

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LARISSA JEREMIAS DUARTE

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO
PELARGONIDINA-3-O-GLICOSÍDEO**

Florianópolis
2017

Larissa Jeremias Duarte

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO
PELARGONIDINA-3-O-GLICOSÍDEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Concentração Análises Clínicas, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Duarte, Larissa Jeremias
MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTI
INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO PELARGONIDINA-3-O-GLICOSÍDEO /
Larissa Jeremias Duarte ; orientador, Eduardo Monguilhott
Dalmarco - Florianópolis, SC, 2017.
115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Inflamação. 3. RAW 264.7. 4. Fragaria x
ananassa Duch. 5. Pelargonidina-3-O-glicosídeo. I. ,
Eduardo Monguilhott Dalmarco. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.


**“MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS
NA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
COMPOSTO Pelargonidina-3-O-glicosídeo”**

POR


Larissa Jeremias Duarte

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

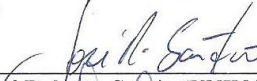
Banca Examinadora:



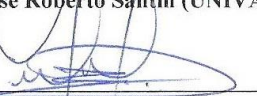
Prof(a). Dr(a). Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Alexandre Sherley Cassimiro Onofre (UFSC –
Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). José Roberto Santin (UNIVALI – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC –
Orientador(a))



Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 10 de março de 2017.

Dedico este trabalho aos meu pais,
Fulgêncio e Marilene, que sempre
me apoiaram e incentivaram meu
crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde e força para perseguir os meus sonhos, por guiar os meus passos e colocar pessoas incríveis no meu caminho.

Agradeço à mais maravilhosa mãe deste mundo, Marilene Jeremias. Minha melhor amiga, meu exemplo e minha maior incentivadora. Obrigada por me dar a vida e por ser a luz da minha estrada. Eu te amo incondicionalmente.

Agradeço ao meu amado pai, Fulgêncio de Amorim Duarte. Obrigada por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu não acreditei, pelos ensinamentos e conselhos, por me dar todo suporte emocional e financeiro durante a minha vida, em todas as minhas escolhas. Ao senhor, a minha eterna gratidão e amor.

Agradeço ao meu namorado, Alysson da Rocha Ferreira, por todo o incentivo nos meus momentos de dúvida, por ser a minha paz nas horas difíceis, por me ouvir durante horas e horas falando sobre o laboratório, morango, ciência e afins. Sou e serei eternamente grata pelo teu colo, teu apoio, teu amor, tua compreensão e tua companhia em todos os momentos. Obrigada por ser o meu melhor amigo e o meu amor. Eu te amo muito.

À minha madrinha, Cristiane Jeremias, por ser uma das minhas maiores incentivadoras e ter sido a minha inspiração para a realização deste Mestrado. Te amo.

Ao meu avô, Fernando Isaías Duarte, que mesmo tendo feito apenas até o ensino fundamental, foi a pessoa que mais me ensinou o quão importante é o estudo. Obrigada, vô.

Aos meus familiares – tios, tias, primos, primas, avó e avô – que, mesmo não estando sempre por perto, torcem muito pelo meu sucesso e minha felicidade. Amo vocês.

A todas as minhas amigas, em especial: Ana Carolina Bordin, Ana Beatriz Mello, Sara Feltrin e Maria Eduarda Klingelfus, por entenderem meus momentos de ausência durante estes dois anos e por estarem sempre à disposição de ajudar. Obrigada por serem tão especiais, amo vocês.

À Lua, minha cadelinha amada, por ser a minha companheira de todas as horas, principalmente as de estudos, e por me dar amor incondicional. Obrigada, bebê.

Agradeço a todos os meus companheiros do Laboratório de Pesquisa em Imunologia pelos ensinamentos e pela troca de experiências. Em especial à Ana Beatriz Gobbo e ao Marcus Vinícius, por estarem sempre dispostos a me ajudar e por disponibilizarem seus tempos livres para me passar o conhecimento de vocês. Muito obrigada.

Meu muito obrigada ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de ser sua aluna de pós-graduação. Obrigada por todo tempo disponibilizado e pelos ensinamentos. Agradeço também à Prof. Tânia Fröde, pelo conhecimento, infraestrutura e por possibilitar a minha formação.

Agradeço, ainda, à CAPES, pelo apoio financeiro, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia por todo o suporte dado durante o meu mestrado.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

(Marie Curie)

RESUMO

Fragaria x ananassa Duch., conhecida como morango-de-jardim, é consumida mundialmente *in natura* ou na forma de sucos, geleias e iogurtes produzidos pela indústria alimentícia. Diversos estudos têm demonstrado que o morango pode ter importantes atividades biológicas, como antioxidante, anti-hipertensivo e também anti-inflamatório. Neste sentido, avaliamos o efeito anti-inflamatório do extrato dos frutos de *Fragaria x ananassa* e seu principal composto, a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (P3G), analisando seus efeitos na migração de leucócitos, níveis de exsudação, atividades da mieloperoxidase (MPO), adenosina desaminase (ADA), concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), fator de necrose tumoral-*alfa* (TNF- α) e de interleucina-6 (IL-6), utilizando o modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Também foi realizado um estudo *in vitro* para identificar a ação específica de P3G em proteínas cinases ativados por mitógeno (p38^{MAPK}), cinase c-Jun N-terminal (JNK^{MAPK}), fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1). Para realização dos ensaios *in vivo*, os frutos congelados de morangos foram sonicados com 25 mL de metanol acidificado (HCl 1%) durante 75 minutos. Os extratos foram filtrados, e o solvente evaporado sob pressão reduzida até à *secura* produzindo o extrato bruto (EB). O composto majoritário presente no EB (P3G) foi utilizado nos experimentos, em forma de padrão obtido a partir de fonte comercial (Sigma-Aldrich, Co.). Em ambos os experimentos a dexametasona (Dex) foi utilizada como medicamento de referência anti-inflamatório. Na análise estatística, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que o EB e P3G foram capazes de reduzir todos os parâmetros inflamatórios avaliados no modelo da pleurisia induzida pela carragenina ($p < 0,05$) e também na cultura celular de macrófagos murinos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) ($p < 0,01$), com exceção para a P3G, que não causou inibição na fosforilação da p38^{MAPK}. Além disso, foi demonstrado que o mecanismo molecular desse efeito, envolve a inibição da ativação de I κ B- α ($p < 0,05$) e a redução da fosforilação de JNK^{MAPK} ($p < 0,01$). Esses efeitos levaram a uma redução da ativação do NF- κ B ($p < 0,05$) e do AP-1 ($p < 0,001$), dois fatores de transcrição de destaque na cascata inflamatória desencadeada pela ativação do receptor de membrana Toll-like tipo 4 (TLR4). Esses resultados sugerem que o composto testado é um potencial candidato para

o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios para utilização em patologias nas quais essa via exerce um papel de destaque.

Palavras-chave: Inflamação, Raw 264.7, pleurisia, morango, pelargonidina-3-*O*-glicosídeo.

ABSTRACT

Molecular mechanisms involved in the anti-inflammatory activity of the compound Pelargonidin-3-O-glucoside.

Fragaria x ananassa Duch., known as garden strawberry, is worldwide consumed *in natura* or in the form of juices, jams or yogurts produced by the food industry. Studies have shown that strawberry may have important biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory and antihypertensive. We therefore evaluated the anti-inflammatory effect of *Fragaria x ananassa* fruit extract and its major compound, pelargonidin-3-O-glucoside (P3G), analyzing its effect on leukocyte migration, exudation levels, myeloperoxidase (MPO), adenosine deaminase (ADA) activities and nitric oxide (NO_x), tumoral necrosis factor (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) levels, using an *in vivo* murine model of pleurisy. We also have carried out an *in vitro* study to identify the specific action of P3G in p38 mitogen-activated protein kinase (p38^{MAPK}), c-Jun N-terminal kinase (JNK^{MAPK}), nuclear transcript factors κ B (NF- κ B) and activated protein 1 (AP-1). To this end, the plant material was subjected to extraction. Briefly, frozen fruits of strawberry were sonicated with 25 mL of acidified (HCl 1%) methanol for 75 minutes. The extracts were filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure to dryness yielding the crude extract (CE). The major compound present in CE (P3G) was used in our experiments as a standard obtained from commercial source (Sigma-Aldrich, Co.). In *in vivo* experiments, all inflammatory parameters were assessed 4 hours after pleurisy induction. In all of these work procedures, dexamethasone (Dex 0.5 mg / kg, p.o.) was used as anti-inflammatory reference drug. In *in vitro* experiments, the inflammatory parameters were measured by Western Blot, also using dexamethasone as reference drug (Dex 7 μ M). For statistical analysis, we used the analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls post-hoc test. P values < 0.05 were considered significant. The results presented in our study demonstrated that the crude extract (CE), and P3G are able to reduce the inflammatory parameters evaluated in the murine model of pleurisy (p < 0,05), and also in the cell culture of murine macrophages (p < 0,01), except for P3G, that did not cause inhibition in p38^{MAPK} phosphorylation. Moreover, we demonstrated that the molecular mechanism of this effect involves the arrest of I κ B- α activation (p < 0,05) and reduction in JNK^{MAPK} phosphorylation (p < 0,01). These effects lead to a reduction in NF- κ B (p

< 0,05) and AP-1 activation ($p < 0,001$) of the transcription factors conductors of the inflammatory pathway triggered by the activation of TLR4. These results suggests that the tested compound is a potential candidate for a development of anti-inflammatory agent to treat diseases in which this pathway exerts a pivotal role.

Keywords: Inflammation, Raw 264.7, pleurisy, strawberry, pelargonidin-3-*O*-glucoside.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.....	31
Figura 2 - Fórmula estrutural da pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo.....	33
Figura 3 - Formação de agentes oxidantes pela enzima MPO	37
Figura 4 - Vias de formação e ação da adenosina	39
Figura 5 - Formação e efeitos do óxido nítrico na inflamação.....	41
Figura 6 - Via canônica de ativação do NF- κ B	44
Figura 7 - Cascata de sinalização das MAPK e ativação do AP-1	48
Figura 8 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida por carragenina em camundongos	50
Figura 9 - Esquema da curva dose-resposta utilizando modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos	60
Figura 10 - Cromatograma de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	69
Figura 11 - Espectro de massas (EM), massas/massas (EM/EM) e estrutura química da pelargonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo.	70
Figura 12 - Citotoxicidade celular em macrófagos Raw 264.7 após exposição a diferentes doses de P3G.....	75
Figura 13 - Efeito da P3G na produção de NO _x , TNF- α e IL-6, em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.	77
Figura 14 - Efeito da P3G na fosforilação de p38 ^{MAPK} em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.....	79
Figura 15 - Efeito da P3G na fosforilação de JNK ^{MAPK} em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.....	80
Figura 16 - Efeito da P3G sobre a via de ativação do NF- κ B em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS	82
Figura 17 - Efeito da P3G na translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B, induzida por LPS em macrófagos Raw 264.7.	84

Figura 18 - Efeito da P3G na ativação do fator de transcrição AP-1 em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.....	86
Figura 19 - Resumo gráfico do mecanismo molecular responsável pelo efeito anti-inflamatório da P3G.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação de antocianinas no extrato de <i>Fragaria x ananassa</i>	71
Tabela 2 - Efeito do extrato bruto (EB) de <i>Fragaria x ananassa</i> e P3G sobre o influxo de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação no lavado pleural, em modelo animal de pleurisia induzida por carragenina (Cg)	72
Tabela 3 - Efeitos do extrato bruto (EB) de <i>Fragaria x ananassa</i> e P3G sobre as atividades de MPO, ADA, concentrações de NOx e níveis de TNF- α e IL-6 no lavado pleural em modelo animal de pleurisia induzida por carragenina (Cg).....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA: adenosina desaminase
ADP: adenosina difosfato
AMP: adenosina monofosfato
AMPC: adenosina monofosfato cíclico
AMT: antocianinas monoméricas totais
ANOVA: análise de variância
AP-1: proteína ativadora 1
ATF 1/2/6: fatores ativadores de transcrição dependentes de AMP
ATP: adenosina trifosfato
BAFFR: receptor ativador para fator nuclear *kappa* B
BHA: hidroxí-butil-anisol
BHT: hidroxí-butil-tolueno
c-Rel - subunidade (c-Rel) do fator nuclear NF- κ B
CD40: *cluster* de diferenciação 40
Cg: carragenina
CKII: caseína cinase II
CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COX-2: ciclooxigenase 2
DDIT3: fator de transcrição induzido por dano ao DNA 3
DMSO: dimetil sulfóxido
DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica
EB: extrato bruto
EM: espectrometria de massas
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular
ERN: espécies reativas de nitrogênio
EROs: espécies reativas de oxigênio
FBBB: Fast Blue BB
FC: Folin-Ciocalteu
FGF: fator de crescimento fibroblástico
GSK-3 β : glicogênio cinase sintase 3 β

HTAB: brometo de hexadecil-trimetilamônio
IC₅₀: concentração inibitória 50%
IκBα: subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF-κB
IKK: proteína inibitória *kappa* B cinase
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
JNK: cinase c-Jun N-terminal
LSP1: proteína específica de linfócitos 1
LPS: lipopolissacarídeo
LTβR: receptor beta de linfotóxina
MAF: fibrosarcoma musculoaponeurótico
MAPK: proteínas cinases ativadas por mitógenos
MAPKK: proteína cinase dupla induzida por mitógeno
MAPKK3: proteína cinase dupla induzida por mitógeno 3
MAPKK6: proteína cinase dupla induzida por mitógeno 6
MCP-1: proteína quimiotática de monócitos 1
MEF-2: fator otimizador de miócitos 2
MEF-2C: fator otimizador de miócitos 2C
MNK1: cinase interativa com MAPKs
MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB: fator de transcrição nuclear *kappa* B
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NOS: óxido nítrico sintase
NOx: metabólitos do óxido nítrico
●O₂⁻: ânion superóxido
O₂: oxigênio molecular
●OH: radical hidroxila
p50: subunidade (p50) do fator nuclear NF-κB
p65: subunidade (p65) do fator nuclear NF-κB
PGE₂: prostaglandina E₂
RAW 264.7: Linhagem celular murina
RelA: subunidade (RelA) do fator nuclear NF-κB
RelB: subunidade (RelB) do fator nuclear NF-κB
RSK2: ribossomal S6 cinase 2

Sal: solução de salina estéril
SAPK: proteína cinase ativada por estresse
SOD: superóxido dismutase
SRF: fator de resposta sérica
TAT: teores de antocianinas totais
TFT: teores de fenólicos totais
TGF: fator de crescimento transformador
TGF- β : fator de crescimento transformante *beta*
TLR-4: receptores tipo Toll-like 4
TLR-9: receptores tipo Toll-like 9
TNF- α : fator de necrose tumoral *alfa*
TNFR1: receptor 1 de TNF- α
TNFR2: receptor 2 de TNF- α
TTP: tristetraprolina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. PRODUTOS NATURAIS	29
1.2. <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.....	30
1.3. ANTOCIANINAS	32
1.4. PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	33
1.4.1. NEUTRÓFILOS.....	34
1.4.2. MONONUCLEARES	35
1.4.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	35
1.4.3.1. MIELOPEROXIDASE (MPO)	35
1.4.3.2. ADENOSINA DESAMINASE (ADA).....	37
1.4.3.3. ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	39
1.4.4. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS	41
1.4.4.1. FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR <i>kappa</i> B (NF- κ B)	42
1.4.4.2. PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENO p38 (p38 ^{MAPK}).....	45
1.4.4.3. PROTEÍNA CINASE c-Jun N-terminal (JNK ^{MAPK})	46
1.4.4.4. PROTEÍNA ATIVADORA-1 (AP-1)	47
1.5. MODELO DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	49
2. OBJETIVOS.....	51
2.1. OBJETIVO GERAL.....	51
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1. EXPERIMENTAÇÃO FARMACOGNÓSTICA.....	53
3.1.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	53
3.1.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO	53

3.1.3. OBTENÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO	54
3.1.4. ANÁLISE DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)....	54
3.1.5. ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS (TAT)	55
3.1.6. IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS POR CLUE/PDA/EM/EM	57
3.2. EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	58
3.2.1. ANIMAIS.....	58
3.2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	58
3.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL CELULAR	60
3.2.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXSUDATO	61
3.2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	61
3.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ADENOSINA DESAMINASE (ADA).....	62
3.2.7. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO _x)	62
3.2.8. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF- α E IL-6).....	63
3.3. EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	64
3.3.1. CULTURA CELULAR E ESTIMULAÇÃO COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	64
3.3.2. CITOTOXICIDADE.....	64
3.3.3. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO _x) <i>in vitro</i>	65
3.3.4. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF- α e IL-6) <i>in vitro</i>	65
3.3.5. PREPARAÇÃO DO EXTRATO TOTAL DE CÉLULAS E EXTRATOS CITOSÓLICOS E NUCLEARES	65

3.3.6. WESTERN BLOT.....	66
3.3.7. FÁRMACOS E REAGENTES	66
3.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4. RESULTADOS	69
4.1. <i>Primeira Parte - ANÁLISE FITOQUÍMICA (Teor de P3G)...</i>	69
4.2. <i>Segunda Parte - RESULTADOS IN VIVO (Efeito Anti-inflamatório).....</i>	71
4.2.1. EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE <i>Fragaria x ananassa</i> E P3G SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS, MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E EXSUDAÇÃO NO LAVADO PLEURAL	71
4.2.2. EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE <i>Fragaria x ananassa</i> E P3G SOBRE AS ATIVIDADES DE MPO, ADA E CONCENTRAÇÕES DE NO _x NO LAVADO PLEURAL	73
4.2.3. EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE <i>Fragaria x ananassa</i> E P3G SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α e IL-6 NO LAVADO PLEURAL	73
4.3. <i>Terceira Parte - RESULTADOS IN VITRO (Mecanismo molecular da P3G)</i>	75
4.3.1. CITOTOXICIDADE DA P3G	75
4.3.2. EFEITO INIBITÓRIO DA P3G NA PRODUÇÃO DE NO _x , TNF- α E IL-6, EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS	76
4.3.3. EFEITO INIBITÓRIO DA P3G NA FOSFORILAÇÃO DE MAPKs EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS	77
4.3.4. EFEITO INIBITÓRIO DA P3G SOBRE A VIA DE ATIVAÇÃO DO NF- κ B EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS	81
4.3.5. EFEITO DA P3G NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κ B, INDUZIDA POR LPS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7	83

4.3.6. EFEITO DA P3G NA ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO AP-1 EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS.....	85
5. DISCUSSÃO	87
6. CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE A – TRABALHO DESENVOLVIDO.....	113
ANEXO I	115

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS

O potencial das espécies vegetais como fonte de novos fármacos não é novidade. O estudo das plantas oferece um grande campo para investigação científica, além disso, nos dias atuais observa-se um renascimento do interesse da utilização de produtos naturais para o tratamento de doenças. Estima-se que, das aproximadamente 300 mil espécies de plantas existentes, apenas 6% foram investigadas farmacologicamente e 15% fitoquimicamente (CRAGG; NEWMAN, 2013). O grande número de compostos derivados de plantas, hoje presente em vários estágios de estudos clínicos, indicam que a investigação científica dos produtos naturais ainda é, e se mantêm como fonte de novos candidatos a fármacos (MISHRA; TIWARI, 2011; SCHMIDT et al, 2008; RISHTON, 2008).

Compilações de estudos desenvolvidos nas décadas passadas apontam que entre os anos de 1981 a 2010, surgiram cerca de 297 novas moléculas bioativas naturais de um total de 1130, destinados às mais diversas indicações, provenientes e/ou que tiveram suas estruturas químicas baseadas em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). A descoberta de moléculas bioativas advindas dos produtos naturais não é realmente uma novidade, fato é que o perfil de desenvolvimento de fármacos atual é apenas o resultado da política de pesquisa mundial por moléculas de origem vegetal que se estende desde o aparecimento dos primeiros fármacos no mercado mundial para uso humano. Algumas grandes descobertas provenientes da flora mundial perduram até os dias atuais, como por exemplo a descoberta do agente anti-hipertensivo reserpina, dos antimaláricos quinina e artemisina, do β -agonista efedrina, vincristina e vimblastina com propriedades anticâncer, entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2013). Diante disso, investir no conhecimento da biodiversidade é de primordial importância para que o patrimônio genético brasileiro seja conservado e utilizado de forma racional.

A constante busca de novas substâncias que possuam potencial atividade biológica, bem como a obtenção de novas estruturas químicas que possam resultar em futuros fármacos são além de interesse para a indústria farmacêutica, os atuais objetivos das pesquisas na área de plantas medicinais.

Desde a antiguidade, os produtos naturais têm sido amplamente utilizados como matérias-primas de medicamentos (GOSSLAU et al., 2011; MISHRA; TIWARI, 2011). Atualmente, continuam representando a fonte mais importante de diversidade química para a descoberta de novos protótipos para a terapêutica de diversas doenças (KINGSTON, 2011; NEWMAN, CRAGG, 2012; CRAGG, NEWMAN, 2013). Na medicina tradicional, principalmente os extratos de plantas têm sido utilizados no tratamento de diversas doenças de caráter inflamatório, infeccioso, entre outros (PETRONILHO et al., 2012).

O interesse em medicamentos derivados de plantas (fitoterápicos) tem aumentado significativamente em todo o mundo. Esse interesse é especialmente observado nos países desenvolvidos, principalmente em alguns países europeus e nos Estados Unidos. Dados financeiros relativos à décadas passadas citam que o mercado global para esta classe de medicamentos atingiu 20 bilhões de dólares anualmente (CALIXTO, 2000). De maneira notável, os compostos derivados de plantas são atualmente empregados na terapia moderna, além de desempenhar um papel importante para a síntese de algumas moléculas mais complexas. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis provêm de fontes naturais (plantas e microrganismos). Em algumas áreas da terapêutica, como a oncologia, a quantidade de medicamentos derivados de plantas atinge 60% (CALIXTO, 2000; NEWMAN; CRAGG, 2012; CRAGG; NEWMAN, 2013; MISHRA; TIWARI, 2011).

1.2. *Fragaria x ananassa* Duch.

O morangueiro é uma planta pertencente à família das Rosáceas e ao gênero *Fragaria*, sendo que a variedade atualmente utilizada na alimentação humana é um híbrido resultante do cruzamento espontâneo das espécies *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana* (CALVETE et al., 2008). Os morangos são frutos falsos, sobre os quais se encontram os aquênios, que são os frutos verdadeiros (SANHUEZA et al., 2005). Os frutos verdadeiros são pequenos, duros e superficiais, comumente considerados como sementes (CAMARGO; PASSOS, 1993). Barroso et al. (1999) classificam os seus frutos em “frutos múltiplos”, esses quando maduros têm até cinco centímetros de diâmetro e a coloração pode ser rosada, vermelha ou púrpura (**Figura 1**).

Figura 1 - *Fragaria x ananassa* Duch.



Fonte: pfaf.org
(<http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Fragaria+x+ananassa>)
(Consultado em: 27 de janeiro de 2017).

O cultivo do morangueiro é mundial, porém os principais produtores são China, Estados Unidos, México, Turquia e Espanha (FAO, 2013). No Brasil, os estados com maior produção são Minas Gerais (40%), Rio Grande do Sul (25%) e São Paulo (15%), embora outros, como Santa Catarina e Paraná estejam aumentando sua produção (ANTUNES; PERES, 2013). Estima-se que a produção anual brasileira esteja na faixa de 105.000 toneladas (ANTUNES; REISSER, 2007).

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) está entre os frutos mais populares, sendo a espécie de maior expressão entre as pequenas frutas, consumido in natura ou na forma de produtos manufaturados (OLIVEIRA; NINO; SCIVITTARO, 2005). Rico em vitaminas e minerais, possui elevado poder antioxidante, associado aos componentes fenólicos, aos pigmentos e também às altas quantidades de ácido elágico, ácido fólico e ácido ascórbico. Vários estudos têm mostrado que o morango apresenta elevada atividade antioxidante, a qual está relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos, que são produzidos pelas plantas, em resposta a estresses causados por fatores edafoclimáticos ou mesmo

por agressores, como insetos, microrganismos, entre outros (HEINONEN; MEYER; FRANKEL, 1998; VINSON et al., 2001; SUN et al., 2002; ZHANG et al., 2008; KEUTGEN; PAWELZIK, 2007).

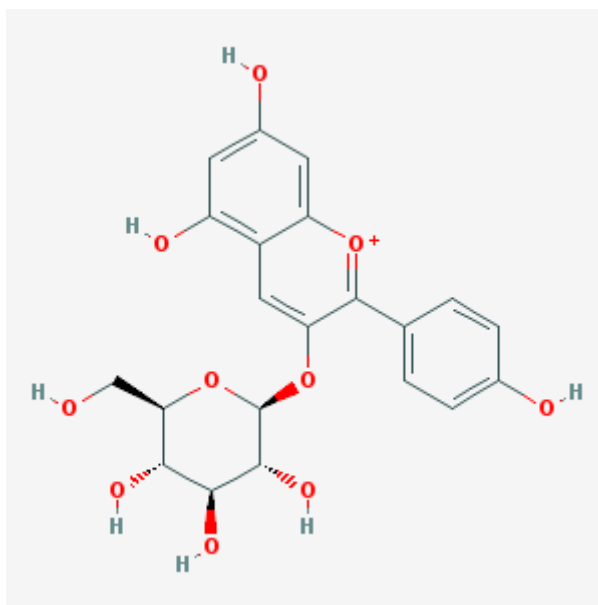
Os metabólitos secundários presentes em *F. ananassa* são representados, na sua grande maioria, por compostos fenólicos, majoritariamente por flavonóides, em que os principais representantes são as antocianinas e flavonóis. Ainda são encontrados em grandes concentrações taninos hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavanóis (AABY et al., 2012; GIAMPIERI et al., 2013; GIAMPIERI et al., 2012). Comparado a outras frutas, tais como ameixa, laranja, uva vermelha, kiwi, toronja rosa, uva branca, banana, maçã, tomate, pêra e melão, Wang, Cao e Prior (1996), verificaram que o morango apresentou a maior atividade antioxidante total. Em outro estudo, o morango apresentou atividade antioxidante de 2 a 11 vezes maior do que maçã, pêssego, pêra, uva, tomate, laranja e kiwi (SCALZO et al., 2005).

1.3. ANTOCIANINAS

As antocianinas são pigmentos solúveis em água que têm despertado grande interesse da indústria alimentícia, com o intuito de utilizá-los como substitutos aos corantes sintéticos, os quais podem ser altamente tóxicos à saúde humana (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; VALLS et al., 2009). São potentes antioxidantes, chegando a superar antioxidantes alimentícios clássicos, como hidroxibutilanisol (BHA), hidroxibutiltolueno (BHT) e tocoferol (FUKUMOTO; MAZZA, 2000; WANG; CAO; PRIOR, 1997). A atividade antioxidante das antocianinas é responsável pela prevenção de diversas patologias, como câncer e doenças cardíacas, ambas relacionadas ao estresse oxidativo (BUENO et al., 2012; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; VALLS et al., 2009).

Entre as antocianinas presentes nos morangos, a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo representa mais de 80% do total de antocianinas encontradas, seguida pela cianidina-3-*O*-glicosídeo e pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo, sendo que estas três estruturas compreendem mais de 95% da totalidade das antocianinas (BRIDLE; VIGUERA; BARBERAN, 1995; DA SILVA et al., 2007; GIAMPIERI et al., 2013; LUKTON; CHICHESTER; MACKINNEY, 1955; WICKLUND et al., 2005) (**Figura 2**).

Figura 2 - Fórmula estrutural da pelargonidina-3-O-glicosídeo



Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443648#section=Top>).
 (Consultado em: 16 de março de 2017).

Muitos trabalhos reportam diferentes atividades biológicas para os morangos e, especialmente, para as antocianinas, dentre as quais podemos citar a prevenção de processos inflamatórios, estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer, diabetes tipo 2, obesidade e doenças neurodegenerativas (GIAMPIERI et al., 2015).

1.4. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta imune que permite a sobrevivência durante a infecção ou lesão e mantém a homeostase do tecido sob uma variedade de condições nocivas (MEDZHITOV, 2010). O termo inflamação, proveniente do latim *inflammare*, foi primeiramente utilizado por Celsus há cerca de 2000 anos, o qual documentou os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. No século 19, Virchow caracterizou o quinto sinal cardinal: perda de função.

O processo inflamatório compreende uma série de eventos celulares e metabólicos, bem como a liberação de mediadores químicos e enzimas, tais como: aumento da permeabilidade vascular decorrente da vasodilatação existente, exsudação, migração de leucócitos, formação e liberação de espécies reativas, angiogênese, liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, apoptose celular, entre outros (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). Em princípio, a inflamação pode ser controlada em quatro níveis: indutores, sensores, mediadores e tecidos alvo (MEDZHITOV, 2010).

Mediadores como a histamina, prostaglandinas e o óxido nítrico são capazes de agir na musculatura lisa vascular e promover a vasodilatação, o qual aumenta o fluxo sanguíneo. Histamina e leucotrienos atuam em células endoteliais a fim de aumentar a permeabilidade vascular, permitir o extravasamento de proteínas e facilitar a transmigração de leucócitos. Por fim, algumas citocinas, como o fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) e a interleucina 1 *beta* (IL-1 β), aumentam a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e, sendo assim, contribuem para o recrutamento dos mesmos (NEWTON; DIXIT, 2012). Células do sistema imune inato residentes do tecido, tais como macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células dendríticas, bem como leucócitos circulantes, incluindo monócitos e neutrófilos, são capazes de reconhecer patógenos ou dano celular e responder a eles direta ou indiretamente (NEWTON; DIXIT, 2012).

1.4.1. NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação e fazem parte da primeira linha de defesa em uma resposta inflamatória aguda. Diferentemente do que acontece em humanos, os neutrófilos de camundongos correspondem a apenas 10% a 25% dos leucócitos circulantes. Entretanto, em ambos, esses têm por função a destruição ou bloqueio do agente causador da inflamação por meio de diversos mecanismos (JAILLON et al., 2013), e são classicamente caracterizados pela sua capacidade fagocítica, liberação de enzimas líticas de seus grânulos e produção de espécies reativas com potencial antimicrobiano (MANTOVANNI et al., 2011). Eles possuem três tipos de grânulos no seu citoplasma, e cada um contém proteínas específicas: grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e grânulos terciários (gelatinase), além das vesículas secretórias. No interior dos grânulos primários, há enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos e dentre

eles destacam-se a mieloperoxidase (MPO) (BORREGAARD, 2010; HOSTETTER, 2012).

1.4.2. MONONUCLEARES

Em uma fase mais tardia do processo inflamatório há o envolvimento de outras células importantes do sistema imune: os monócitos/macrófagos. Eles, além de desempenharem importante função na imunidade inata e adaptativa, exibem três funções principais, tais como: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação (AUFFRAY, SIEWEKE, GEISSMANN, 2009).

Os monócitos, após migrarem para o tecido, se diferenciam em macrófagos e, uma vez ativados, têm a capacidade de secretar citocinas, quimiocinas, e óxido nítrico (NO) (DALE; BOXER; LILES, 2008). Podem ser desativados principalmente pela interleucina-10 (IL-10), fator transformante de colônias *beta* (TGF- β) e pela redução das citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

1.4.3. MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

1.4.3.1. MIELOPEROXIDASE (MPO)

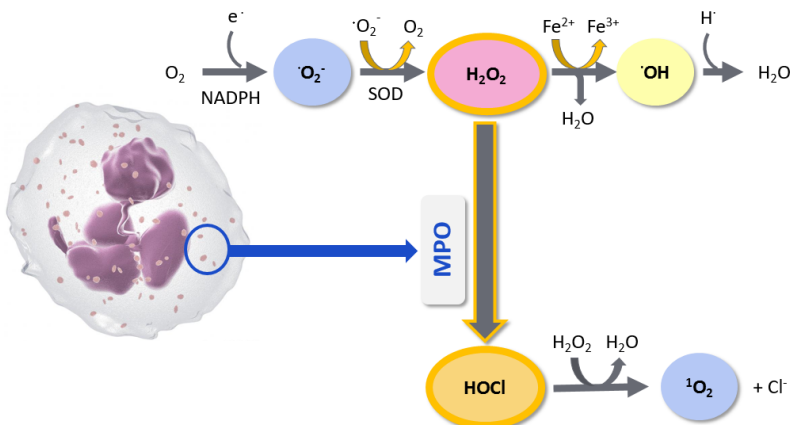
Uma vez ativados os neutrófilos, e em menor proporção os mononucleares, há liberação e aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), responsável por converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ácido hipocloroso (HOCl), esse com potencial ação antimicrobiana e na resposta imune inata (PROKOPOWICZ et al., 2012). Essa enzima foi primeiramente descrita por Agner em 1941 sendo detectada em uma diversidade de doenças inflamatórias. Ela está armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e é liberada tanto no fagossoma, após a fagocitose de patógenos, quanto para o meio extracelular após a ativação da célula (NUSSBAUM et al., 2013).

A MPO é uma protease presente nos grânulos azurófilos e tem importante participação no mecanismo da resposta imune devido a formação de substâncias oxidantes microbicidas e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MALLE et al., 2007).

A avaliação da atividade da MPO é uma ferramenta útil para avaliar de maneira indireta a presença de neutrófilos ativados no sítio de inflamação, lembrando que tal enzima pode ser encontrada em enfermidades respiratórias graves como a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MAK, 2008; MONTESEIRÍN, 2009).

Durante a fagocitose, ocorre a ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase (NADPH) que está envolvida na produção de EROs. A NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular ao radical ânion superóxido que é convertida em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase (SOD), o qual destrói as bactérias diretamente, ou após a sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso (HOCl) (KLEBANOFF, 2005). O HOCl é capaz de lesionar as células devido a reações de halogenação e nitração em lipídeos, ácido desoxirribonucleico (DNA) e em lipoproteínas (MALLE et al., 2007). Além disso, a liberação da MPO e das EROs geradas para o exterior da célula podem lesionar os tecidos adjacentes (KLEBANOFF, 2005) (**Figura 3**).

Figura 3 - Formação de agentes oxidantes pela enzima MPO



As enzimas responsáveis pela geração de H_2O_2 , no momento da ativação do neutrófilo no processo de fagocitose, são a NADPH oxidase e a SOD. Esse produto gerado é substrato para a MPO que age convertendo H_2O_2 em HOCl, substância com importante atividade microbicida. Cl^- : cloreto; e^- : elétron; H^+ : hídrion; H_2O : água; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; MPO: mieloperoxidase; NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase; $\bullet O_2^-$: ânion superóxido; O_2 : oxigênio molecular; $\bullet OH$: radical hidroxila; SOD: superóxido dismutase. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de Winterbourn e Kettle (2013).

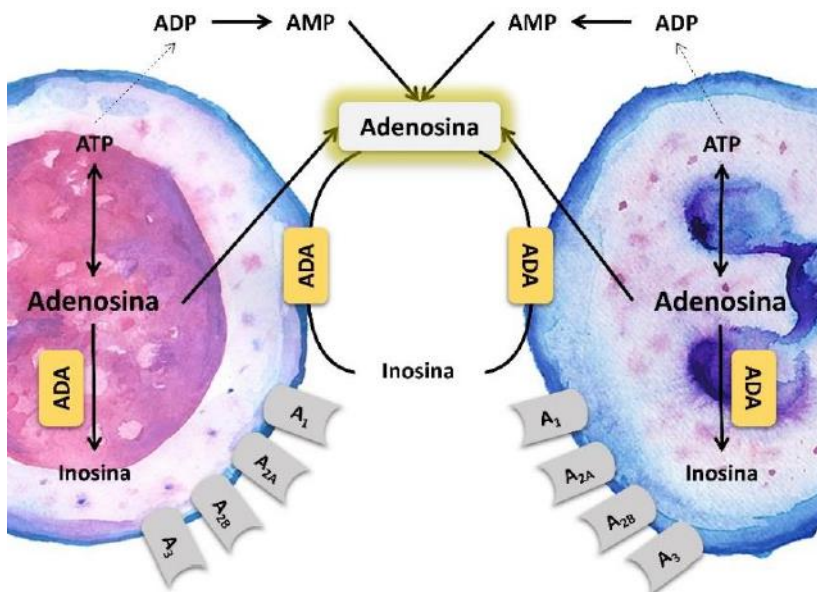
1.4.3.2. ADENOSINA DESAMINASE (ADA)

Outra enzima também envolvida na resposta inflamatória é a adenosina desaminase (ADA). Essa enzima participa do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a desaminação da adenosina em inosina (KRENKE; KORCZYŃSKI, 2010) (**Figura 4**). Ela é liberada por vários tipos celulares, mas com destaque para os linfócitos ativados e desempenha papel importante nos sistemas cardíaco, renal, hepático e respiratório. Seu efeito biológico depende do tipo de receptor ao qual se liga (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) e a concentração de adenosina existente (KUMAR; SHARMA, 2009; ANTONIOLI et al., 2012). Esses receptores são diferenciados de acordo com a afinidade pela adenosina e estão presentes em diversas células, como as células do sistema imune e das vias aéreas (FREDHOLM et al., 2011).

A adenosina possui efeitos tanto pró quanto anti-inflamatórios (FRICK et al., 2009; ANVARI et al., 2010). Em neutrófilos, por exemplo, quando a adenosina se liga em receptores A_{2A} , A_{2B} e A_3 há uma diminuição da adesão destes leucócitos a células do endotélio, assim como a diminuição da produção de ânions superóxidos, tendo então atividade anti-inflamatória. Já ao se ligar a receptores do tipo A_1 nesta célula um aumento na expressão de moléculas de adesão ocorre, sendo esta uma resposta pró-inflamatória (KUMAR; SHARMA, 2009).

A adenosina desempenha papel central na modulação da resposta inflamatória em doenças pulmonares crônicas, artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais e sepse (ANTONIOLI et al., 2012).

Figura 4 - Vias de formação e ação da adenosina



Diversos tipos celulares estão envolvidos na síntese de adenosina. A mesma pode ser produzida intracelularmente e exportada para o espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos, ou ainda pode ser resultado da degradação extracelular de nucleotídeos de adenina liberados (ATP e/ou ADP). Quando liberada, age em diferentes receptores (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃). A enzima ADA exerce a função de gerar inosina a partir de adenosina tanto a nível extracelular quanto intracelular. ADA: adenosina desaminase; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; ATP: adenosina trifosfato. Fonte: Adaptado de Antonioli et al. (2014).

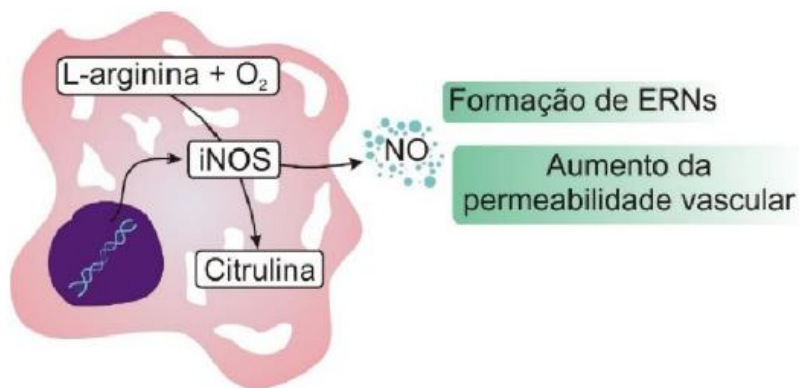
1.4.3.3. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Outro mediador participante do processo inflamatório e que deve ser citado é o óxido nítrico (NO), que é um gás solúvel, liberado principalmente por células endoteliais e macrófagos. Ele está envolvido em diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, inflamação, neurotransmissão e apoptose. É, além disso, um importante vasodilatador que participa da resposta imune inata e/ou específica (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007; WANG et al., 2010).

O óxido nítrico é liberado a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (GHOSH; ERZURUM, 2011) (**Figura 5**). São conhecidas pelo menos três isoformas desta enzima: duas são constitutivas, presentes em condições fisiológicas – neuronal (nNOS, NOS1) e endotelial (eNOS, NOS3), e a terceira isoforma é conhecida como NOS induzida (iNOS, NOS2), liberada quando ocorre estímulo, como por exemplo o processo inflamatório, vírus, bactérias, alérgenos, poluentes ambientais, ou quando há presença de marcadores como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β (POBER; SESSA, 2007; STEWART; KATIAL, 2012).

Em doenças como a asma brônquica e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), observa-se um aumento nas concentrações de NO. A iNOS pode ser produzida por meio de estímulo inflamatório. A indução desta enzima acarreta em aumento da permeabilidade vascular devido ao aumento de NO, a formação de edema e a infiltração de células inflamatórias também são resultado desta indução (POBER; SESSA, 2007). Além disso, a iNOS é indiretamente responsável por catalisar a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) através do aumento de NO no local do processo inflamatório. Estes metabólitos são capazes de causar lesão ao DNA, lipídeos microbianos e células saudáveis, sendo este mecanismo presente na inflamação em doenças autoimunes (RICCIARDOLO et al., 2004; MENEGAZZI et al., 2006).

Figura 5 - Formação e efeitos do óxido nítrico na inflamação



Durante o processo inflamatório, o aminoácido essencial L-arginina, é oxidado pela enzima iNOS para formar L-citrulina e óxido nítrico. O NO favorece o influxo de leucócitos para local da inflamação, formação de edema e gera ERNs. ERNs: espécies reativas de nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; NO: óxido nítrico; O₂: oxigênio molecular. Fonte: Adaptado de Ghosh e Erzurum (2011).

1.4.4. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

Citocinas são moléculas proteicas que enviam sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Possuem função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígenica (VARELLA; FORTE, 2001).

Diversas citocinas liberadas por células dendríticas, neutrófilos, monócitos, linfócitos, macrófagos, dentre outras células participam do processo inflamatório como importantes mediadores (STEWART; KATIAL, 2012). Elas auxiliam na manutenção da homeostasia e determinam o tipo de resposta imune, agindo como imunomoduladoras (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010; CHANG; DONG, 2011). Estes mediadores, dependendo do estímulo, possuem efeitos pró ou anti-inflamatórios e o balanço entre essas citocinas tem um papel fundamental nos mecanismos regulatórios de defesa do hospedeiro (WILSON et al., 2005; MALAVIYA, 2006).

O TNF- α é liberado por diferentes células no local onde ocorre a inflamação e promove a ativação de vários tipos celulares além da liberação de outras citocinas e mediadores químicos. Consequentemente, ocorre maior expressão de moléculas de adesão no endotélio e nos leucócitos o que denota a quimiotaxia celular do vaso para o tecido lesado (SEELY; PASCUAL; CRISTOU, 2003). A participação do TNF- α no desenvolvimento de diversas patologias e condições é bem relatada, como nos casos de: câncer, sepse, artrite reumatóide, diabetes e doença inflamatória intestinal (SABIO; DAVIS, 2014). As interações dos TNFs com seus receptores, TNFR1 ou TNFR2, podem resultar na ativação do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de genes para citocinas inflamatórias diversas. Além de estimularem a produção de vários mediadores inflamatórios, os TNFs podem induzir apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio e necrose celular (CHU, 2013).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina fortemente correlata a reações agudas de estresse, doenças cardiovasculares, depressão, doenças osteomusculares, neoplasias e doença de Alzheimer (LUTGENDORF et al., 2004). Ela é sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microrganismos e também à estimulação por outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α (SOUZA et al., 2008). É uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imunes antigênicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos, aumenta a concentração de zinco intracelular nestas células e tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). Adicionalmente, ela exerce efeitos na formação óssea, metabolismo geral e funções endócrinas, tendo a habilidade de afetar diversos tecidos e órgãos (ERSHLER, 1993; WOLVEKAMP; MARQUET, 1990).

1.4.4.1. FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR *kappa* B (NF- κ B)

Um ponto chave na expressão das citocinas pró-inflamatórias é a ativação, nas células, do NF- κ B, que controla a transcrição de genes da maioria dos fatores inflamatórios, incluindo o TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, COX-2, quimiocinas, óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e moléculas de adesão (BARNES; KARIN, 1997). Os fatores de transcrição NF- κ B

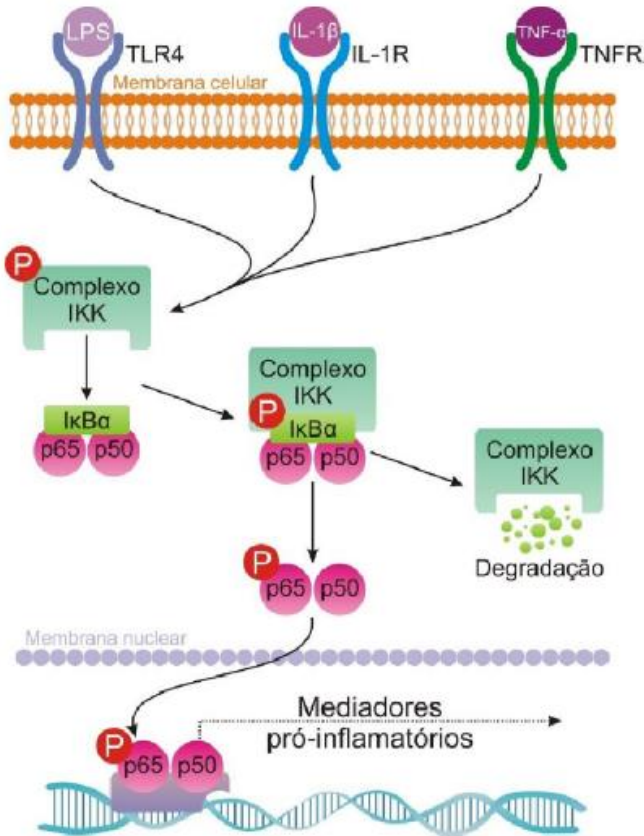
são reguladores da resposta imune, resposta a estresse, apoptose e diferenciação celular (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011).

O NF- κ B é um heterodímero formado por membros da família de genes Rel presentes em mamíferos, a qual inclui as subunidades p105/p50, p100/p52, p65 (Rel A), Rel B, e c-Rel (HOFFMANN; NATOLI; GHOSH, 2006; GHOSH; MAY; KOPP, 1998). Ele é composto por duas subunidades, e seu protótipo clássico é constituído por uma proteína de 50 kDa, chamada de p50 ou NF- κ B1 e uma outra de 65 kDa chamada de p65 ou Rel A (BAEUERLE; HENKEL, 1994). As principais vias de ativação desse fator de transcrição são a via canônica (clássica) e a via não-canônica (alternativa). A via canônica corresponde a ativação do heterodímero p65/p50 e ocorre através da ligação de LPS, TNF- α ou interleucina-1 (IL-1) a seus receptores, TLR, TNFR e IL-1R, respectivamente (**Figura 6**). A via não canônica necessita da ativação de outros, como o receptor do fator de ativação de célula B (BAFFR), CD40, receptor ativador para fator nuclear *kappa* B (RANK) ou ainda do receptor β de linfotóxina (LT β R), para que haja a participação de outro heterodímero, o p52/RelB (HOESEL; SCHMID, 2013).

Os complexos ativados pela via de sinalização canônica se apresentam na forma de hetero ou homodímeros, sendo o heterodímero p65/p50 o mais abundante na grande maioria das células. Quando associado a subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- κ B (I κ B- α) o heterodímero p65/p50 mantém-se inativo no citoplasma. É por meio da degradação da I κ B- α mediado pelo complexo IKK e a fosforilação da subunidade p65 que o NF- κ B passa a induzir suas atividades regulatórias na inflamação como expressão de citocinas pró-inflamatórias (VIATOUR et al., 2005; JANSSENS; TSCHOPP, 2006).

Há um consenso na literatura de que a exposição a patógenos, citocinas e outros fatores estressantes ativam o fator de transcrição NF- κ B levando à indução transcricional de mais de 200 genes (PAHL, 1999). A desregulação na transcrição dependente do NF- κ B está relacionada com complicações associadas a desordens crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, desordens auto-imunes e certos tipos de câncer (CRUZ-MACHADO, 2010).

Figura 6 - Via canônica de ativação do NF- κ B



A via de sinalização do NF- κ B é ativada por diferentes receptores durante o processo inflamatório, como por exemplo: receptores de IL-1, TNF- α e o TLR4. No processo de ativação o complexo proteico IKK é ativado e fosforila a proteína inibitória I κ B α , que então será degradada não realizando mais suas funções sobre as subunidades p65 e p50 do NF- κ B. Quando ativado e fosforilado, o dímero p65/p50 se transloca para o núcleo celular e realiza a transcrição nuclear de genes responsáveis por produzir citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. IKK: proteína inibitória *kappa* B cinase; I κ B α : subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- κ B; IL-1 β : interleucina-1- β ; IL-1R: receptor de interleucina-1; LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo *Toll-like 4*; TNF- α : fator necrose tumoral *alpha*; TNFR: receptor de fator necrose tumoral. Fonte: Adaptado de Viatour et al. (2005).

1.4.4.2. PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENO p38 (p38^{MAPK})

As MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) são proteínas cinases ativadas pela fosforilação dos resíduos treonina/tirosina (WIDMANN et al., 1999), responsáveis pela transmissão dos sinais extracelulares para o núcleo, onde a transcrição de genes específicos é induzida pela fosforilação e ativação de fatores de transcrição (SEGER; KREBS, 1995). As vias de sinalização MAPKs estão presentes em praticamente todas as células eucarióticas e participam de uma diversidade de processos biológicos essenciais, incluindo controle do ciclo celular, proliferação de células, apoptose, ativação do sistema imune e proteção contra o estresse oxidativo (SEGER; KREBS, 1995). De acordo com a similaridade no nível da sequência primária de aminoácidos e o modo de ativação, membros da família MAPK são divididos em três subfamílias: ERK (do inglês, *extracellular-signal-regulated kinase*); JNK (do inglês, *c-Jun amino-terminal kinase*) e p38 (HANKS; HUNTER, 1995).

A cascata de sinalização das MAPKs respeita uma sequência de reações de fosforilação e defosforilação as quais inicialmente ativam uma MAPK cinase cinase (MAPKKK); estas ativam uma MAPK cinase (MAPKK) que por fim ativa MAPKs específicas como p38, JNK e ERK, estas serão responsáveis pela expressão gênica levando a resposta fisiológica apropriada (MUTALIK; VENKATESH, 2006). Quando ativadas, as MAPKs transmitem o estímulo recebido através da superfície celular por fosforilar seus alvos, tais como enzimas e fatores de transcrição, estes por sua vez regulam os processos celulares subsequentes tais como manutenção de sobrevivência, indução de morte celular, transformação maligna, regulação da progressão do ciclo celular e também o processo inflamatório (GUO; YANG, 2006).

A p38 é um membro da família de MAPK envolvida em inúmeras funções celulares e é frequentemente associada a condições patológicas. Ela é uma serina/treonina cinase que transduz estímulos extracelulares em respostas transcricional e pós-translacional intracelular (WIDMANN et al., 1999; ONO; HAN, 2000). Sua atividade é induzida principalmente por estímulos de estresse (como choque osmótico, hipóxia, proteínas de choque térmico e radiação ultravioleta), além de ser ativada por estímulos pró-inflamatórios e citocinas, como a IL-1, TGF- β e TNF- α (FRESHNEY et al., 1994; ROUSE et al., 1994; RAINGEAUD et al., 1995; HANNIGAN et al., 1998).

Existem quatro isoformas de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) as quais diferem principalmente pela sua distribuição tecidual (ZARUBIN; HAN, 2005). Ela pode ser ativada intracelularmente, após estímulo de receptores, por duas diferentes MAP cinase cinase (MAPKK). A MAPKK3 e a MAPKK6, embora outras também possam ativar. Após sua fosforilação a p38 é capaz de induzir fatores de transcrição e proteínas intracelulares como ATF-1/2/6, SRF, MEF-2, DDIT3, LSP1, TTP e MNK1 sendo estes envolvidos no processo inflamatório por meio da regulação da liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, indução de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e iNOS, aumento na expressão de moléculas de adesão em neutrófilos, além de manterem a estabilidade do mRNA de citocinas pró-inflamatórias e regularem a sua tradução (ZARUBIN; HAN, 2005) (**Figura 7**).

1.4.4.3. PROTEÍNA CINASE c-Jun N-terminal (JNK^{MAPK})

Outra MAPK é a JNK, também conhecida como proteína cinase ativada por estresse (SAPK), possui importante papel na neurodegeneração e apoptose, como também no desenvolvimento e na manutenção da dor crônica (ZHUANG et al., 2006). Diversos estímulos como, estresse, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), fatores de crescimento (FGF e TGF) e ativação de receptores Toll-like (TLR-4 e TLR-9) induzem a ativação da JNK (WESTON; DAVIS, 2002)

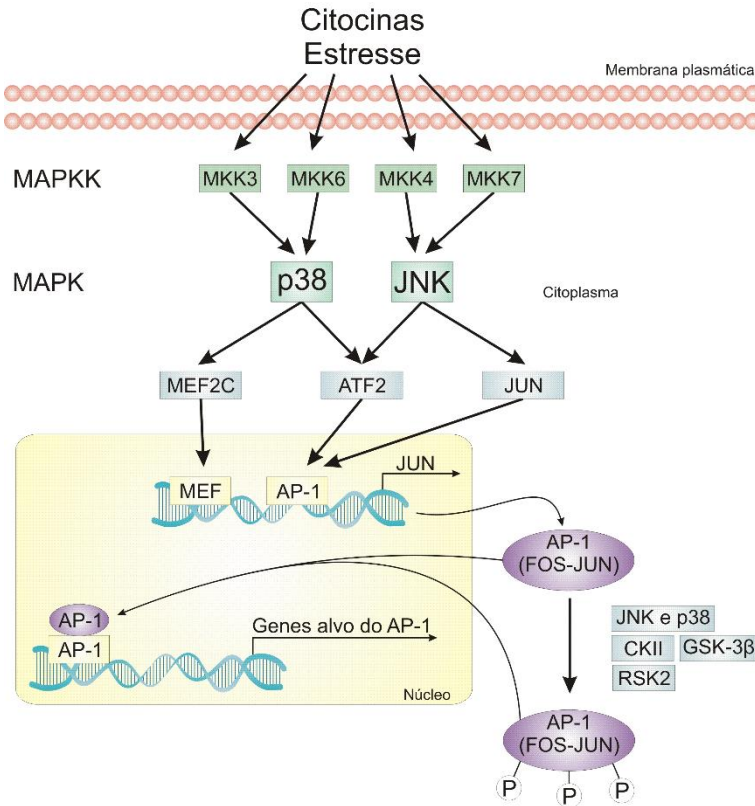
A família de JNK compreende um subgrupo das MAPKs (JNK1, JNK2 e JNK3) (XIA; KARIN, 2004); originalmente isolada em pulmões de ratos e ativada em resposta a citocinas, irradiação UV e agentes que danificam o DNA. Assim como a p38 e ERK, a JNK localiza-se no citoplasma e após estímulo vai até o núcleo para que ocorra a transcrição gênica (ROUX; BLENIS, 2004). A via da JNK pode ser ativada por diferentes estímulos, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , e, assim, leva a produção e liberação de IL-6, IL-1 β , PGE2, NO e MCP-1 (HANSEN; MALCANGIO, 2013). O principal alvo da via de sinalização JNK é a ativação do fator de transcrição AP-1 (Proteína Ativadora-1) que é mediado, em parte, pela fosforilação de c-Jun e moléculas relacionadas (WESTON; DAVIS, 2002) (**Figura 7**).

1.4.4.4. PROTEÍNA ATIVADORA-1 (AP-1)

O fator de transcrição AP-1 tem sido muito estudado, a fim de elucidar o papel de cada um de seus componentes na proliferação celular e transformação. Entretanto, rapidamente se tornou claro que a atividade de AP-1 se estende muito além dos seus efeitos limitados sobre a proliferação. Uma série de evidências aponta AP-1 na inflamação, diferenciação, apoptose, migração celular e cicatrização de feridas (SHAULIAN; KARIN, 2002; HESS et al., 2004). Ele é encontrado em diversos tipos celulares e pode ser estruturalmente formado, até onde se sabe, por proteínas das famílias Jun (c-Jun, JunB, Jun D), Fos (c-Fos, Fra1, Fra2, FosB), fator ativador de transcrição (ATF) ou do fibrosarcoma musculoponeurótico (MAF) (VESELY et al., 2009; EFERL; WAGNER, 2003), dispostas como homo ou heterodímeros, ligadas por uma estrutura chamada de zíper de leucina (GLOVER; HARRISON, 1995).

A composição mais comum do AP-1 em células de mamíferos é o heterodímero formado pelas proteínas c-Jun e c-Fos (**Figura 7**). No entanto, diferentes dímeros do AP-1 podem ser expressos, de acordo com o estágio e tipo celular durante o desenvolvimento (EFERL; WAGNER, 2003; SCHONTHALER et al., 2011). O c-Jun, normalmente, é pouco expresso, todavia sua expressão se torna elevada em resposta a diversos estímulos, como fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e irradiação ultravioleta (KARIN, 1995). Com isso, c-Jun/AP-1 tem emergido como um promissor alvo terapêutico para o tratamento de diversas patologias (WEISS; BOHMANN, 2004), como inflamação aguda, artrite reumatoide (DASS; CHOONG, 2008) e remodelamento vascular (KIM; IWAO, 2003).

Figura 7 - Cascata de sinalização das MAPK e ativação do AP-1



A atividade do AP-1 é estimulada por muitos fatores externos, como estresse, citocinas, e pela família de proteinocinas ativadas por mitógenos (MAPK) p38 e JNK. Essas, por sua vez, são previamente fosforiladas por cinases de MAPK (MAPKK), a família das MKK. As MAPK ativam diversos fatores de transcrição, dentre eles o fator potenciador específico de miócito 2C (MEF2C), o fator ativador 2 de transcrição (ATF2) e Jun, os quais induzem a transcrição de genes Fos (não mostrado) e Jun. Consequentemente aumentam o número de complexos AP-1 e dos genes ativados por AP-1. A fosforilação pós-translacional do AP-1 por diversas cinases regula a atividade do AP-1: aumenta o potencial de transativação e a estabilidade e capacidade dos componentes do AP-1 se ligarem ao DNA. CKII, caseína cinase II; GSK-3 β , glicogênio cinase sintase 3 β ; RSK2, ribossomal S6 cinase 2. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de Eferl e Wagner, 2003.

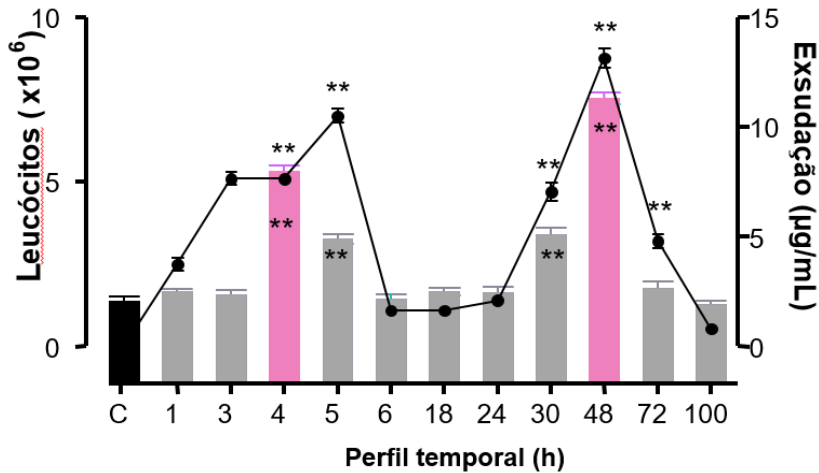
1.5. MODELO DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

Dentre os modelos experimentais para indução de inflamação pulmonar *in vivo*, pode-se destacar o modelo de inflamação neutrofílica. E, nesta condição clínica, a resposta inflamatória pulmonar apresenta predomínio do influxo de neutrófilos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Para isto, nos modelos utilizados, destacam-se a indução de infecção pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa* e o uso de lipopolissacarídeos (LPS) para estimular a resposta imune inata (HOFFMANN et al., 2005; DONG et al., 2009).

Outro modelo, que também mimetiza a inflamação neutrofílica na cavidade pleural e no pulmão, é o da pleurisia que foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1989) e camundongos (HENRIQUES et al., 1990). A carragenina (Cg) é uma mistura de polissacarídeos derivados principalmente das algas *Chondrus crispus*, que possui o nome popular “musgo-irlandês” (BRITO, 1989) e é o irritante mais utilizado para a indução de inflamação em estudos experimentais (BRITO, 1989). Ela participa da ativação da imunidade inata pois apresenta a capacidade de desencadear respostas intracelulares envolvendo diversos adaptadores e proteínas cinases que culminam na ativação de NF- κ B (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008). Além disso, esse agente flogístico pode ainda induzir o processo inflamatório por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que acarreta na ativação de cinases relacionadas as vias de ativação de NF- κ B e das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008).

O modelo de inflamação induzida pela carragenina em camundongos é caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica, em que na primeira fase (4 h) desta resposta ocorre o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, e da exsudação, na cavidade pleural dos camundongos. E na segunda fase (48 h) da resposta inflamatória, observa-se também aumento da exsudação, bem como de células mononucleares (SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996) (**Figura 8**). Este modelo possui vantagens em relação aos outros modelos citados, pois, possibilita a avaliação do exsudato da cavidade pleural, bem como da migração celular e mediadores inflamatórios (HENRIQUES et al., 1990; SALEH, CALIXTO, MEDEIROS, 1996), sendo então escolhido para a realização deste trabalho.

Figura 8 - Perfil temporal do modelo da pleurisia induzida por carragenina em camundongos



O perfil do modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos é do tipo bifásico. Sua primeira fase (4 h) representa uma resposta aguda marcada pela migração massiva de polimorfonucleares para cavidade pleural, além da formação de exsudato. Já sua segunda fase (48 h) há uma inversão do perfil leucocitário, com predomínio nessa fase de mononucleares, presença de exsudação e é observado o início do remodelamento tecidual. Fonte: Adaptado de (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito anti-inflamatório do extrato bruto hidroalcoólico e do composto majoritário extraído de *Fragaria x ananassa* Duch. e propor o seu provável mecanismo de ação utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Experimentação in vivo - Pleurisia induzida pela carragenina

1. Avaliar o efeito do extrato vegetal e composto isolado sobre a migração de leucócitos e exsudação;
2. Investigar o efeito do extrato vegetal e composto isolado sobre as atividades da mieloperoxidase (MPO), adenosina-desaminase (ADA), e sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico (NOx);
3. Investigar o efeito do extrato vegetal e composto isolado sobre as concentrações do fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6).

Experimentação in vitro - Macrófagos murinos (Raw 264.7) estimulados por LPS

1. Avaliar o efeito do composto P3G sobre as concentrações de NOx, TNF- α e IL-6;
2. Investigar o efeito do composto P3G sobre a fosforilação da cinase ativada por mitógeno p38^{MAPK};
3. Investigar o efeito do composto P3G sobre a fosforilação da cinase ativada por mitógeno JNK^{MAPK};
4. Investigar o efeito do composto P3G sobre a fosforilação da proteína inibitória *kappa* B cinase (IKK α/β);
5. Investigar o efeito do composto P3G sobre a fosforilação da subunidade inibitória do NF- κ B (I κ B- α);
6. Investigar o efeito do composto P3G sobre a fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear (NF- κ B);

7. Investigar o efeito do composto P3G sobre a fosforilação da subunidade c-Jun (AP-1).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Primeira parte

3.1. EXPERIMENTAÇÃO FARMACOGNÓSTICA

É importante salientar que, todos os procedimentos relativos a obtenção e análise e quantificação do extrato, nomeados a partir deste ponto como primeira parte da dissertação, foram realizados em parceria por nossos colaboradores Prof. Dr. Flávio H. Reginatto e doutorando Vitor Clasen Chaves, do laboratório de Farmacognosia, do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. Por motivos éticos, optamos por descrever as metodologias empregadas e os resultados obtidos na fase de investigação farmacognóstica, mas não incluí-los como parte dos objetivos da presente dissertação.

3.1.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), cultivar Camarosa, foram cultivados em ambiente protegido com cobertura plástica anti-UV, na Universidade de Passo Fundo (UPF), no município de Passo Fundo/RS, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Eunice Calvete. Os mesmos foram coletados em janeiro de 2012, no seu pico de maturação. Após a coleta, os frutos foram armazenados a -20 °C até o momento da sua extração e análise.

3.1.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato foi preparado de acordo com metodologia previamente descrita (CARVALHO et al., 2012), com mínimas modificações. De forma resumida, 1 g de frutos congelados de morangos foram sonicados (Ultrasonic Cleaner 1450, Unique) com 25 mL de metanol acidificado (HCl 1%, pH 1,0) por 75 min, ao abrigo da luz. Após a extração, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 35 °C, até a proporção de 1 g para 5 mL de solução. Finalmente, o extrato seco foi armazenado a - 20 °C até o momento da realização das análises.

3.1.3. OBTENÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO

O composto majoritário presente nesta variedade, P3G, já foi identificado e caracterizado por meio de métodos cromatográficos e de suas constantes físicas e dados espectroscópicos de Infravermelho (IV), Massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais (^1H , ^{13}C) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC). Em nossos experimentos, foi utilizado o referido composto na forma de padrão obtido de fonte comercial (Sigma-Aldrich, Co.).

3.1.4. ANÁLISE DOS TEORES DE FENÓLICOS TOTAIS (TFT)

Para determinar o teor de fenólicos totais, duas técnicas espectrofotométricas já descritas na literatura foram utilizadas: Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) e Fast Blue BB (MEDINA, 2011a; b).

Folin-Ciocalteu

O TFT no extrato de *F. ananassa* foi determinado a partir da adição de 0,125 mL do extrato a 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após seis minutos, foram adicionados 1,25 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7%, além de 1 mL de água destilada. Após a reação de complexação por 90 minutos, as absorbâncias foram medidas a 760 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para construir a curva analítica, elaborada a partir de soluções metanólicas de ácido gálico na faixa de concentração entre 60 – 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de fruto fresco ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}\text{FF}$) (CHAVES, 2014).

Fast Blue BB

O TFT também foi analisado pela metodologia descrita por Medina (2011a), que consiste na reação direta entre o sal de diazônio Fast Blue BB e os compostos polifenólicos. Para tal, foi adicionado, para cada 1 mL de extrato, 0,1 mL do reagente Fast Blue BB em uma concentração

de 0,1%. As soluções foram homogeneizadas por 1 minuto para posterior adição de alíquotas de 0,1 mL de NaOH 5%. A reação ocorreu à temperatura ambiente por 90 minutos, e as absorbâncias foram medidas a 420 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para preparar uma curva analítica, contendo seis soluções metanólicas de ácido gálico em concentrações na faixa de 40 – 150 µg.mL⁻¹. As análises foram efetuadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de fruto fresco (mg EAG.g⁻¹ FF) (CHAVES, 2014).

3.1.5. ANÁLISE DOS TEORES DE ANTOCIANINAS TOTAIS (TAT)

Assim como na quantificação dos compostos fenólicos, os teores de antocianinas totais foram mensurados a partir de duas técnicas: o método do pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001) e análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CHAVES, 2014).

Método pH diferencial

O doseamento de antocianinas monoméricas totais foi realizado a partir da utilização de duas soluções tampão, das quais a primeira trata-se de uma solução de cloreto de potássio (0,025 M) em pH 1, e a segunda, uma solução de acetato de sódio (0,4 M) com pH 4,5. 5,0 mL de cada tampão foram adicionados a 0,5 mL das diferentes amostras. Após 30 minutos da adição dos tampões, a leitura foi realizada em dois comprimentos de onda (520 e 700 nm). Os resultados foram expressos em miligramas de antocianinas monoméricas totais (AMT) por 100 gramas de fruto fresco, baseado nas equações 1 e 2 descritas por Giusti e Wrolstad (2001) e exemplificadas a seguir.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5} \text{ Equação 1}$$

$$\text{AMT (mg EP.100 g FF}^{-1}\text{)} = A \times MM \times FD \times 100 / \epsilon \times L \text{ Equação 2}$$

Nessas equações, MM é massa molecular do padrão utilizado para expressar os resultados; FD é o fator de diluição envolvido na

análise; ϵ é o coeficiente de absorvidade molar ($L.M^{-1}.cm^{-1}$); L trata-se do caminho ótico (cm); EP significa equivalentes de pelargonidina-3-O-glicosídeo (padrão utilizado), e FF corresponde à abreviação de frutos frescos. O peso molecular utilizado para o cálculo dos teores de AMT foi 433,2 unidades de massa atômica, referente a pelargonidina-3-O-glicosídeo, antocianina presente majoritariamente nos frutos de morango. O fator de diluição refere-se à união de dois fatores. O primeiro relativo à concentração do extrato, para a qual foi utilizado fator 5, resultante da razão entre o volume de solução extrativa e a massa de fruto utilizado. O segundo fator envolvido refere-se à diluição da amostra pela solução tampão. Dessa forma, a razão do volume total (5,5 mL) pelo volume de amostra (0,5 mL) resultou em um FD 11. O coeficiente de absorvidade molar foi calculado através da equação de Lambert-Beer, e obteve-se como resultado $25660 L.M^{-1}.cm^{-1}$ para pelargonidina-3-O-glicosídeo em uma solução de metanol a 1% HCl (CHAVES, 2014).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As antocianinas também foram quantificadas e identificadas individualmente pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido da marca PerkinElmer® série 200, equipado com detector de UV por arranjo de diodos, bomba quaternária, desgaseificador on line e amostrador automático. Os dados foram processados através do software Chromera® Workstation. Todas as análises foram realizadas em coluna Brownlee Choice C18 (150 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m) PerkinElmer® sob fluxo constante de $1 mL.min^{-1}$. O sistema de eluição utilizado baseou-se em um gradiente linear, em que a fase móvel utilizada foi metanol (A) e uma solução aquosa de ácido fórmico 3% (B). A eluição iniciou de forma isocrática, com a proporção de 10% de A em relação a B durante 2 minutos. Após esse período, ocorreu um aumento linear na proporção de A, chegando a 20% em 1 minuto. Durante os 16 minutos seguintes, a proporção de metanol foi elevada a 41%, para, posteriormente, sofrer um acréscimo final, elevando-se para 70% em 11 minutos. As análises ocorreram sob temperatura de $21^{\circ}C (\pm 2^{\circ}C)$, com volume de injeção de 20 μ L. A fase móvel foi preparada diariamente, passando por processo de filtragem e desgaseificação para posterior utilização. Os cromatogramas foram monitorados no comprimento de onda de 520 nm, e seus respectivos espectros adquiridos na faixa de 190 a 700 nm. Os picos majoritários foram caracterizados através de comparação dos tempos de retenção com

as substâncias de referência disponíveis, comparação dos espectros e co-injeção com padrões. As amostras utilizadas foram extratos de frutos de morango em uma concentração de 0,2 gramas de fruto fresco por mililitro da solução extrativa. As substâncias de referência utilizadas foram pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo (CHAVES, 2014).

3.1.6. IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS POR CLUE/PDA/EM/EM

As análises das antocianinas também foram realizadas em CLUE acoplado a detector de fotodiodo (PDA) e em espectrômetro de massa de alta resolução (Xevo® G2 QTof model – WATERS®). As antocianinas foram separadas usando coluna Polar-RP Synergi™ - Phenomenex® (4 µm, 150 x 2,0 mm; em 40 °C), e o volume de injeção foi de 5 µL. A constituição da fase móvel foi de solução aquosa de ácido fórmico 2% (solvente A) e acetonitrila com 1% de ácido fórmico (solvente B). O modo de eluição foi baseado em um gradiente linear com fluxo contínuo (0,4 mL.min⁻¹) com tempo de corrida total de 34 min de acordo com as seguintes condições: 0-10 min, 5-12% B; 10-29 min, 12-18% B; 29-33 min, 18% B; e 33-34 min, 5% B. A detecção foi realizada em 520 nm, e a escala de varredura espectral foi de 350 – 650 nm (PDA). Os parâmetros de detecção de espectrometria de massa foram: *electrospray ionization source* (ESI) definido em modo de íon positivo; tensão capilar 1,0 kV; temperatura do bloco 120 °C; temperatura de dessolvatação 600 °C; taxa de fluxo de nitrogênio do nebulizador 80 L.h⁻¹; fluxo de desolvatação do gás nitrogênio 800 L.h⁻¹; e a voltagem do cone 40 V. O software utilizado para aquisição e processamento de dados foi MassLynx v.4.1. Os espectros de massa foram adquiridos numa gama de massa de *m/z* 200 a 1000 com tempo de varredura de 0,5 s. Análises EM/EM foram realizadas utilizando argônio como gás de colisão e a energia da rampa de colisão (10 – 30 eV). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Segunda Parte

3.2. EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

3.2.1. ANIMAIS

Para os fins deste estudo, foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas com 1 mês de idade, pesando entre 20-25 g, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais mencionados foram acomodados em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem, em condições de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz controladas (ciclos claro/escuro de 12 h) no Biotério Setorial. Receberam alimentação (ração) e água à vontade (*ad libitum*) em bebedouros e comedouros apropriados, trocados com frequência, durante todos os experimentos. Para a realização deste estudo, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo nº PP00965, e os experimentos realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O modelo experimental utilizado neste estudo foi o da pleurisia induzida pela carragenina (Cg) em camundongos, de acordo com o protocolo proposto por Saleh, Calixto e Medeiros (1996). Para induzir a pleurisia, utilizou-se uma injeção de 0,1 mL do agente flogístico, carragenina 1% (Cg), administrado na cavidade pleural direita dos animais, através do espaço intercostal, utilizando-se uma agulha 13x5 mm e cânula de poliestireno (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Após 4 h da indução do processo inflamatório, todos os parâmetros inflamatórios foram avaliados. Os animais sofreram morte indolor assistida através de uma overdose de quetamina (225 mg/kg, i.p.) e xilazina (45 mg/kg, i.p.) e, posteriormente, o tórax foi aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) contendo heparina (20 UI/mL). As amostras do lavado pleural foram então coletadas para determinação da migração leucocitária (total e diferencial), exsudação, atividades da mieloperoxidase (MPO) e adenosina-desaminase (ADA), metabólitos do óxido nítrico (NOx), bem como das concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6.

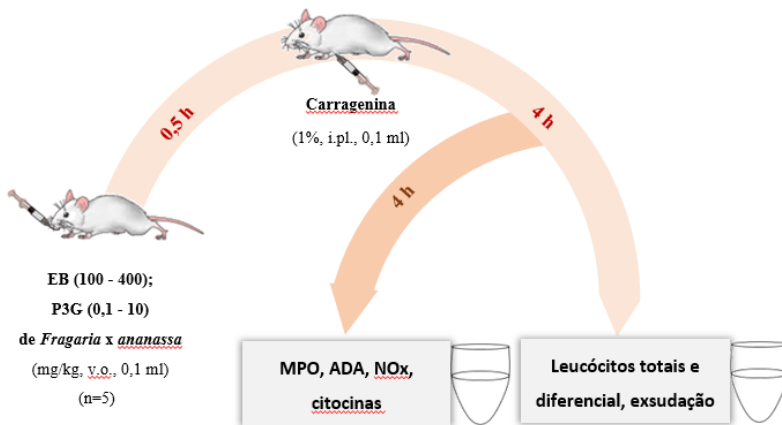
De forma resumida, o procedimento experimental foi executado da seguinte forma: o extrato bruto (EB) e o composto isolado (P3G) foram diluídos em solução de salina estéril e administrados por via oral (v.o.), utilizando agulha curva para gavagem em camundongos, em que diferentes grupos de animais receberam diferentes doses de extrato bruto (EB: 100-400 mg/kg) ou do composto isolado pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (P3G: 0,1-10 mg/kg). Decorridas 0,5 h, a pleurisia foi induzida e após 4 h os animais foram eutanasiados e então coletados os lavados pleurais para quantificação de leucócitos totais, contagem diferencial e quantificação da concentração de exsudato (**Figura 9**).

Em seguida, utilizando a melhor dose de EB (400 mg/kg) ou P3G (10 mg/kg) capazes de reduzir de maneira significativa a migração leucocitária e a exsudação na cavidade pleural, uma análise tempo-resposta foi realizada para verificar o melhor tempo de tratamento prévio à indução da pleurisia. Para isso, dois grupos de animais receberam o EB (400 mg/kg, v.o.) ou P3G (10 mg/kg, v.o.) 0,5 h ou 2 h antes da aplicação da Cg. Após 4 h os animais foram eutanasiados e o lavado pleural coletado para avaliação dos parâmetros contagem de leucócitos e exsudação. Desta forma, foi selecionado o tempo de pré-tratamento de 0,5 h como sendo o mais efetivo (Resultados não demonstrados).

Determinada a dose efetiva na curva dose-resposta e o tempo de pré-tratamento mais efetivo na análise tempo-resposta, prosseguiu-se o estudo com o objetivo de avaliar outros parâmetros inflamatórios, como MPO, ADA, NOx e citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Diferentes grupos de animais receberam EB (400 mg/kg, v.o.) ou P3G (10 mg/kg, v.o.) e, passadas 0,5 h, induziu-se a pleurisia com Cg. Decorridas as 4 h da pleurisia, os animais foram eutanasiados e o lavado pleural foi coletado (**Figura 9**).

Todos os experimentos foram acompanhados de grupos controle positivo e negativo. No grupo controle positivo (Cg), os animais receberam apenas a administração da Cg (1%, i.pl.), já o controle negativo (Sal) os animais receberam apenas a administração de solução salina estéril (0,9%, i.pl.). Além disso, outro grupo de animais foi tratado previamente com o fármaco de referência anti-inflamatório, dexametasona (Dex: 0,5 mg/kg, v.o.).

Figura 9 - Esquema da curva dose-resposta utilizando modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos



ADA: adenosina desaminase; EB: extrato bruto de *Fragaria x ananassa*; i.pl.: via intra-pleural; MPO: mieloperoxidase; NOx: metabólitos do óxido nítrico; P3G: pelargonidina-3-O-glicosídeo; v.o.: via oral. Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL CELULAR

Para realizar a quantificação dos leucócitos totais nas amostras de lavado pleural utilizou-se o contador hematológico veterinário (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Já para a contagem diferencial entre polimorfonucleares e mononucleares, alíquotas (50 μ L) das amostras foram submetidas à citocentrifugação (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) e, posteriormente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e coradas pela técnica utilizando eosinato de azul de metileno (May-Grünwald) e azul-eosina (Giemsa). A cada lâmina adicionou-se 1 mL de corante May-Grünwald mantido em contato com o sedimento celular por 2 min e, em seguida, adicionou-se 1 mL de água deionizada. Após 3 min, o excesso de corante foi removido e o corante Giemsa (1:20) foi adicionado, que recobriu as lâminas por 15 min. Por fim, as mesmas foram lavadas em água deionizada e secas à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como total de células por mililitro de amostra ($\times 10^6$ cél/mL).

3.2.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE EXSUDATO

A concentração de exsudato foi avaliada pela determinação de proteínas no lavado pleural utilizando a técnica de Lowry (1951). De forma resumida, o lavado foi centrifugado e o reagente Folin-fenol foi adicionado. Assim, o mesmo sofre redução quando reage com proteínas na presença do catalisador Cu^{+2} e produz um composto em absorção máxima de 750 nm. Paralelamente, foi construída uma curva de calibração utilizando-se albumina sérica bovina como padrão, e a absorbância foi obtida a 630 nm em uma leitora de ELISA (Organon Technica, Roseland, New Jersey, USA).

3.2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para avaliar os efeitos do EB e da P3G sobre a atividade da enzima MPO, utilizou-se a metodologia *in-house* previamente descrita (BRADLEY et al., 1982). Brevemente, logo após a coleta do lavado pleural, alíquotas (100 μL) foram tratadas com 100 μL de brometo de hexadecil-trimetilamônio (HTAB 0,5%) e submetidas a três ciclos de vórtex/freeze-thaw e posteriormente à centrifugação ($40000 \times g$ por 15 min a 4 °C) (Sorvall TM ST 40, ThermoScientific®, Swedesboro, Nova Jersey, EUA). Utilizando uma placa de ELISA, foram transferidos 20 μL de sobrenadante do lavado pleural e adicionados 180 μL de meio de reação (0,167 mg/mL dicloridrato de *o*-dianisidina e 0,0005 % H_2O_2) a cada poço. As amostras foram incubadas por 15 min a 37 °C, e a reação foi interrompida pela adição de 15 μL de solução de azida de sódio (NaN_3 1 %). A enzima MPO converte o H_2O_2 do meio de reação em radicais oxigênio. Esses radicais combinam-se com a *o*-dianisidina, oxidando-a e formando um composto de coloração amarela. A quantificação colorimétrica foi realizada em 450 nm com auxílio de leitor de placa de ELISA (Organon Technica, Roseland, Nova Jersey, EUA) e, através da interpolação com uma curva padrão (0,7 a 140 mU/mL) a atividade da MPO foi estimada e expressa em mU/mL.

3.2.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ADENOSINA DESAMINASE (ADA)

Para determinar a atividade da enzima ADA, amostras padrão com concentrações conhecidas (volume final 2,5 mL) ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 mM)) foram preparadas com a finalidade de obter uma curva padrão (10-50 UI/L). Após centrifugação (250 g por 5 min a 4 °C), as amostras de lavado pleural foram transferidas para tubos de ensaio e a reação enzimática iniciou-se com a adição da solução de fosfato de adenosina (pH 6,5, 500 μL , composição: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (15 mM) e adenosina (0,5 mM)). Transcorrida 1 hora de incubação a temperatura de 37 °C, a reação enzimática foi interrompida através da adição de uma solução de fenol (1000 μL , 1 mM), nitroprusseto de sódio (0,17 mM) e tampão alcalino (1000 μL : NaOCl : 11 mM e NaOH : 125 mM). Essa mesma solução também foi adicionada aos tubos de vidro da curva padrão (volume final 2500 μL) (GIUSTI; GALANTI, 1984). Por fim, transferiu-se 200 μL das amostras para uma placa de 96 poços e em seguida as placas foram lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) no comprimento de onda de 620 nm. Os valores de ADA foram expressos em U/L.

3.2.7. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO_x)

Para a determinação indireta dos níveis de NO , foi realizada a quantificação de seus metabólitos (NO_3^- e NO_2^-) utilizando a reação de Griess (GREEN et al., 1982; MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Alíquotas (300 μL) do sobrenadante do lavado pleural foram desproteinizadas pela adição de 30 μL de sulfato de zinco (ZnSO_4 , 20 %) seguidas de banho de gelo por 1 h. Em seguida, 6 μL de hidróxido de sódio (NaOH , 2,5 N) foram incorporados às amostras seguidas de centrifugação (2500 rpm por 15 min). Posteriormente, 100 μL do sobrenadante e 200 μL de solução contendo reagente de Griess (mistura (1:1) de sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 1%) e N-(1-naftil) etilenodiamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$, 0,1%) e cloreto de vanádio III diluído em HCl 1M (VCl_3 , 0,8%)) foram adicionados à placa de ELISA. As amostras foram incubadas por 40 min a 37 °C e, com auxílio de leitor de placas de ELISA (Organon Teknica, Roseland, Nova Jersey, EUA), a leitura das

densidades óticas foi feita em 540 nm. A reação com VCl_3 proporciona a conversão de NO_3^- em NO_2^- . O NO_2^- total reage com a solução de Griess e o produto gerado possui coloração rósea. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de NO_2^- (0-100 μM) foi estabelecida e, através de interpolação com a equação da reta, foi possível a quantificação de NO_3^-/NO_2^- nas amostras. Os resultados foram expressos em μM .

3.2.8. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF- α E IL-6)

Para avaliar as concentrações de TNF- α e IL-6, as amostras do lavado pleural foram coletadas e imediatamente centrifugadas. Neste protocolo foram utilizados anticorpos monoclonais específicos para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Padrões com concentrações conhecidas foram usados conforme instruções fornecidas pelo kit dos fabricantes (Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA). As sensibilidades identificadas nos kits foram: TNF- α (10-2500 pg/mL) e IL-6 (3-3400 pg/mL). Os coeficientes de variação (CV) intra e interensaios observados foram: intra CV: TNF- α = 7.8% e IL-6 = 10%; inter CV: TNF- α = 9.6% and IL-6 = 12% com valores de sensibilidade de TNF- α = 10,0 pg/mL e IL-6 = 3,0 pg/mL. As concentrações de citocinas no lavado pleural foram estimadas por interpolação a partir da curva padrão de cada citocina, de acordo com as instruções do fabricante. As leituras das amostras foram todas realizadas em placas de 96 poços em uma leitora de microplacas (Organon, Technica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores para citocinas foram expressos em pg/mL.

Terceira Parte

3.3. EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

3.3.1. CULTURA CELULAR E ESTIMULAÇÃO COM LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Neste estudo, foi utilizada a linhagem de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC – *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina, e 100 mg/mL de estreptomicina, mantido à temperatura de 37 °C em incubadora umidificada contendo CO₂. O tratamento das células com o composto, bem como a estimulação com LPS, foram realizadas em placa de cultura de 96 poços, e a densidade celular acertada para 5 x 10⁴ célula/poço.

De forma resumida, após confluência das células (> 90%), as mesmas foram incubadas em diversas concentrações (1-128 µM) de P3G ou com 7 µM de Dex, por 1 hora. Posteriormente, foi adicionada uma solução estéril de LPS, com objetivo de alcançar a concentração final de 1 µg/mL de LPS por poço.

3.3.2. CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade da P3G foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). As células da linhagem RAW 264.7 de macrófagos (5 x 10⁴ células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações (1-128 µM) de P3G, sem adição de LPS. Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram incubadas com 0,5 mg/mL de solução MTT por 2 horas. O sobrenadante foi descartado e os cristais violeta formados nas células foram dissolvidos com DMSO (dimetil sulfóxido). A densidade ótica foi medida em 540 nm com um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Switzerland).

3.3.3. QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO_x) *in vitro*

O acúmulo de nitrito presente no meio de cultura foi medido como um indicador da produção de NO por meio da reação de Griess. Diferentemente do ensaio *in vivo*, nesse experimento não foi necessária a redução de nitrato a nitrito utilizando cloreto de vanádio III. Desta forma, 100 µL do meio de cultura foi coletado 24 h após o estímulo com LPS, misturado com o mesmo volume do reagente de Griess e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância a 540 nm foi medida com interpolação a partir da curva padrão de nitrito (0-20 µM), a produção de nitrito foi determinada e os resultados foram expressos em µM.

3.3.4. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (TNF- α e IL-6) *in vitro*

As células RAW foram pré-tratadas com diferentes doses de P3G (1-128 µM) por 1 h, seguido de estímulo com LPS à concentração final de 1 µg/mL por 24 h. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e submetido à determinação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, utilizando kit comercial pelo método imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante previamente descritas nos experimentos *in vivo*.

3.3.5. PREPARAÇÃO DO EXTRATO TOTAL DE CÉLULAS E EXTRATOS CITOSÓLICOS E NUCLEARES

Para análise do efeito de P3G na sinalização celular ligada à ativação do receptor TLR4, o tratamento das células com P3G ou Dex foi realizado com a dose de IC₅₀ obtida nos experimentos prévios de TNF- α .

Após o pré-tratamento com P3G (10 µM) ou Dex (7 µM), as células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) por 30 min. Em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado (pH 7,4), colhidas usando um raspador de células e lisadas em 1x tampão de lise (20 mM sacarose, 1 mM ácido etileno-diamino-tetra-acético, 20 µM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM ditiotreitól, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) suplementado com inibidor de proteases/fosfatases *cocktail*® (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Os

precipitados de células foram ressuspensos em tampão de lise no gelo por 1 h, e os debris celulares foram removidos por centrifugação. Em um experimento paralelo para obter as proteínas citosólicas e nucleares isoladas, parte do extrato das células totais obtidos acima foi submetida a separação usando um kit de reagentes para extração nuclear e citoplasmática (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada utilizando o kit da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.6. WESTERN BLOT

Quantidades iguais de proteínas (extrato da célula inteira: 50 µg/poço, extrato citosólico: 25 µg/poço, extrato nuclear: 25 µg/poço) foram carregadas com tampão Laemmli (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) em gel de eletroforese poliacrilamida a 7,5%, 4-15% ou 10% (SDS), e então transferida a uma membrana PVDF (Immobilon-P® Transfer Membrane, Millipore, Molsheim, France). As membranas foram incubadas em um tampão de bloqueio (5% w/v BSA em TBST) por 1 h, e então incubadas *overnight* com anticorpo primário de coelho anti-total p38, fosfo-p38, total-JNK, fosfo-JNK, total-IKKα/β, fosfo-IKKα/β, total-p65, fosfo-p65, total-cJun, fosfo-cJun, total-laminina B (1:1000) ou de camundongo anti-total-IkBα, fosfo-IkBα (1:500) e total-vinculina α (1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com 0,3% v/v Tween em tampão TBST, incubadas em temperatura ambiente por 1 h com anticorpos secundários anti-camundongo ou anti-coelho conjugados com peroxidase (HRP) (1:500), em seguida, foram lavados três vezes com 0,3% v/v Tween com tampão TBST e reveladas com o reagente amplificador de sinal de quimioluminescência (Luminata Forte® Western HRP, Millipore, Molsheim, France). Por fim, as membranas foram expostas normalizadas e quantificadas no equipamento *Chemidoc Touch® imaging system* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.3.7. FÁRMACOS E REAGENTES

Neste estudo, foram utilizados os seguintes fármacos e reagentes obtidos de: i) Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA): adenosina, carragenina- λ (grau IV), formalina, peróxido de hidrogênio, brometo de

hexadecil-trimetilamônio, mieloperoxidase de neutrófilos humano, tampão Laemli, dicloridrato de *o*-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina), α -naftiletilenodiamida $\cdot 2\text{HCl}$, fenol, azida sódica, dodecil sulfato de sódio, hipoclorito de sódio, nitroprusseto de sódio, sulfanilamida, cloreto de vanádio III; ii) Synth (Diadema, São Paulo, Brazil): etanol; iii) Aché Pharmacological Laboratories S.A (Guarulhos, São Paulo, Brazil): dexametasona; iv) Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil): fosfato dissódico, sulfato de zinco; v) BioTech (São Paulo, São Paulo, Brazil): peróxido de hidrogênio 30%; vi) Reagen (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil): hidróxido de sódio; vii) Roche (São Paulo, São Paulo, Brazil): heparina; viii) Newprov (Pinhais, Paraná, Brazil): corante de May-Grünwald; ix) Laborclin (Pinhais, Paraná, Brazil): corante de Giemsa; x) Peprotech (Rocky Hill, New Jersey, USA): kits de ELISA para quantificação de TNF- α e IL-6; xi) Gibco (Grand Island, New York, USA): *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL); xii) American Type Cell Culture (ATCC, Rockville, MD): células RAW 264.7; xiii) Millipore (Molsheim, France): membranas PVDF, amplificador de quimioluminescência (Luminata Forte® Western HRP, Millipore, Molsheim, France); xiv) BioRad (Hercules, California, USA), SDS gel de poliacrilamida para eletroforese, os anticorpos primários e secundários para o Western Blot foram adquiridos do Cell Signaling Technology, Inc. (Boston, MA, USA) e Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios estudados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) para valores absolutos e também em percentuais de inibição. Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e os grupos tratados foram realizados por meio da análise de variância ANOVA de uma via (one-way ANOVA), complementada pelo pós-teste de Newman-Keuls através do programa de estatística GraphPadPrism® Versão 5.02 (San Diego, Califórnia, EUA). Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

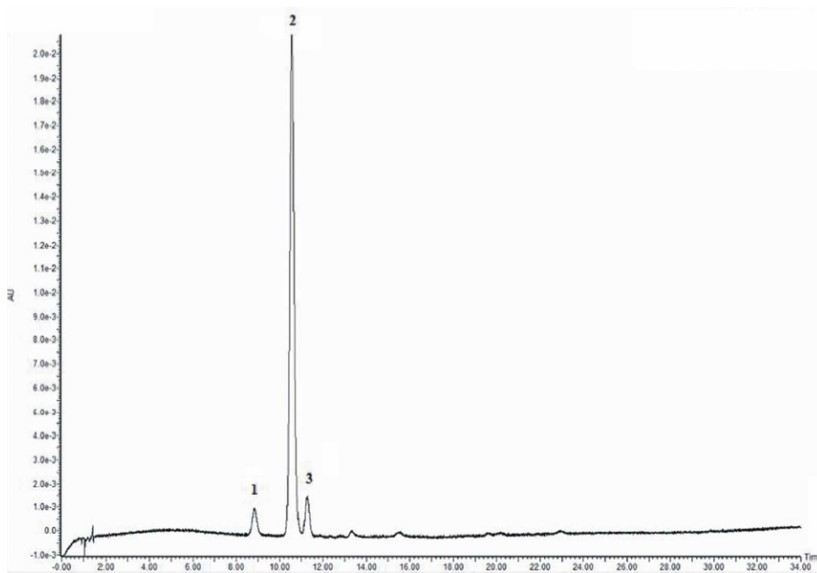
4. RESULTADOS

4.1. Primeira Parte - ANÁLISE FITOQUÍMICA (Teor de P3G)

O extrato dos frutos do morango foi analisado em relação ao seu teor de fenólicos totais (TFT) pelos ensaios de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999) e Fast Blue BB (MEDINA, 2011a; b). Os resultados mostraram um TFT de 2,1 mg/g de frutos frescos ($\pm 4,7\%$) e 2,0 mg/g ($\pm 4,9\%$) pelos ensaios de FC e FBBB, respectivamente.

O teor de antocianinas totais (TAT) foi medido pelos testes de pH diferencial (GIUSTI; WROLSTAD, 2001) e por CLAE. As análises mostraram TAT de 24,1 mg/100 g ($\pm 4,3\%$) de frutos frescos pelo teste de pH diferencial e 27,6 mg/100 g ($\pm 3,4\%$) de frutos frescos pela análise por CLAE (**Figura 10**).

Figura 10 - Cromatograma de *Fragaria x ananassa* Duch.



Pico 1: cianidina-3-*O*-glicosídeo; 2: pelargonidina-3-*O*-glicosídeo; 3: pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo.

A fim de identificar as principais antocianinas presentes no extrato do morango, foi realizada análise por CLUE acoplado a espectrometria de massas de alta resolução. A análise do espectro de massas (EM) demonstrou que pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (composto 2) é a antocianina majoritária, com quantia superior a 80% do TAT (Figura 11).

Figura 11 - Espectro de massas (EM), massas/massas (EM/EM) e estrutura química da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo.



Outras duas antocianinas também foram identificadas, cianidina-3-*O*-glicosídeo (composto 1) e pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo (composto 3) (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação de antocianinas no extrato de *Fragaria x ananassa*

Tempo de retenção (min)	λ_{max} (nm)	Fórmula molecular	[M-H] ⁺ m/z	Erro (ppm)	Fragmentos principais m/z	TAT (%)	Identificação
8,49	516	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449,1065	-4,2	287	5,65	Cianidina-3-O-glicosídeo
10,29	500	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,1130	1,2	271	80,18	Pelargonidina-3-O-glicosídeo
11,09	500	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄	579,1721	1,2	433; 271	14,17	Pelargonidina-3-O-rutinosídeo

TAT – teor de antocianinas totais

4.2. Segunda Parte - RESULTADOS IN VIVO (Efeito Anti-inflamatório)

4.2.1. EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE *Fragaria x ananassa* E P3G SOBRE O INFLUXO DE LEUCÓCITOS, MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E EXSUDAÇÃO NO LAVADO PLEURAL

O EB de *Fragaria x ananassa* nas doses de 300 e 400 mg/kg, reduziu significativamente o influxo de leucócitos totais para a cavidade pleural quando comparado com o grupo controle positivo (Cg) (% inibição: 300 mg/kg: $34,2 \pm 10,8$ e 400 mg/kg: $44,6 \pm 10,5$) ($P < 0,01$). Essa inibição foi devida à capacidade do EB em reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade pleural em ambas as doses de 300 e 400 mg/kg (% inibição: 300 mg/kg: $26,7 \pm 7,6$ e 400 mg/kg: $61,0 \pm 11,3$) ($P < 0,05$). Além disso, a dose de 400 mg/kg foi capaz de inibir significativamente o aumento dos níveis de proteína no líquido pleural, o que representa a redução significativa na exsudação (% de inibição: 400 mg/kg: $46,0 \pm 3,3$) ($P < 0,01$) (**Tabela 2**).

A P3G, a principal antocianina encontrada em *Fragaria x ananassa*, nas doses de 1,0 e 10 mg/kg também reduziu de forma significativa a migração de leucócitos para a cavidade pleural (% inibição 1,0 mg/kg: $40,9 \pm 4,5$ e 10 mg/kg: $58,0 \pm 3,4$) ($P < 0,01$), novamente, essa inibição se deveu a capacidade do composto em reduzir a migração de neutrófilos (% inibição 1,0 mg/kg: $34,0 \pm 6,1$; 10 mg/kg: $66,5 \pm 3,7$) ($P <$

0,001). Além disso, os níveis de proteínas também foram reduzidos pelo tratamento dos animais com P3G nas doses de 0,1, 1,0 e 10 mg/kg (% inibição 0,1 mg/kg: $15,8 \pm 6,9$; 1,0 mg/kg: $39,1 \pm 3,2$ e 10 mg/kg: $52,7 \pm 3,4$) ($P < 0,05$). O fármaco anti-inflamatório de referência utilizado como controle, Dex (0,5 mg/kg), também inibiu esses parâmetros na dose testada (% inibição de leucócitos: $62,5 \pm 3,7$; neutrófilos: $63,3 \pm 3,6$ e proteínas: $57,3 \pm 0,9$) ($P < 0,01$) (**Tabela 2**).

Analisando os resultados obtidos nestes experimentos, concluímos que o efeito anti-inflamatório mais significativo observado com o tratamento com EB de *Fragaria x ananassa* e P3G foi obtido nas doses de 400 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente. Por conta disso, essas foram as doses escolhidas para execução dos experimentos seguintes.

Tabela 2 - Efeito do extrato bruto (EB) de *Fragaria x ananassa* e P3G sobre o influxo de leucócitos, migração de neutrófilos e exsudação no lavado pleural, em modelo animal de pleurisia induzida por carragenina (Cg)

Grupos/doses (mg/kg)	Leucócitos (10^6)	Neutrófilos (10^6)	Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
S	$1,7 \pm 0,07$	$0,2 \pm 0,03$	$26,6 \pm 1,7$
Cg	$6,0 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,2$	$209 \pm 17,3$
Dex (0,5)	$2,6 \pm 0,2^{**}$	$1,6 \pm 0,2^{***}$	$89,2 \pm 2,0^{***}$
EB (100)	$5,4 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,3$	$202,3 \pm 11,7$
EB (200)	$4,6 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,4$	$196,4 \pm 20,4$
EB (300)	$3,9 \pm 0,6^{**}$	$3,4 \pm 0,3^*$	$186,2 \pm 23,3$
EB (400)	$3,3 \pm 0,6^{**}$	$1,8 \pm 0,5^{***}$	$112,7 \pm 6,9^{**}$
P3G (0,1)	$6,3 \pm 1,1$	$4,2 \pm 0,2$	$175,9 \pm 14,4^*$
P3G (1,0)	$4,1 \pm 0,3^{**}$	$3,0 \pm 0,3^{***}$	$127,1 \pm 6,7^{***}$
P3G (10)	$2,9 \pm 0,2^{***}$	$1,6 \pm 0,2^{***}$	$98,8 \pm 7,2^{***}$

Extrato bruto (EB) e pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (P3G) foram administrados por via oral 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina. Os grupos controles negativos foram tratados somente com salina estéril (S: 0,95% NaCl) por via intrapleural. Os grupos controles positivos foram tratados apenas com carragenina (Cg: 1%) por via intrapleural. Dexametasona (Dex) foi utilizada como medicamento anti-inflamatório de referência e foi administrada por via oral. Os valores são reportados como a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle positivo (Cg), n=5 animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.2.2. EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE *Fragaria x ananassa* E P3G SOBRE AS ATIVIDADES DE MPO, ADA E CONCENTRAÇÕES DE NO_x NO LAVADO PLEURAL

O EB de *Fragaria x ananassa* na dose de 400 mg/kg reduziu significativamente as atividades de MPO e ADA (% inibição: 27,4 ± 6,4 e 29,72 ± 5,3, respectivamente) ($P < 0,05$). As concentrações de NO_x no lavado pleural, também foram reduzidos com a mesma dose (% inibição: 63,7 ± 0,4) ($P < 0,001$). Da mesma forma a P3G na dose de 10 mg/kg, também foi capaz de reduzir significativamente as atividades de MPO e ADA (% inibição: 51,1 ± 2,3 e 34,2 ± 4,9, respectivamente) ($P < 0,001$), e as concentrações de NO_x (% inibição: 37,6 ± 4,9) ($P < 0,001$) (**Tabela 3**).

O fármaco anti-inflamatório de referência (Dex) também reduziu todos os parâmetros inflamatórios analisados (% inibição MPO: 47,7 ± 5,3; ADA: 31,0 ± 0,5 e NO_x: 55,5 ± 3,7) ($P < 0,001$) (**Tabela 3**).

4.2.3. EFEITOS DO EXTRATO BRUTO DE *Fragaria x ananassa* E P3G SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE TNF- α e IL-6 NO LAVADO PLEURAL

O EB de *Fragaria x ananassa* e P3G quando administrados nas doses de 400 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, foram capazes de reduzir as concentrações de TNF- α e IL-6 quando comparados com o grupo controle positivo (EB: % inibição de TNF- α : 29,8 ± 9,9 e IL-6: 62,0 ± 9,5) ($P < 0,05$), (P3G: % inibição de TNF- α : 71,9 ± 3,5 e IL-6: 39,2 ± 6,2) ($P < 0,05$) (**Tabela 3**).

Dex também foi capaz de reduzir significativamente as concentrações de TNF- α (% inibição: 44,9 ± 6,9) e de IL-6 no lavado pleural (% inibição: 48,1 ± 7,4) ($P < 0,05$) (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Efeitos do extrato bruto (EB) de *Fragaria x ananassa* e P3G sobre as atividades de MPO, ADA, concentrações de NOx e níveis de TNF- α e IL-6 no lavado pleural em modelo animal de pleurisia induzida por carragenina (Cg)

Grupos/doses (mg/kg)	MPO (mU/L)	ADA (U/L)	NOx (μ M)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
S	66,4 \pm 3,2	2,4 \pm 0,02	61,9 \pm 1,5	8,9 \pm 3,5	7,0 \pm 4,0
Cg	169,1 \pm 4,9	7,6 \pm 0,5	183,0 \pm 20,7	316,1 \pm 25,6	879 \pm 171
Dex (0,5)	84,9 \pm 9***	5,2 \pm 0,04***	81,4 \pm 6,8***	174,4 \pm 22,05**	456,5 \pm 65,1*
EB (400)	132,0 \pm 19,4*	5,3 \pm 0,4***	66,4 \pm 0,7***	233,9 \pm 43,5*	334 \pm 84,1**
P3G (10)	82,6 \pm 3,9***	5,0 \pm 0,4***	114,1 \pm 8,9***	88,9 \pm 11,1***	534 \pm 54,5*

Extrato bruto (EB) e pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (P3G) foram administrados por via oral 0,5 h antes da indução da inflamação com carragenina. Os grupos controles negativos foram tratados somente com salina estéril (S, 0,95% NaCl) por via intrapleural. Os grupos controles positivos foram tratados apenas com carragenina (Cg, 1%) por via intrapleural. Dexametasona (Dex) foi utilizada como medicamento anti-inflamatório de referência e foi administrada por via oral. EB: animais pré-tratados com extrato bruto (400 mg/kg, v.o.) antes da administração de Cg; P3G: animais pré-tratados com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (10 mg/kg, v.o.) antes da administração de Cg; n = 5 animais; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

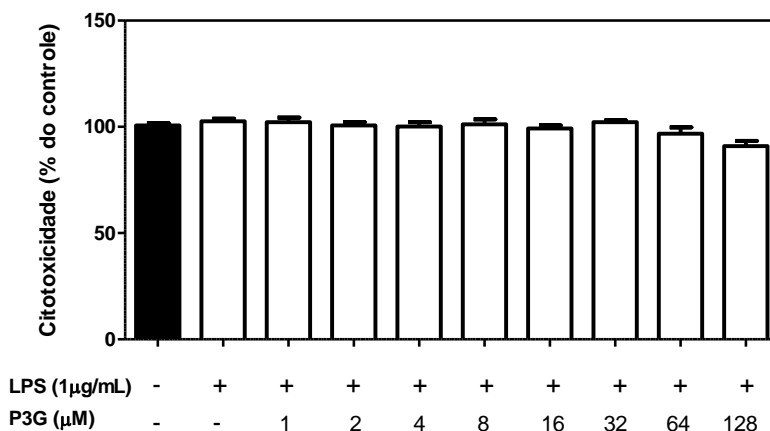
4.3. Terceira Parte - RESULTADOS IN VITRO (Mecanismo molecular da P3G)

Nesta fase dos experimentos, a Dex foi utilizada como fármaco anti-inflamatório de referência na dose de 7 μM , a qual foi escolhida em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório (Dados não demonstrados).

4.3.1. CITOTOXICIDADE DA P3G

O efeito citotóxico de P3G em macrófagos da linhagem Raw 264.7 foi determinado utilizando o ensaio colorimétrico MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)]. A viabilidade das células incubadas com diferentes concentrações de P3G (1–128 μM) não foi afetada em todas as concentrações testadas ($P > 0,05$) (**Figura 12**). Sendo assim, todos os experimentos subsequentes foram conduzidos com concentrações não-tóxicas de P3G.

Figura 12 - Citotoxicidade celular em macrófagos Raw 264.7 após exposição a diferentes doses de P3G.



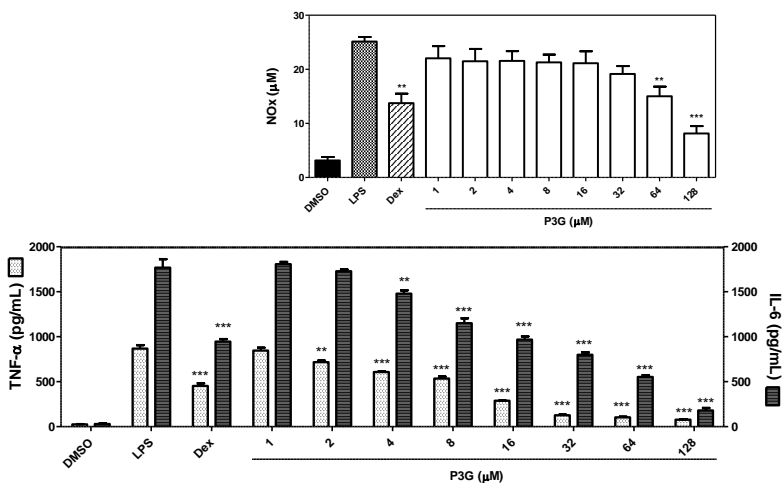
Resultado da avaliação da citotoxicidade da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (P3G) frente a macrófagos da linhagem Raw 264.7, através do ensaio colorimétrico do MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência dos macrófagos em experimentos independentes \pm erro padrão da média ($n=4$).

4.3.2. EFEITO INIBITÓRIO DA P3G NA PRODUÇÃO DE NO_x, TNF- α E IL-6, EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS

A secreção de NO pelos macrófagos tratados com LPS foi significativamente inibida pelo tratamento com P3G nas doses de 64 e 128 μM (% inibição: $23,8 \pm 5,7$ e $40,3 \pm 7,1$, respectivamente) com IC_{50} de 83,2 μM ($P < 0,01$). Como esperado, o medicamento anti-inflamatório dexametasona na dose de 7 μM também inibiu a produção desse mediador pró-inflamatório pelos macrófagos Raw 264.7 (% inibição: $67,6 \pm 5,5$) ($P < 0,01$) (**Figura 13, inset**).

A citocina pró-inflamatória TNF- α foi inibida pelo tratamento dos macrófagos com P3G nas doses de 2 a 128 μM (% inibição: $17,3 \pm 2,0$ a $91,1 \pm 0,6$) com IC_{50} de 10,0 μM ($P < 0,01$). Já a citocina IL-6, foi inibida pelo tratamento com P3G nas doses de 4 a 128 μM (% inibição: $16,3 \pm 2,0$ a $89,9 \pm 1,7$) e o IC_{50} calculado para esse parâmetro foi de 6,8 μM ($P < 0,01$). A secreção de ambos mediadores pró-inflamatórios também foi inibida pelo tratamento dos macrófagos com o fármaco anti-inflamatório de referência Dex na dose de 7 μM (% inibição: TNF- α : $47,8 \pm 3,3$ e IL-6: $46,5 \pm 1,6$) ($P < 0,001$) (**Figura 13**).

Figura 13 - Efeito da P3G na produção de NOx, TNF- α e IL-6, em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.



Efeitos da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo sobre os níveis de TNF- α e IL-6 em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS. *Inset*, Efeito da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo sobre os níveis de NOx. DMSO: células tratadas somente com dimetilsulfóxido estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (1 μ g/mL); Dex: animais pré-tratados com dexametasona (7 μ M) antes da administração de LPS; P3G: células pré-tratadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (1-128 μ M) antes da administração de LPS. Resultados foram expressos como a média \pm e.p.m; n = 4; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

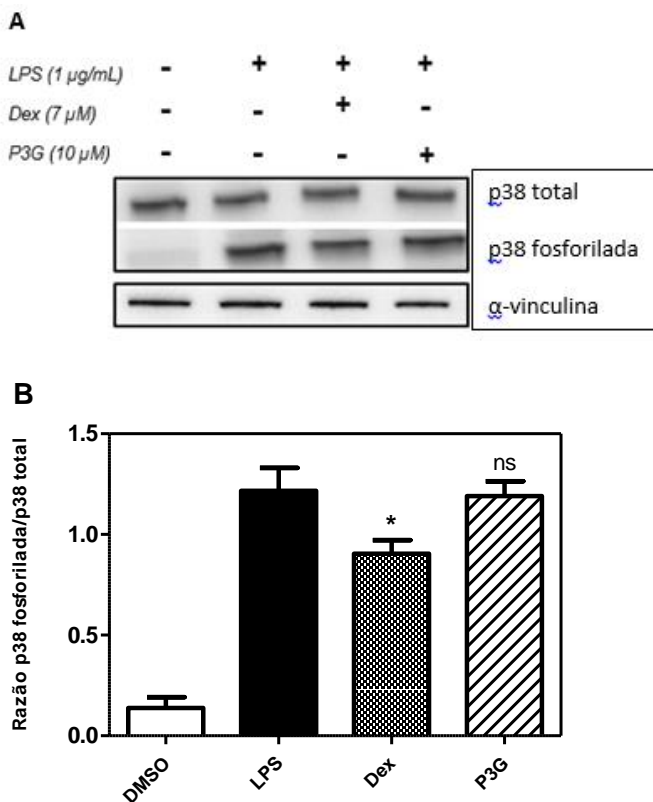
4.3.3. EFEITO INIBITÓRIO DA P3G NA FOSFORILAÇÃO DE MAPKs EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS

As MAPKs desempenham papéis críticos na resposta celular ao estímulo com LPS. Além disso, também são conhecidas por serem importantes para a ativação dos fatores de transcrição nuclear NF- κ B e AP-1 (VERMEULEN et al., 2003). Para investigarmos se a inibição da resposta inflamatória por P3G foi mediada por meio da inibição das vias de MAPK relacionadas ao processo inflamatório, examinamos seu efeito sobre a inibição da fosforilação de p38^{MAPK} e JNK^{MAPK} em macrófagos

Raw 264.7. Para dar segmento a estes experimentos, a dose de P3G escolhida foi o IC_{50} para $TNF-\alpha$, obtido no experimento anterior.

Para nossa surpresa, a fosforilação de $p38^{MAPK}$ não foi atenuada pelo tratamento com P3G, em macrófagos estimulados com LPS (% inibição: $8,5 \pm 4,2$) ($P > 0,05$), já o medicamento anti-inflamatório de referência Dex na dose de $7 \mu M$ foi capaz de reduzir a fosforilação de $p38^{MAPK}$ (% inibição: $25,8 \pm 5,4$) ($P < 0,05$) (**Figura 14**).

Figura 14 - Efeito da P3G na fosforilação de p38^{MAPK} em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS

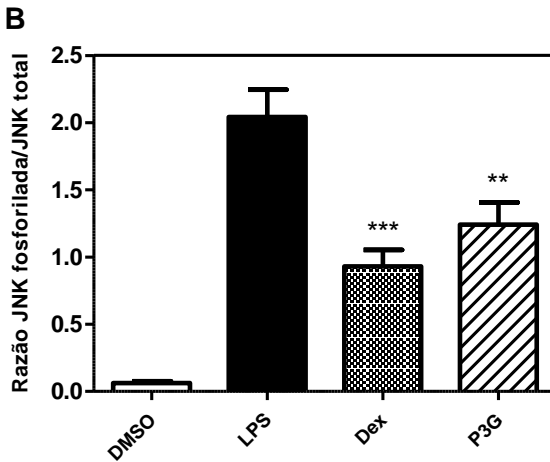
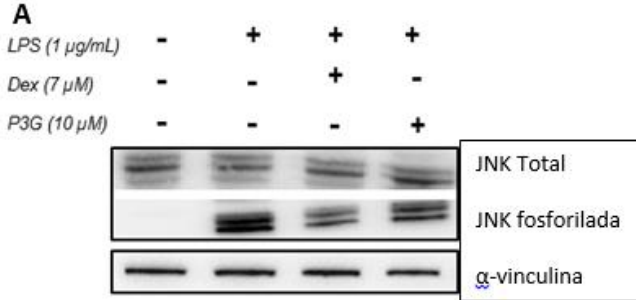


Efeito da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo na fosforilação de p38^{MAPK} em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS. (A) Imagem representativa de Western blot dos experimentos de fosforilação de p38. (B) Representação gráfica dos experimentos de fosforilação de p38. DMSO: células tratadas somente com dimetilsulfóxido estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (1 µg/mL); Dex: animais pré-tratados com dexametasona (7 µM) antes da administração de LPS; P3G: células pré-tratadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (10 µM) antes da administração de LPS. Resultados foram expressos como a média ± e.p.m; n = 4; * $P < 0,05$.

Por outro lado, a fosforilação de JNK^{MAPK} induzida por LPS, foi significativamente inibida pelo tratamento com P3G (% inibição: 39,1 ± 8,1) ($P < 0,01$), assim como o fármaco de referência Dex, também inibiu

a fosforilação desta MAPK (% inibição: $54,4 \pm 6,0$) ($P < 0,001$) (**Figura 15**).

Figura 15 - Efeito da P3G na fosforilação de JNK^{MAPK} em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.



Efeito da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo na fosforilação de JNK^{MAPK} em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS. (A) Imagem representativa de Western blot dos experimentos de fosforilação de JNK. (B) Representação gráfica dos experimentos de fosforilação de JNK. DMSO: células tratadas somente com dimetilsulfóxido estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$); Dex: animais pré-tratados com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS; P3G: células pré-tratadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (10 μM) antes da administração de LPS. Resultados foram expressos como a média \pm e.p.m; $n = 4$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4.3.4. EFEITO INIBITÓRIO DA P3G SOBRE A VIA DE ATIVAÇÃO DO NF- κ B EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS

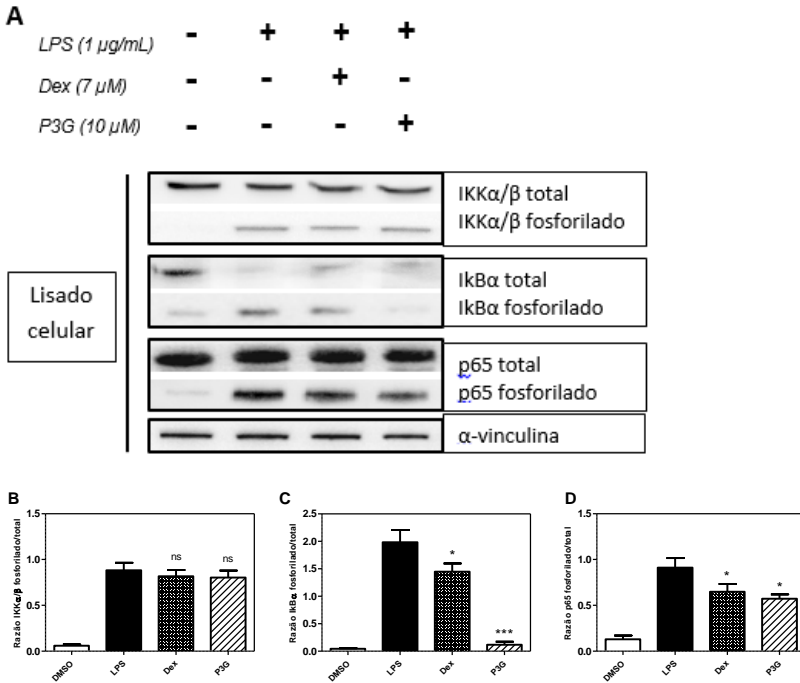
Nesta etapa dos experimentos, avaliamos o efeito da P3G sobre a via de ativação do NF- κ B, principal fator de transcrição envolvido na síntese de mediadores pró-inflamatórios após a ativação de TLR4 e, em muitos casos, ativada por ação direta das MAPKs (ASEHNOUNE et al., 2004). Nesse contexto, os primeiros experimentos destinaram-se a observar o efeito da P3G sobre o complexo de cinases IKK α/β . O complexo IKK-cinase é o elemento central da cascata NF- κ B, responsável pela fosforilação do I κ B α , uma subunidade inibitória que está presente no citoplasma do macrófago e que interage com o heterodímero NF- κ B (p65/p50).

Sendo assim, nossos resultados demonstram que a P3G não é capaz de reduzir a fosforilação das cinases IKK α/β , e subsequentemente sua ativação (% inibição: $12,8 \pm 6,7$) ($P > 0,05$). Curiosamente, da mesma forma, o fármaco anti-inflamatório Dex também não inibiu a fosforilação de IKKs na dose testada (% inibição: $11,5 \pm 5,7$) ($P > 0,05$) (**Figura 16A e B**).

Seguindo em frente na via ativadora do NF- κ B, foi avaliado o efeito da P3G sob a fosforilação da subunidade I κ B- α . Nesses experimentos, observou-se uma redução significativa desta fosforilação pelo tratamento dos macrófagos com P3G (% inibição: $94,1 \pm 2,9$) ($P < 0,001$). A Dex, da mesma forma, também reduziu a fosforilação de I κ B- α (% inibição: $27,0 \pm 7,4$) ($P < 0,05$) (**Figura 16A e C**).

Finalmente, observou-se o efeito de P3G sob o próximo componente dessa cascata, a subunidade p65, que é ativada após a fosforilação de I κ B- α . Nesses experimentos, o tratamento de macrófagos com P3G antes da estimulação com LPS reduziu significativamente a fosforilação de p65 quando comparado com o grupo controle estimulado (% inibição: $37,2 \pm 5,3$) ($P < 0,05$). Da mesma forma, a Dex também inibiu esse parâmetro (% inibição: $30,2 \pm 8,1$) ($P < 0,05$) (**Figura 16A e D**).

Figura 16 - Efeito da P3G sobre a via de ativação do NF- κ B em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS



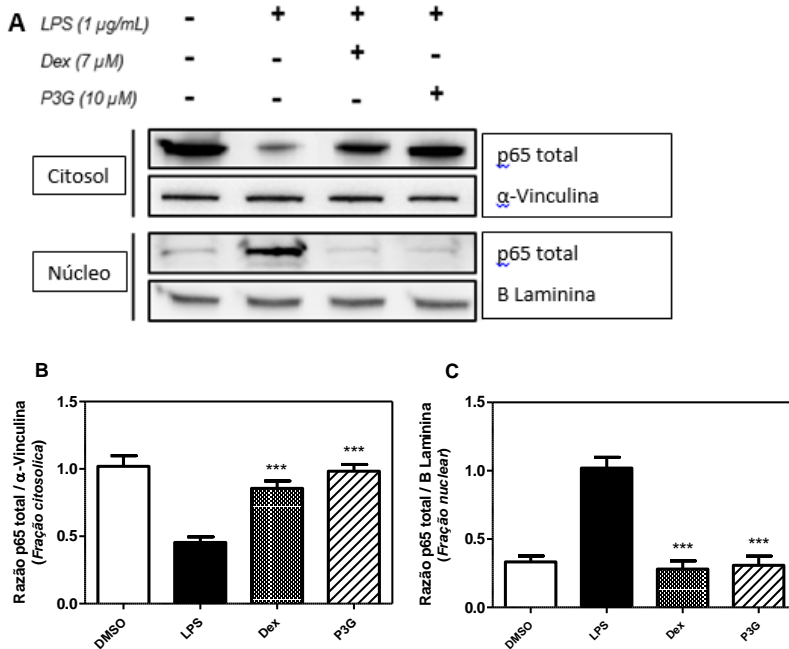
Efeito da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo na via do NF- κ B em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS. (A) Imagem representativa de Western blot dos experimentos de fosforilação da via do NF- κ B. (B) Representação gráfica dos experimentos de fosforilação de IKK α / β . (C) Representação gráfica dos experimentos de fosforilação de I κ B- α . (D) Representação gráfica dos experimentos de fosforilação de p65. DMSO: células tratadas somente com dimetilsulfóxido estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (1 μ g/mL); Dex: animais pré-tratados com dexametasona (7 μ M) antes da administração de LPS; P3G: células pré-tratadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (10 μ M) antes da administração de LPS. Resultados foram expressos como a média \pm e.p.m; n = 4; * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$.

4.3.5. EFEITO DA P3G NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κ B, INDUZIDA POR LPS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7

Também foi investigado se o efeito da P3G poderia ser devido, em parte, à inibição da translocação da subunidade p65 do NF- κ B do citosol, para o núcleo após sua fosforilação. Nestes experimentos, no grupo controle estimulado o LPS foi administrado sozinho, e como esperado, demonstrou uma diminuição no conteúdo de p65 citosólico e consequente aumento no seu conteúdo nuclear ($P < 0,001$) (**Figura 17**).

O pré-tratamento dos macrófagos com P3G reduziu significativamente a translocação da subunidade p65 de NF- κ B do citosol para o núcleo. Nesse contexto, fica comprovado que a P3G inibe a translocação dessa unidade para o núcleo, mantendo níveis elevados de p65 no citosol, quando comparado com o grupo estimulado com LPS ($P < 0,001$) (**Figura 17A e B**). Para confirmação destes dados, também foi observada a redução no conteúdo da subunidade p65 no núcleo após o tratamento com P3G, quando comparado com o grupo tratado com LPS ($P < 0,001$) (**Figura 17A e C**). O fármaco anti-inflamatório de referência, apresentou o mesmo padrão de resultados da P3G ($P < 0,001$) (**Figura 17A, B e C**).

Figura 17 - Efeito da P3G na translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B, induzida por LPS em macrófagos Raw 264.7.



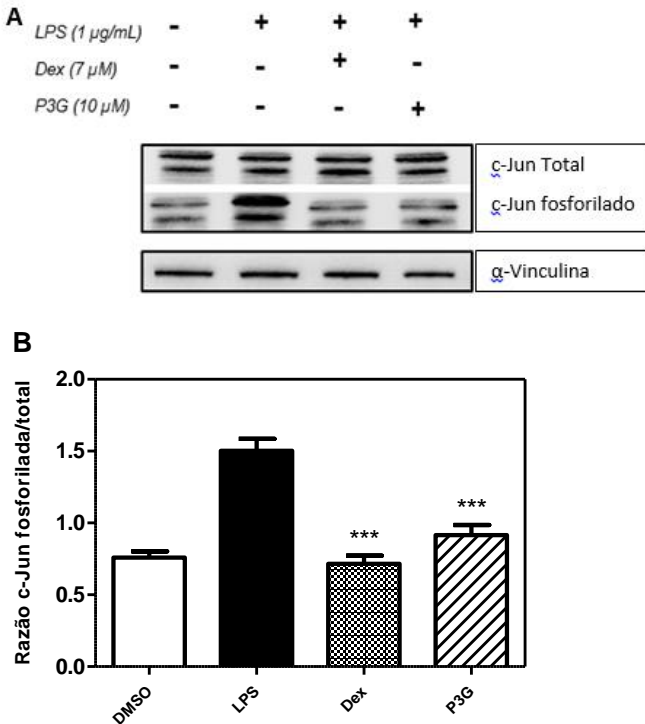
Efeito da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo na translocação nuclear da subunidade p65 do NF- κ B, induzida por LPS em macrófagos Raw 264.7. (A) Imagem representativa de Western blot dos experimentos com as frações p65 citosólica e nuclear do NF- κ B. (B) Representação gráfica dos experimentos com a fração p65 citosólica do NF- κ B. (C) Representação gráfica dos experimentos com a fração p65 nuclear do NF- κ B. DMSO: células tratadas somente com dimetilsulfóxido estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (1 μ g/mL); Dex: animais pré-tratados com dexametasona (7 μ M) antes da administração de LPS; P3G: células pré-tratadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (10 μ M) antes da administração de LPS. Resultados foram expressos como a média \pm e.p.m; n = 4; * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$.

4.3.6. EFEITO DA P3G NA ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO AP-1 EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS

A proteína ativadora-1 (AP-1) é outro fator de transcrição condutor ligado à ativação de TLR4. AP-1 é montado através da dimerização de um domínio característico bZIP (zíper de leucina de região básica) com a combinação de várias subunidades, sendo que no processo inflamatório estimulado por LPS, as subunidades c-Fos e c-Jun apresentam papel de destaque (EFERL; WAGNER, 2003). Por este motivo, avaliamos o efeito de P3G sob a fosforilação da subunidade c-Jun no extrato total dos macrófagos.

Nesse contexto, os experimentos demonstraram que P3G é capaz de inibir a fosforilação da subunidade c-Jun de forma significativa (% inibição: $39,0 \pm 4,8$) ($P < 0,001$), da mesma forma, a Dex na dose testada também apresentou resultado semelhante (% inibição: $52,2 \pm 3,7$) ($P < 0,001$) (**Figura 18A e B**).

Figura 18 - Efeito da P3G na ativação do fator de transcrição AP-1 em macrófagos Raw 264.7 estimulados com LPS.



Efeito da pelargonidina-3-*O*-glicosídeo na ativação do fator de transcrição AP-1, induzida por LPS em macrófagos Raw 264.7. (A) Imagem representativa de Western blot dos experimentos com c-Jun. (B) Representação gráfica dos experimentos com c-Jun. DMSO: células tratadas somente com dimetilsulfóxido estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (1 $\mu\text{g/mL}$); Dex: animais pré-tratados com dexametasona (7 μM) antes da administração de LPS; P3G: células pré-tratadas com pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (10 μM) antes da administração de LPS. Resultados foram expressos como a média \pm e.p.m; n = 4; *** $P < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

O morango é um dos frutos pequenos mais consumidos mundialmente, seja *in natura* ou na forma de geleias, iogurtes, sucos, entre outros. Sua cor e seu odor adocicado atraem a atenção dos consumidores. É rico em vitamina A, E, K, mas um dos seus aspectos nutricionais de maior relevância é sua grande quantidade de vitamina C (aproximadamente 60 mg por 100 g de fruto fresco) (US DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015). Além dos nutrientes tradicionais, os morangos estão entre as fontes alimentares mais ricas em fitoquímicos, representadas por compostos fenólicos, principalmente pelas antocianinas. De fato, os compostos fenólicos presentes no morango são conhecidos pela sua ação antioxidante e anti-inflamatória e possuem propriedades antimicrobianas, antialérgicas e anti-hipertensivas, assim como a capacidade de inibir as atividades de algumas enzimas e receptores fisiológicos, prevenindo doenças relacionadas com o estresse oxidativo (WANG; CAO; PRIOR, 1996). Na última década, morangos, mirtilos, framboesas, entre outros, foram estudados por suas propriedades biológicas e funcionais, principalmente usando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Fato é que, atualmente, estudos epidemiológicos e intervencionistas em seres humanos utilizando morangos estão crescendo, embora não existam indicações científicas definitivas, sobre o(s) mecanismo(s) de ação pelo qual os compostos majoritários presentes nesta fruta exercem seus efeitos (GIAMPIERI et al., 2015). Embora muitas vezes não se saiba exatamente o que ocorre em nível molecular no organismo vivo, após a utilização dos produtos naturais, são por comprovações experimentais e algumas vezes clínicas que pode se concluir que os metabólitos secundários advindos das plantas estão entre os melhores candidatos a desenvolvimento de fármacos, muito disso, devido à diversidade química e a complexidade estrutural dos mesmos. Apoiando esta afirmação, estudos têm demonstrado os efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo* das antocianinas, incluindo a ação anti-inflamatória (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; HIDALGO et al., 2012; TALL et al., 2004; ZHU et al., 2013).

Desta forma, levando-se em conta o conhecimento sobre os benefícios do consumo do morango e das antocianinas para a saúde humana, e ainda o fato de que a bibliografia disponível sobre os mecanismos moleculares destes compostos ainda seja bastante incipiente (GIAMPIERI et al. 2015; HUANG et al., 2016), decidimos neste estudo, investigar o possível efeito anti-inflamatório do extrato bruto de *Fragaria*

x *ananassa* Duch. e do seu principal composto, a pelargonidina-3-*O*-glicosídeo (P3G), também conhecido como calistefina, em um modelo de inflamação aguda pulmonar. Além disso também realizamos experimentos *in vitro*, com a finalidade de delinear e sugerir o possível mecanismo molecular pelo qual a P3G exerce seu efeito anti-inflamatório.

Os resultados apresentados em nosso estudo demonstraram que o EB e o composto majoritário do morango, P3G, são capazes de reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados no modelo murino de pleurisia e na cultura celular de macrófagos murinos. Primeiramente, nos experimentos *in vivo*, o EB de *Fragaria x ananassa* e a P3G mostraram um importante perfil anti-inflamatório, inibindo o influxo de leucócitos para a cavidade pleural induzida por carragenina, e esta inibição foi devido à redução na migração de neutrófilos. Esses efeitos foram seguidos por uma redução na atividade de MPO. Expressa em grânulos primários de neutrófilos, a MPO desempenha um papel fundamental no processo inflamatório e o aumento dessa enzima está diretamente ligado à ativação dessas células (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Esses resultados nos levam a sugerir que o EB e a P3G não só reduziram o influxo de leucócitos para a cavidade pleural devido à inibição da migração de neutrófilos, como também inibiram sua ativação. Resultados semelhantes foram obtidos por Ologundudu e colaboradores (2009), que também demonstraram redução nos níveis de leucócitos quando coelhos receberam uma administração intraperitoneal de uma fração rica em antocianinas isolada de *Hibiscus sabdariffa*, no modelo 2, 4-dinitrofenilhidrazina de hematotoxicidade em coelhos (OLOGUNDUDU et al., 2009). Além disso, Hassimotto et al. (2013) mostraram em um modelo de peritonite, que tanto a fração enriquecida com antocianina extraída da amoreira silvestre como o cianidina-3-glicosídeo, a antocianina mais abundante no extrato, reduziram o influxo de polimorfonucleares nos exsudatos peritoneais quando administrados 1 h após a injeção de carragenina (HASSIMOTTO et al., 2013).

A redução significativa na migração de neutrófilos para a cavidade pleural observada em nossos resultados pode ser explicada, pelo menos em parte, pela capacidade do EB e da P3G em inibir significativamente a atividade da ADA. A adenosina desaminase é uma enzima responsável pela desaminação da adenosina, que reduz os níveis deste importante autacóide anti-inflamatório. A diminuição da atividade de ADA pelo EB e P3G, mantém os níveis de adenosina que podem se ligar aos receptores A_{2a} e A_3 , induzindo uma redução significativa na adesão dos neutrófilos às células endoteliais, o que consequentemente

reduz a sua migração para o local da inflamação (ANTONIOLI et al., 2014). Essas afirmações são sustentadas por experimentos anteriores realizados em nosso laboratório utilizando o mesmo modelo inflamatório, onde foi demonstrado que a redução significativa na atividade da ADA leva à redução da migração de neutrófilos para a cavidade pleural (DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2004; DE SOUZA et al., 2015).

A formação de exsudado é outro sinal da reação inflamatória. Esse fenômeno, dentre outros fatores, está diretamente ligado à produção de óxido nítrico após o agente flogístico estimular a resposta da imunidade inata induzindo a expressão de iNOS (CUZZOCREA et al., 2000; KAWAMURA et al., 2000). O NO é uma molécula de gás solúvel e responsável pelo relaxamento vascular e, conseqüentemente, pelo extravasamento de fluido dos capilares para o tecido danificado (TSUCHIYA et al., 2007). Neste contexto, nossos experimentos mostraram que o EB e P3G foram capazes de reduzir a concentração de exsudado na cavidade pleural de forma dose dependente. Reforçando esses resultados, o EB e P3G foram capazes de reduzir os níveis de NO, tanto nos experimentos *in vitro*, quanto nos experimentos *in vivo*. Nossos resultados são corroborados por Wang et al. (2015), que demonstraram um efeito inibitório importante de antocianinas isoladas de frutos de *Ligustrum* sp. sob níveis de NO, em modelos de edema de orelha, permeabilidade capilar abdominal e granuloma induzido por implante de algodão, em camundongos (WANG et al., 2015). Reforçando essa afirmação em outro estudo, Vendrame et al. (2014) mostraram que os ratos Zucker obesos submetidos a uma dieta com mirtilos, uma outra fonte rica em antocianinas, tiveram a sua função vascular aórtica restaurada por meio da diminuição da iNOS (VENDRAME et al., 2014).

A chave para que a cascata inflamatória desempenhe sua função é a produção e liberação de citocinas para o ambiente extracelular. No sistema imune inato quando o receptor do tipo Toll-like 4 (TLR4) é ativado, ativa a via canônica de NF- κ B e uma série de proteínas adaptadoras citosólicas são recrutadas, e iniciam uma cascata de sinalização intracelular resultando na fosforilação e ativação do complexo de enzimas IKK. A IKK β subsequentemente fosforila o inibidor de NF- κ B, o I κ B- α , levando à sua degradação proteossomal, permitindo assim a translocação nuclear de NF- κ B e induzindo a produção de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6, entre outras (MANSELL; JENKINS, 2013). Em relação aos nossos resultados, observou-se que a P3G interfere na via de NF- κ B, inibindo a fosforilação de I κ B- α , no entanto, não foi capaz de reduzir a fosforilação das IKK cinases. Esse resultado sugere que a P3G

atua inibindo a degradação proteossômica de I κ B- α . Nesta mesma direção, um estudo realizado por Zhang et al. (2010) também demonstrou que uma antocianina, cianidina-3-O- β -glicosídeo, inibia a expressão de IL-6 e TNF- α por meio da supressão direta da fosforilação de I κ B- α em células THP-1 induzidas por LPS (ZHANG et al., 2010).

Uma vez que a I κ B- α foi inibida pela P3G, a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B também foi reduzida e, com isso, sua translocação para o núcleo. O mesmo padrão de resultados foi obtido por Chen et al. (2006), que também mostrou a inibição da ativação e translocação de NF- κ B para o núcleo com um tratamento com outras duas antocianinas, cianidina-3-rutinosídeo e cianidina-3-glicosídeo em células de carcinoma humano de pulmão altamente metastático (CHEN et al., 2006). Além disso, Lee et al. (2014) demonstraram que a translocação da subunidade p65 do NF- κ B para o núcleo foi significativamente atenuada por antocianinas isoladas de mirtilo, amora e groselha-negra em macrófagos de camundongos derivados de medula óssea induzidos por LPS (LEE et al., 2014). Por fim, um estudo conduzido por Kim e colaboradores (2006) mostrou *in vivo* que as antocianinas isoladas da soja preta têm efeitos protetores sobre o infarto do miocárdio e na expressão de moléculas de adesão endotelial, efeito atribuído à inibição da ativação do NF- κ B (KIM et al., 2006).

A especificidade e a regulação fina do grau e duração da ativação do receptor TLR4 no processo inflamatório é orquestrado pelos fatores de transcrição em conjunto as proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), mais especificamente a p38^{MAPK} e JNK^{MAPK} (BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012). A ativação de MAPKs regula diretamente a ativação de alguns fatores de transcrição, incluindo AP-1. Essa ativação produz uma interação sinérgica com a via canônica do NF- κ B, resultando na expressão gênica através da estimulação de genes promotores de muitos mediadores, tais como as citocinas IL-6 e TNF- α (MANSELL; JENKINS, 2013). Neste contexto, nossos experimentos mostraram que a P3G tem um efeito inibitório muito importante sob a fosforilação de JNK^{MAPK} e conseqüentemente sobre a subunidade c-Jun do fator de transcrição AP-1. Nossos achados são corroborados por Shin e colaboradores (2006), que também demonstraram que as antocianinas reduzem significativamente a fosforilação da cinase c-Jun N-terminal (JNK), em um modelo de isquemia cerebral em ratos (SHIN; PARK; KIM, 2006).

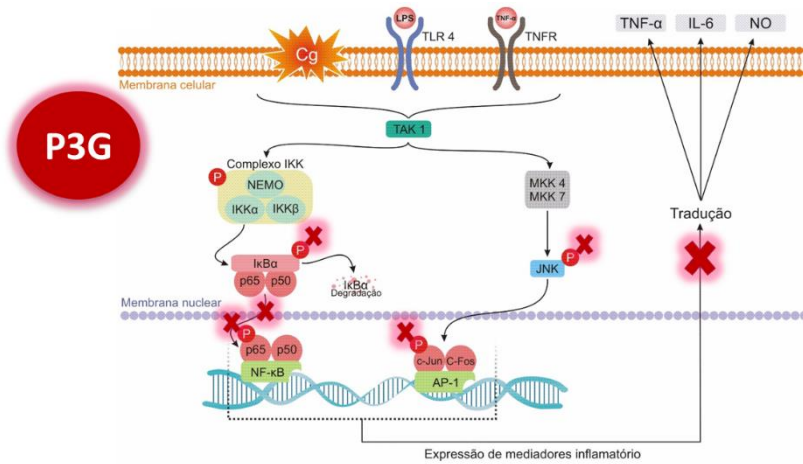
Investigando-se com mais detalhes o mecanismo molecular dessa inibição, verificamos que a P3G inibiu a fosforilação de JNK^{MAPK}, mas

curiosamente não a fosforilação da p38^{MAPK}. Fato que chamou a atenção, uma vez que esta via é citada por diversos autores como crucial no desenvolvimento do processo inflamatório após ativação de TLR4. A partir do momento que as MKK3 e MKK6 transmitem um sinal à p38, a mesma é translocada do citoplasma para o núcleo, ativando fatores de transcrição que controlam a expressão de enzimas envolvidas na inflamação (AVELAR, 2013). Muitos trabalhos mostram que diversas antocianinas, inibem a fosforilação da p38^{MAPK} (LIMTRAKUL et al., 2015; LONG et al., 2012; MA, et al., 2015). No entanto, outros estudos corroboram com nossos resultados, como o de Serra e colaboradores (2013) onde a antocianina cianidina-3-*O*-glicosídeo não foi capaz de inibir a fosforilação da p38^{MAPK}. Além disso, Hou et al. (2004) demonstraram em um modelo validado para a triagem de agentes quimio-preventivos de câncer, que as antocianinas suprimiram a transativação de AP-1 bloqueando a fosforilação na via de JNK, mas não a p38 (HOU et al., 2004).

6. CONCLUSÃO

Como conclusão, foi demonstrado que o importante efeito anti-inflamatório do morango se dá, pelo menos em parte, à presença de altas quantidades de P3G. Além disso, o mecanismo molecular desse efeito envolve a inibição da ativação de I κ B- α e redução da fosforilação de JNK^{MAPK}. Esses efeitos levam a uma redução na ativação de NF- κ B e AP-1 dos fatores de transcrição condutores da via inflamatória desencadeada pela ativação de TLR4, sugerindo que o composto testado é um potencial candidato para o desenvolvimento de uma terapia anti-inflamatória eficaz no tratamento de doenças inflamatórias, onde essa via exerce papel de destaque.

Figura 19 - Resumo gráfico do mecanismo molecular responsável pelo efeito anti-inflamatório da P3G



AP-1: proteína ativadora-1; Cg: carragenina; c-Fos: proteína da família Fos; c-Jun: proteína da família Jun; IκB-α: proteína inibidora *kappa* B *alfa*; IKK: proteína inibitória *kappa* B cinase; IKKα: proteína inibitória *kappa* B cinase *alfa*; IKKβ: proteína inibitória *kappa* B cinase *beta*; IL-6: interleucina-6; JNK: proteína cinase c-Jun N-terminal; LPS: lipopolissacarídeo; MKK4: proteína cinase dupla induzida por mitógeno 4; MKK 7: proteína cinase dupla induzida por mitógeno 7; NEMO: modulador essencial de NF-κB; NF-κB: fator de transcrição nuclear *kappa* B; NO: óxido nítrico; P3G: pelargonidina-3-*O*-glicosídeo; p65: subunidade (p65) do fator nuclear NF-κB; p50: subunidade (p50) do fator nuclear NF-κB; TAK1: TGF-*beta* cinase ativada; TLR4: receptor tipo Toll like 4; TNF-α: fator de necrose tumoral *alfa*; TNFR: receptor de TNF. Fonte: Elaborado pela autora.

REFERÊNCIAS

- AABY, K. et al. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842-862, 2012.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1051-68, 2014.
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry Production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n. 1-2, p. 156-61, 2013.
- ANTUNES, L. E. C.; REISSER, C. J. Fragole, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, v. 69, p. 60-65, 2007.
- ANVARI, F. et al. Tissue-derived proinflammatory effect of adenosine A2B receptor in lung ischemia-reperfusion injury. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 140, n. 4, p. 871-877, 2010.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 92-106, 2010.
- ASEHNOUNE, K. et al. Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 2522-2529, 2004.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 669-692, 2009.
- AVELAR, L. G. A. O papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Trematoda)

e na proteção contra o estresse oxidativo. **Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear fator-kappa B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066-71, 1997.

BARROSO, G.M. et al. **Frutos e sementes** – Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV, p. 443, 1999.

BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 141-179, 1994.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 973–982, 2008.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38 (MAPK)–STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 1185–1194, 2012.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

BOWEN-FORBES, C. S.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 554–560, 2010.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206–209, 1982.

BRIDLE, P.; VIGUERA, C. G.; BARBERAN, F. A. T. Analysis of anthocyanins by capillary zone electrophoresis. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 4, p. 537-545, 1995.

BRITO, F. D. Pleurisy and pouch models of acute inflammation. In: **Pharmacological methods in the control of inflammation**. Dagenham, p. 173-228, 1989.

BUENO, J. M. et al. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 126-151, 2012.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179–89, 2000.

CALVETE, E. O. et al. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008.

CAMARGO, L. S.; PASSOS, F. A. **Morango**: O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico. Ângela Maria Furlani e Glauco Pinto Viégas (editores). Campinas, Instituto Agronômico, v.1, 1993.

CARVALHO, A. et al. Anti HSV-1 activity of five strawberry cultivars. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, p. 133-137, 2012.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CHANG, S. H.; DONG, C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 7, p. 1069-1075, 2011.

CHAVES, V. C. Teor de antocianinas, compostos fenólicos e capacidade de captação de radicais livres de frutos de cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Dissertação (Mestrado) – Curso de Farmácia**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

CHEN, P. et al. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, p. 248–259, 2006.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222-225, Jan 2013.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, 2013.

CRUZ-MACHADO, S. da S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-KB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40-43, jun. 2010.

CUZZOCREA, S. et al. Inducible Nitric Oxide Synthase—Knockout Mice Exhibit Resistance to Pleurisy and Lung Injury Caused by Carrageenan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 1859–1866, 2000.

DA SILVA, F. L. et al. Anthocyanin pigments in strawberry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 374-382, 2007.

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.

DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. **Transplant Immunology**, v. 12, p. 151-157, 2004.

DASS, C. R.; CHOONG, P. F. C-jun: pharmaceutical target for DNzyme therapy of multiple pathologies. **Pharmazie**, v. 63, p. 411-414, 2008.

DE SOUZA, R. R. et al. Modulatory effect of *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 373-379, 2015.

DONG, L. et al. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. **The Journal of Asthma**, v. 46, n. 3, p. 229-233, 2009.

EFERL, R.; WAGNER, E.F. AP-1: a double-edge sword in tumorigenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 11, p. 859-68, nov. 2003.

ERSHLER, W. B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 41, p. 176–181, 1993.

FAO. Agricultural Production/strawberry. **Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO**, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 12 abril 2016.

FREDHOLM, B.B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, p.1–34, 2011.

FRESHNEY, N. W. et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, p. 1039–1049, 1994.

FRICK, J. S. et al. Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 8, p. 4957–4964, 2009.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets- Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–286, 2005.

FUKUMOTO, L.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3597-3604, 2000.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 1008–1016, 2011.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B.: NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 225-260, 1998.

GIAMPIERI, F., et al. The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. **Nutrition**, v. 28, n. 1, p. 9-19, 2012.

GIAMPIERI, F., et al. The potential impact of strawberry on human health. **Natural Product Research**, v. 27, n. 4-5, p. 448-455, 2013.

GIAMPIERI, F., et al. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. **Food & Function**, v. 6, p. 1386–1398, 2015.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. Adenosine deaminase: colorimetric method. In: HU BERGMAYER (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinheim, Germany: [s.n.]. p. 315–323, 1984.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

GLOVER, J. N.; HARRISON, S. C. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. **Nature**, v. 373, n. 6511, p. 257-61, jan. 1995.

GOSSLAU, A. et al. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 74–82, 2011.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–8, out. 1982.

GUO, Y.; YANG, B. Altered cell adhesion and cell viability in a p38alpha mitogen-activated protein kinase-deficient mouse embryonic stem cell line. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 5, p. 655-64, outubro 2006.

HANNIGAN, M. et al. The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 55-58, 1998.

HANKS, S. K.; HUNTER, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **FASEB Journal**, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995.

HANSEN, R. R.; MALCANGIO, M. Astrocytes-multitaskers in chronic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 716, p. 120-128, 2013.

HASSIMOTTO, N. et al. Inhibition of Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice by Oral Administration of Anthocyanin Mixture from Wild Mulberry and Cyanidin-3-Glucoside. **BioMed Research International**, v. 2013, ID. 146716, 2013.

HEINONEN, M.I.; MEYER, A.S.; FRANKEL, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4107-4112, 1998.

HEINRICH, P. C., CASTELL, J. V., ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, p. 621-36, 1990.

HENRIQUES, M. G. et al. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 99, n. 1, p. 164-168, 1990.

HESS, J. et al. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 25, p. 5965-73, 2004.

HIDALGO, M. et al. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. **Genes & Nutrition**, v. 7, p. 295-306, 2012.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 86, p. 1-15, jan. 2013.

HOFFMANN, A., NATOLI, G., GHOSH, G. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. **Oncogene**, v. 25, p. 6706-6716, 2006.

HOFFMANN, N. et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2504-2514, 2005.

HOSTETTER, S. J. Neutrophil Function in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 157–171, 2012.

HOU, D. et al. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 29-36, 2004.

HUANG, Y. et al. Maximizing the health effects of strawberry anthocyanins: understanding the influence of the consumption timing variable. **Food & Function**, v. 7, p. 4745-4752, 2016.

JAILLON, S. et al. Neutrophils in innate and adaptive immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 377-94, 2013.

JANSSENS, S.; TSCHOPP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF- κ B response. **Cell Death & Differentiation**, v.13, p. 773-784, 2006.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16483-6, jul. 1995.

KAWAMURA, M. et al. Are the anti-inflammatory effects of dexamethasone responsible for inhibition of the induction of enzymes involved in prostanoid formation in rat carrageenin-induced pleurisy? **European Journal of Pharmacology**, v. 400, p. 127-35, 2000.

KEUTGEN, A.J.; PAWELZIK, E. Modifications of Strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 4066-4072, 2007.

KIM, H. et al. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia / reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. **FEBS Letters**, v. 580, p. 1391–1397, 2006.

KIM, S.; IWAO, H. Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of

vascular remodeling. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 91, p. 177-181, 2003.

KINGSTON, D.G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KRENKE, R.; KORCZYŃSKI, P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 16, n. 4, p. 367-75, 2010.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **European Journal of Pharmacology**, v.616, n. 1-3, p. 7-15, 2009.

LEE, S. et al. Berry anthocyanins suppress the expression and secretion of proinflammatory mediators in macrophages by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B independent of NRF2-mediated mechanism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 404–411, 2014.

LIMTRAKUL, P. et al. Suppression of Inflammatory Responses by Black Rice Extract in RAW 264.7 Macrophage Cells via Downregulation of NF- κ B and AP-1 Signaling Pathways. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 10, p. 4277-83, 2015.

LONG, N. et al. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. **Cancer Science**, v. 104, n. 3, p. 298-303, 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUKTON, A.; CHICHESTER, C.; MACKINNEY, G. Characterization of a second pigment in strawberries. **Nature**, v. 176, p. 790, 1955.

LUTGENDORF, S. K. et al. Religious participation, interleukin-6, and mortality in older adults. **Health Psychology**, v. 23, n. 25, p. 465-475, 2004.

MA, M. M. et al. Cyanidin-3-O-Glucoside Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Injury Both In Vivo and In Vitro Suppression of NF- κ B and MAPK Pathways. **Inflammation**, v. 38, n. 4, p. 1669-82, 2015.

MAK, J. C. W. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, p. 368–374, 2008.

MALAVIYA, A. M. Cytokine network and its manipulation in rheumatoid arthritis. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 54 Suppl, p. 15-8, 2006.

MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 6, p. 838-54, 2007.

MANSELL, A.; JENKINS, B. J. Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: a potent combination in inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 24, p. 249–256, 2013.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MEDINA, M.B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 1565-1571, 2011a.

MEDINA, M.B. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 79-87, 2011b.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MENEGAZZI, M. et al. Hypericum perforatum attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 5, p. 740-53, 2006.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 62–71, fev. 2001.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–807, out. 2011.

MONTSEIRÍN, J. Neutrophils and Asthma. **Journal Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 5, p. 340-354, 2009.

MUTALIK, V. K.; VENTKATESH, K. V. Effect of the MAPK cascade structure, nuclear translocation and regulation of transcription factors on gene expression. **BioSystems**, v. 85, p. 144-157, 2006.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunology Letters**, v. 111, p. 1-5, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-35, 2012.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, 2012.

NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 692–713, 2013.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-kappa B signaling pathways. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 695-708, 2011.

OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SCIVITTARO, W.B. Mudanças certificadas do morango: maior produção e qualidade da fruta. **A Lavoura**, v.108, n.655, p.35-38, 2005.

OLOGUNDUDU, A. et al. Effect of Hibiscus sabdariffa anthocyanins on 2,4- dinitrophenylhydrazine-induced hematotoxicity in rabbits. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, p. 140–144, 2009.

ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cellular Signalling**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2000.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, p. 6853–6866, 1999.

PETRONILHO, S. et al. In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 1-12, 2012.

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

PROKOPOWICZ, Z. et al. Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and Statesman. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 43-54, 2012.

RAINGEAUD, J. et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 7420–7426, 1995.

RICCIARDOLO, F. L. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 731-65, 2004.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D–49D, maio 2008.

ROUSE, J. et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 78, p. 1027–1037, 1994.

ROUX, P. P.; BLENIS, J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 320-344, junho 2004.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 237-245, junho 2014.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 811-819, 1996.

SANHUEZA, R. M. V. et al. Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do nordeste. **Embrapa Uva e Vinho**, 2005. Disponível em < www.embrapa.gov.br >. Acesso em: 12 abril 2016.

SCALZO, J. et al. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. **Nutrition**, v. 21, p. 207–213, 2005.

SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, p. S3–S9, jul. 2008.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93-151, 2006.

SCHONTHALER, H. B. et al. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, p. i109-i112, mar. 2011.

SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. Animal models for testing drugs on inflammatory and hypersensitivity reactions. In: **Textbook of immunopharmacology**, New York, p. 253-261, 1989.

SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, v. 7, p. 291-307, 2003.

SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **FASEB Journal**, v. 9, n. 9, p. 726-735, 1995.

SERRA, D. et al. Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, e73001, 2013.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. E131-6, 2002.

SHIN, W.; PARK, S.; KIM, E. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats. **Life Sciences**, v. 79, p. 130–137, 2006.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, v. 72, p. 367-380, 1956.

SOUZA, J. R. M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

STEWART, L.; KATIAL, R. K. Exhaled Nitric Oxide. **Immunology and Allergy Clinics of North America**. v. 32, n. 3, p. 347-362, 2012.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449–7454, 2002.

TALL, J. M. et al. Tart cherry anthocyanins suppress inflammation-induced pain behavior in rat. **Behavioural Brain Research**, v. 153, p. 181–188, 2004.

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

TSUCHIYA, K. et al. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 148, p. 4548–4556, 2007.

US DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference**. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

VALLS, J. et al. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-72, 2009.

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

VENDRAME, S. et al. Wild blueberry consumption affects aortic vascular function in the obese Zucker rat. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 39, p. 255–261, 2014.

VERMEULEN, L. et al. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). **EMBO Journal**, v. 22, p. 1313–1324, 2003.

VESELY, P. W. et al. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. **Mutation Research**, v. 682, p. 7-12, 2009.

VIATOUR, P. et al. Phosphorylation of NF-kappa B and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 1, p. 43-52, 2005.

VINSON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5315-21, 2001.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705, 1996.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Science**, v. 45, 304-309, 1997.

WANG, J. et al. The mechanism of anthocyanin to anti-inflammatory and analgesic from Ligustrum fruit. **Chinese Journal of Applied Physiology**, v. 31, p. 431-436, 2015.

WANG, Y. et al. Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death? **Protein Cell**, v. 1, n. 2, p. 133-142, 2010.

WEISS, C.; BOHMANN, D. Deregulated repression of c-Jun provides a potential link to its role in tumorigenesis. **Cell Cycle**, v. 3, p. 111-113, 2004.

WESTON, C. R.; DAVIS, R. J. The JNK signal transduction pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 142-149, 2002.

WICKLUND, T. et al. Antioxidant capacity and colour of strawberry jam as influenced by cultivar and storage conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 4, p. 387-391, 2005.

WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.

WILSON, H. M. et al. Inhibition of macrophage nuclear factor-kappa B leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 1, p. 27-37, 2005.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-60, fev. 2013.

WOLVEKAMP, M. C.; MARQUET, R. L. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. **Immunology Letters**, v. 24, p. 1-9, 1990.

XIA, Y.; KARIN, M.. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. **Trends In Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 94-101, fev. 2004.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell research**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2005.

ZHANG, Y. et al. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.670 - 675, 2008.

ZHANG, Y. et al. Cyanidin-3-O- β -glucoside inhibits LPS-induced expression of inflammatory mediators through decreasing I κ B α phosphorylation in THP-1 cells. **Inflammation Research**, v. 59, p. 723–730, 2010.

ZHU, Y. et al. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, p. 843–849, 2013.

ZHUANG, Z. Y. et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 13, p. 3551-3560, 2006.

APÊNDICE A – TRABALHO DESENVOLVIDO

Artigo submetido:

- Molecular mechanism of Pelargonidin-3-*O*-glucoside the main responsible compound for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits.

ScholarOne Manuscripts™ Eduardo Galmarco ▾ Instructions & Forms Help Log Out

WILEY BioFactors

Home Author Review

Authoring Dashboard

Authoring Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts >
- Start New Submission >
- Legacy instructions >
- 5 Most Recent E-mails >
- English Language Editing Service >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Negis, Yesim	BiCF-16-0223	Molecular mechanism of Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucoside, the main responsible compound for the anti-inflammatory effect of Strawberry fruits View Submission	16-Dec-2016	20-Dec-2016
<ul style="list-style-type: none"> Evaluating Recommendation 				

ANEXO I**Protocolo de aprovação na comissão de ética no uso de animais
(CEUA/UFSC)****Protocolo**

PP00965

Título

Metodologias in vivo utilizadas no laboratório de pesquisa em Imunologia (CCS/UFSC).

Data de Entrada

09/04/2015

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

19/06/2015

Considerações

Ofício nº 46/CEUA/PROPESQ/2015

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Eduardo Monguilhott Dalmarco, Laboratório de Pesquisa em Imunologia

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de cinco mil e duzentos e sessenta e um sessenta camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério central

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 23/09/2019

Data 23/06/2015

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE