrifugadas com hexadeciltrimetilamonio bromídico (HTAB) 0,5% a 11.000 G por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e incubado com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 2 mg/mL por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, essa mistura foi incubada com peróxido de hidrogênio1 mM por 10 minutos a 37 °C, seguido pela adição de acetato de sódio 0,5 M, pH 5,0. Por fim, o produto da reação foi determinado em espectrofotômetro a 630 nm (Suzuki *et al.*, 1983). Os resultados foram expressos em densidade óptica normalizada por proteínas totais, em µg/µL, presentes em cada amostra. A dosagem de proteínas totais de amostras de lavado broncoalveolar foi realizada através do ensaio de Bradford usando uma curva padrão de albumina bovina (Bradford, 1976). A determinação da atividade da MPO e a dosagem de proteínas totais foram realizadas em duplicata ou triplicata, conforme apropriado. A média de cada duplicata ou triplicata foi usada para as análises estatísticas subsequentes.

3.5. Avaliação do efeito analgésico em pata

3.5.1. Indução da hiperalgesia inflamatória por LPS intraplantar

Para indução do modelo de hiperalgesia inflamatória, foi utilizado LPS suspendido em PBS autoclavado (pH = 7,4). O preparo da solução contendo LPS foi feita sob condições assépticas dentro de capela de fluxo laminar e as alíquotas armazenadas a -20 °C. No dia do experimento, as alíquotas foram descongeladas e homogeneizadas para ser feita a injeção *i.pl*, usando 20 µL de suspensão de LPS por pata. Para determinar a concentração de LPS a ser usada nos experimentos subsequentes, os animais foram injetados por via *i.pl* com 3 concentrações diferentes de LPS (200, 20 ou 2 ng/20 µL). Os animais do grupo controle receberam injeção *i.pl* de PBS autoclavado (20 µL). Para avaliar a resposta dos animais frente à hiperalgesia mecânica induzida pelo LPS, foi utilizado um analgesímetro para mensurar a latência do comportamento de retirada de pata segundo o método de Randall-Selitto

modificado por Ferreira e colaboradores (Ferreira, Nakamura e Abreu, 1978). Com exceção da medida basal, realizada antes da injeção do LPS, as demais avaliações foram realizadas em intervalos regulares de 1 a 7 h após administração do LPS, com intervalo de 1 h entre cada avaliação. Cada animal foi submetido a três avaliações por hora, havendo um período de 3 a 5 minutos entre cada avaliação.

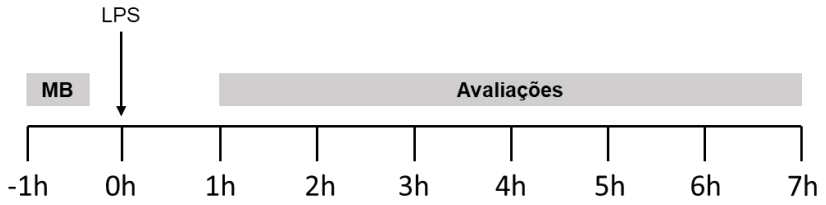


Figura 4: Delineamento da curva dose-resposta para modelo de hiperalgesia inflamatória.
Note: MB = medida basal.

3.5.2. Determinação da duração do efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF

Para avaliar o comportamento temporal do efeito analgésico do 29-HF, camundongos *Swiss* machos foram desafiados com LPS *i.pl* (200 ng/20µL) ou PBS autoclavado (20 µL) e, 4 h depois, os animais receberam injeção de veículo (DMSO 2,5%) ou 29-HF (20 mg/kg) por via *i.p*. A latência do comportamento de retirada de pata de cada camundongo foi determinada através de leituras no analgesímetro segundo o método de Randall-Selitto modificado por Ferreira e colaboradores (Ferreira, Nakamura e Abreu, 1978). Exceto pela medição basal, realizada antes da injeção de LPS, a latência do comportamento de retirada da pata foi avaliada nos seguintes tempos: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 minutos após a administração do 29-HF. Cada animal passou por três avaliações por tempo, com um intervalo de 3 a 5 minutos entre cada avaliação.

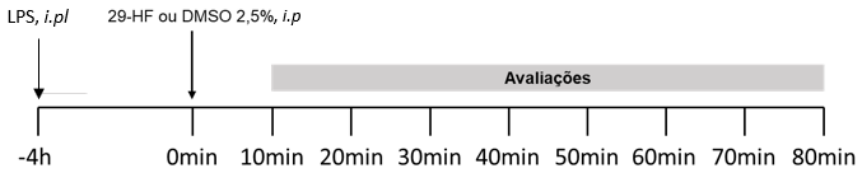


Figura 5: Delineamento da curva tempo-resposta para modelo de hiperalgesia inflamatória.
Note: MB = medida basal.

3.5.3. Teste de desempenho no Rotarod

Para discernir se a latência para o animal retirar a pata se deve a um efeito analgésico ou a uma possível alteração neuromotora induzida pelo 29-HF (*i.p*), utiliza-se o teste de performance em *Rotarod*, segundo Soares e colaboradores, com modificações (Soares *et al.*, 2022), onde os animais são colocados para escalar sob uma barra horizontal cilíndrica controlada por um motor que gira a plataforma numa velocidade constante. A barra cilíndrica apresenta 5,5 cm de largura e 2,5 cm de diâmetro, estando elevada em 16 cm de altura com relação à plataforma do aparelho O teste teve duração mínima de 15 segundos e máxima de 120 segundos. Para a execução do teste, camundongos *Swiss* machos receberam injeção intraperitoneal (100 µL) de xilazina (2 mg/kg) em PBS (Soares *et al.*, 2022), 29-HF (20 mg/kg) ou DMSO 2,5%, e 30 minutos depois, foram submetidos a três avaliações subsequentes no *Rotarod*, onde foi cronometrado o tempo médio para cada animal cair da barra rotativa.

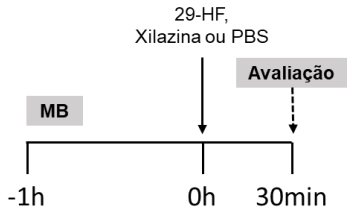


Figura 6: Delineamento do teste de desempenho no Rotarod.
Note: MB = medida basal.

3.5.4. Avaliação do efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF

Foi realizado uma avaliação do efeito anti-nociceptivo do 29-HF frente ao modelo de hiperalgesia mecânica induzida por injeção *i.pl* de LPS. Em um trabalho prévio, Sousa e colaboradores demonstraram efeito antiedematoso após gavagem com 29-HF na dose de 20 mg/Kg (Sousa *et al.*, 2017). Com essa referência, o efeito anti-nociceptivo do 29-HF no modelo de hiperalgesia mecânica associada à inflamação, foi avaliado com uma dose de 20 mg/kg do composto, administrado pela

via *i.p*, para assegurar maior biodisponibilidade comparado à administração oral usada no estudo de referência. Para determinar o efeito analgésico sistêmico do 29-HF frente ao modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por injeção *i.pl* de LPS, camundongos *Swiss* machos foram tratados por via intraperitoneal, com três doses de 29-HF (5, 10 ou 20 mg/kg) ou DMSO 2,5%. 4 horas antes da administração do 29-HF, os animais receberam injeção intraplantar de LPS (200 ng/20 µL). A eficácia analgésica foi avaliada medindo-se a latência do comportamento de retirada da pata de cada camundongo usando um analgesímetro. A latência do comportamento de retirada da pata foi registrada 30 minutos após a injeção do 29-HF ou DMSO 2,5%, sendo a medida basal averiguada antes da injeção de LPS. Cada animal passou por três avaliações por tempo, com um intervalo de 3 a 5 minutos entre cada avaliação.

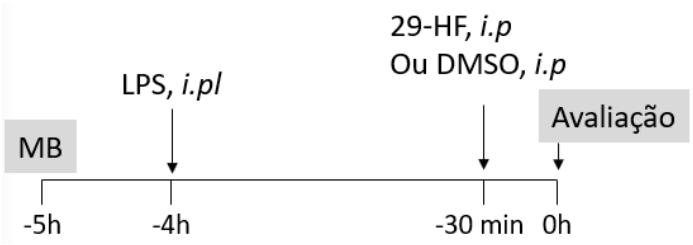


Figura 7: Delineamento para determinação do efeito analgésico sistêmico do 29-HF.

3.5.5. Avaliação do efeito anti-nociceptivo local do 29-HF

Para determinar o efeito anti-nociceptivo local do 29-HF, administrado por via intraplantar, camundongos *Swiss* machos foram tratados com três doses de 29-HF (8, 4 e 2 mg/kg) em 20 µL, ou DMSO 2,5% (20 µL). Para tal, camundongos *Swiss* machos foram desafiados com injeção *i.pl* de LPS e, 4 h depois, foram tratados com injeção *i.pl* de 29-HF ou DMSO 2,5%. As doses de 29-HF usadas em administração local foram obtidas com base em uma conversão a partir das doses sistêmicas através da seguinte fórmula:

$$D_{i.pl} = 0{,}01 * D_{i.p}, \text{ onde}$$

$D_{i.pl}$ = dose intraplantar

$D_{i.p}$ = dose intraperitoneal

A partir da fórmula de conversão, as doses avaliadas foram aproximadas para 8, 4 e 2 mg/kg. O 29-HF foi administrado após 4 horas da injeção intraplantar de LPS (200 ng/20 µL). Seguindo a medida basal, a latência do comportamento de retirada de pata foi determinada 30 minutos após a administração de 29-HF ou DMSO 2,5% através do teste de Randall-Selitto modificado por Ferreira e colaboradores (Ferreira, Nakamura e Abreu, 1978). Cada animal passou por três avaliações por hora, com um intervalo de 3 a 5 minutos entre cada avaliação.

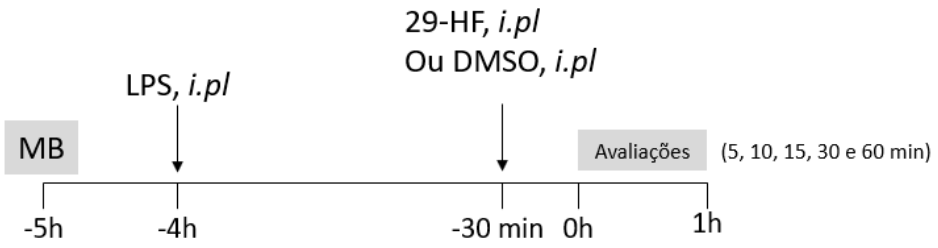


Figura 8: Delineamento para determinação do efeito analgésico local do 29-HF.

3.6. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M) e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de pós-hoc de Tukey ou Bonferroni, conforme apropriado. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *software* GraphPad Prism 8 (EUA). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do 29-HF no modelo experimental de inflamação pulmonar aguda induzida por instilação intranasal de LPS

4.1.1. A instilação intranasal de LPS provoca infiltração neutrofílica nos alvéolos

Conforme aparente na **Tabela 1**, não houve diferença estatística entre a quantidade de macrófagos/monócitos entre os grupos avaliados. Ademais, a concentração de 10 ng/20 µL de LPS não foi capaz de apresentar aumento significativo de leucócitos totais em amostras de LBA (**Tabela 1**). Porém, comparado ao grupo PBS, as concentrações de 100 e 1000 ng/20 µL de LPS apresentaram aumento de leucócitos presentes em amostras resuspendidas, não havendo diferença estatística entre os animais que receberam 100 e 1000 ng de LPS (**Tabela 1**). Similarmente, as concentrações de 100 e 1000 ng/20 µL de LPS foi capaz de provocar aumento do número de neutrófilos em amostras de LBA quando comparado ao grupo PBS, não havendo diferença significativa entre os grupos que receberam 100 e 1000 ng de LPS (**Tabela 1** e **Figura 9**). Desse modo, foi padronizado o uso de LPS 100 ng para os próximos experimentos de indução de inflamação pulmonar.

Tabela 1: Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos em LBA de animais que receberam instilação *i.n* de LPS ou PBS.

		LPS (ng), *i.n*		
Células	PBS, *i.n*	10	100	1000
Total	1,7 ± 0,3	4,3 ± 0,5	10,0 ± 1,6***	9,8 ± 1,5***
Neutrófilos	0,09 ± 0,03	2,9 ± 0,6	6,7 ± 1,6**	10,7 ± 2,5*
Macrófagos & monócitos	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,2	2,9 ± 0,4	2,2 ± 1,2

Os valores representam a média ± E.P.M x 10^5 células por mL de LBA. Análise estatística: *One-way* ANOVA seguindo por teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 quando comparado ao grupo PBS. n = 4 a 6 animais por grupo.

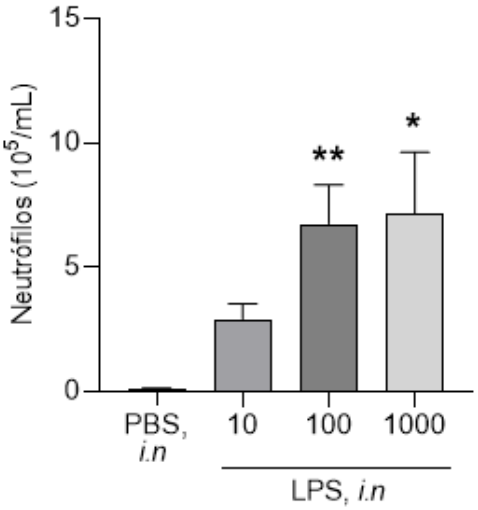


Figura 9: Contagem de neutrófilos em LBA de animais que receberam instilação *i.n* de LPS ou PBS.
Os dados representam a média ± E.P.M x 10^5 neutrófilos por mL de LBA. Análise estatística: *One-way* ANOVA seguindo por teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01 quando comparado ao grupo PBS. n = 4 a 6 animais por grupo.

4.1.2. A injeção subcutânea de 29-HF reduziu a infiltração neutrofílica nos alvéolos de animais desafiados com instilação intranasal de LPS

Frente ao modelo de inflamação pulmonar discutido no item anterior, foi realizado outro experimento para averiguar o potencial efeito do 29-HF contra o recrutamento de neutrófilos (ou infiltrado neutrofílico) aos alvéolos de animais desafiados com LPS *i.n*.

Como pode ser visto na **Tabela 2**, a instilação *i.n* de LPS provocou aumento expressivo do número total de leucócitos, assim como o número de neutrófilos, reproduzindo os resultados obtidos na curva concentração-resposta de LPS para a indução de inflamação pulmonar aguda (**Tabela 1**). Curiosamente, o número de macrófagos/monócitos também apresentou aumento significativo em todos os grupos do presente experimento. Ademais, as três doses de 29-HF avaliadas apresentaram redução significativa do número total de leucócitos, bem como na contagem diferencial de neutrófilos e macrófagos/monócitos, quando comparado ao grupo DMSO *s.c* + LPS *i.n* (**Tabela 2** e **Figura 10**).

Com relação à infiltração neutrofílica, nota-se que as três doses de 29-HF foram capazes de reduzir o infiltrado neutrofílico quando comparado ao grupo DMSO *s.c* +

LPS *i.n*, no entanto, não houve diferença estatística entre as doses de 29-HF avaliadas (**Figura 10**). Sendo assim, foi padronizado o uso da menor dose efetiva de 29-HF (0,3 mg/kg) para dar seguimento aos próximos experimentos avaliando o perfil anti-inflamatório do 29-HF frente à inflamação pulmonar aguda induzida por LPS *i.n*.

Tabela 2: Contagem total e diferencial de leucócitos obtidos de LBA de camundongos pré-tratados com 29-HF *s.c* e desafiados com LPS *i.n*.

	PBS, *i.n*	LPS (100 ng/20 µL), *i.n*				
				29-HF (mg/kg), *s.c*		
Células	DMSO, *s.c*	DMSO, *s.c*	Dex, *s.c*	0,3	3,0	30,0
Total	1,5 ± 0,14	24,7 ± 6,7****	3,1 ± 0,5####	9,4 ± 1,1##	9,0 ± 1,4##	6,8 ± 2,2###
Neutrófilos	0,05 ± 0,03	17,9 ± 4,0****	1,5 ± 0,3####	7,4 ± 1,1##	6,9 ± 1,4##	5,6 ± 2,1###
Macrófagos & monócitos	1,4 ± 0,1	5,8 ± 2,1**	1,5 ± 0,3##	1,5 ± 0,3##	1,7 ± 0,4#	1,0 ± 0,3##

Os valores representam a média ± E.P.M x 10^5 células por mL de LBA. Note: Dex = dexametasona (0,5 mg/kg). Análise estatística: *One-way* ANOVA seguindo por teste de Tukey. ****p < 0,0001 e **p < 0,01 quando comparado ao grupo DMSO *s.c* + PBS *i.n*; ####p < 0,0001, ###p < 0,001 e ##p < 0,01 quando comparado ao grupo DMSO *s.c* + LPS *i.n*. n = 5 a 7 animais por grupo.

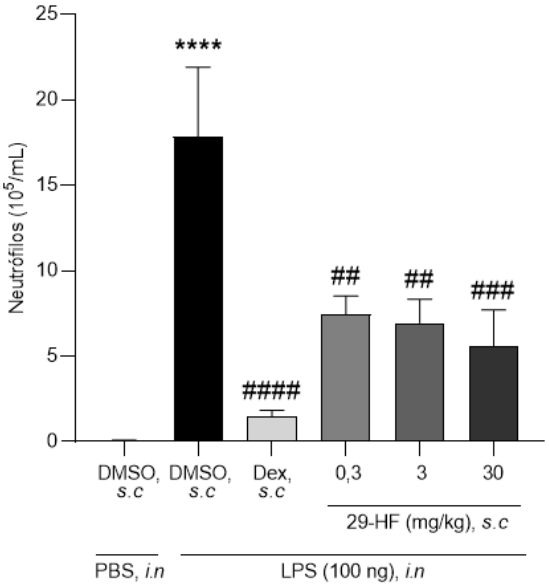


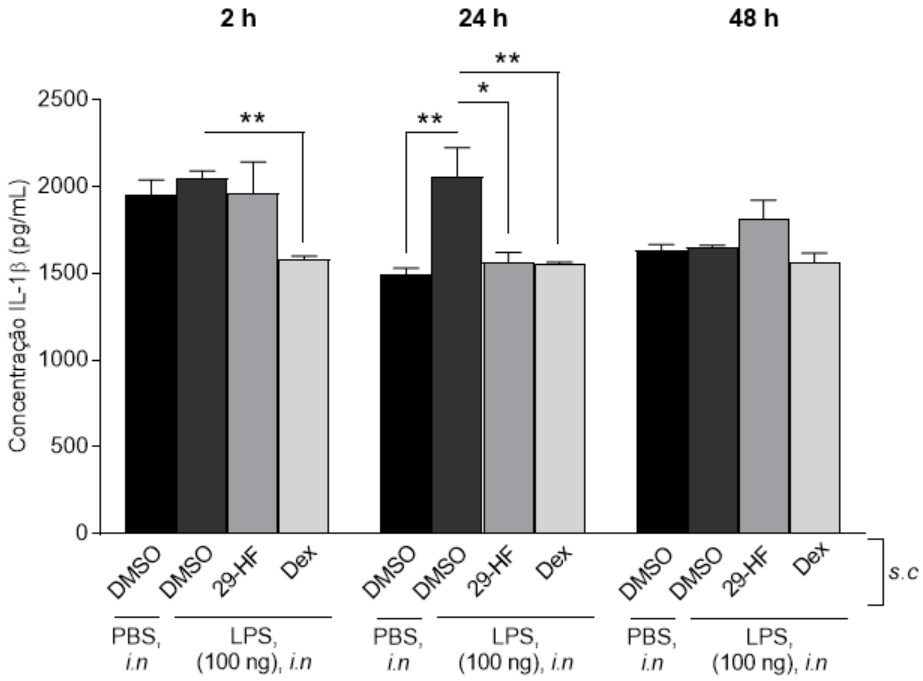
Figura 10: Contagem de neutrófilos em LBA de camundongos pré-tratados com 29-HF *s.c* e desafiados com LPS *i.n*.
Os dados representam a média ± E.P.M x 10^5 neutrófilos por mL de LBA. Note: Dex = dexametasona. Análise estatística: *One-way* ANOVA seguindo por teste de Tukey. ****p < 0,0001 quando comparado ao grupo DMSO *s.c* + PBS *i.n*; ####p < 0,0001, ###p < 0,001 e ##p < 0,01 quando comparado ao grupo DMSO *s.c* + LPS *i.n*. n = 5 a 7 animais por grupo.

4.1.3. A injeção subcutânea de 29-HF reduziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias nos alvéolos de camundongos desafiados com instilação intranasal de LPS

A quantificação de citocinas em amostras biológicas por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) é um método amplamente estabelecido para investigar o perfil da sinalização extracelular em modelos de inflamação. O pré-tratamento dos camundongos com 29-HF pela via *s.*c reduziu a produção das citocinas IL-6 e IL-1β em amostras de LBA coletadas 2, 24 e 48 h após a instilação intranasal do LPS.

Frente ao pré-tratamento com 29-HF pela via *s.c*, a concentração de IL-1β detectada em LBA mostrou redução significativa 24 h após desafio com instilação de LPS *i.n* (**Figura 11 A**) enquanto para IL-6, houve redução detectada 2 h após o desafio (**Figura 11 B**). Não foi diferença estatística para a concentração de TNF-α em nenhum tempo (**Figura 11 C**).

A



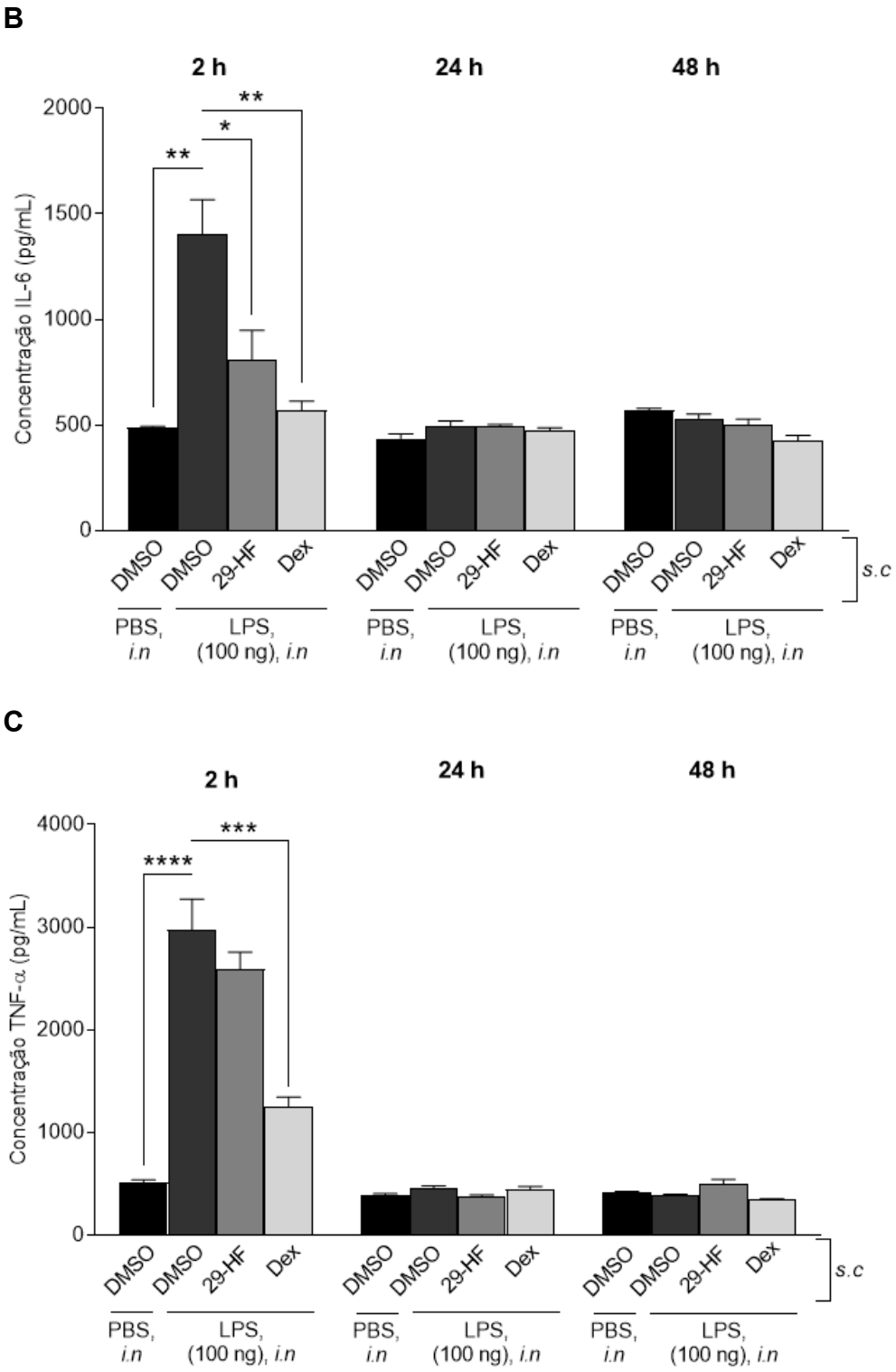


Figura 11: Dosagem das citocinas IL1β (A), IL-6 (B) e TNF-α (C) em amostras de LBA de camundongos C57BL/6 pré-tratados com 29-HF, dexametasona ou DMSO pela via s.c e desafiados com instilação i.n de LPS ou PBS.

Os dados representam a média ± E.P.M da concentração de cada citocina expressa em pg/mL. Note: Dex = dexametasona. Análises estatísticas: *One-way* ANOVA seguido por teste de Tukey. ****p < 0,0001; **p < 0,001 e *p < 0,05, quando comparado ao grupo DMSO + LPS. n = 3 a 4 animais por grupo, experimentos realizados em duplicata.

4.1.4. A injeção subcutânea de 29-HF reduziu a atividade da mieloperoxidase nos alvéolos de camundongos desafiados com instilação intranasal de LPS

O modelo de inflamação pulmonar, induzido pela instilação intranasal de LPS, não apenas resulta em um aumento na infiltração de neutrófilos nos alvéolos, mas também desencadeia uma marcante ativação dos neutrófilos presentes no tecido. Para avaliar a presença e a ativação de neutrófilos nos alvéolos de camundongos C57BL/6 machos desafiados com a instilação intranasal de LPS ou PBS, utilizou-se a medida da atividade da MPO.

Conforme ilustrado na **Figura 12**, a instilação de LPS resultou em um significativo aumento na atividade da MPO após 24 h em animais que receberam injeção subcutânea de DMSO, em comparação com aqueles que foram pré-tratados com DMSO e receberam instilação de PBS autoclavado. Notavelmente, os animais submetidos ao pré-tratamento com 29-HF, seguido pela instilação de LPS, apresentaram uma notável redução na atividade da MPO.

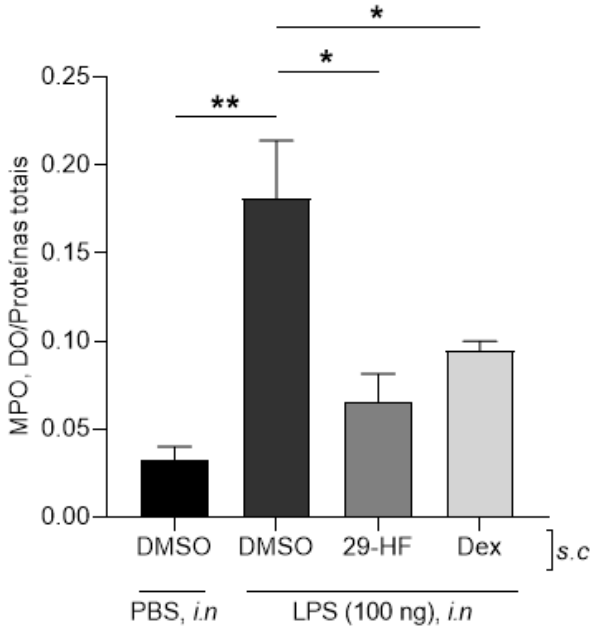


Figura 12: Atividade da MPO em lavado broncoalveolar obtido de camundongos pré-tratados com injeção s.c de 29-HF, dexametasona ou DMSO e então desafiados com instilação i.n de LPS ou PBS.
Os dados representam a média ± E.P.M da densidade óptica (DO) normalizada pela dosagem de proteínas totais na amostra de LBA correspondente, sendo expressos em DO/(µg/µL) em amostras colhidas após 24 h. Note: Dex = dexametasona, DMSO = dimetilsulfóxido. Análises estatísticas: *One-way* ANOVA seguido por teste de Tukey. **p < 0,001, *p < 0,05, quando comparado ao grupo DMSO + LPS. n = 3 animais por grupo.

4.1. Efeito do 29-HF no modelo experimental de hiperalgesia mecânica induzida por injeção intraplantar de LPS

4.1.3. A injeção intraplantar de LPS provoca hiperalgesia mecânica camundongos Swiss machos

Comparados aos animais do grupo controle (PBS, *i.pl*), os animais do grupo LPS 20 ng e 200 ng apresentaram redução significativa do limiar nociceptivo nos tempos de 1 h até 5 h e 1 h até 6 h, respectivamente, sendo que o maior efeito nociceptivo foi detectado nos animais que receberam 200 ng de LPS *i.pl*. Portanto, a concentração de 200 ng/20 µL de LPS foi definida com a concentração capaz de provocar o maior grau de hiperalgesia mecânica nos animais e foi padronizada para os próximos experimentos envolvendo o modelo de hiperalgesia mecânica (**Figura 13**). Além disso, foi determinado que 4 h representa o pico do efeito hiperalgésico induzido pelo LPS 200 ng, sendo esse o período após o qual os próximos experimentos com injeção *i.pl* de LPS foram apurados (**Figura 13**).

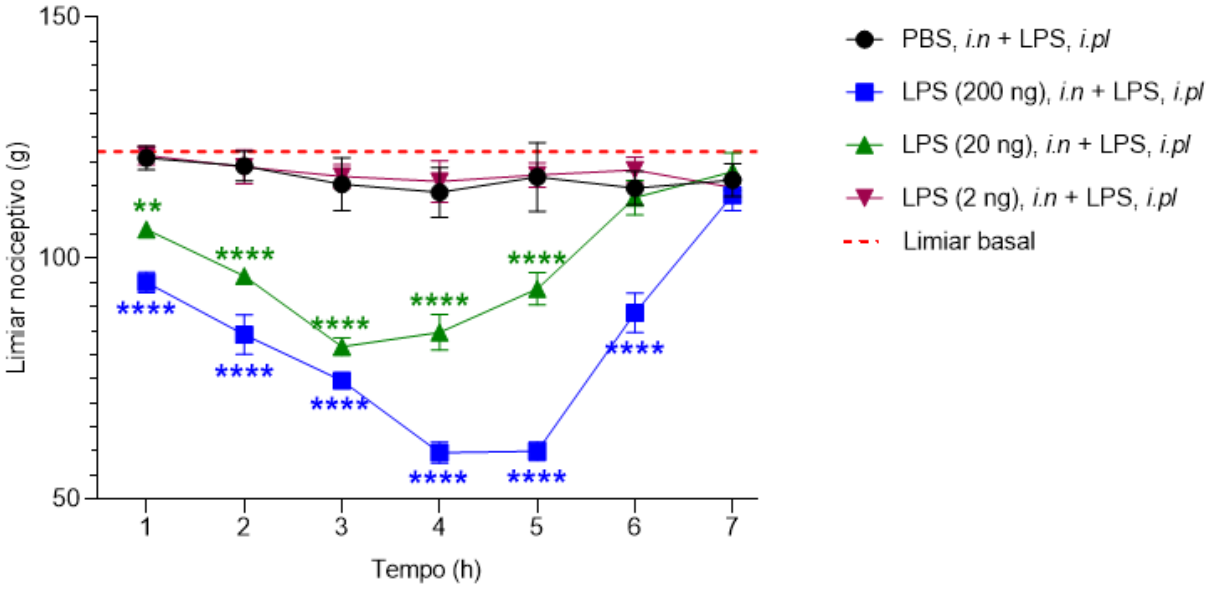


Figura 13: Efeito hiperalgésico, expresso através do limiar nociceptivo (em g), provocado pela injeção *i.pl* de LPS em três concentrações (200, 20 ou 2 ng/20 µL) na pata traseira esquerda de camundongos *Swiss* machos.
Os dados representam a média ± E.P.M do limiar nociceptivo de n = 5 animais por grupo. Análise estatística: *Two-way* ANOVA seguindo por teste de Tukey. ****p < 0,0001; ***p < 0,001 e **p < 0,01 comparado ao grupo PBS. Note: A injeção i.pl de LPS ou PBS foi realizada logo após a aferição da medida basal (MB) em cada animal.

4.1.4. A injeção intraperitoneal de 29-HF apresenta efeito anti-nociceptivo em modelo de hiperalgesia mecânica induzida por LPS i.pl

Após 20, 30 e 40 minutos, os animais tratados com 29-HF apresentaram efeito anti-nociceptivo, com efeito máximo observado 30 minutos após administração do 29-HF (**Figura 14**). Com isso, o experimento foi repetido, incluindo as doses de 10 e 5 mg/Kg de 29-HF, *i.p* (**Figura 15**). Conforme visto na **Figura 15**, quando comparado ao grupo controle (DMSO 2,5%, *i.p* + LPS, *i.pl*) todas as doses testadas apresentaram efeito anti-nociceptivo de modo dose-dependente.

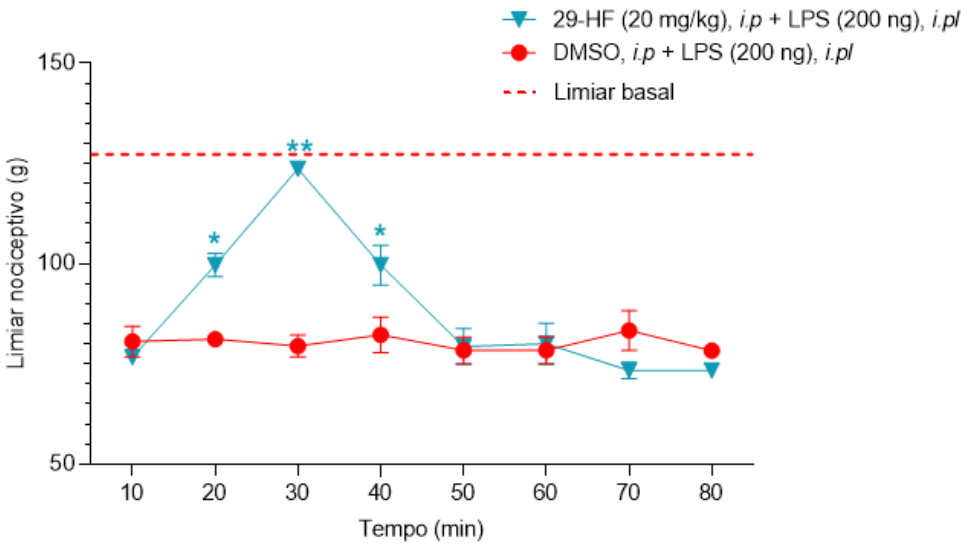


Figura 14: Duração do efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF (20 mg/Kg, *i.p*).
Os dados representam a média ± E.P.M do limiar nociceptivo de n = 3 a 5 animais por grupo. Análise estatística: *Two-way* ANOVA seguindo por teste de Bonferroni. **p < 0,01 e *p < 0,05 comparado ao grupo DMSO + LPS. Note: A injeção *i.pl* do LPS foi realizada logo após a aferição da medida basal (MB).

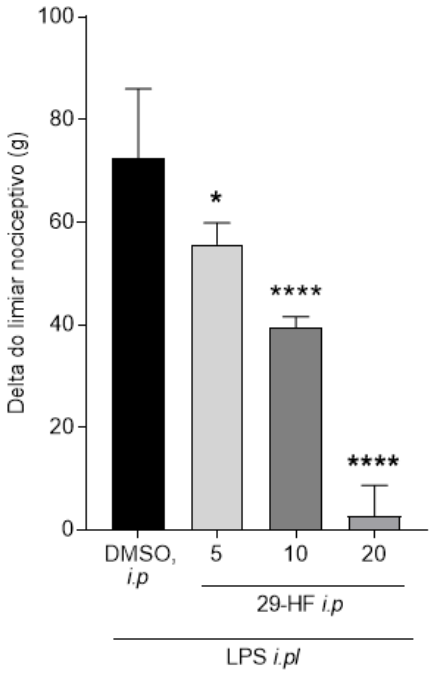


Figura 15: Efeito anti-nociceptivo sistêmico do 29-HF (20, 10 e 5 mg/kg).
Os dados representam a média ± E.P.M. do delta (Δ) do limiar nociceptivo (em g) de n = 5 animais por grupo. Análise estatística: *One-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. ****p < 0,0001 e *p < 0,05 com relação ao grupo DMSO + LPS. Note: Δ = MB – MT, onde: Δ = delta do limiar nociceptivo MB = média do limiar basal e MT = média do limiar após tratamento.

Além do efeito anti-nociceptivo sistêmico, através de injeção *i.p*, também foi avaliado o efeito anti-nociceptivo local do 29-HF através de injeção *i.pl*. As doses de 8 e 4 mg/kg apresentaram efeito anti-nociceptivo significativo comparado ao grupo controle (DMSO 2,5%, *i.pl*) nos tempos de 5 a 15 minutos para o grupo 29-HF 4 mg/kg e 5 a 30 minutos para o grupo 29-HF 8 mg/kg (**Figura 16**).

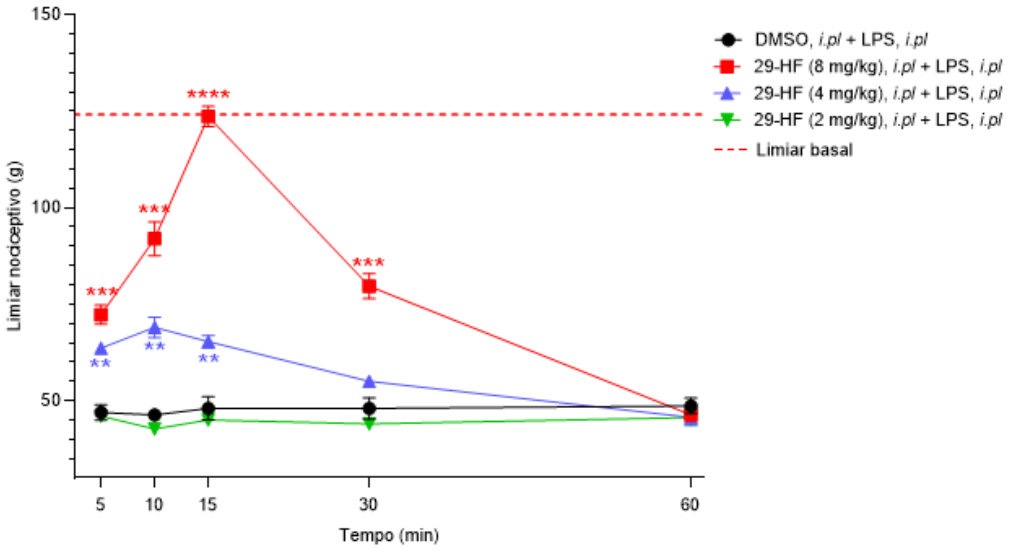


Figura 16: Efeito anti-nociceptivo local do 29-HF.

Os dados representam a média ± E.P.M. do limiar nociceptivo (em g) de n = 5 animais por grupo. Análise estatística: *Two-Way* ANOVA seguido do teste de Tukey. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,01 com relação ao grupo controle (DMSO 2,5%). Note: A injeção *i.pl* do LPS foi realizada logo após a aferição da medida basal (MB).

Para discernir se a latência para o animal retirar a pata se devia a um efeito anti-nociceptivo ou a uma possível alteração neuromotora induzida pelo 29-HF, foi realizado o teste de performance em *Rotarod*, segundo Soares e colaboradores, com modificações (Soares *et al.*, 2022). Os animais desafiados com xilazina apresentaram o menor tempo de permanência na barra rotativa, indicando alteração neuromotora, enquanto os animais que receberam injeção *i.p* de 29-HF não apresentaram diferença estatisticamente significativa dos animais que receberam DMSO 2,5% *i.p*, mostrando, portanto, que a injeção sistêmica do 29-HF não induz alterações neuromotoras, reforçando que a latência observada no comportamento de retirada de pata se deve a um efeito anti-nociceptivo (**Figura 17**).

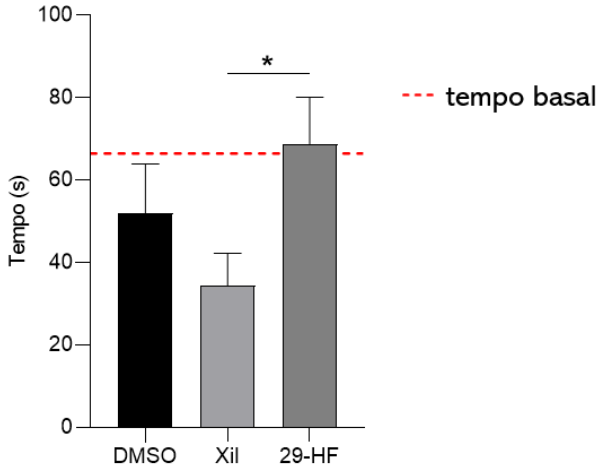


Figura 17: Avaliação do desempenho motor em camundongos *Swiss* machos tratados com 29-HF (20 mg/kg) *i.p*, xilazina (16 mg/kg) *s.c* ou veículo (DMSO 2,5%) *i.p*.
Os dados representam a média ± E.P.M da média da latência (em segundos) da queda da barra rotativa para três medidas de n = 11 animais por grupo. Note: Xil = xilazina. Análise estatística: *One-way* ANOVA seguindo por teste de Tukey. *p < 0,05 comparado ao grupo Xil.

5. DISCUSSÃO

A mucosa pulmonar apresenta uma das maiores áreas de superfície comunicada com o meio externo, além de um ambiente interno úmido e aquecido, condições fisiológicas favoráveis à respiração eficiente. No entanto, essas características do trato respiratório inferior o tornam uma das principais portas entrada para patógenos no organismo (Bălan et al., 2023; Kumar, 2020 e Torres et al., 2019). As infecções pulmonares provocadas por bactérias Gram-negativas representam um dos maiores desafios técnicos para o manejo clínico de pneumonia em pacientes, principalmente aqueles que apresentam uma condição de saúde vulnerabilizada, como crianças, idosos, e pessoas com comorbidades (Alfares et al., 2023; Bălan et al., 2023 e Torres et al., 2019). Frente ao constante fluxo de partículas carregadas pelo ar para os alvéolos durante o processo de respiração, as vias aéreas inferiores contam com um complexo e robusto arsenal imunológico capaz de responder e eliminar grande parte dos agentes potencialmente patogênicos que entram em contato com a mucosa pulmonar (Korkmaz e Traber, 2023 e Kumar, 2020).

Apesar do sistema respiratório poder contar com um arsenal imunológico robusto e uma microbiota própria, as infecções pulmonares podem levar a quadros complicados de pneumonia devido à intensa resposta inflamatória que é deflagrada. Entre pacientes hospitalizados, há um risco particularmente elevado para contrair uma infecção pulmonar (Alfares et al., 2023). Esses pacientes quase invariavelmente se encontram em estado de saúde debilitada ou fragilizada e, atrelado a isso, há elevado risco de exposição a patógenos resistentes a antimicrobianos com o uso de dispositivos e procedimentos invasivos (Alfares et al., 2023).

Recentemente, com a pandemia do COVID-19, o mundo inteiro presenciou as severas consequências sociais e pessoais provocadas por um descompasso severo da inflamação nos pulmões. A coinfecção de SARS-CoV-2 com bactérias oportunistas foi e continua sendo especialmente preocupante, uma vez que essa situação agrava consideravelmente a resposta inflamatória, elevando a possibilidade de acirrar a lesão aguda e sobrecarregar o sistema respiratório, aumentando a necessidade de intervenções clínicas mais intensivas (Patton et al., 2023 e Westblade, Simon e Satlin, 2021).

Em infecções das vias respiratórias inferiores, a infiltração de neutrófilos desempenha um papel crucial na prevenção da disseminação da infecção nos pulmões e para outros órgãos, já que esse tipo celular é altamente capacitado como células fagocíticas, equipadas com diversas substâncias microbicidas (Arora e Singh, 2023). Além do papel antimicrobiano dos neutrófilos, estudos recentes têm ampliado o nosso conhecimento sobre o escopo de atividades desempenhadas por essas células no contexto de mecanismos resolutivos da inflamação, evidenciando um grau impressionante de plasticidade fenotípica para os neutrófilos. Por exemplo, a metaloprotease de matriz do tipo 9 (MMP-9) derivada de neutrófilos pode facilitar o reparo tecidual em modelo de lesão aguda pulmonar (Blázquez-Prieto *et al.*, 2018).

No entanto, é importante destacar que uma infiltração excessivamente intensa quase invariavelmente resultará em danos colaterais à arquitetura do interstício pulmonar e dos alvéolos, principalmente devido à acumulação de substâncias citotóxicas liberadas dos grânulos das células polimorfonucleares, gerando uma amplificação da resposta inflamatória para além da infecção inicial (Filep, 2022). Por esse motivo, a efetividade de uma terapia anti-inflamatória em processos inflamatórios agudos está muito ligada à capacidade dos compostos de reduzir a infiltração de neutrófilos ao sítio da inflamação.

Embora a modulação farmacológica da inflamação seja uma estratégia crucial para o tratamento eficaz de pneumonias graves, há uma notável carência de medicamentos anti-inflamatórios clinicamente relevantes para casos de inflamações pulmonares graves. Os GCCs, apesar de serem eficazes em muitos cenários de pneumonias e síndromes respiratórias, frequentemente induzem alterações metabólicas significativas em pacientes já debilitados, especialmente com o uso prolongado ou em doses elevadas, que aumenta o risco de efeitos sistêmicos (Hanania, Chapman e Kesten, 1995 e Oray *et al.*, 2016). Essa capacidade dos GCCs de afetar índices metabólicos está ligada principalmente à natureza hormonal dos corticosteroides endógenos, que desempenham um papel na regulação de diversos processos fisiológicos, como o metabolismo energético e ósseo (Wang, 2005). Além disso, existe a possibilidade da terapia com GCCs ampliar a sobrevivência e reatividade de neutrófilos (Obinata *et al.*, 2003; Ronchetti *et al.*, 2018) ou induzir imunossupressão (Yang *et al.*, 2019), ambos efeitos altamente danosos em casos de infecções pulmonares. Essas limitações enfatizam a necessidade de buscar novas

classes terapêuticas de compostos com propriedades anti-inflamatórias, fundamentando assim o presente estudo, que investigou o potencial farmacológico do composto friedelânico 29-HF em um contexto de inflamação pulmonar aguda experimentalmente induzida.

Diante do cenário apresentado, a instilação intranasal de LPS desencadeou uma resposta inflamatória aguda nos pulmões de camundongos C57BL/6, que foi caracterizada experimentalmente neste estudo por meio de uma significativa infiltração (**Figura 9**) e ativação de neutrófilos (**Figura 12**) acompanhada de um aumento na liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 (**Figura 11**). Essa predominância de células polimorfonucleares, a elevação das citocinas citadas, bem como taxas elevadas da atividade da MPO, induzidas pelo LPS, é considerado um modelo de lesão aguda pulmonar (Ali *et al.*, 2020), permitindo, assim, a correlação entre os resultados experimentais com situações clinicamente relevantes associadas a pneumonias e suas complicações mais graves.

O composto friedelânico 29-HF demonstrou um efeito anti-inflamatório notável em camundongos C57BL/6 que foram submetidos à instilação intranasal de LPS, influenciando eventos cruciais que caracterizam o modelo de inflamação pulmonar aguda. Um dos achados mais significativos em nossos resultados foi a capacidade do 29-HF, administrado via subcutânea, de reduzir o recrutamento de neutrófilos para os alvéolos pulmonares (**Figura 10**), um processo chave que caracteriza a fisiopatologia da inflamação aguda e que também está fortemente associado ao grau de dano tecidual colateral que resulta da infiltração neutrofílica devido ao acúmulo de substâncias citotóxicas, oxidativas e proteolíticas liberadas dos grânulos de células polimorfonucleares.

O 29-HF também demonstrou a capacidade de reduzir a atividade da MPO no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por instilação intranasal de LPS (**Figura 12**). A MPO é um marcador enzimático crucial para avaliar o estado de ativação das células polimorfonucleares, que são as principais fontes de liberação de MPO no sítio da inflamação (Pulli *et al.*, 2013; Rizo-Téllez, Sekheri e Filep, 2022). Embora este estudo tenha empregado um método indireto, é relevante mencionar que a utilização de técnicas diretas para quantificar a MPO poderia fornecer dados valiosos, uma vez que a MPO possui a capacidade autócrina de amplificar a ativação e sobrevivência neutrofílica, independentemente de sua atividade enzimática, ao

interagir com integrinas CD11b/CD18, promovendo vias de sinalização intracelulares que sustentam a ativação dos neutrófilos (El Kebir *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2005).

Além de servir como um marcador para a ativação neutrofílica, a atividade da MPO extracelular pode ser utilizada para estimar o grau de estresse oxidativo em processos inflamatórios, pois a MPO contribui significativamente para o surgimento do dano oxidativo indesejado em tecidos inflamados (Pulli *et al.*, 2013). Em suma, a modulação da ativação neutrofílica e do estresse oxidativo mediado por esses leucócitos, evidenciada pela redução da atividade da MPO, configura um passo indispensável para mitigar respostas inflamatórias e, assim, restringir o grau de dano colateral ao tecido pulmonar.

A quantificação de citocinas em amostras de LBA fornece uma informação importante sobre a resposta inflamatória deflagrada nos alvéolos de camundongos que receberam instilação intranasal de LPS. As citocinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas que desempenham papel fundamental na sinalização das respostas imunes (Kany, Vollrath e Relja, 2019). Células endoteliais e mononucleares, sobretudo macrófagos, são as principais responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao LPS (Liu *et al.*, 2018). Ao se ligar ao TLR4 na superfície dessas células, o LPS ativa vias de sinalização que resultam na produção *downstream* de TNF-α, IL-1β e IL-6 (Liu *et al.*, 2018; Lu, Yeh e Ohashi, 2008; Villar-Lorenzo *et al.*, 2016). A IL-6 está intimamente envolvida no processo de recrutamento neutrofílico ao tecido pulmonar (Florentin *et al.*, 2021) enquanto IL-1β e TNF-α são mediadores importantes na ativação e sobrevivência de neutrófilos recrutados (Chen *et al.*, 2021; Ralph *et al.*, 2021).

A instilação de LPS pela via intranasal provocou elevação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α obtidas no LBA e a injeção subcutânea de 29-HF foi capaz de reduzir a liberação de IL-6 e IL-1β 2 e 24 horas após desafio com LPS, respectivamente (**Figura 11**). Esses resultados sugerem que o 29-HF atua na modulação da liberação de IL-6 e IL-1β, ambas importantes para o recrutamento e ativação de neutrófilos. Os triterpenos e triterpenóides naturais podem inibir a ativação de TLR4, reduzindo a cascata de sinalização que resulta na biossíntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Harun *et al.*, 2020 e Miranda *et al.*, 2022).

Além de afetar a integridade e funcionalidade tecidual, alguns processos inflamatórios apresentam outra camada de relevância clínica: a dor, que ocorre em tecidos inflamados inervados por fibras nociceptoras. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser conceituada como uma experiência emocional desagradável que acompanha a etapa de percepção do impulso nociceptivo (Raja *et al.*, 2020). Devido a essa característica emocional, costuma-se reservar o conceito de dor para humanos, enquanto a nocicepção é um termo mais aceito para descrever esse processo em animais não humanos (Raja *et al.*, 2020).

O estímulo nocivo que desencadeia a nocicepção pode ser de natureza mecânica, térmica e/ou química (revisado por Cook *et al.*, 2018). Os estímulos químicos, em particular, estão associados a processos inflamatórios, uma vez que diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e eicosanoides, interagem com os nociceptores, induzindo um acentuado estado de sensibilização nesses neurônios, resultando em uma redução do limiar de ativação dessas fibras nervosas, que configura um processo de hiperalgesia mecânica (Calil *et al.*, 2014; Raja *et al.*, 2020 e Sandkühler, 2009). Deste modo, muitos agentes capazes de modular a sinalização pró-inflamatória também podem apresentar graus apreciáveis de atividade analgésica contra a hiperalgesia mecânica associada à inflamação de tecidos inervados por nociceptores.

A administração do LPS pela via intraplantar pode ser utilizada como um modelo de hiperalgesia mecânica (Calil *et al.*, 2014). Desta forma, para avaliar o potencial anti-nociceptivo do 29-HF frente ao modelo, foi padronizada uma concentração de LPS capaz de provocar hiperalgesia máxima em camundongos *Swiss* machos (**Figura 13**). Em seguida, foi demonstrado que o composto 29-HF apresenta um acentuado efeito anti-nociceptivo contra a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de LPS. Tal efeito anti-nociceptivo foi observado para o 29-HF administrado pela via intraperitoneal quanto intraplantar, sugerindo que o composto apresenta capacidade analgésica local e sistemicamente (**Figuras 15 e 16**). Ademais, verificou-se, através do teste em *Rotarod* (Soares *et al.*, 2022), que o 29-HF administrado sistemicamente não induz alterações neuromotoras, evidenciando que a latência observada no comportamento de retirada de pata se deve a capacidade anti-nociceptiva do composto (**Figura 17**).

Uma parte significativa do efeito anti-nociceptivo apresentado pelo 29-HF pode estar atrelado ao efeito anti-inflamatório do composto. A hiperalgesia mecânica induzida por LPS é resultado direto da inflamação aguda provocada no tecido através de vias dependentes do TLR4, resultando na liberação de um repertório impressionante de moléculas mediadoras, entre elas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β e IL-6, e eicosanoides, sobretudo prostaglandina E_2 (PGE_2) (Calil *et al.*, 2014). Esses mediadores liberados no microambiente inflamatório atuam de diversas formas para induzir sensibilização ou ativação dos nociceptores. Por exemplo, algumas citocinas provocam a liberação de catecolaminas, que então ativam receptores adrenérgicos nos nociceptores (revisado por Perl, 1999). Alternativamente, as citocinas e prostaglandinas também atuam diretamente sobre as fibras nociceptoras de duas maneiras principais: i) através da ligação com seus respectivos receptores expressos na superfície dos nociceptores ou ii) através da ativação de canais iônicos que promovem a sensibilização da fibra (Kanda *et al.*, 2021).

Conforme foi demonstrado através da dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático, o 29-HF apresentou capacidade de reduzir significativamente a liberação de IL-6 e IL-1β em modelo de inflamação induzida por LPS (**Figura 12**). No contexto da hiperalgesia induzida por LPS, portanto, pelo menos parte do efeito analgésico do 29-HF poderia estar associado à redução da liberação de IL-1β e IL-6 (Cook *et al.*, 2018 e Zhang e An, 2007).

Os compostos triterpênicos podem apresentar efeitos analgésicos por outros mecanismos aquém dos efeitos imunomodulatórios. O ácido oleanólico, por exemplo, mostrou capacidade de ativar canais K^+_{ATP} em nociceptores, promovendo um estado de hiperpolarização (Maia *et al.*, 2006). Por outro lado, alguns compostos triterpênicos também podem atuar através da ativação de vias opioidérgicas (Maia *et al.*, 2006; Veloso *et al.*, 2014). Seria relevante, portanto, investigar se o efeito anti-nociceptivo do 29-HF também poderia estar associado a esses mecanismos alternativos.

Além disso, seria altamente benéfico aprofundar os estudos sobre o potencial farmacológico do 29-HF, especialmente em relação aos seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante e anti-nociceptivo. Dada a discussão anterior, uma abordagem subsequente poderia envolver a exploração das vias de sinalização e, portanto, dos mecanismos farmacológicos subjacentes aos efeitos anti-inflamatórios e anti-nociceptivos observados no presente trabalho.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados evidenciam que o composto friedelânico, 29-HF, isolado do galho de *Maytenus gonoclada* Mart, demonstra propriedades anti-inflamatórias e anti-nocicpetivas, respectivamente, em modelos de inflamação pulmonar aguda induzida por instilação intranasal de LPS e de hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de LPS. Embora haja um grande interesse em explorar o potencial farmacológico de triterpenos e triterpenóides pentacíclicos, é importante observar que a literatura científica ainda carece de informações substanciais relacionadas ao subgrupo dos compostos friedelânicos. Até onde sabemos, nosso estudo é pioneiro ao explorar a capacidade do 29-HF de modular a liberação de mediadores inflamatórios e o recrutamento celular em um modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS. Além disso, demonstramos que o 29-HF exerce um efeito anti-nociceptivo notável, tanto sistemicamente quanto localmente, em um modelo de hiperalgesia mecânica induzida por injeção intraplantar LPS. Em conjunto, nossos resultados evidenciam que o 29-HF, quando administrado sistemicamente, tem o potencial de modular processos-chave da sinalização e amplificação da resposta imune inata pulmonar ao LPS, ao mesmo tempo em que reduz a hiperalgesia periférica associada à resposta inflamatória, tanto sistemicamente quanto localmente. Esses resultados sugerem a possibilidade de investigar formulações de 29-HF, tanto para administração sistêmica quanto local, com o objetivo de atenuar a resposta imune inata, além de explorar os mecanismos envolvidos com esses efeitos. Essas abordagens podem contribuir para a descoberta de novas estratégias farmacológicas anti-inflamatórias que visam a redução das consequências indesejadas da inflamação, incluindo lesões em órgãos inflamados e hiperalgesia inflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627–635, maio 2018.

AFONSO, P. V. *et al.* LTB4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. **Developmental Cell**, v. 22, n. 5, p. 1079–1091, maio 2012.

ALI, HASSAN *et al.* Attenuation of LPS-induced acute lung injury by continentalic acid in rodents through inhibition of inflammatory mediators correlates with increased Nrf2 protein expression. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 81, 25 nov. 2020.

ALRUHAIMI, R. S. Betulinic acid protects against cardiotoxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 30, n. 17, p. 51180–51190, abr. 2023.

ARORA, A.; SINGH, A. Exploring the role of neutrophils in infectious and noninfectious pulmonary disorders. **International Reviews of Immunology**, v. 0, n. 0, p. 1–21, 24 jun. 2023.

BENNETT, J. M. *et al.* Inflammation–Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 2018.

BERTANI, B.; RUIZ, N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, p. 10.1128/ecosalplus.ESP-0001–2018, ago. 2018.

BLACK, J. Claude Bernard on the action of curare. **BMJ : British Medical Journal**, v. 319, n. 7210, p. 622, 4 set. 1999.

BLÁZQUEZ-PRIETO, J. *et al.* Impaired lung repair during neutropenia can be reverted by matrix metalloproteinase-9. **Thorax**, v. 73, n. 4, p. 321–330, abr. 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRATTSAND, R.; LINDEN, M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 10 Suppl 2, p. 81–90; discussion 91-92, 1996.

BUCHMANN, K. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014.

CALIL, I. L. *et al.* Lipopolysaccharide induces inflammatory hyperalgesia triggering a TLR4/MyD88-dependent cytokine cascade in the mice paw. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e90013, 2014.

CARBONE, F. *et al.* Apomorphine for Parkinson's Disease: Efficacy and Safety of Current and New Formulations. **CNS Drugs**, v. 33, n. 9, p. 905–918, 2019.

CHEN, D. *et al.* TNF-α Induces Neutrophil Apoptosis Delay and Promotes Intestinal Ischemia-Reperfusion-Induced Lung Injury through Activating JNK/FoxO3a Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 8302831, 29 dez. 2021.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 14 dez. 2017.

CHENG, Y. *et al.* Maslinic acid attenuates UVB-induced oxidative damage in HFF-1 cells. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 22, n. 8, p. 2352–2360, ago. 2023.

CHENG, Y.-C. *et al.* Echinocystic Acid Ameliorates Arthritis in SKG Mice by Suppressing Th17 Cell Differentiation and Human Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes Inflammation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 51, p. 16176–16187, 28 dez. 2022.

COOK, A. D. *et al.* Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 3, p. 240–255, 1 mar. 2018.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 1 jan. 2005.

DALAL, P. J.; MULLER, W. A.; SULLIVAN, D. P. Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 190, n. 3, p. 535–542, mar. 2020.

DAVEY, A.; MCAULEY, D. F.; O'KANE, C. M. Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. **European Respiratory Journal**, v. 38, n. 4, p. 959–970, 1 out. 2011.

DE ALMEIDA, A. D. *et al.* A role for mast cells and mast cell tryptase in driving neutrophil recruitment in LPS-induced lung inflammation via protease-activated receptor 2 in mice. **Inflammation Research**, v. 69, n. 10, p. 1059–1070, out. 2020.

DIAS, D.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, 16 abr. 2012.

DUARTE, D. F. Opium and opioids: a brief history. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, p. 135–146, fev. 2005.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.

DUTTA, S. *et al.* Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 17, p. 1907–1932, 26 jun. 2023.

DZOBO, K. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. **Comprehensive Pharmacology**, p. 408–422, 2022.

EL KEBIR, D. *et al.* Myeloperoxidase Delays Neutrophil Apoptosis Through CD11b/CD18 Integrins and Prolongs Inflammation. **Circulation Research**, v. 103, n. 4, p. 352–359, 15 ago. 2008.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. Suppl 1, p. 69–75, mar. 2001.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; ABREU, M. S. DE. THE HYPERALGESICEFFECTS OF PROSTACYCLINAND PROSTAGLANDIN E2. v. 16, n. 1, 1978.

FICKO, C.; CONAN, P.-L. Le paludisme en 2022 : aspects cliniques et thérapeutiques. **Médecine Tropicale et Santé Internationale**, v. 3, n. 2, p. mtsi.v3i2.2023.378, 5 jun. 2023.

FILEP, J. G. Targeting Neutrophils for Promoting the Resolution of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 866747, 2022.

FLAJNIK, M. F.; KASAHARA, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 47–59, jan. 2010.

FLORENTIN, J. *et al.* Interleukin-6 mediates neutrophil mobilization from bone marrow in pulmonary hypertension. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 2, p. 374–384, fev. 2021.

FRANGIE, C.; DAHER, J. Role of myeloperoxidase in inflammation and atherosclerosis (Review). **Biomedical Reports**, v. 16, n. 6, p. 53, jun. 2022.

FRISHMAN, W. H. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy on blood pressure and peripheral edema. **The American Journal of Cardiology**, v. 89, n. 6A, p. 18D-25D, 21 mar. 2002.

FURMAN, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, dez. 2019.

GALLEGO-JARA, J. *et al.* A Compressive Review about Taxol®: History and Future Challenges. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5986, 17 dez. 2020.

GHLICHLOO, I.; GERRIETS, V. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). *Em*: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. .

GOA, K. L.; FAULDS, D. Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy. **Drugs & Aging**, v. 5, n. 3, p. 200–234, set. 1994.

GRANCHI, C. Biological Activity of Natural and Synthetic Compounds. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3652, 7 jun. 2022.

GRAY, P. A. *et al.* Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyclo-oxygenase and lipoxygenase activity in whole blood from aspirin-sensitive asthmatics vs healthy donors. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 7, p. 1031–1038, dez. 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1–93, fev. 2006.

HANANIA, N. A.; CHAPMAN, K. R.; KESTEN, S. Adverse effects of inhaled corticosteroids. **The American Journal of Medicine**, v. 98, n. 2, p. 196–208, fev. 1995.

HARUN, N. H. *et al.* Immunomodulatory effects and structure-activity relationship of botanical pentacyclic triterpenes: A review. **Chinese Herbal Medicines**, v. 12, n. 2, p. 118–124, abr. 2020.

KANDA, H. *et al.* Localization of prostaglandin E2 synthases and E-prostanoid receptors in the spinal cord in a rat model of neuropathic pain. **Brain Research**, v. 1750, p. 147153, 1 jan. 2021.

KANG, Y.-M. *et al.* Effects of Echinocystic Acid on Atopic Dermatitis and Allergic Inflammation of the Skin and Lungs. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 104, p. 154211, set. 2022.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6008, 28 nov. 2019.

KORKMAZ, F. T.; TRABER, K. E. Innate immune responses in pneumonia. **Pneumonia**, v. 15, n. 1, p. 4, 25 fev. 2023.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816–827, fev. 2015.

KUMAR, V. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

LAU, D. *et al.* Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 2, p. 431–436, 11 jan. 2005.

LI, Q. *et al.* Maslinic Acid Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Myocardial Inflammation and Apoptosis by Regulating HMGB1-TLR4 Axis. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 8, p. 768947, 2021.

LIU, X. *et al.* LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF-κB, STAT3 or AP-1 activation. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 4, p. 5484–5491, 1 abr. 2018.

LU, Y.-C.; YEH, W.-C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, maio 2008.

MAIA, J. L. *et al.* Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: Possible mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 54, n. 4, p. 282–286, 1 out. 2006.

MATHUR, S.; HOSKINS, C. Drug development: Lessons from nature (Review). **Biomedical Reports**, v. 6, n. 6, p. 612–614, 1 jun. 2017.

MEES, M. *et al.* Maytenus robusta Reissek, a medicinal plant popularly used to treat digestive diseases, promotes ameliorative effects in colon and liver of mice exposed to dextran sulfate sodium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 261, p. 113180, out. 2020.

MEIZLISH, M. L. *et al.* Tissue Homeostasis and Inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 557–581, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Portaria Interministerial n. 2.960/2008. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/pnpmf/ppnpmf. Acesso em: 03 de jun. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Fitoterápicos e homeopáticos na RENAME. Atualizado 06 de dez. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/orientacao-ao-prescritor/fitoterapicos-e-homeopaticos-na-rename. Acesso em: 03 de jun. 2023.

MIRANDA, R. D. S. *et al.* Antiinflammatory activity of natural triterpenes—An overview from 2006 to 2021. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 4, p. 1459–1506, abr. 2022.

MULLER, W. A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 323–344, 2011.

NIERO, R.; FALONI DE ANDRADE, S.; CECHINEL FILHO, V. A Review of the Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Plants of the Maytenus Genus. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 18, p. 1851–1871, 1 jun. 2011.

OBINATA, H. *et al.* Glucocorticoids up-regulate leukotriene B4 receptor-1 expression during neutrophilic differentiation of HL-60 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, n. 1, p. 114–119, 12 set. 2003.

ORAY, M. *et al.* Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 15, n. 4, p. 457–465, 2 abr. 2016.

PALUDAN, S. R. *et al.* Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 3, p. 137–150, mar. 2021.

PERL, E. R. Causalgia, pathological pain, and adrenergic receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7664–7667, 6 jul. 1999.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803–815, out. 2007.

PULLI, B. *et al.* Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67976, 5 jul. 2013.

QI, L. *et al.* Maslinic Acid Ameliorates Myocardial Ischemia Reperfusion Injury-Induced Oxidative Stress via Activating Nrf2 and Inhibiting NF-[Formula: see text]B Pathways. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 51, n. 4, p. 929–951, 2023.

RAJA, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, 1 set. 2020.

RALPH, B. A. *et al.* The IL-1 Receptor Is Required to Maintain Neutrophil Viability and Function During Aspergillus fumigatus Airway Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

REGLERO-REAL, N. *et al.* Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 10, p. 2048–2057, out. 2016.

RIZO-TÉLLEZ, S. A.; SEKHERI, M.; FILEP, J. G. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2302, nov. 2022.

RONCHETTI, S. *et al.* How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, dez. 2018.

SAFFAR, A. S.; ASHDOWN, H.; GOUNNI, A. S. The Molecular Mechanisms of Glucocorticoids-Mediated Neutrophil Survival. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 4, p. 556–562, abr. 2011.

SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 707–758, abr. 2009.

SHAFER, S. L. From d-tubocurarine to sugammadex: the contributions of T. Cecil Gray to modern anaesthetic practice. **BJA: British Journal of Anaesthesia**, v. 107, n. 1, p. 97–102, 1 jul. 2011.

SHAN, W.-G. *et al.* Natural Friedelanes. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1392–1434, ago. 2013.

SMITH, P. F. *et al.* Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-o-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p. 3574–3581, out. 2007.

SOARES, G. L. *et al.* Caryocar villosum attenuates inflammation by inhibiting CXCL1 activation and peripheral hyperalgesia through opioid pathway modulation. **Acta Amazonica**, v. 52, n. 3, p. 245–253, set. 2022.

SOLIMAN, A. M.; BARREDA, D. R. Acute Inflammation in Tissue Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 641, jan. 2023.

SONG, T. *et al.* Protective effect of lupeol on arthritis induced by type II collagen via the suppression of P13K/AKT signaling pathway in Sprague dawley rats. **Environmental Toxicology**, v. 37, n. 7, p. 1814–1822, jul. 2022.

SOUSA, G. F. D. *et al.* Anti-inflammatory, antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of friedelanes from Maytenus robusta branches and isolation of further triterpenoids. **Phytochemistry Letters**, v. 21, p. 61–65, set. 2017.

SU, X.; MILLER, L. H. The discovery of artemisinin and Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Science China. Life sciences**, v. 58, n. 11, p. 1175–1179, nov. 2015.

SUZUKI, K. *et al.* Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 2, p. 345–352, 15 jul. 1983.

TABATA, H. Production of paclitaxel and the related taxanes by cell suspension cultures of Taxus species. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 453–461, abr. 2006.

TAWFEEK, N. *et al.* Phytochemistry, Pharmacology and Medicinal Uses of Plants of the Genus Salix: An Updated Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.

TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAU, J.; LIBERT, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763–778, 16 abr. 2018.

VELOSO, C. C. *et al.* Pharmacological potential of Maytenus species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 533–540, jul. 2017.

VELOSO, C. DE C. *et al.* Tingenone, a pentacyclic triterpene, induces peripheral antinociception due to opioidergic activation. **Planta Medica**, v. 80, n. 17, p. 1615–1621, nov. 2014.

VILLAR-LORENZO, A. *et al.* Friedelane-type triterpenoids as selective anti-inflammatory agents by regulation of differential signaling pathways in LPS-stimulated macrophages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 313, p. 57–67, 15 dez. 2016.

WAGHOLE, R. J. *et al.* In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of Tetrastigma sulcatum leaf extract, pure compound and its derivatives. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 291–311, fev. 2022.

WANG, M. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. **Nutrition & Metabolism**, v. 2, p. 3, 2 fev. 2005.

WAUTIER, J.-L.; WAUTIER, M.-P. Endothelial Cell Participation in Inflammatory Reaction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6341, 13 jun. 2021.

WHAYNE, T. F. Clinical Use of Digitalis: A State of the Art Review. **American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions**, v. 18, n. 6, p. 427–440, dez. 2018.

WOO, S.-D.; LUU, Q. Q.; PARK, H.-S. NSAID-Exacerbated Respiratory Disease (NERD): From Pathogenesis to Improved Care. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1147, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**. Geneva: World Health Organization, 2013.

XIAO, L.; LIU, Y.; WANG, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 3, p. H317–H325, fev. 2014.

YANG M.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; LIN, J.; ZENG J.; XU, Z. Inhaled corticosteroids and risk of upper respiratory tract infection in patients with asthma: a meta-analysis. Infection, v. 47, p. 377-385, 2019.

YOKOMIZO, T.; SHIMIZU, T. The leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 as potential therapeutic targets. **Immunological Reviews**, 13 mar. 2023.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHANG, L. *et al.* Phytochemicals and biological activities of species from the genus Maytenus. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 4, p. 575–606, abr. 2020.

ANEXOS

Anexo A – Certificado de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de animais da UFMG (CEUA)

UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo in vivo e in vitro do potencial farmacológico do triterpenóide pentacíclico 29-hidroxifriedelan-3-ona isolado do galho da Maytenus gonoclada Mart. (Maytenus robusta Reissek) na resposta imune inata experimental induzida por LPS", protocolo do CEUA: 33/2023 sob a responsabilidade de Andre Klein que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/03/2023.