



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Avaliação da actividade anti-inflamatória de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. em modelos *in vivo* de inflamação crónica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Margarida Castel-Branco (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

---

Rita Francisca de Vasconcelos Rodrigues Pereira

2013

## **Agradecimentos**

Aos laboratórios de Farmacologia e de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, locais onde se realizou este trabalho experimental, no nome da Professora Doutora Maria Margarida Caramona e da Professora Doutora Maria Teresa Batista, pelo acolhimento e por terem proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho um agradecimento muito sincero.

À Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e à Professora Doutora Maria Margarida Castel-Branco, orientadoras desta dissertação, agradeço a orientação científica, ensinamentos, disponibilidade, incentivo e confiança dada ao longo deste trabalho. Agradeço ainda a oportunidade dada pra integrar este projecto.

Ao laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no nome do Professor Doutor António Cabrita, pelos serviços de histologia.

Ao Professor Doutor Rui de Carvalho, agradeço a disponibilidade e a co-orientação deste trabalho.

Ao João, pelos ensinamentos, dedicação e paciência ao longo de todo este ano, o meu muito obrigado.

Ao Rafael, à Beatriz, à Lúcia e à Dona Helena agradeço pelo apoio laboratorial e boa disposição sempre demonstrada ao longo deste trabalho.

Aos meus “mais que tudo”, Mãe, Pai e “Hique”. Obrigada pelo amor, preocupação, paciência e apoio, factores cruciais para que conseguisse atingir o final desta fase da minha vida. Obrigada pela pessoa que sou hoje, que sem o vosso carinho, ensinamentos e educação não o seria. Mano, além disso, obrigada por tornares a minha vida numa diversão constante.

Ao Luís, obrigada pela amizade, carinho, força e, sobretudo, paciência. Obrigada por permaneceres ao meu lado em todos os momentos.

A todos os amigos, mas em especial à Ana, Marisa e Joana. Pela amizade incondicional, diversão, carinho, força e dias intensivos de companhia na biblioteca.

## Resumo

A inflamação crónica, fortemente associada a várias doenças da actualidade, afecta drasticamente a qualidade de vida de uma grande parte da população mundial. Actualmente, o tratamento de tais patologias prende-se com terapêuticas aliadas a várias limitações, entre as quais graves efeitos secundários. Com o intuito de ultrapassar essas adversidades, a procura de compostos de origem natural, com potencial terapêutico e reduzidos efeitos secundários, tem sido incessante.

O infuso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., espécie com grande distribuição geográfica, tem sido amplamente usado pela medicina tradicional no tratamento de diversas patologias, entre as quais condições inflamatórias. Contudo, pouco conhecimento existe ainda sobre as suas reais acções terapêuticas, e subsequentes mecanismos de acção.

Este trabalho surge, deste modo, com o objectivo de investigar o efeito do extracto aquoso de *C. citratus* (livre de óleo essencial) num processo inflamatório crónico. Para tal, o estudo utilizou um modelo *in vivo* desse processo induzido pelo método de *cotton pellet* (*cotton pellet-induced granuloma*), realizado em ratos *Wistar* machos. Este modelo foi tratado com o extracto de *C. citratus* por um período de cinco dias, após o qual se procedeu à análise do efeito imunomodulador. O procedimento referido também foi utilizado para os controlos do estudo (indometacina, 1 mg/Kg; dexametasona, 2,5 mg/Kg; veículo).

As relações percentuais de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES, no foco inflamatório crónico, foram comparadas entre os grupos teste e controlo negativo pela técnica de ELISA.

O *C. citratus* reduziu a expressão da maioria dos elementos proteicos pró-inflamatórios analisados, à excepção das isoformas da IL-1. O efeito nas citocinas anti-inflamatórias foi igualmente uma redução, embora não se tenha verificado uma diminuição tão acentuada como a que se verificou para a indometacina. Daqui pode concluir-se que, de facto, o extracto aquoso de *C. citratus* possui um efeito imunomodulador e um maior efeito protector em comparação com os AINES, evidenciando, por isso, uma possível actividade anti-inflamatória crónica.

Além disso, os resultados da análise histológica efectuada não evidenciaram qualquer citotoxicidade associada à administração da toma crónica.

Os resultados obtidos no presente estudo constituem, deste modo, fortes indicadores de efeito terapêutico do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. no que toca a desordens inflamatórias de carácter crónico, edificando, desta forma, uma base a futuros estudos que possam confirmar totalmente a propriedade originalmente descrita pela etnomedicina.

**Palavras-chave:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., processo inflamatório crónico, citocinas, etnomedicina.

## Abstract

Today, chronic inflammation is strongly linked to several diseases that dramatically affect a large portion of the world population's life quality. Currently, treatment of these pathologies relates to therapeutic coupled to several limitations, including severe side effects. In order to overcome these adversities, the exploration for natural compounds with therapeutic potential and reduced side effects, has been unremitting.

*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. leaves infusion, species with wide geographic distribution, is used in traditional medicine for the treatment of several diseases, including inflammatory conditions. However, there is little knowledge about the real therapeutic actions and mechanisms of the species.

Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of essential oil-free infusion of *C. citratus* in chronic inflammatory process. For this, we used an *in vivo* model of chronic inflammation by cotton pellet-induced granuloma, in male Wistar rats. This model was treated with aqueous extract of *C. citratus* for five days. After this, we examined the immunomodulatory effect of this vegetal specimen on granuloma. The above procedure also used for controls (indomethacin 1 mg/Kg; dexamethasone, 2.5 mg/Kg; vehicle).

The relationship of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF and RANTES in granuloma were performed by comparison between test group and negative control using the ELISA technique.

*C. citratus* inhibited the most of cytokines, with exception of IL-1's isoforms. The effect on anti-inflammatory cytokines was also reduced. Although the reduction, the effect was lower than indomethacin's effect. This supports the immunomodulatory and protective effect of oil-free infusion of *C. citratus* compared with NSAIDs. And, so it evidenced the chronic anti-inflammatory properties. Furthermore, histological analysis's results showed that the extract was not found to be cytotoxic in chronic doses.

The results of this study are strong indicators of therapeutic effect of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., in chronic inflammatory diseases and it may become a basis for future studies in order to confirm this property, described originally by folk medicine.

**Keywords:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., chronic inflammation, cytokines, ethnomedicine.

## Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AINEs:** anti-inflamatórios não-esteróides

**AMPc:** monofostato cíclico de adenosina

**ARNm:** ácido ribonucleico mensageiro

**C:** cisteínas

**CAIR:** moléculas cinases associadas ao receptor da interleucina 1

**CMH:** complexo maior de histocompatibilidade

**COX:** enzima ciclo-oxigenase

**DM:** domínio de morte

**DMATR:** proteína de domínio de morte associada ao receptor do factor de necrose tumoral

**ELISA:** *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

**EPM:** erro padrão da média

**ERG:** elementos de resposta a glucocorticóides

**FADM:** proteína adaptadora do domínio de morte

**FATR:** factor associado ao receptor do factor de necrose tumoral

**FCDP:** factor de crescimento derivado de plaquetas

**FCE:** factor de crescimento epidérmico

**FCF:** factor de crescimento dos fibroblastos

**FCFb:** factor de crescimento dos fibroblastos básico

**FCVE:** factor de crescimento vascular endotelial

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FTC- $\beta$ :** factor de transformação de crescimento  $\beta$

**GDP:** guanina di-fosfato

**GM-FEC:** factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos

**GTP:** guanina tri-fosfato

**IFN:** interferão

**IFN-R:** receptor de interferão

**I $\kappa$ B:** inibidor citoplasmático do NF- $\kappa$ B

**IKK:** factor inibitório do NF- $\kappa$ B cinase

**IL:** interleucina

**IL-1Ra:** antagonista do receptor da IL-1

**IL-1R:** receptor da interleucina 1

**IL-2R:** receptor da interleucina 2

**IL-4R:** receptor da interleucina 4

**IL-6R:** receptor da interleucina 6

**IL-10R:** receptor da interleucina 10

**JAK:** família de tirosinas cinases *Janus*  
**JNK:** cinases c-jun  
**KAL:** células *killer* activadas por linfocinas  
**kDa:** quilodalton  
**LCD40:** ligando indutor de apoptose relacionado com o factor de necrose tumoral  
**LFas:** ligando fas  
**M-FEC:** factor estimulador de colónias de macrófagos  
**MyD88:** proteína de resposta primária à diferenciação mielóide 88  
**NK:** células *natural killer*  
**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor  $\kappa$ B*  
**PA-1:** proteína 1 activadora  
**PG:** prostaglandina  
**PI3C:** via da fosfatidilinositol-3 cinase  
**PIM-1:** proteína 1 inflamatória de macrófagos  
**PIR-1:** proteína 1 de interacção com o receptor  
**PRF:** peroxidase de raiz-forte  
**RANTES:** *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*  
**RAPG:** receptores acoplados à proteína G  
**RG:** receptor glucocorticóide  
**RHC:** região de homologia responsável pela ligação às citocinas  
**SDM:** proteína silenciadora do domínio de morte  
**SH:** domínio de homologia Src  
**STAT:** família de transdutores de sinal e activadores de transcrição  
**TIR:** domínio citoplasmático *Toll*/receptor da interleucina-1  
**TLRs:** *Toll-like receptors*  
**TMB:** 3,3,5,5-tetrametilbenzidina  
**TNF:** *Tumor necrosis factor*  
**TNFR:** receptor do factor de necrose tumoral  
**WSXWS:** sequência de aminoácidos triptofano-serina-X-triptofano-serina



# Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Abreviaturas.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xiv
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
Introdução.....	1
1.1. Processo inflamatório.....	2
1.1.1. Processo inflamatório crónico.....	4
1.1.2. Mediadores inflamatórios.....	6
1.1.2.1. As citocinas.....	7
1.1.2.1.1. Famílias de citocinas mais relevantes, seus receptores e vias de sinalização intracelular.....	9
1.1.2.1.1.1. Superfamília de citocinas do tipo I.....	10
1.1.2.1.1.2. Superfamília de citocinas do tipo II.....	14
1.1.2.1.1.3. Superfamília de factores de necrose tumoral.....	16
1.1.2.1.1.4. Superfamília de quimiocinas.....	19
1.1.2.1.1.5. Superfamília da interleucina-1.....	21
1.2. Terapêutica anti-inflamatória.....	24
1.2.1. Fármacos sintéticos.....	24
1.2.1.1. Anti-inflamatórios não esteróides.....	24
1.2.1.2. Glucocorticóides.....	26
1.2.2. Fármacos de origem natural.....	29
1.2.2.1. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	29
1.2.2.1.1. Composição do óleo essencial.....	31
1.2.2.1.2. Composição em compostos não-voláteis.....	32
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>35</b>
Objectivos.....	35
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>37</b>
Materiais e métodos.....	37

Materiais e métodos.....	37
3.1. Material.....	38
3.1.1. Material botânico.....	38
3.1.2. Animais de laboratório.....	38
3.1.3. Fármacos/Reagentes químicos.....	38
3.1.4. Material físico e <i>software</i> .....	39
3.2. Métodos.....	40
3.2.1. Preparação do extracto botânico de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf....	40
3.2.2. Doses botânicas administradas aos animais.....	40
3.2.3. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelo <i>in vivo</i> de inflamação crónica.....	41
3.2.3.1. Desenho experimental.....	41
3.2.3.2. Indução do processo inflamatório crónico nos animais.....	42
3.2.3.3. Análise da actividade anti-inflamatória em modelos <i>in vivo</i> .....	43
3.2.3.3.1. Determinação do nível de citocinas.....	43
3.2.4. Monitorização da temperatura basal.....	44
3.2.5. Análise histológica.....	45
3.2.6. Análise estatística.....	45
<b>Capítulo 4</b> .....	46
Resultados.....	46
4.1. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelos <i>in vivo</i> de inflamação crónica.....	47
4.1.1. Quantificação do nível de citocinas.....	47
4.2. Monitorização da temperatura basal.....	62
4.3. Análise histológica.....	62
<b>Capítulo 5</b> .....	64
Discussão.....	64
<b>Capítulo 6</b> .....	73
Conclusões.....	73
<b>Capítulo 7</b> .....	75
Referências bibliográficas.....	75

## Índice de Figuras

**Figura 1** - Representação do domínio extracelular conservado que dá origem à classificação das diferentes famílias de citocinas. Adaptado de Wilson *et al.*, 2009.

**Figura 2** - Representação esquemática da via de transdução de sinal da família de citocinas IL-1. Adaptado de Dinarello, 2002.

**Figura 3** - Classificação científica de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

**Figura 4** - *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Fotografia gentilmente cedida pela ERVITAL, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda., sediada em Mezio, Castro Daire, Portugal.

**Figura 5** - Principais elementos químicos que compõem o óleo essencial. Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

**Figura 6** - Principais componentes não-voláteis do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Crozier *et al.*, 2009; Ferreira, 2011; Shah *et al.*, 2011; Agostini-Costa *et al.*, 2012.

**Figura 7** - Representação da placa fornecida pelo *kit*. A placa de ELISA de 96 poços está indicada para a detecção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES (colunas 1a 12). As linhas A a H fornecem a possibilidade da detecção de cada citocina em seis amostras e em dois controlos intrínsecos. Adaptado do protocolo fornecido pelo *kit Multi-Analyte ELISArray*, da QIAGEN.

**Figura 8** - Esquema representativo dos passos cruciais ao protocolo da técnica de ELISA empregue.

**Figura 9** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo.

**Figura 10** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\beta$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 11** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-2, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\*

diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 12** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-4, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 13** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-6, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 14** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-10, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 15** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-12, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 16** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-13, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo.

\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e  
\*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 17** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do IFN- $\gamma$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 18** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do TNF- $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 19** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do GM-FEC, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 20** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do RANTES, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 21** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1mg/Kg e Dexametacina, 2,5 mg/Kg) na presença localizada do leque de citocinas analisadas neste estudo, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). Cada coluna representa a absorvância obtida para cada citocina de cada grupo analisado, normalizada com os controlos intrínsecos ao *kit* utilizado. A normalização foi determinada em percentagem, de acordo com a fórmula:  $((\text{média de absorvância do grupo teste} - \text{absorvância do controlo negativo intrínseco ao kit}) / (\text{absorvância do controlo positivo do kit} - \text{absorvância do controlo negativo do kit})) \times 100$ . Os dados representam a média  $\pm$  EPM

de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinado por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 22** - Imagens histológicas de corte de fígado com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.

**Figura 23** - Imagens histológicas de corte de rim com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.

## Índice de Tabelas

**Tabela I** - Imensidão funcional das citocinas, onde se pode verificar a redundância das suas funções. Adaptada de Wilson *et al.*, 2009.

**Tabela II** - Relação entre a dose humana utilizada na medicina tradicional e a dose de rato equivalente (Carlini *et al.*, 1986; EUFDA, 2005; Wojcikowshi *et al.*, 2013).

**Tabela III** - Relação percentual do nível de citocinas de cada grupo analisado. A relação foi calculada pela normalização com os correspondentes controlos intrínsecos ao *kit Multianalyte ELISArray*, da QIAGEN Sciences. A normalização foi determinada em percentagem de acordo com a seguinte fórmula, ((média das absorvâncias do grupo teste – absorvância do controlo negativo intrínseco ao *kit*)/(absorvância do controlo positivo do *kit* – absorvância do controlo negativo do *kit* ) x 100. Os dados são expressos como média ± EPM de 5-7 ensaios similares.

**Tabela IV** - Monitorização da temperatura basal dos animais antes e cinco dias após o processo de indução. Os dados são expressos como média ± EPM de 5-7 ensaios similares e estatisticamente analisados por ANOVA, segundo o teste de Bonferroni.

# **Capítulo 1**

## **Introdução**



## 1.1. Processo inflamatório

Os invertebrados, por não possuírem sistema vascular, reagem a um agente agressor digerindo-o através de hemócitos ou, caso não seja possível a sua digestão, a porção tecidual agredida é rejeitada e substituída através de processos de regeneração. O mesmo não acontece em formas de vida mais evoluídas, como é o caso da espécie humana. Nestas, a reacção fisiológica a um dano é realizada através de mecanismos complexos, dada a existência do sistema circulatório, sendo o processo inflamatório ou inflamação uma das primeiras linhas de defesa destes organismos (Spector, 1989).

O processo inflamatório é um mecanismo de protecção e de defesa do organismo, baseando-se numa resposta biológica e fisiológica dos tecidos vivos a qualquer tipo de agressão por forma a restabelecer a homeostasia. Este processo é desencadeado por agressões causadas por infecções (bacterianas, fúngicas e/ou virais), por traumatismos corporais (danos químicos, térmicos e/ou incisões), por corpos estranhos ou por distúrbios imunológicos (Kumar *et al.*, 2005; Suralkar, 2008; Pinto, 2009). Embora qualquer tecido possa sofrer danos, a inflamação caracteriza-se essencialmente por ser uma reacção que envolve a microcirculação (arteríolas, vénulas, capilares e vasos linfáticos) e os seus componentes (leucócitos, eritrócitos, plaquetas e plasma) (Spector, 1989).

O processo inflamatório, tendo em consideração o tempo e a resposta à agressão, é caracterizado por duas fases distintas: uma fase aguda e uma fase crónica. Inicialmente, sugeria-se até que os dois processos tivessem origem em causas distintas devido à actividade das diferentes células e mediadores envolvidos, o que resultava em diferentes quadros patológicos. Contudo, actualmente reconhece-se que ambos os processos estão interligados (Roy *et al.*, 2013).

A resposta aguda é uma resposta rápida e de curta duração (Spector, 1989), encarregue de conduzir mediadores até ao local da lesão e aí neutralizar o agressor. Devido a este propósito, ela é representada por três eventos principais: alteração do calibre dos vasos sanguíneos e alterações estruturais na microcirculação – fase vascular da inflamação – e migração dos leucócitos até ao foco inflamatório, com a finalidade de neutralizar o agente nocivo – fase celular da inflamação (Kumar *et al.*, 2005; Corwin, 2008). Deste modo, a resposta inflamatória aguda evolui a partir da fase vascular que tem início logo após a agressão. De facto, imediatamente após a agressão ocorre uma vasodilatação local e um recrutamento de capilares adicionais, o que provoca um

aumento da permeabilidade vascular. Estas etapas são mediadas por aminas vasoativas, tais como a histamina e a serotonina, libertadas por mastócitos e monócitos, pouco tempo após a agressão.

As alterações vasculares verificadas proporcionam um aumento do fluxo sanguíneo local, processo que justifica o rubor e o calor da inflamação, e ainda um aumento da permeabilidade vascular. Em consequência, saem para o espaço extravascular proteínas, água, elementos dos sistemas de complemento, da coagulação e das cininas, bem como leucócitos, por um processo denominado exsudação. Este processo consubstancia-se num aumento da movimentação de um filtrado plasmático para o espaço intersticial, razão da formação do edema (Corwin, 2008).

Uma das características capitais da inflamação aguda é o extravasamento de leucócitos. Este processo, juntamente com um gradiente de substâncias quimiotáticas, permite a sua chegada e activação celular no tecido alvo. Uma vez no local da lesão, os leucócitos, em particular os neutrófilos (leucócitos polinucleares), tentam neutralizar o agente patogénico, geralmente através de mecanismos fagocíticos e enzimáticos, reparando a lesão (Pinto, 2009; Kumar *et al.*, 2010a).

O processo inflamatório agudo pode ter, contudo, três resultados finais: (1) uma resolução completa, ocorrendo quando a lesão é limitada e a destruição dos tecidos foi pouco significativa e, assim, as células são regeneradas, sucedendo-se fenómenos de retorno à homeostase; (2) uma cicatrização com tecido conjuntivo (fibrose), quando o processo provoca uma destruição considerável dos tecidos, ou a lesão instigada envolve tecidos incapazes de regenerar, ou quando existe um grande exsudato de fibrina, terminando com uma reabsorção do tecido assolado sendo substituído por fibrose; (3) progressão para um processo inflamatório crónico, sendo esta transição caracterizada pela permanência do agente lesivo ou pela interferência no processo normal de cicatrização.

Assim, um processo inflamatório crónico é representado por um longo intervalo temporal, histologicamente pela presença de células mononucleares (linfócitos e macrófagos), proliferação de vasos sanguíneos, desenvolvimento de respostas imunitárias específicas (humorais e celulares), fibrose e necrose tecidular (Cotran *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2005; Gabay, 2006; Pinto, 2009). Este processo constitui, assim, um pilar de vários estados patológicos crónicos comuns, como artrite reumatóide, aterosclerose (Roy *et al.*, 2013), fibrose pulmonar (Cotran *et al.*, 1999; Kumar *et al.*,

2005; Pinto, 2009), asma, psoríase (Roy *et al.*, 2013), tuberculose e esclerose múltipla, entre muitos outros (Kumar *et al.*, 2010a).

Embora um processo inflamatório crónico partilhe várias características, envolva, por vezes, os mesmos tipos celulares de uma inflamação aguda e inclua mesmo fases agudas no seu decorrer (Spector, 1989), a constituição de uma resposta inflamatória crónica compreende uma resposta diferente da inflamação aguda a determinada causa (Kumar *et al.*, 2010a). Desta forma, não sendo o propósito deste trabalho a inflamação aguda, iremos focar-nos apenas no terceiro ponto dos resultados obtidos da resposta inflamatória: o processo inflamatório crónico (Cotran *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2010b).

### 1.1.1. Processo inflamatório crónico

Um processo inflamatório crónico tem como factores etiológicos a não neutralização de um agente agressor que causou inicialmente uma inflamação aguda, a interferência no processo normal de recuperação desta, antigénios endógenos que desencadeiam respostas auto-imunes (Lee *et al.*, 2009), a exposição prolongada a substâncias tóxicas ou não degradáveis (Underwood *et al.*, 2009) ou, de uma forma subtil, pela persistência de agentes crónicos de baixa intensidade que não invocam um processo inflamatório agudo significativo. É possível, então, definir um processo inflamatório crónico como sendo uma resposta inflamatória de longa duração e ininterrupta, que ocorre simultaneamente com uma destruição tecidual (Kumar *et al.*, 2010b) e com sucessivas tentativas de reparação tecidual (Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

O processo inflamatório crónico possui características morfológicas diferentes de um processo inflamatório agudo. Na inflamação aguda ocorrem alterações vasculares, edema e infiltração de neutrófilos, ao passo que na inflamação crónica predomina um infiltrado de células mononucleares (macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células plasmáticas) e uma destruição tecidual (induzida pelo próprio agressor e pelas células inflamatórias), acompanhada de tentativas de cicatrização do tecido devastado (substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo acompanhada de angiogénese e fibrose) (Kumar *et al.*, 2010b).

O processo de reparação, conseguido pelo crescimento de tecido de granulação, está intimamente associado à inflamação crónica, visto que uma das características deste processo é a destruição da arquitectura tecidual. O tecido de granulação consubstancia-

se em tecido conjuntivo fibroso composto, principalmente, por macrófagos, fibroblastos e novos vasos sanguíneos (Kumar *et al.*, 2010a).

Uma outra característica da inflamação crónica que a distingue do processo inflamatório agudo é a presença de uma exsudação não muito pronunciada, o que leva a um maior envolvimento celular, resultado da elevada mobilização e proliferação local (Nowak *et al.*, 2004).

Num qualquer processo inflamatório crónico o tipo celular predominante é o macrófago, sendo a sua acumulação uma importante característica do processo. Desse modo, dependendo da organização espacial dos macrófagos e da participação de outros tipos celulares, pode classificar-se a inflamação crónica em não-granulomatosa (não específica ou difusa) ou em granulomatosa (específica) (Nowak *et al.*, 2004). O conceito granuloma tem origem no termo “tumores de aparência granular” e é definido como sendo um agregado celular denso e localizado de macrófagos activos em conjunto com os seus derivados, numa tentativa de reter o agente ofensivo (Spector, 1989; Kumar *et al.*, 2010a; Kumar *et al.*, 2010b).

Um processo inflamatório crónico não-específico é assim designado devido à sua aparência microscópica difusa. Isto deve-se à presença simultânea de neutrófilos (que continuam a ser recrutados para manterem uma resposta aguda), de macrófagos e de linfócitos. A zona lesada é delimitada por tecido de granulação e, quando presente uma estimulação por citocinas, há síntese de colagénio, cercando a lesão com uma espécie de tecido cicatrizado. Este tipo de inflamação crónica está associado ao que ocorre na sucessão de um processo inflamatório agudo (Spector, 1989), e é o tipo mais comum de inflamação crónica. Como exemplos temos a artrite reumatóide e outras doenças auto-imunes (Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

Opostamente, agentes crónicos inatos incluem corpos estranhos inertes (como microrganismos) e reacções inflamatórias imunológicas descritas como sendo reacções de hipersensibilidade tardia. Este tipo de agentes desencadeia uma inflamação crónica granulomatosa, que se caracteriza pela presença de poucos neutrófilos e pela predominância de macrófagos, levando à formação de uma lesão específica, denominada granuloma (Spector, 1989; Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

Dentro do tipo granulomatoso, os granulomas podem ainda ser classificados em dois tipos, consoante a capacidade do agente agressor ser ou não reconhecido pelo sistema imunitário e a sua diferente patogénese (Kumar *et al.*, 2010b). Caso se tratem de corpos estranhos inertes e passem despercebidos ao sistema imunitário, os granulomas

daí resultantes designam-se de “granulomas de corpo estranho” – apresentam-se pequenos, e os únicos elementos observados são células gigantes multinucleadas formadas por fusão; se o agente agressor desencadear uma resposta imunitária celular, há a formação de “granulomas imunes” – caracterizam-se por uma estrutura composta por macrófagos modificados (grande área citoplasmática e finas delimitações celulares) conhecidos por células epitelióides e por células gigantes multinucleadas, cercadas por leucócitos mononucleares (linfócitos T e células plasmáticas) (Kumar *et al.*, 2010a; Kumar *et al.*, 2010b). Pode ainda suceder que, em alguns casos de inflamação granulomatosa, o centro do granuloma se encontre necrosado (Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

Apesar da distinção que é feita entre inflamação crónica difusa e granulomatosa, existem patologias que se desenvolvem partilhando características de ambos os tipos inflamatórios (Kumar *et al.*, 2010a).

### 1.1.2. Mediadores inflamatórios

O processo inflamatório, tal como descrito anteriormente, é uma resposta complexa dos tecidos vivos ao dano, caracterizando-se por uma fase aguda e uma fase crónica. A organização de todos os eventos de um processo inflamatório, que envolva o recrutamento ou activação celular é responsabilidade dos chamados mediadores inflamatórios (Kumar *et al.*, 2010a).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados dentro de quatro categorias (Feghali *et al.*, 1997):

- Os mediadores lipídicos, como o factor de activação plaquetário e derivados do ácido araquidónico, como as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas, sintetizados a partir de fosfolípidos membranares;
- Peptídeos pró-inflamatórios provenientes de quatro cascatas biológicas – cascata da coagulação, sistema do complemento, sistema das cininas e sistema fibronolítico;
- Óxido nítrico, um vasodilatador endógeno;
- Grupo de polipeptídeos sintetizados de novo com origem celular, conhecidos por citocinas, que constituem o maior leque de moléculas com influência na resposta inflamatória devido ao seu papel crucial na migração e activação celular.

No processo inflamatório crónico, as citocinas têm um papel fundamental em vários procedimentos, entre eles, o recrutamento, activação e replicação local de macrófagos e células T, sobrevivência das células inflamatórias pela inibição do processo apoptótico, na concepção de uma resposta imunitária e na síntese de tecido de granulação e fibrose (Kumar *et al.*, 2010a).

### 1.1.2.1. As citocinas

As citocinas podem ser definidas como proteínas de baixo peso molecular (7-80 kDa) principalmente produzidas por leucócitos, mas também o podem ser por células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (Lamoureux *et al.*, 2007). As citocinas exercem a sua função local ou sistemicamente sobretudo de duas formas: de uma forma autócrina, quando se ligam a receptores da superfície da célula onde são sintetizadas: de uma forma parácrina, quando actuam em células adjacentes às que as produziram (Feghali *et al.*, 1997; Lamoureux *et al.*, 2007). Contudo, quando são sintetizadas em elevada quantidade, elas também podem actuar endocrinamente, ao entrarem na circulação e efectuarem funções em lugares distantes do seu local de origem (Kumar *et al.*, 2010a). Todas as formas de produção subjacentes ao seu método de actuação são altamente reguladas (Wilson *et al.*, 2009).

A família de citocinas inclui moléculas proferidas por uma grande diversidade de denominações, como interleucinas, interferões, quimiocinas, factores estimuladores de colónias, factores de crescimento e todas as proteínas cujo nome englobe a palavra factor (Kumar *et al.*, 2010a).

O modo de acção das citocinas está, na maioria das vezes, dependente da ligação a receptores específicos da superfície celular, da qual resulta um sinal que, dando início a uma cascata de sinalização, leva essencialmente a alterações na transcrição genética. Fenotipicamente, estas alterações podem traduzir-se na regulação da comunicação entre células envolvidas tanto em processos fisiológicos como patológicos. Os processos invadidos por estas são a imunidade, inflamação, hematopoiese, embriogénese, quimiotaxia, apoptose e crescimento, função e diferenciação de várias células durante a inflamação e respostas imunitárias tardias, como demonstra a Tabela I (Lamoureux *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009).

**Tabela I:** Imensidão funcional das citocinas, onde se pode verificar a redundância das suas funções. Adaptada de Wilson *et al.*, 2009.

Função	Citocinas envolvidas
<b>Pró-inflamatória</b>	IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, IL-27
<b>Anti-inflamatória</b>	IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, IL-25, FTC- $\beta$
<b>Antiviral</b>	IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$
<b>Factores de crescimento das células T</b>	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21
<b>Factores de crescimento das células B</b>	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-14, IL-21
<b>Factores hematopoiéticos</b>	IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, GM-FEC, M-FEC, factor das células estaminais
<b>Factores quimiotáticos</b>	CXCL1, CXCL8 (IL-8), CCL2, CCL5, CCL11
<b>Embriogénese</b>	FCVE, FCF, FTC- $\beta$
<b>Reparação tecidual/cicatrização</b>	FTC- $\alpha$ , FTC- $\beta$ , FCE, PDGF, FCFb
<b>Imunidade inata</b>	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27
<b>Imunidade adquirida</b>	IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , FTC- $\beta$ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-17

Em condições fisiológicas, o controlo *in vivo* da rede de citocinas envolve diversos processos. Muitas vezes esse controlo é tão complexo que acaba por desencadear produção ou activação excessiva de citocinas, originando processos patológicos. De facto, as citocinas, para além de apresentarem tempos de semi-vida curtos, são estritamente reguladas espacialmente. Algumas citocinas necessitam de sofrer uma clivagem para se tornarem activas. Ademais, as citocinas podem induzir ou inibir a produção de outras e dos seus receptores e podem actuar sinérgica ou antagonisticamente. As citocinas podem ainda antagonizar receptores específicos, não transmitindo sinal. Um outro tipo de regulação envolve a presença de inibidores das vias de sinalização inerentes às citocinas (Wilson *et al.*, 2009).

Por todos estes motivos, o estudo destas moléculas de baixo peso molecular prende-se com várias dificuldades. Além do pleiotropismo por elas verificado por executarem múltiplas funções dependendo do tipo celular com que interagem, raramente são produzidas ou agem individualmente. Este facto conduz, muitas vezes, a eventos de sinergismo ou antagonismo. Há ainda a acrescentar o facto da redundância funcional verificada pela partilha de várias funções (Tabela I) (Wilson *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010a).

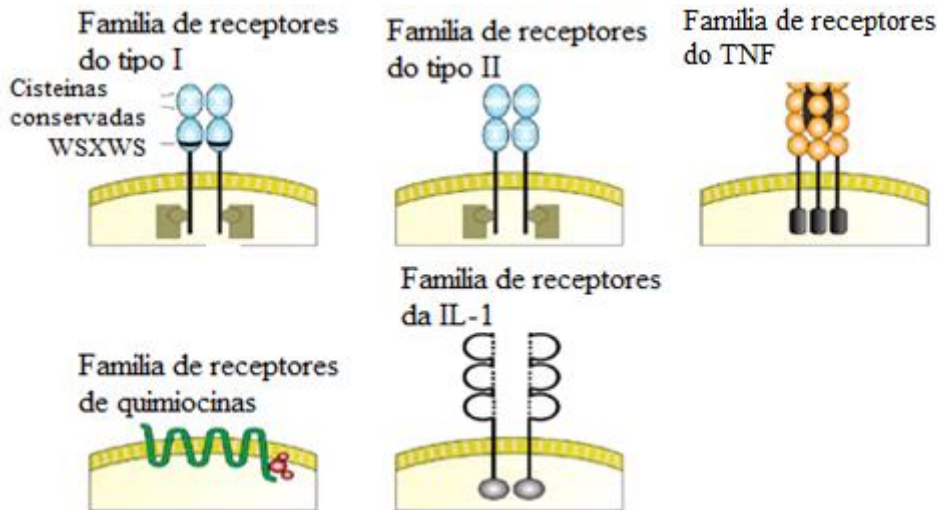
Apesar da redundância e pleiotropismo das citocinas, estas podem ser divididas, em termos latos, em dois grandes grupos: as envolvidas na inflamação aguda e as responsáveis por mediar a inflamação crónica (Feghali *et al.*, 1997), em que cada grupo pode ainda ser subdividido consoante o seu envolvimento na patogénese – pró-inflamatórias, ou protecção contra/término da resposta inflamatória – anti-inflamatórias. No entanto, é necessário ter em conta que algumas citocinas contribuem significativamente para ambos os processos. Daqui pode concluir-se que as citocinas desenvolvem uma rede de acções extensa, onde fenómenos de sinergismo, antagonismo, regulação positiva e negativa têm lugar, o que torna o estudo de determinado processo inflamatório um verdadeiro desafio (Wilson *et al.*, 2009).

#### **1.1.2.1.1. Famílias de citocinas mais relevantes, seus receptores e vias de sinalização intracelular**

Com a expansiva descoberta das citocinas, tornou-se evidente a possibilidade de as classificar em subgrupos, ou em famílias, tendo por base a partilha de características estruturais, localizações cromossomais ou mesmo de subunidades dos respectivos receptores (Meager *et al.*, 2007). Como a redundância funcional e o pleiomorfismo das citocinas são, na maioria das vezes, uma consequência da homologia dos seus receptores é, frequentemente, feita a classificação destas proteínas com suporte no receptor a que se ligam e, consequentemente, no mecanismo de sinalização intracelular por elas induzido.

Todas as famílias de receptores de citocinas partilham uma estrutura proteica tridimensional. O padrão comum dos receptores de citocinas é constituído por uma subunidade específica e única para a ligação de determinada citocina e outras subunidades comuns a todos. Esta igualdade de subunidades pode explicar, ainda que parcialmente, a redundância funcional das citocinas. Por exemplo, a IL-6, a IL-11 e a oncostatina M, por possuírem uma subunidade gp130, actuam de forma similar nas células hepáticas; contudo, em certas células, cada uma tem uma função única. Esta diferença provavelmente será consequência da expressão diferencial de receptores específicos ao ligando. É possível, então, classificar as citocinas em cinco grupos com base na homologia estrutural do domínio de ligação extracelular do receptor e o seu respectivo mecanismo de sinalização (Figura 1).





**Figura 1** - Representação do domínio extracelular conservado que dá origem à classificação das diferentes famílias de citocinas. Adaptado de Wilson *et al.*, 2009.

#### 1.1.2.1.1.1. Superfamília de citocinas do tipo I

A maior família de citocinas, classificada com base nas características comuns dos seus receptores, é designada por família de citocinas do tipo I. Esta família engloba cerca de 27 membros, incluindo as citocinas helicais IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 e o GM-FEC (Foster *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009). A origem da sua designação advém da classe de receptores a que se ligam – a família de receptores do tipo I.

Os receptores do tipo I são proteínas membranares do tipo I, cuja estrutura pode ser essencialmente considerada na forma modular (Bravo *et al.*, 2000). No segmento extracelular, o módulo crucial envolve uma região de homologia responsável pela ligação às citocinas (RHC) constituída por, pelo menos, dois domínios de fibronectina do tipo III. O domínio RHC básico, um domínio com uma sequência conservada WSXWS, o domínio transmembranar e um domínio intracelular conservado (Liongue *et al.*, 2007) estão presentes em todos os receptores do tipo aqui abordado, os quais, para alguns membros, são o suficiente para que ocorra a sinalização intracelular pretendida. Contudo, a maioria dos receptores do tipo I requer domínios auxiliares, como domínios do tipo imunoglobulina ou moléculas de fibronectina adicionais, para que a respectiva sinalização ocorra (Wang *et al.*, 2009).

De um modo geral, os receptores da superfície celular interagem com os seus ligandos através de interações altamente específicas; contudo, isso não acontece com

os receptores de citocinas, uma vez que, são receptores poli-específicos capazes de interagirem com um espectro considerável de ligandos. Na família de receptores de citocinas do tipo I existem três receptores principais partilhados pelas citocinas da família: a cadeia comum gamma ( $\gamma_c$ ), o gp130 e a cadeia comum beta ( $\beta_c$ ). É, no entanto, necessário salientar a baixa, ou nenhuma, afinidade que cada um destes, sozinho, possui com as citocinas, formando apenas complexos de alta afinidade na presença de receptores não sinalizadores específicos para elas (Wang *et al.*, 2009).

A formação do complexo de alta afinidade entre o ligando e o receptor alvo é o evento inicial na activação da cascata de transdução de sinal intracelular. De facto, isto leva à formação de um complexo proteico de sinalização, que pode incluir a família de tirosinas cinases citoplasmáticas JAK e a família de factores de transcrição STAT (transdutores de sinal e activadores de transcrição). Os membros destas famílias (quatro membros JAK e sete membros STAT (Schindler *et al.*, 2007)) são caracterizados pela exibição de diferentes afinidades para com distintos receptores. Este facto oferece diferentes combinações para darem resposta, ao mesmo tempo, às funções sobrepostas e únicas das citocinas (Wilson *et al.*, 2009). Isto significa que a composição do complexo sinalizador, e o conseqüente sinal, estão dependentes da identidade e composição dos receptores complexados pelo ligando (Bravo *et al.*, 2000).

Assim, a ligação da citocina ao receptor induz uma oligomerização responsável pela justaposição dos domínios intracelulares das subunidades de sinalização. Não tendo actividade enzimática intrínseca, os receptores de citocinas do tipo I estão constitutivamente associados a tirosinas cinases da família *Janus*. Esta associação faz com que as JAK sejam activadas pela oligomerização sofrida pelo complexo receptor. A activação enzimática das JAK faz com que se auto-fosforilem e aos domínios do receptor a elas coligados. Nesta medida, os resíduos de tirosina fosforilados funcionam como locais de acoplamento para a segunda família de proteínas envolvida: os STATs. A ligação dos STATs ao complexo leva-os à sua fosforilação e conseqüente dissociação dos receptores. Os STATs dissociados formam dímeros que, após translocação nuclear, ligam a sequências de ADN e actuam como factores de transcrição (Bravo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009).

Apesar de principal, a via JAK/STAT não é a única pela qual as citocinas do tipo I sinalizam, utilizando por vezes vias como a via PI3C e a via RAS-PCAM (Wang *et al.*, 2009). Resumidamente, a via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3C) leva à fosforilação e activação da proteína cinase B. Esta, por sua vez, activa a fosforilação do

complexo IKK, resultando na degradação do I $\kappa$ B e consequente libertação do factor nuclear (NF- $\kappa$ B) (mecanismo descrito mais à frente). A via RAS-PCAM leva à translocação nuclear da proteína cinase activa por mitogénio (PCAM), juntamente com outros factores e co-activadores de transcrição, que dão início à transcrição de uma variedade de genes (Huang *et al.*, 2008).

Os receptores partilhados permitem subagrupar os complexos de receptores de citocinas do tipo I em três subclasses: os complexos que usam o receptor partilhado gp130, os que usam o receptor  $\gamma$ c e, por fim, os que usam a cadeia  $\beta$ c.

O gp130 é o componente comum aos complexos receptores associados à designada “superfamília de citocinas gp130” ou IL-6/IL-12, composta por 10 membros, dos quais se salientam a IL-6 e a IL-12 (Wang *et al.*, 2009). A IL-6 é sintetizada no foco inflamatório por fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos, incitada por diversas citocinas mas inibida por glucocorticosteróides (Meager *et al.*, 2007). Na resposta inflamatória aguda, a IL-6 altera a concentração de muitas proteínas de fase aguda, de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Já quanto à sua presença num processo inflamatório crónico, a IL-6 não só incita as reacções de fase aguda como também conduz ao desenvolvimento de respostas imunitárias celulares e humorais específicas (Gabay, 2006), ao actuar como factor de crescimento e diferenciação de células B e activador e diferenciador de células T (Feghali *et al.*, 1997). A IL-6 tem um efeito ambíguo: quando presente em determinados níveis (inflamação aguda), tem uma acção protectora; em episódios de cronicidade, tem uma acção pró-inflamatória ao favorecer a acumulação de células mononucleares no foco inflamatório (Gabay, 2006). Já a IL-12, citocina envolvida na resposta inflamatória crónica mediada por células, é sintetizada essencialmente por células B activas e macrófagos. Biologicamente, ela é responsável pela promoção da síntese e activação de células T citotóxicas, pelo aumento da actividade citolítica, pela proliferação de células *natural killer* (NK) e células *killer* activadas por linfocinas (KAL) e pela maturação de células dendríticas e linfócitos Th1 (Feghali *et al.*, 1997; Meager *et al.*, 2007; Shaikh, 2011). Tanto a IL-6, como a IL-12, exercem as suas funções biológicas através da ligação a receptores heterodiméricos de alta afinidade. Estes são, estruturalmente, definidos pela cadeia receptora específica para a citocina IL-6R $\alpha$  e IL-12R $\beta$ 1, e pela cadeia sinalizadora partilhada gp130 e IL-12R $\beta$ 2, respectivamente. Ambas as cadeias sinalizadoras estão associadas à proteína Tyk2 (Schindler *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). Já os membros da família STAT, responsáveis pela sinalização feita por estas citocinas, são distintos: o STAT3, factor

associado à indução de expressão de genes anti-inflamatórios e pró-proliferativos, anti-apoptóticos e codificantes de proteínas de fase aguda, é induzido pela IL-6; já a IL-12 leva à activação do STAT4, proteína que alveja genes pró-inflamatórios e antagonistas da proliferação (Schindler *et al.*, 2007).

A cadeia  $\beta_c$ , uma proteína transmembranar do tipo I, é composta por quatro domínios de fibronectina que formam dois pares de módulos RHC contíguos (Wang *et al.*, 2009). Esta cadeia receptora partilhada é funcional apenas com a presença das cadeias  $\alpha$  específicas da citocina, como ocorre com o GM-FEC. Esta citocina pertence à classe dos factores estimuladores de colónias (FEC), assim designado pela sua capacidade de indução de formação de colónias de macrófagos e granulócitos em culturas de medula óssea. O GM-FEC é sintetizado por monócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais quando activas por produtos de macrófagos (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e a sua acção principal prende-se com a inflamação aguda. Nesta, o GM-FEC estimula as funções efectoras dos neutrófilos, eosinófilos e fagócitos mononucleares (Feghali *et al.*, 1997). Estas funções são dependentes da ligação do GM-FEC ao seu complexo receptor, ao qual está associado a molécula JAK2 e a proteína STAT5 (Schindler *et al.*, 2007).

Finalmente, a cadeia  $\gamma_c$  está presente na sinalização feita por citocinas como a IL-2, IL-4 e IL-13 (Wang *et al.*, 2009). Ao ser sintetizada, mormente por linfócitos T, a IL-2 actua como factor de crescimento/activador de células T, NK e B e como promotora do desenvolvimento de células KAL. A IL-2 possui ainda um papel crítico tanto na regulação da resposta inflamatória crónica humoral como na celular. Isto porque a ligação da IL-2 ao receptor da IL-2 (IL-2R) nos linfócitos T leva à proliferação celular, bem como ao aumento da secreção de linfocinas e expressão de moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (CMH II) (Feghali *et al.*, 1997, Shaikh, 2011). Os receptores de alta afinidade para a IL-2, encontrados principalmente nos linfócitos T, consistem em três cadeias polipeptídicas – IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ , ambas expressas em células T não activas, e IL-2R $\alpha$ , expressa aquando da sua activação (Meager *et al.*, 2007). A ligação da IL-2 ao seu receptor activa a JAK-3 e a STAT-5, factor este associado à eritropoiese e linfopoiese (Schindler *et al.*, 2007). A IL-4, por sua vez, tem origem a partir de células CD4+, mastócitos e basófilos e está envolvida na resposta inflamatória humoral. Este papel é traduzido pelas funções por ela desempenhadas, entre elas a indução da diferenciação de células T (Th0) a células Th2 (responsáveis pela secreção de citocinas de diferenciação), a inibição do

desenvolvimento de células Th1 (células que segregam citocinas ativadoras dos macrófagos) e a indução da diferenciação de monócitos a macrófagos, ao mesmo tempo que inibe o crescimento dos últimos. Além disso, a IL-4 é um antagonista das funções desempenhadas pelo IFN- $\gamma$  e vice-versa (Feghali *et al.*, 1997). A IL-13, com origem principalmente nas células T, é uma citocina anti-inflamatória por inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e a activação do NF- $\kappa$ B nos macrófagos. Além disso, controla positivamente a diferenciação e proliferação dos linfócitos B. Os IL-4R, expressos em escasso número, são partilhados pela IL-4 e pela IL-13. Este complexo receptor é constituído por uma cadeia receptora específica para a IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) e pela  $\gamma_c$ , a subunidade comum de alta afinidade (Meager *et al.*, 2007). A ligação da IL-4, ou da IL-13, ao IL-4R activa a via JAK/STAT através da JAK3, e subsequentemente do STAT6, homodímero implicado na activação genética proliferativa e diferenciativa, como a de células B e mastócitos (Schindler *et al.*, 2007).

#### **1.1.2.1.1.2. Superfamília de citocinas do tipo II**

A família de citocinas do tipo II é assim chamada devido à sua semelhança com a família anteriormente descrita, ou seja, tendo por base o padrão de aminoácidos conservados do domínio extracelular da família de receptores a ela associados (Kotenko *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2009). Esta família engloba os interferões do tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$ ), os do tipo II (IFN- $\gamma$ ) e os membros da família IL-10 (como a IL-10, IL-19 e IL-20) (Feghali *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2009). Os ligandos, que utilizam os receptores de citocinas da classe II para sinalizar, em particular, os IFNs e a IL-10, são importantes imunomoduladores capazes de induzir um largo espectro de respostas biológicas dependendo do tipo celular, das condições e/ou co-estimuladores presentes (Kotenko *et al.*, 2000). Os interferões do tipo I são vitais ao desenvolvimento de respostas antivirais e anti proliferativas. Já o IFN- $\gamma$ , membro dos interferões do tipo II, é um homodímero sintetizado nas células T activas e por células NK. Este último tipo é crucial à promoção de respostas imunitárias celulares ao elevar os níveis de expressão de moléculas do CMH I e II em células nucleadas e é, ainda, um estimulador de funções efectoras dos fagócitos mononucleares. A IL-10, sintetizada por células T e B activas, é, por outro lado, uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora e, por essa razão, é vulgarmente conhecida por “anti-citocina” (Shaikh, 2011). Esta propriedade está patente nas acções que tem sobre os monócitos activos. A IL-10 inibe a síntese de várias citocinas, como IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e a expressão de várias moléculas do

CMH II, bem como impede fortemente a apresentação de antígenos pelas mesmas células, que conduz à inibição das respostas celulares (Meager *et al.*, 2007). A “anti-citocina” é ainda capaz de interditar a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e de promover a degradação do ARNm codificante de citocinas pró-inflamatórias (Shaikh, 2011). A IL-10 é ainda capaz, sinergisticamente, de promover a proliferação e a diferenciação de células B, bem como a hematopoiese (Feghali *et al.*, 1997; Meager *et al.*, 2007).

A família de receptores de citocinas do tipo II é composta por sete membros funcionais: o factor tecidual e três pares de subunidades receptoras, que compõem os complexos individuais dos receptores em virtude dos IFN do tipo I (subunidades IFN- $\alpha$ R1 e IFN- $\alpha$ R2), dos IFN do tipo II (IFN- $\gamma$ R1 e IFN- $\gamma$ R2) e da IL-10 (IL-10R1 e IL-10R2). Estruturalmente, os receptores de citocinas do tipo II são semelhantes aos receptores do tipo I, caracterizando-se por um domínio extracelular com moléculas de fibronectina do tipo III mas pela ausência da sequência WSXWS (Kotenko *et al.*, 2000). Já o domínio intracelular está associado a uma molécula tirosina cinase pertencente à família das *Janus* cinase, através da qual é transmitido o sinal pela via de sinalização JAK/STAT (Wilson *et al.*, 2009).

A estrutura similar exibida pelos complexos dos receptores IL-10 e IFN- $\gamma$  sugere que a sinalização feita pelos ligandos respectivos envolve, em geral, os mesmos eventos. Tanto o homodímero IFN- $\gamma$  como o homodímero IL-10 estabelecem ligação a duas moléculas das cadeias dos respectivos receptores (duas cadeias IFN- $\gamma$ R1 e duas IL-10R1). Este evento inicial é, contudo, insuficiente para que haja sinalização intracelular e, por isso, as segundas cadeias são recrutadas (IFN- $\gamma$ R2 e IL-10R2) (Meager *et al.*, 2007). Tal como já mencionado, ao domínio intracelular dos membros desta família está inerente uma molécula tirosina cinase que, no caso das cadeias IFN- $\gamma$ R1 e IL-10R1, se denomina JAK1, mas que são distintas no caso das segundas cadeias (à IFN- $\gamma$ R2 está associada a JAK2 e à IL-10R2 a TyK2) (Kotenko *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007).

A ligação do ligando ao seu receptor específico induz uma oligomerização dos componentes do receptor que resulta na activação das JAKs. Devido à activação ocorre fosforilação dos resíduos de tirosina dos domínios intracelulares das cadeias R1 (Kotenko *et al.*, 2000). Os resíduos fosfotirosil do receptor dali resultantes recrutam, directamente, STATs específicos (devido a interacções com SH2), que se tornam substrato para as JAKs. Nas células não estimuladas, as STATs encontram-se no citoplasma como homodímeros inactivos. As moléculas STAT são fosforiladas e, por

isso, tornam-se activas. Estas são libertadas do receptor devido à sua reorientação em dímero antiparalelo, que permite a ligação dos domínios SH2 de uma STAT à fosfotirosina da outra STAT. Os dímeros daqui resultantes translocam-se para o núcleo, onde interagem com elementos promotores de transcrição genética específicos (Schindler *et al.*, 2007).

Os STATs activados pela sinalização feita por IFN- $\gamma$  são distintos dos activos pela IL-10. O IFN- $\gamma$  promove a activação do STAT-1, cujos genes alvo promovem a inflamação e antagonizam a proliferação. Pelo contrário, a sinalização feita pela IL-10 conduz à activação das STAT3, cujos genes por elas direccionados são caracterizados por actividade anti-inflamatória e pró-proliferativa. Interessantemente, pode-se notar uma acção antagonista entre o IFN- $\gamma$  e a IL-10, particularmente na regulação de respostas Th1 e Th2 e ainda, na activação de macrófagos, desempenhada pelo IFN- $\gamma$  que é inibida pela IL-10 (Kotenko *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 2007).

#### **1.1.2.1.1.3. Superfamília de factores de necrose tumoral**

A descoberta de uma molécula com actividade anti-tumoral, há cerca de 30 anos, resultou numa outra superfamília de citocinas – a família dos Factores de necrose tumoral (TNF). Esta grande família compreende membros como o TNF- $\alpha$ , o membro prototípico da família (Wajant *et al.*, 2003), a linfotoxina- $\alpha$ , o ligando Fas (LFas), o ligando CD 40 (LCD40) e o ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF (LIART), entre outros (Baud *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008).

Embora numerosos, os membros TNF exercem um estreito leque de bioactividades relativamente ao TNF- $\alpha$ . O LIART e o LFas induzem, maioritariamente, apoptose e não um processo inflamatório (Wajant *et al.*, 2003); já o LCD40 previne a morte celular programada e induz proliferação celular (Baud *et al.*, 2001). Por sua vez, o TNF- $\alpha$  pode ser considerado o principal mediador pró-inflamatório, com capacidade facultativa de induzir apoptose. Em situações fisiopatológicas, o TNF- $\alpha$  demonstra uma dualidade funcional, ao estar fortemente comprometido tanto com processos regenerativos como com a destruição tecidual (Wajant *et al.*, 2003). Particularmente, o TNF- $\alpha$  é responsável pela indução da migração e activação de linfócitos e leucócitos, pela febre (devido ao aumento da concentração de prostaglandinas (PG) no hipotálamo), pela síntese de proteínas de fase aguda, pela proliferação e diferenciação celular, pela expressão genética e, entre outras, pela apoptose (Baud *et al.*, 2001). Sendo que, ao contrário do que acontece com a generalidade das citocinas, o TNF- $\alpha$ , tal como a IL-1,

exerce o seu efeito sistemicamente, quer quando sintetizado em grande quantidade na inflamação aguda, quer na inflamação crónica, produzido em menor nível (Shaikh, 2011). A dualidade funcional pode ser explicada através de importantes parâmetros influenciadores do efeito *net* do TNF, tais como a especificidade tecidual, o contexto celular, os níveis de expressão de receptores e a duração de acção do mediador (Baud *et al.*, 2001; Wajant *et al.*, 2003).

O FNT- $\alpha$  é, principalmente, sintetizado por macrófagos, mas também por células linfóides, mastócitos, fibroblastos e células endoteliais (Feghali *et al.*, 1997), como sendo uma proteína transmembranar do tipo II, estabilizada estruturalmente como homotrímero. No entanto, uma forma solúvel homotrimérica é sintetizada proteoliticamente a partir da forma transmembranar pela enzima conversora de TNF- $\alpha$ . A bioactividade da última está dependente da sua concentração, uma vez que tende a dissociar-se a concentrações abaixo da escala nanomolar, e da sua baixa afinidade aos receptores.

Os membros da família TNF praticam as suas funções biológicas através da interacção com receptores membranares específicos, os receptores da família TNF. Especificamente, o TNF- $\alpha$  sinaliza através de dois receptores distintos: o TNF-R1, constitutivamente expresso na maioria dos tecidos, e o TNF-R2, tipicamente encontrado em células do sistema imunitário, como os macrófagos.

Estruturalmente, ambos os receptores são constituídos, extracelularmente, por quatro domínios ricos em cisteínas que lhes conferem uma estrutura alongada, responsável pela interacção com o ligando (Wajant *et al.*, 2003; Brauschädel *et al.*, 2007). Já o domínio intracelular tem uma particularidade que subdivide a família TNF-R em receptores que contêm um domínio de morte (DM) e receptores que interagem com FATR (factores associados ao receptor TNF). Com a ligação do TNF- $\alpha$  ao TNF-R1, o DM conduz a sinalização a um programa de morte celular, através de proteases pró-apoptóticas, embora este receptor também seja um forte activador de expressão genética através do recrutamento indirecto de membros da família FATR. Já o TNF-R2 recruta directamente o membro FATR-2, com consequente indução genética.

A expressão genética induzida por TNF é desencadeada principalmente por proteínas da família NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um grupo de factores de transcrição, constituídos pela família NF- $\kappa$ B/Rel, envolvidos na activação transcripcional de genes inflamatórios em resposta a citocinas ou outros factores estimulantes (Wajant *et al.*,



2003). A via NF- $\kappa$ B há muito que é considerada a via de sinalização pró-inflamatória prototípica (Lawrence, 2009).

Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B encontra-se inactivo no citoplasma devido à ligação de uma proteína inibitória de 43 kDa – a I $\kappa$ B – que lhe mascara a sequência de localização nuclear (Haddad *et al.*, 2011). Em resposta ao TNF- $\alpha$ , bem como a outros agonistas, as I $\kappa$ B podem sofrer degradação proteolítica, consequência da sua ubiquitinação induzida pela fosforilação pelo complexo inibitório da NF- $\kappa$ B cinase (IKK). O complexo IKK acredita-se ser composto por um heterómero de duas cinases (IKK-1 ou  $\alpha$  e IKK-2 ou  $\beta$ ), uma proteína reguladora IKK $\gamma$  (NEMO) (Lawrence, 2009) e um homodímero de proteína de choque térmico 90.

O primeiro passo na activação do complexo IKK é a reorganização dos membros do TNF-R1, devido às alterações estruturais induzidas pela ligação do ligando. O DM é capaz de se auto-agregar e, assim, sinalizar, independentemente da presença de um ligando. Contudo, esta propriedade intrínseca é silenciada por uma proteína silenciadora do DM (SDM). Após a ligação do ligando, a SDM dissocia-se do complexo TNF-R1 e a proteína de DM associada ao TNF-R1 (DMATR) é conscrita para o DM do TNF-R1. A ligação do DMATR ao TNF-R1 serve assim como plataforma para ligação de outras duas moléculas efectoras: o factor 2 associado ao TNF-R (FATR2), responsável pelo recrutamento do complexo IKK, e a proteína 1 de interacção com o receptor (PIR1), necessária à activação do mesmo.

Contudo, outras vias secundárias parecem ter também lugar: a PIR1 parece activar indirectamente a IKK através da via PCAM e ainda, a molécula FATR6 relacionada com a FATR2 é capaz de interagir com uma proteína cinase C atípica, que também está implicada na activação do NF- $\kappa$ B. De facto, embora o conhecimento das múltiplas funções do TNF- $\alpha$  *in vivo*, bem como as vias que levam da interacção TNF/TNF-R1 à activação do complexo IKK e do NF- $\kappa$ B, estejam bem compreendidos, os mecanismos dos últimos eventos da resposta do NF- $\kappa$ B ainda se encontram por definir (Wajant *et al.*, 2003).

Além do NF- $\kappa$ B, o TNF- $\alpha$  induz igualmente a activação de cinases do grupo das proteínas cinase activadas por *stress*/cinase c-jun (JNK). Após activação, as cinases JNK translocam-se para o núcleo aumentando a actividade transcripcional de factores, como o c-Jun, através da sua fosforilação. O c-Jun pertence a um grupo de proteínas que se dimerizam para formar factores de transcrição, conhecidos como proteína 1

ativadora (PA-1). A PA-1 está comprometida com processos celulares, como proliferação, diferenciação e prevenção de processos apoptóticos.

Ademais à transcrição genética, o TNF é capaz de induzir mecanismos moleculares de morte celular, através do DM citoplasmático do seu receptor. Não obstante, este processo é minoritário em relação à sua função reguladora em processos inflamatórios, até, por vezes, inibindo-se mutuamente. Apesar de não ser o único meio de indução de apoptose, diversos estudos têm comprometido a presença de uma proteína adaptadora FADM, ligada à DMATR, e de caspases ao processo indutor de morte celular (Wajant *et al.*, 2003). A FADM recruta moléculas caspases 8 para a sua proximidade, local onde ocorre a sua activação auto-proteoliticamente. A activação comporta a activação de cascatas de caspases que, por fim, conduzem à clivagem de um largo número de proteínas celulares, resultando na morte da célula (Baud *et al.*, 2001).

Assim, o TNF- $\alpha$  tem um papel essencial na regulação do balanço entre respostas pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas e, ao mesmo tempo, na proliferação celular e inflamação. Embora o conhecimento actual da sinalização feita pelo TNF- $\alpha$  seja extenso, não está ainda completo. A sua conclusão pode vir a ser relevante na intervenção terapêutica de doenças inflamatórias crónicas, como a doença de Crohn, artrite reumatóide, esclerose múltipla e Alzheimer (Baud *et al.*, 2001).

#### **1.1.2.1.1.4. Superfamília de quimiocinas**

Desde a descoberta da CXCL8 (IL-8) e da CCL2 (PIM-1), no final dos anos 80, que a superfamília das quimiocinas tem sido largamente expandida (Zlotnik *et al.*, 2012). As quimiocinas abrangem um grupo de proteínas solúveis, de baixo peso molecular, ímpares entre as citocinas pelas suas propriedades quimiotácticas (Wilson *et al.*, 2009). Produzidas e alvejadas por uma variedade múltipla de células são, contudo, essencialmente, endereçadas à quimioatração leucocitária e ao tráfego de células imunes para todo o organismo (Huang *et al.*, 2008).

Funcionalmente, as cerca de 40 quimiocinas descritas (Chensue, 2013) podem ser divididas em três categorias: as quimiocinas responsáveis pela manutenção da homeostasia, as que induzem processos inflamatórios e as de dupla função, ou seja, quimiocinas que medeiam ambos os processos (Huang *et al.*, 2008; Zlotnik *et al.*, 2012).

As quimiocinas homeostáticas, expressas constitutivamente mas limitadas ao tipo celular, estão envolvidas na organização e regulação do sistema imunitário ao

mediar a migração homeostática de linfócitos e células dendríticas (células envolvidas na imunidade adquirida). Pelo contrário, as quimiocinas inflamatórias são produzidas apenas perante situações de infecção, ou inflamatórias, desencadeando o recrutamento de células como macrófagos e neutrófilos para o foco inflamatório (Huang *et al.*, 2008; Zlotnik *et al.*, 2012).

A assinatura molecular das quimiocinas baseia-se em quatro resíduos de cisteína conservados intercalados por ligações dissulfito (Zlotnik *et al.*, 2012). Com base na presença e posicionamento dos dois resíduos de cisteína do N-terminal, as quimiocinas podem ser agrupadas em quatro subfamílias: CXC, CC, (X)C e CX<sub>3</sub>C. Nas quimiocinas CXC, um único aminoácido não conservado (X) separa a primeira da segunda cisteína, enquanto a subfamília CC possui as suas cisteínas adjacentes; as citocinas CX<sub>3</sub>C possuem três aminoácidos entre as suas cisteínas e a subfamília (X)C distingue-se por não conter a primeira e a terceira cisteína (Zlotnik *et al.*, 2012).

A actividade das quimiocinas é mediada pela ligação à família de receptores acoplados à proteína G (RAPG), mais concretamente a um subgrupo da classe A, a classe G $\alpha$ i das proteínas G heterotriméricas (Zlotnik *et al.*, 2012). A classe A do receptor RAPG, também designada por receptores rodopsina, é uma subfamília geralmente subdividida em quatro grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Em geral, os RAPGs interagem com as, e sinalizam através de, proteínas heterotriméricas reguladoras, capazes de interagirem com o nucleotídeo guanina (proteína G). Após estimulação pelo ligando, o RAPG sofre uma alteração conformacional capaz de activar a proteína G pelo processo fosforilativo de GDP a GTP. A activação da proteína G induz o seu desacoplamento ao receptor e, consequentemente, o desencadeamento de uma cascata de eventos de sinalização que regulam várias funções celulares (Huang *et al.*, 2008). As quimiocinas partilham ainda outra característica com as demais citocinas: a sobreposição de outras vias de sinalização como a JAK/STAT e a PI3C (Huang *et al.*, 2008). Com vista à quimiotaxia ocorrem processos celulares dependentes de actina, síntese de moléculas de adesão, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, reorganização do citoesqueleto e extensão de pseudópodes; nos leucócitos há a promoção de processos fagocíticos e de desgranulação (Juan *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009; Koelink *et al.*, 2012).

A nomenclatura dos receptores é determinada de acordo com a principal subfamília por eles ligada. Estão descritos cerca de 20 receptores de quimiocinas com actividade quimiotáctica dependente de G $\alpha$ i, embora cinco receptores atípicos tenham sido também descritos. Estes últimos são estruturalmente semelhantes, embora as suas

funções se prendam com o sequestro de quimiocinas, evitando a sinalização, ou então, para a estabilização da concentração destas, para uma mais eficiente quimiotaxia (Juan *et al.*, 2009; Zlotnik *et al.*, 2012; Chensua, 2013).

Este tipo de citocinas parece ter uma ampla acção na inflamação crónica, já que este processo é caracterizado pela contínua activação das células imunes residentes e contínua infiltração de células circulantes (Koelink *et al.*, 2012).

Uma das quimiocinas mais versáteis pertence à subfamília CC, o CCL5, ou tradicionalmente conhecido como RANTES. O CCL5 é armazenado em grandes concentrações nos grânulos plaquetários e das células T CD8+, mas libertado rapidamente sob activação celular (Zlotnik *et al.*, 2012). Este, tal como os membros da sua subfamília, activa principalmente monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos (Juan *et al.*, 2009).

#### **1.1.2.1.1.5. Superfamília da interleucina-1**

Historicamente, a família IL-1, também conhecida por superfamília imunoglobulina, compreendia duas proteínas: a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (Meager *et al.*, 2007). Contudo, actualmente, é composta por 11 membros, dos quais se destacam as duas referidas e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra), como os mais bem estudados (Dinarello, 2002; Huang *et al.*, 2008; Dinarello, 2009). A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são membros agonistas da família, enquanto a IL-1Ra é um antagonista do receptor específico para a IL-1 $\alpha$  e para a IL-1 $\beta$ . Esta propriedade, única da família IL-1, pode levar à neutralização do efeito pró-inflamatório das isoformas IL-1, já que este inibidor endógeno compete pelo receptor IL-1 (Feghali *et al.*, 1997; Dinarello, 2002).

A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são sintetizadas como pró-formas, em que apenas a da IL-1 $\alpha$  é biologicamente activa quando apresentada na membrana celular. As respectivas pró-formas são clivadas por proteases específicas (calpaína para a IL-1 $\alpha$  e a enzima conversora de IL-1 $\beta$ ) para produzir as formas maduras de 17,5 kDa e 17,3 kDa, respectivamente (Meager *et al.*, 2007).

Os principais membros da família, à excepção da IL-1Ra, são essencialmente citocinas pró-inflamatórias, devido à sua habilidade estimulatória de expressão de genes associados à inflamação e doenças auto-imunes (Dinarello, 2002). Ambas as isoformas são produzidas por uma grande variedade celular incluindo os monócitos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos T e B. Responsáveis por efeitos num vasto leque de células, dão origem a um elevado número de actividades biológicas. A abundância de efeitos tem

origem, principalmente, na capacidade que a IL-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) tem para induzir a síntese de outras citocinas, que assim exercem as suas próprias funções (Meager *et al.*, 2007). A IL-1 é encarregue da indução do processo pirogénico através da estimulação da COX-2 e fosfolipase A2, e ainda actua, sinergisticamente, com factores de crescimento hematopoiéticos resultando no estímulo proliferativo de células T (Feghali *et al.*, 1997; Dinarello, 2002; Shaikh, 2011).

A família de receptores IL-1 é codificada por cerca de nove genes distintos. Contudo, bem como os membros desta família de citocinas, muitos dos receptores a ela associado encontram-se ainda com funções por definir. Aos três principais membros estão associados os receptores IL-1R1 (ou IL-1RI), IL-1R2 (ou IL-1RII) e IL-1R3 (ou IL-1R AcP). Dos três membros referidos, o IL-1 $\beta$  possui a menor afinidade para o receptor membranar do IL-1RI, e ainda menor para com a sua forma solúvel. A IL-1 $\beta$  liga-se com maior afinidade ao receptor IL-1RII, que se caracteriza por não possuir maquinaria de sinalização, designado por receptor negativo ou *decoy*, sendo considerada uma interacção quase irreversível devido ao longo tempo de dissociação. Já o IL-1Ra é o membro com maior afinidade a IL-1RI, tornando a ligação praticamente irreversível (Dinarello, 2002).

Os receptores da superfamília IL-1 são, extracelularmente, caracterizados por três domínios conservados do tipo imunoglobulina (Akira *et al.*, 2004; Drexler *et al.*, 2010), confiados ao reconhecimento dos membros da família, ao passo que o domínio intracelular do IL-1R é partilhado pelos *Toll-like receptors (TLRs)*, designando-se por domínio citoplasmático *Toll/receptor* da IL-1 (TIR). O domínio TIR é responsável pela sinalização desencadeada pelos membros da superfamília IL-1, à excepção do IL-1RII, que não o possui (Figura 2).

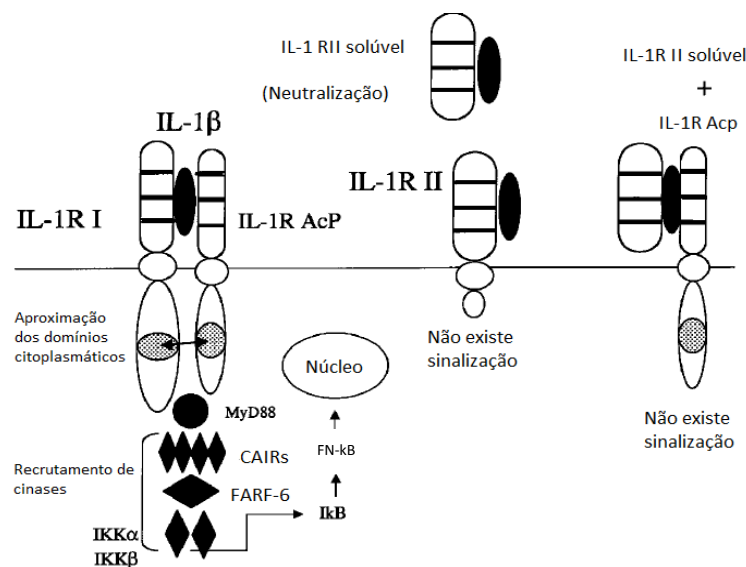
Após a ligação do ligando ao domínio extracelular, o complexo *TLR/IL-1R* dimeriza, sofrendo uma alteração conformacional indispensável ao recrutamento de moléculas necessárias à cascata sinalizadora. Destas destaca-se a proteína de resposta primária à diferenciação mielóide 88 – MyD88. Esta molécula é comum a vários receptores *TLR* para a transdução de sinal e, para isso, recruta moléculas cinases associadas ao receptor da IL-1 (CAIR-1 e CAIR-4) para que interajam com o “domínio de morte” a ela associado. Uma vez aí, o complexo CAIR-1/CAIR-4 sofre um processo fosforilativo, pelo qual uma molécula FARF6 se associa à CAIR-1 fosforilada. O complexo formado por CAIR-1 e por FARF6 dissocia-se do receptor e activa o complexo IKK - responsável pela fosforilação do I $\kappa$ B (processo que conduz à sua

ubiquitinação e consequente degradação por um proteossoma). Daqui advém a translocação dos dímeros do NF-κB (p50/p65) para o núcleo e consequente indução da expressão de genes pró-inflamatórios com locais de ligação para o NF-κB (Dinarello, 2002; Akira *et al.*, 2004; Drexler *et al.*, 2010). O NF-κB é uma família de factores de transcrição induzíveis largamente estudados que regula a expressão de mediadores inflamatórios (Haddad *et al.*, 2011).

Afora o envolvimento e indução do NF-κB, esta via tem um outro alvo, ao levar à activação de cascatas de PCAM, onde se incluem a PCAM p38, a proteína cinase regulada por sinais extracelulares e a proteína *JNK*, que aduz igualmente a um aumento da ligação de factores de transcrição ao ADN (Akira *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2009; Drexler *et al.*, 2010).

Quando há ligação ao IL-1RII, não ocorre transdução de sinal, já que o receptor *decoy* não possui domínio citoplasmático. Por sua vez, este receptor é responsável pela prevenção da ligação da IL-1β ao receptor do tipo I e consequente sinalização.

O receptor solúvel da IL-1RII também é capaz de ligar membros IL-1, embora a sua ligação tenha como intuito a neutralização desse membro ou sequestração de cadeias essenciais (ex. IL-1RI AcP) necessárias à transdução pelo IL-1 RI (Dinarello, 2002).



**Figura 2** - Representação esquemática da via de transdução de sinal da família de citocinas IL-1. Adaptado de Dinarello, 2002.

## 1.2. Terapêutica anti-inflamatória

### 1.2.1. Fármacos sintéticos

São inúmeras as doenças que evoluem com episódios de dor, febre e inflamação e, por esse facto, desde muito cedo incessantemente se procuraram compostos que aliviassem esses sintomas e tratassem os distúrbios inflamatórios. Actualmente, os fármacos mais utilizados, para esse fim, são os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e os anti-inflamatórios esteróides, também denominados glucocorticóides ou corticosteróides (Guimarães *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2007).

Os AINEs são um grupo heterogéneo de compostos químicos que partilham não só propriedades anti-inflamatórias como também propriedades analgésicas e antipiréticas (Roy *et al.*, 2013). Estes compostos são os escolhidos entre os dois principais grupos para o alívio sintomático da dor e inflamação em várias enfermidades crónicas, como na artrite reumatóide, em afecções inflamatórias mais agudas, como fracturas e entorses, mas também no alívio de outras dores, como a pós-operatória, a dental e enxaquecas. A sua extensa utilização está, contudo, demarcada por diversos efeitos adversos.

Os glucocorticóides são os fármacos anti-inflamatórios por excelência, pois actuam no processo inflamatório tanto na fase aguda – nas manifestações precoces de rubor, calor, dor e edema – como na fase crónica – nas manifestações mais tardias de cicatrização, reparação da lesão e reacções proliferativas da inflamação crónica (Rang *et al.*, 2007). A eficácia deste grupo de agentes terapêuticos resulta dos efeitos pleiotrópicos do receptor glucocorticóide em diversas vias de sinalização. Contudo, estes efeitos pleiotrópicos desencadeiam igualmente efeitos adversos, como retardamento no crescimento infantil, imunossupressão, hipertensão, osteoporose e distúrbios metabólicos, entre outros (Rhen *et al.*, 2005).

#### 1.2.1.1. Anti-inflamatórios não esteróides

Remonta ao antigo Egipto a utilização de plantas para combater dores reumáticas e febre, que mais tarde se veio a saber terem salicilatos na sua constituição. Em 1860, o ácido salicílico torna-se extensamente útil como anti-séptico, antipirético, anti-reumático, analgésico e anti-inflamatório. Esta vasta lista de efeitos terapêuticos promove uma revolução no desenvolvimento de novos fármacos com acções farmacológicas mimetizadas, incluindo o acetilsalicilato (aspirina) da Bayer®. Os

agentes daqui resultados passam a constituir um grupo designado por “fármacos tipo aspirina” ou por “anti-inflamatórios não esteróides” (Vane *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2006). A grande variedade de estruturas e formulações não reflectem, porém, propriedades terapêuticas díspares. De facto, todos os AINEs aliviam inchaço, rubor e dor inflamatória, febre e enxaquecas (Vane *et al.*, 1998). Todavia, a utilização a longo prazo destes fármacos é acompanhada de efeitos secundários dose-dependentes, destacando-se, entre eles, as complicações cardiovasculares, gastrointestinais e renais (Guimarães *et al.*, 2006).

A partilha não só dos mesmos efeitos terapêuticos como também dos efeitos secundários fez com que os especialistas conjecturassem que o mecanismo de acção dos AINEs se baseasse numa só intervenção bioquímica (Vane *et al.*, 1998). Em 1960, Vane e os seus colaboradores determinaram a base de acção deste grupo de agentes terapêuticos: a inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COXs). As COXs são enzimas responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em mediadores pró-inflamatórios, como as PGs e os tromboxanos, e em mediadores homeostáticos, como a prostaciclina (Orlando *et al.*, 2010).

A enzima ciclo-oxigenase possui três isoformas – COX-1, COX-2 e COX-3 – embora o conhecimento sobre a última seja ainda bastante limitado (Roy *et al.*, 2013). As outras duas isoformas, apesar de partilharem 60% de identidade e a mesma actividade catalítica, distinguem-se na expressão tecidual e regulação (Guimarães *et al.*, 2006). A COX-1, por ser uma enzima constitutiva na maioria dos tecidos, opera como regulador homeostático, sendo responsável pela integridade da mucosa gástrica, função plaquetária e fluxo renal; já a COX-2 é uma forma induzível da enzima, não se exprimindo em condições fisiológicas na generalidade dos tecidos, com algumas excepções. De facto, a COX-2 é expressa, constitutiva e fisiologicamente, no rim, cérebro, ossos e cartilagem (Guimarães *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2013).

Os níveis de COX-2, que são em geral baixos nas células, são intensamente regulados por vários estímulos mitogénicos e inflamatórios, como citocinas e mensageiros intracelulares (Vane *et al.*, 1998). A COX-2, por ter notabilidade em situações patológicas, em particular na inflamação, está associada à acção anti-inflamatória dos AINEs. Por outro lado, os indesejáveis efeitos secundários são devidos à inibição da homeostática COX-1 e da COX-2 fisiológica (Vane *et al.*, 1998).

Tanto a COX-1 como a COX-2 exercem as suas funções biológicas como homodímero, constituído por dois domínios catalíticos intrínsecos: o de dioxigenase e o



de peroxidase. A via das ciclo-oxigenases, que conduz a biotransformação do ácido araquidónico (clivado dos fosfolípidos membranares pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub>) a prostanóides, tem início com a adição de duas moléculas de oxigénio ao ácido araquidónico pela COX. Daí resultam intermediários que, pela acção do domínio catalítico de peroxidase, guiam a formação de distintos prostanóides, envolvidos tanto na patogénese como na regulação homeostática.

Esta enzima bifuncional é composta por três unidades estruturais: um domínio do tipo factor de crescimento epidermal, um domínio de ligação à membrana e um domínio enzimático (Vane *et al.*, 1998). O domínio de ligação à membrana forma a estrutura em canal hidrofóbico, característica das COX, através do qual tanto substratos como inibidores acedem ao local activo da COX (Seta *et al.*, 2012).

Em geral, os AINEs são ácidos fracos que previnem, reversível ou irreversivelmente, a biossíntese de prostanóides, pela obstrução do acesso do ácido araquidónico ao domínio catalítico da COX. A obstrução é realizada através da inserção do AINE no canal onde permanece através de ligações de hidrogénio a resíduos de arginina. A grande variedade estrutural dos AINEs prende-se com vários graus de selectividade no que toca à inibição da COX-1 ou da COX-2 (Seta *et al.*, 2012). Este facto permite dividir os AINEs em duas classes: os AINEs clássicos, ou não selectivos, que abrangem os fármacos que inibem ambas as isoformas das enzimas e os *Coxibs*, que englobam os agentes que bloqueiam preferencialmente a COX-2. Contudo, os últimos estão largamente associados a um grande risco de ocorrência de eventos cardiovasculares trombóticos (Roy *et al.*, 2013).

Os AINEs podem também intervir, minoritariamente, a nível de outros mecanismos inflamatórios, como na remoção de espécies reactivas de oxigénio, na diminuição da síntese de IL-1 e nos eventos intracelulares mediados pelo cálcio (Rang *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2013).

### 1.2.1.2. Glucocorticóides

No processo inflamatório, as citocinas não são só responsáveis pela activação de componentes do sistema inflamatório. Indirectamente, elas também influenciam a síntese e secreção de glucocorticóides pelas células do córtex adrenal (Smoak *et al.*, 2004).

Ao actuar num universo enorme de tipos celulares, os glucocorticóides exercem os seus efeitos anti-inflamatórios e imunossuppressores tanto em processos inflamatórios

agudos como crónicos (Chapman *et al.*, 2013). Estes actuam ao nível da activação e repressão de genes anti e pró-inflamatórios, respectivamente, bem como a nível pós-transcricional (Barnes, 2010). De facto, desde a descoberta da cortisona em 1940 e do seu sucesso inicial no tratamento da artrite reumatóide, que os glucocorticóides sintéticos constituem a terapia anti-inflamatória mais eficaz para muitas doenças crónicas (Barnes, 2010; Chapman *et al.*, 2013).

Devido à sua natureza lipofílica, os glucocorticóides entram para o meio intracelular por um processo de difusão passiva. Aí, exercem as suas funções pela interacção com o receptor glucocorticóide (RG), membro da superfamília de receptores de factores de transcrição nuclear (De Bosscher *et al.*, 2003). Das duas isoformas do RG humanas,  $RG\alpha$  e  $RG\beta$ , apenas a  $RG\alpha$  liga glucocorticóides e tem actividade na transcrição genética. O  $RG\beta$ , por sua vez, interage com o ADN, mas não com os glucocorticóides, e está teoricamente associada à inibição da  $RG\alpha$  e à resistência deste tipo de fármacos (Smoak *et al.*, 2004; Barnes, 2010). Em células não estimuladas, o  $RG\alpha$  encontra-se sequestrado no citoplasma por um complexo proteico que lhe mascara a sequência de localização nuclear. Após interacção com o ligando, o  $RG\alpha$  activo é rapidamente translocado para o núcleo, local onde modula, estimulando ou inibindo, processos transcripcionais de genes inflamatórios, pela ligação directa ao ADN ou por interacções com outros factores de transcrição (Smoak *et al.*, 2004).

A activação transcripcional requer a homodimerização do RG. Enquanto homodímero, o RG complexado ao glucocorticóide interage com elementos de resposta a glucocorticóides (ERG) presentes no promotor dos genes positivamente regulados. A ligação a ERG induz uma alteração conformacional do RG que promove o recrutamento de várias moléculas co-activadoras para o complexo GR-ADN. Estas moléculas, como a proteína de ligação a elementos de resposta a AMPc, possuem actividade de acetiltransferase de histonas, intrínseca. A acção destas provoca uma acetilação de histonas, que induz um rearranjo nucleossomal relaxado e, por isso, um fácil acesso da maquinaria de transcrição ao promotor alvo. Os genes que são modulados positivamente pelos glucocorticóides, codificam proteínas anti-inflamatórias como o IL-1Ra, a IL-10 e a lipocortina-1, uma proteína com efeito inibitório na enzima fosfolipase  $A_2$  e consequente inibição da produção de mediadores lipídicos pela cascata do ácido araquidónico (Barnes, 1998; De Bosscher *et al.*, 2003).

Contudo, os glucocorticóides exercem o seu maior efeito anti-inflamatório pela repressão transcripcional. Para isso, o  $RG\alpha$  pode reprimir os genes pela ligação directa a

ERG negativos, embora a repressão genética esteja maioritariamente associada a interacções com outros factores de transcrição (NF- $\kappa$ B e PA-1) (Smoak *et al.*, 2004; De Bosscher *et al.*, 2003). Neste último mecanismo, o RG- $\alpha$  activo interage com moléculas co-repressoras que atenuam a actividade co-activadora de moléculas promovidas pelo NF- $\kappa$ B. O complexo RG-glucocorticóide recruta a enzima desacetilase-2 de histonas que, ao estruturar a compactação do ADN, evitando o acesso dos factores de transcrição aos seus locais de ligação, incita a repressão genética (Barnes, 2010). Entre outras formas, este tipo de formulação farmacológica pode também suprimir a actividade do NF- $\kappa$ B através da activação do gene codificador do inibidor I $\kappa$ B (De Bosscher *et al.*, 2003). Os mecanismos de repressão expostos levam à repressão da síntese das citocinas como TNF- $\alpha$ , GM-FEC, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, RANTES e enzimas, COX-2 e isoforma indutível da óxido nítrico sintetase (Smoak *et al.*, 2004).

Apesar dos meios pelos quais R $\alpha$  antagoniza PA-1 não estarem completamente descritos, pensa-se que tenham a mesma base de acção dos utilizados na inibição do NF- $\kappa$ B. Entre eles, a interacção directa com o complexo de c-jun e c-fos, bem como a inibição das fosforilações da cascata PCAM necessárias à activação do c-Jun (Smoak *et al.*, 2004; Rhen *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2006).

Os glucocorticóides podem ainda exercer efeitos na pós-transcrição genética. Alguns genes pró-inflamatórios codificam sequências de ARNm instáveis, que necessitam de estímulos inflamatórios para os estabilizar. A via p38 PCAM é um exemplo deste mecanismo, ao estabilizar os ARNm de proteínas como a COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-6. Os glucocorticóides reprimem este efeito através da indução de inibidores da PCAM ou por aumento da transcrição de ribonucleases específicas, resultando numa rápida degradação do ARNm e consequente diminuição de secreção proteica (Barnes, 1998; Rhen *et al.*, 2005; Barnes, 2010).

A eficácia dos glucocorticóides no alívio de desordens inflamatórias, devido ao pleiotropismo do seu receptor, faz com que sejam bastante úteis clinicamente. Contudo, essa mesma característica é responsável por um elevado número de efeitos secundários, o que faz com que a sua utilização seja limitada. Efeitos secundários comuns prendem-se com hipertensão, hiperglicémia, imunossupressão e aterosclerose (Chapman, 2013). De facto, esta é a principal razão pela qual imensos esforços têm sido aplicados nesta área, para o possível desenvolvimento de compostos esteróides menos ofensivos e que permitam terapias mais específicas (Barnes, 1998; De Bosscher *et al.*, 2003; Rhen *et al.*, 2005).

## 1.2.2. Fármacos de origem natural

Actualmente, o tratamento maioritário de enfermidades associadas a desordens inflamatórias crónicas prende-se com terapêuticas aliadas a várias limitações, como graves efeitos secundários, falta de eficácia e elevados custos de produção (Francisco *et al.*, 2011). Com um grande interesse em ultrapassar estes contratempos, tanto a medicina convencional como os próprios doentes, têm recorrido cada vez mais ao uso da medicina complementar e da medicina tradicional, como é o caso do uso de extractos de plantas medicinais.

A fitoterapia, para além de ser a base dos sistemas de medicina tradicional mundiais, consubstancia 25% dos fármacos actualmente comercializados (de constituição vegetal bruta) e 25% dos fármacos derivados de extractos vegetais quimicamente modificados (Ahmed *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o mundo ocidental tem renovado o interesse pela utilização das plantas com fim terapêutico, constituindo um crucial auxílio nos cuidados de saúde, não só como complemento à medicina clássica, como também no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos (Cunha, 2005; Francisco *et al.*, 2011).

Estima-se que cerca de 1200 espécies vegetais apresentem propriedades medicinais. No entanto, menos de 10% destas foram alvo de investigação sobre as suas características fitoquímicas e farmacológicas (Nyireddy, 2004). Por este facto, há necessidade de finalizar o conhecimento científico sobre o mecanismo de acção pelo qual estas espécies têm actividade, de modo a garantir um uso terapêutico de qualidade, seguro e eficaz (Cunha, 2005).

Insere-se aqui o interesse em avaliar o efeito do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., espécie botânica largamente utilizada tradicionalmente no “combate” a várias patologias, especialmente nas que envolvem um processo inflamatório crónico.

### 1.2.2.1. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., espécie anteriormente descrita por *Andropogon citratus* por De Candolle e reclassificada por Otto Stapf, pertence à família Poaceae (comummente conhecida por gramíneas), que compreende cerca de 660 géneros e 9000 espécies vegetais (Figura 3) (Kasali *et al.*, 2001). A designação *Cymbopogon* tem origem nas palavras gregas *kymbe* e *pogon*, significando “arranjo de flores em espiga” (Shah *et al.*, 2011); já *citratus*, com origem latina, refere-se ao sabor a

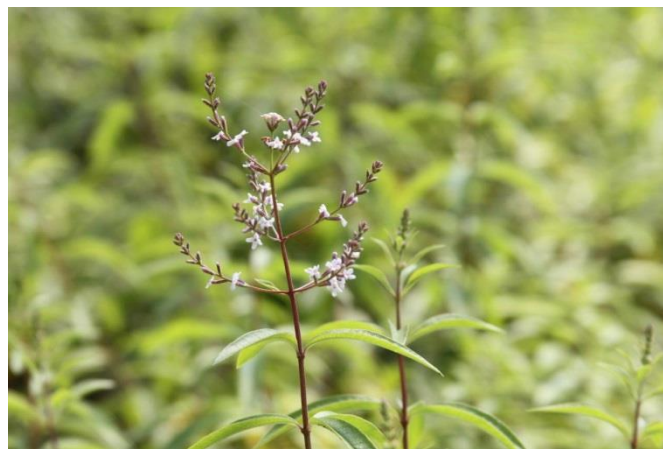
**Reino:** Plantae  
**Sub-reino:** Tracheobionta  
**Superdivisão:** Spermatophyta  
**Divisão:** Magnoliophyta  
**Classe:** Liliopsida  
**Subclasse:** Commelinidae

**Figura 3** - Classificação científica de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.  
Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

limão característico das folhas desta espécie. Em Portugal, é vulgarmente conhecido por Erva-príncipe (Negrelle *et al.*, 2007).

Apesar de nativo do sudoeste asiático, o *C. citratus* cresce espontaneamente por todo o mundo, embora com preferência por regiões tropicais ou de savana (Figueirinha *et al.*, 2008). A erva-príncipe é uma gramínea perene com rizoma, azul-esverdeada, de caules fortes, folhas lineares (Figura 4) e com agradável aroma a limão (devido ao seu óleo essencial), cujo crescimento pode atingir três metros de altura (Negrelle *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2009; Francisco *et al.*, 2011).

Além da habitual utilização em bebidas aromáticas e na culinária (Figueirinha *et al.*, 2008), os infusos e os decoctos preparadas com base nas folhas, secas ou frescas, deste espécime há muito que são usados na medicina tradicional. A ampla distribuição mundial faz com que esta prática seja utilizada para um largo espectro de finalidades terapêuticas. A etnomedicina aconselha, terapeuticamente, o “chá” de *C. citratus* para



**Figura 4** - *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Fotografia gentilmente cedida pela ERVITAL, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda., sediada em Mezio, Castro Daire, Portugal.

distúrbios gastrointestinais e nervosos e como agente ansiolítico, relaxante, antipirético, anti-séptico, antioxidante, analgésico, antiasmático, antiespasmódico, anti-reumático e anti-inflamatório (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Asaolu *et al.*, 2009).

Apesar do seu disseminado uso e aceitação, pouca informação existe sobre o mecanismo de acção pelo qual o *C. citratus* exerce as suas actividades biológicas (Negrelle *et al.*, 2007; Orlando *et al.*, 2010).

### 1.2.2.1.1. Composição do óleo essencial

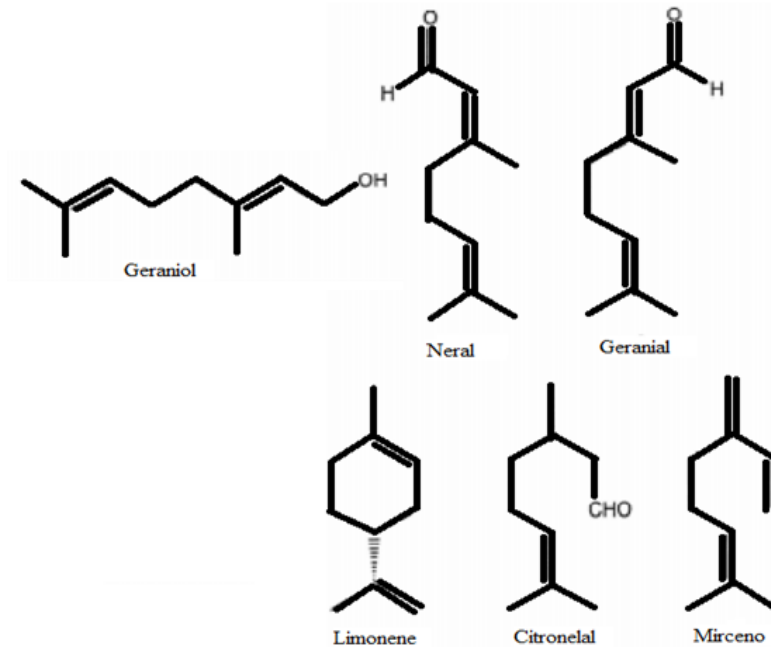
Além das infusões e decocções das folhas utilizadas pela medicina tradicional, outras substâncias originárias desta espécie têm grande utilidade, em especial o óleo essencial que exubera no *C. citratus* (Negrelle *et al.*, 2007).

Na medicina tradicional, o óleo essencial é utilizado no tratamento da acne, pé-de-atleta, enxaquecas, câibras musculares e como agente anti-inflamatório, antimicrobiano, antibacteriano e insecticida (Schaneberg *et al.*, 2002). Já industrialmente, o óleo essencial é muito utilizado na indústria alimentícia, de perfumaria e cosmética (Negrelle *et al.*, 2007; Asaolu *et al.*, 2009; Bassolé *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2011).

Devido ao seu grande proveito económico, há uma maior incidência de estudos fitoquímicos centrados nos compostos voláteis de *C. citratus* e, conseqüentemente, um maior conhecimento sobre eles em comparação com os compostos não-voláteis (Figueirinha *et al.*, 2008).

A composição química do óleo essencial de *C. citratus* apresenta variabilidade qualitativa e quantitativa. Isto acontece devido à dependência da composição química de factores como a origem geográfica, método de cultivo, idade da espécie e fotoperíodo (Negrelle *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2008). Os compostos voláteis das plantas são, em geral, líquidos lipofílicos com alta pressão de vapor (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Porém, independentemente da origem geográfica e dos outros factores, o óleo essencial do *C. citratus* é composto maioritariamente por citral (Figura 5), designação dada à mistura dos aldeídos guanial (citral A) e neral (citral B) (Barbosa *et al.*, 2008; Bassolé *et al.*, 2011). Esta mistura, onde predomina o geranial, representa de 30 a 93,74% da composição do óleo essencial da erva-príncipe, e é responsável pelo característico aroma a limão da espécie (Negrelle *et al.*, 2007).

Além dos compostos maioritários – os aldeídos – o óleo essencial é ainda composto por terpenos (dos quais se destacam o mirceno e o limonene), outros aldeídos, como o citronelal e álcoois e esteres, como o geraniol (Figura 5) (Negrelle *et al.*, 2007).



**Figura 5** - Principais elementos químicos que compõem o óleo essencial.  
Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

### 1.2.2.1.2. Composição em compostos não-voláteis

As folhas de *C. citratus* constituem a fonte de óleo essencial, o composto mais bem estudado fitoquimicamente. Mas, como as propriedades terapêuticas têm vindo a ser atribuídas aos compostos não-voláteis, alguma atenção, embora pouca, tem vindo a ser dada a esses elementos (Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010).

As folhas e raízes são constituídas, tal como todo o reino Plantae, por metabolitos secundários. Os metabolitos secundários são os fitoconstituintes cujo papel na planta não se prende com processos de fotossíntese, respiração, crescimento ou desenvolvimento, mas que apesar disso se encontram presentes em elevadas concentrações (Croizer *et al.*, 2009). Dentro dos metabolitos secundários encontram-se, na erva-príncipe, essencialmente polifenóis, dos quais ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, alcalóides, terpenos e álcoois (Figura 6) (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010). Todos estes elementos são conhecidos por vários efeitos terapêuticos e protectores intrínsecos (Asaolu *et al.*, 2009).

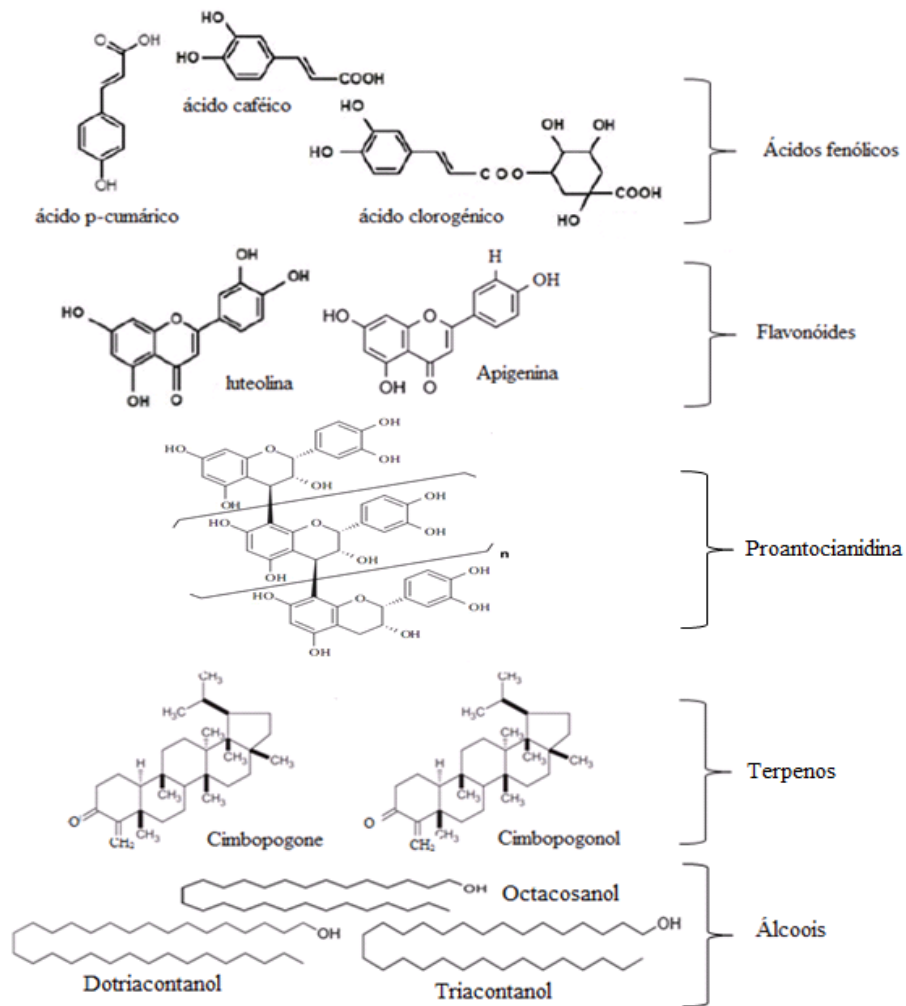
Os polifenóis e os seus derivados constituem os compostos não-voláteis maioritários da planta *C. citratus*, bem como do infuso preparado a partir desta (Figueirinha *et al.*, 2008). Os polifenóis são caracterizados por possuírem na sua estrutura pelo menos um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilo conjugados, estrutura que toma a designação de fenol (Cunha, 2005; Agostini-Costa *et al.*, 2012). A presença destes compostos está associada à inibição de mediadores inflamatórios por repressão genética e enzimática e ao sequestro de espécies reactivas de oxigénio; consequentemente, a presença destes compostos prende-se com as actividades anti-inflamatória, antioxidante e anti carcinogénica (Cheel *et al.*, 2002; Cunha, 2005; Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2012). Dentro desta família sobressaem os ácidos fenólicos, compostos de baixo peso molecular (Croizier *et al.*, 2009) dos quais se destacam o ácido caféico, o ácido *p*-cumárico, o ácido clorogénico e seus derivados (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008); os flavonóides, polifenóis de peso molecular intermédio, dos quais se salientam a luteolina e a apigenina (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Croizier *et al.*, 2009); e por fim os taninos, em que os taninos condensados, também designados por proantocianidinas (polímeros de longa cadeia) se evidenciam (Cunha, 2005; Figueirinha *et al.*, 2008; Agostini-Costa *et al.*, 2012).

Os alcalóides são compostos com um ou mais átomos de azoto heterocíclicos derivados, essencialmente, de aminoácidos (Agostini-Costa *et al.*, 2012). As actividades terapêuticas atribuídas aos alcalóides estão associadas a efeitos sedativos, antiespasmódicos e hipnóticos (Cunha, 2005).

Os terpenos são a maior e a mais diversa família de produtos naturais, compreendendo desde compostos com estruturas lineares a moléculas policíclicas e de moléculas de cinco carbonos (isopreno) a compostos com milhares de unidades de isoprenos. Todos os terpenos são sintetizados pela condensação de unidades de isopreno e classificados pelo número desses conjuntos no núcleo estrutural (Agostini-Costa *et al.*, 2012). O *C. citratus* contém dois triterpenos (30 carbonos): o cimbopogone e o cimbopogonol (Figura 6) (Negrelle *et al.*, 2007).



Os álcoois presentes nas folhas da erva-príncipe são o octacosanol, o dotriacontanol e o triacontanol (Negrelle *et al.*, 2007).



**Figura 6** - Principais componentes não-voláteis do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Crozier *et al.*, 2009; Ferreira, 2011; Shah *et al.*, 2011; Agostini-Costa *et al.*, 2012.

## **Capítulo 2**

### **Objetivos**

Actualmente, a terapêutica anti-inflamatória crónica disponível afecta a qualidade de vida dos doentes. Isto leva a que cada vez mais se procurem fármacos alternativos, com semelhante eficácia mas maior segurança. Há, conseqüentemente, um crescente número de estudos procurando alternativas terapêuticas em compostos de origem natural.

Depois de se ter comprovado a acção anti-inflamatória do infuso, livre do óleo essencial, de *C. citratus*, em modelo animal de inflamação aguda (Garcia, 2010; Garcia *et al.*, 2013), é objectivo do presente estudo averiguar a actividade anti-inflamatória do mesmo infuso num modelo animal de inflamação crónica, procurando desta forma justificar o seu uso tradicional em situações de doenças inflamatórias crónicas.

Desta forma, os principais objectivos deste estudo foram:

1. Avaliar a actividade anti-inflamatória do extracto de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. num modelo experimental *in vivo* de inflamação crónica.
2. Contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na referida actividade anti-inflamatória do *Cymbopogon citratus*.
3. Avaliar a toxicidade crónica do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

## **Capítulo 3**

### **Materiais e métodos**

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Material botânico

O estudo avaliativo realizado teve como interveniente a espécie botânica *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. As folhas secas utilizadas deste espécime foram adquiridas à ERVITAL, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda., sediada em Mezio, Castro Daire, Portugal. Este local está situado a 1000 metros acima do nível das águas do mar, onde a espécie foi cultivada em estufa. Não obstante, foi confirmada a sua identidade pelo Professor Doutor Jorge Paiva, do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra. Um exemplar deste material encontra-se confiado ao Herbanário da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

#### 3.1.2. Animais de laboratório

Neste estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar albinos, machos, com peso compreendido entre 250-300 g, adquiridos na Charles River Inc., Espanha. Os processos de alojamento, de manutenção e utilização de todos os animais experimentados (n=30) seguiram em conformidade com a Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro e com prévia aprovação pela Direcção Geral de Veterinária para este estabelecimento de utilização. Segundo as directrizes da portaria acima referida, os animais foram alojados em gaiolas individuais mantidas num Rack (Allentown®) com adequada ventilação (taxa de ventilação de 59-60 renovações de ar/hora), temperatura (22-23°C) e iluminação (ciclo luz-obscuridade de 12/12 horas). O acesso à dieta padronizada para roedores (4 RF 21/I, Mucedola, Itália) e à água foi *ad libitum*.

#### 3.1.3. Fármacos/Reagentes químicos

Para a execução do protocolo experimental foi administrada, por via intramuscular, uma mistura de cetamina (50 mg/mL, Ketalar®, Parke-Daves, Pfizer, Seixal, Portugal) e cloropromazina (2,5%, Largatil®, Phône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória, Amadora, Portugal) nas doses de 50 mg/Kg e 2,3 mg/Kg, respectivamente.

Como fármaco anti-inflamatório não esteróide padrão foi utilizada, por via oral, a indometacina (1 mg/mL, 25 mg, Indocid®, *IROKO products Ltd.*, Londres, Reino Unido) numa dose diária de 2 mg/Kg (Barreto *et al.*, 2012).

Como fármaco padrão da classe dos glucocorticóides foi utilizada, por via oral, a dexametasona ( $\geq 97\%$ , 25 mg, SIGMA-Aldrich®, Sintra, Portugal) numa dose diária de 2,5 mg/Kg (Wu *et al.*, 2006).

Como anti-séptico de largo espectro nas intervenções cirúrgicas realizadas foi utilizado o iodopovidona (Betadine®, Viatris, Lisboa, Portugal).

De entre os reagentes químicos utilizados durante os ensaios salientam-se o *n*-hexano (Carlo Erba Reagenti SpA, Milão, Itália) – hidrocarboneto usado na remoção dos constituintes lipídicos, aquando da preparação do extracto aquoso de *C. citratus* – e o conjunto de reagentes químicos, com origem QIAGEN Sciences (Maryland, EUA) utilizado na execução do *kit* de quantificação de citocinas (*Multianalyte ELISArray*).

#### 3.1.4. Material físico e software

Material físico	Fabricante
gaiolas individuais ventiladas	Allentown®
<i>Rack</i>	Allentown®
evaporador rotativo	Buchi®, R-114
ultra-sons	Brandon®, 2200
termómetro digital de microsonda	Physitemp®, <i>model Bat-12</i>
sonda térmica	Physitemp®
centrifugador	SIGMA®, 2-5
estufa de esterilização	Jouan®
leitor de placas de ELISA	BioSurplus®, SLT. Spectra
processador de tecidos	Shandon®, Citadel 1000
micrótopo	Shandon®, AS325
microscópico óptico	Nikon®, Eclipse E600
Software	Fabricante
editor de fotografias histológicas	Abobe®, Photoshop CS3
construtor digital de gráficos	GraphPad®, Prism 5

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparação do extracto botânico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

O método utilizado na preparação do extracto de *C. citratus* seguiu em conformidade com o proposto por Figueirinha e seus colaboradores (2008).

O extracto foi preparado pela adição de 150 mL de água fervente a 5 g de folhas secas de *C. citratus*, previamente pulverizadas. A infusão foi deixada repousar por 15 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, o infuso foi filtrado sob vácuo, e o volume de 150 mL perfeito com o mesmo solvente. Após filtrado, o infuso foi repetidamente tratado com *n*-hexano, para a remoção dos seus componentes apolares. De seguida, a fase aquosa, livre de óleo essencial, foi concentrada por evaporação rotativa, liofilizada, e o resultado armazenado a - 4°C até ser necessário (Garcia, 2010).

Aquando dos ensaios com os modelos animais procedeu-se à ressuspensão, diária, do extracto liofilizado em água destilada. As ressuspensões foram feitas para um extracto aquoso final de concentração 50 mg/mL.

### 3.2.2. Doses botânicas administradas aos animais

Com o objectivo de avaliar o uso terapêutico do extracto aquoso de *C. citratus* utilizado na etnomedicina procurou adaptar-se a dose humana referenciada ao modelo animal do estudo. Tradicionalmente, a infusão é preparada com a adição de 150 mL de água a duas folhas frescas ou a 2 g de folhas secas do espécime em estudo. Esta preparação corresponde a uma dose de 2 mL de infuso por Kg de massa corporal (Carlini *et al.*, 1986) e a 27 mg de folha por Kg de massa corporal.

A conversão para doses animais foi realizada com base nas directrizes recomendadas pela FDA (*Food and Drug Administration*). Esta conversão é necessária para compensar o facto de que a espécie humana ou, outros animais de grande porte, tem, em geral, uma taxa metabólica mais baixa e, por conseguinte, requerem uma menor dose (mg) por Kg de massa corporal (Wojcikowshi *et al.*, 2013). Segundo o guia para a indústria da FDA, no cálculo da dose de extracto a administrar a ratos considerou-se o factor 6 (EUFDA, 2005). Considerando os factores supramencionados e o rendimento de extracção obtido (16,6%) foi preparada uma solução de extracto aquoso de *C. citratus* de concentração final de 50 mg/mL. Desta solução foram administradas doses crónicas (duplas) bi-diárias de 68 mg/Kg de massa corporal do animal (Tabela II). A

duplicação da dose seguiu em conformidade com os resultados de Garcia e seus colaboradores (2010), que verificaram um maior efeito anti-inflamatório deste espécime aquando da administração de dose dupla em relação à indicada pela medicina tradicional (efeito dose-dependente).

**Tabela III** - Relação entre a dose humana utilizada na medicina tradicional e a dose de rato equivalente (Carlini *et al.*, 1986; EUFDA, 2005; Wojcikowshi *et al.*, 2013).

Espécie	Massa corporal (Kg)	Factor de conversão (Km)	Dose (mg/Kg)
Humano adulto	60	37	27
Rato	0,150	6	68 (x2)

### 3.2.3. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelo *in vivo* de inflamação crónica

#### 3.2.3.1. Desenho experimental

O estudo da actividade anti-inflamatória crónica do extracto de *C. citratus* requereu quatro grupos experimentais: um grupo-teste englobando os animais aos quais foi administrado o extracto botânico nas doses acima referidas (n=12); um primeiro grupo controlo-positivo referente aos animais que receberam a indometacina como AINE padrão (n=6); um segundo grupo controlo-positivo referente aos animais que receberam a dexametasona como glucocorticóide padrão (n=5); um quarto e último grupo controlo-negativo ao qual foi administrado água destilada como veículo (n=7). Nos quatro casos, a administração foi executada oralmente, por gavagem orogástrica.

A administração do extracto aquoso de *C. citratus*, bem como a administração do veículo, ocorreu duas vezes por dia (de manhã e ao final do dia), nos cinco dias consecutivos após o dia de indução do processo inflamatório crónico. Como supracitado, a administração seguiu em conformidade com a executada pela medicina tradicional, desse modo, a dose bi-diária foi requisito desta última. Já a administração de ambos os fármacos anti-inflamatórios aos animais do grupo correspondente ocorreu em dose única diária, nos mesmos dias de experiência, conforme a indicação terapêutica dos mesmos.



### 3.2.3.2. Indução do processo inflamatório crónico nos animais

Um qualquer estudo realizado *in vivo* necessita dos seus respectivos modelos animais. Para averiguar o efeito anti-inflamatório crónico do extracto aquoso de *C. citratus* foi concebido um modelo *in vivo* de inflamação crónica. O método empregue foi uma modificação do utilizado por Winter e seus colaboradores (1957) – o método da “porção de algodão” (do inglês *Cotton Pellet*). Esta técnica induz inflamação crónica sob a forma de granuloma, permitindo avaliar a proliferação dos componentes envolvidos neste processo (Paschapur *et al.*, 2009), incluindo mediadores anti- e pró-inflamatórios. Neste teste, a migração de monócitos/macrófagos, a proliferação de fibroblastos, a apoptose e todos os componentes associados à inflamação crónica ocorrem nas imediações do *cotton pellet*, envolvendo-o em tecido de granulação (Uzkeser *et al.*, 2012).

O procedimento iniciou-se anestesiando os animais com a mistura anestésica acima descrita (Nagar *et al.*, 2005). De seguida, uma porção de cerca de  $10 \pm 0,49$  mg de algodão, previamente esterilizada por autoclavagem, foi inserida na região interescapular de cada animal (Paschapur *et al.*, 2009). A esterilização do material cirúrgico, bem como das porções de algodão, foi realizada em estufa de esterilização a 180°C. O processo de microcirurgia realizou-se após tricotomia da zona dorsal dos animais, zona na qual se efectuou uma pequena incisão subcutânea para a inserção do algodão. A incisão foi suturada com linha estéril.

Após cinco dias da execução desta técnica, os animais foram novamente anestesiados e os *cotton pellets* removidos cirurgicamente, bem como os tecidos circundantes (Winter *et al.*, 1957; Suralkar *et al.*, 2008; Paschapur *et al.*, 2009; Nagar *et al.*, 2011).

Este procedimento permitiu a utilização de método de avaliação que consistiu na solubilização do granuloma em tampão de diluição (fornecido pelo *kit*) para a avaliação do nível de citocinas através da técnica de *ELISA*.

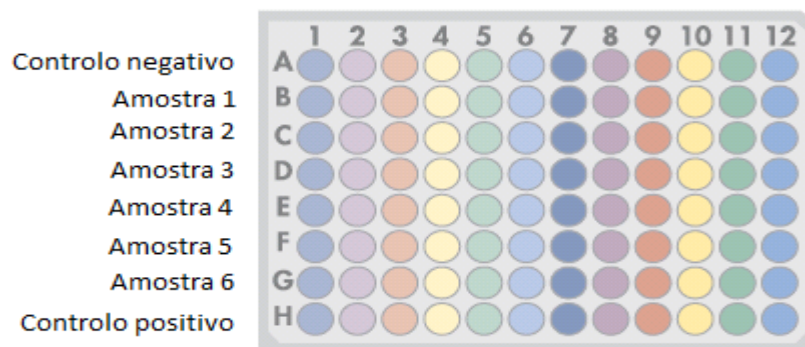
### 3.2.3.3. Análise da actividade anti-inflamatória em modelos *in vivo*

#### 3.2.3.3.1. Determinação do nível de citocinas

A relação do nível de citocinas nas amostras do solubilizado do granuloma, em conjunto com a porção de algodão, foi determinada pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Lee *et al.*, 2009; Novoselova *et al.*, 2009).

Ao quinto dia após a indução do processo inflamatório crónico, o granuloma foi cirurgicamente removido. Esta estrutura tecidular, bem como a porção de algodão que lhe deu origem, foram solubilizadas em 2 mL de tampão de diluição provido pelo *kit Multi-Analyte ELISArray*, da QIAGEN. Após recolha do solubilizado, este sofreu uma diluição 1:2 com o mesmo tampão. De seguida, foi executado o *kit* colorimétrico em questão, seguindo as instruções do fornecedor (Figura 7).

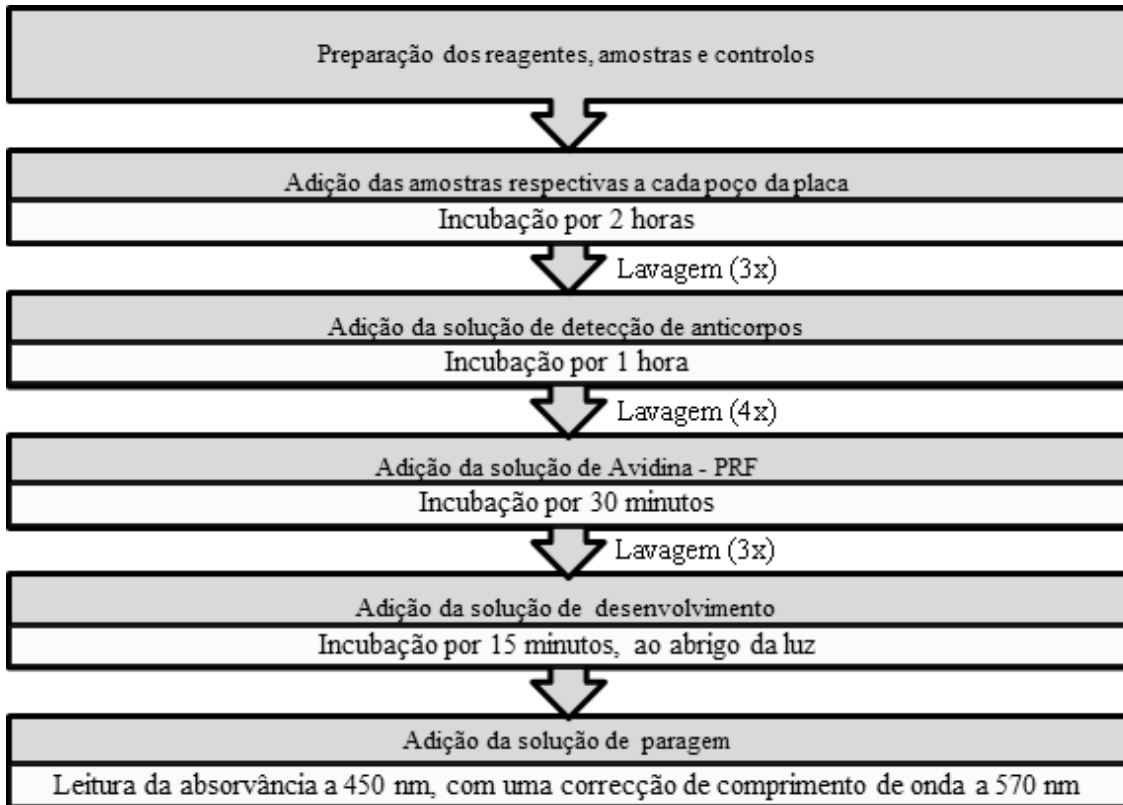
Resumidamente, o procedimento teve início com a preparação de todos os reagentes necessários, amostras e controlos. De seguida, adicionou-se 50 µL de tampão de ensaio em cada poço da placa, ao qual se somou 50 µL das amostras/controlos, nos



**Figura 7** - Representação da placa fornecida pelo *kit*. A placa de ELISA de 96 poços está indicada para a detecção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES (colunas 1a 12). As linhas A a H fornecem a possibilidade da detecção de cada citocina em seis amostras e em dois controlos intrínsecos. Adaptado do protocolo fornecido pelo *kit Multi-Analyte ELISArray*, da QIAGEN.

respectivos poços. Depois de uma breve agitação, incubou-se a placa por 2 horas. Após esse período, procedeu-se a três lavagens e à adição de 100 µL da solução de detecção de anticorpos, a qual exige uma incubação de 1 hora. Foram novamente feitas três lavagens, às quais se seguiu a adição de 100 µL de avidina-PRF (peroxidase de raiz-forte) e uma incubação de 30 minutos. Seguiram-se quatro lavagens. Adicionou-se, sucessivamente, 100 µL de solução de desenvolvimento e uma incubação por 15

minutos ao abrigo da luz. Após este tempo foi adicionada a mesma quantidade de solução de paragem. Finalmente, dentro dos 30 minutos de reacção da última solução, foi lida a absorvância a 450 nm, com uma correcção de comprimento de onda de 570 nm para corrigir imperfeições ópticas existentes na placa de ELISA (plástico) (Figura 8).



**Figura 8** - Esquema representativo dos passos cruciais ao protocolo da técnica de ELISA empregue.

### 3.2.4. Monitorização da temperatura basal

A febre é um efeito sistémico estritamente associado a processos inflamatórios e provido, maioritariamente, pela acção de citocinas. Para monitorizar possíveis alterações na temperatura corporal dos modelos animais em estudo e, por isso, a existência de uma possível acção antipirética associada ao extracto aquoso do *C. citratus* ou um processo infeccioso, determinou-se a temperatura corporal dos animais em estudo.

A medição da temperatura basal foi realizada cerca de 2 semanas antes dos ensaios de indução, enquanto que a temperatura tida com um processo inflamatório crónico a decorrer foi determinada no dia do sacrifício dos animais.

Para o procedimento, os animais foram anestesiados com a mistura anestésica referida anteriormente. A sonda térmica foi inserida 3-4 cm no recto do animal, e aí permaneceu por 2 minutos, permitindo neste período a estabilização da temperatura. O nível de pirexia foi ostentado por um termómetro digital e registado manualmente (Tomazetti *et al.*, 2005; Mythreyi *et al.*, 2008; Victoria *et al.*, 2012).

### 3.2.5. Análise histológica

Após a recolha do granuloma foram sacrificados por deslocamento cervical e sujeitos a necropsia (todos os grupos num total de n=30). Neste procedimento foram recolhidos os rins e fígado para posterior análise histológica. A preparação das peças consistiu na formulação de fragmentos de espessura 0,5 cm, cortados transversalmente, com ulterior imersão em formaldeído 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram processados pela substituição do formaldeído por parafina, que permite uma maior firmeza aquando da necessidade de corte. Após inclusão em blocos de parafina, os fragmentos foram armazenados a -20°C. Dos fragmentos congelados foi possível realizar um corte de 4 µm de espessura. A fracção daqui originária foi colocada em lâminas, desparafinada com xilol e etanol e colorada com hematoxilina e eosina. A hematoxilina cora os núcleos celulares de azul, enquanto a eosina cora o citoplasma com tom vermelho rosado. As lâminas prontas foram observadas com auxílio de uma microscópio óptico de luz, com objectivas de 20x e 40x, adaptado a uma máquina digital (Ferreira, 2011).

### 3.2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com testes de cinco ou mais experiências independentes (n≥5). Os dados obtidos foram analisados segundo a aplicação ANOVA *one-way* seguida pela correcção de Bonferroni. Os mesmos dados foram considerados estatisticamente significativos se p<0,05 para a probabilidade de ocorrência de probabilidade nula. O *Prism 5,0 (GraphPad Software)* foi usado para todas as análises estatísticas.

# **Capítulo 4**

## **Resultados**

## **4.1. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelos *in vivo* de inflamação crónica**

### **4.1.1. Quantificação do nível de citocinas**

Após execução do protocolo experimental, os níveis relativos de um conjunto de citocinas presentes no granuloma formado foram pesquisados pela técnica de ELISA.

Na Tabela III podem observar-se os resultados da análise realizada ao nível das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES presentes no granuloma induzido por *cotton pellet* nos diferentes grupos teste – *C. citratus*, indometacina e dexametasona e no grupo controlo negativo.

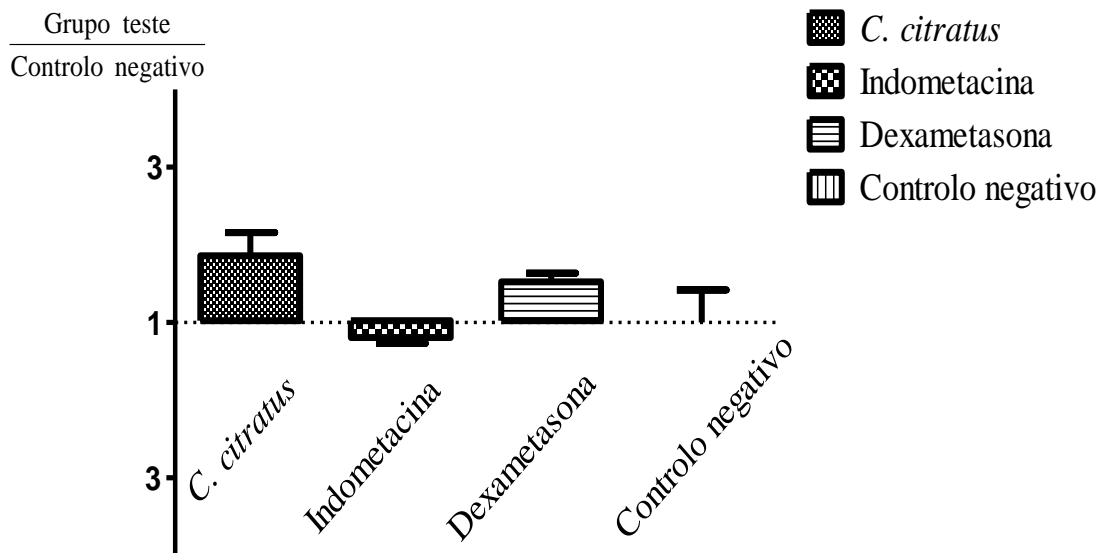
Foram determinados os níveis percentuais das citocinas através da normalização da média de absorvâncias dos grupos analisados com os valores de absorvância dos controlos intrínsecos ao *kit* utilizado.

**Tabela III** - Relação percentual do nível de citocinas de cada grupo analisado. A relação foi calculada pela normalização com os correspondentes controlos intrínsecos ao *kit Multianalyte ELISArray*, da *QIAGEN Sciences*. A normalização foi determinada em percentagem de acordo com a seguinte fórmula: ((média das absorvâncias do grupo teste – absorvância do controlo negativo intrínseco ao *kit*)/(absorvância do controlo positivo do *kit* – absorvância do controlo negativo do *kit*)) x 100. Os dados são expressos como média ± EPM de 5-7 ensaios similares.

Relação percentual do nível de citocinas (% ± EPM)												
	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	IL-13	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	GM-FEC	RANTES
<i>C. citratus</i>	9,75 ± 1,579	99,13 ± 14,564	-14,75 ± 0,594	0,68 ± 0,211	3,70 ± 1,108	1,61 ± 2,071	1,91 ± 0,319	2,35 ± 0,136	-0,10 ± 0,344	3,35 ± 0,585	2,62 ± 0,649	4,95 ± 1,051
Indometacina	4,23 ± 0,381	33,85 ± 2,099	2,51 ± 0,788	-0,16 ± 0,075	-1,82 ± 0,810	-7,92 ± 4,247	0,07 ± 0,036	1,36 ± 0,71	-0,37 ± 0,238	2,53 ± 0,713	0,076 ± 0,060	1,65 ± 0,334
Dexametasona	7,99 ± 0,599	-0,79 ± 23,327	45,38 ± 6,032	8,11 ± 0,391	-0,51 ± 1,539	10,17 ± 3,065	14,97 ± 2,967	17,78 ± 1,064	1,48 ± 0,687	7,69 ± 1,284	9,84 ± 0,352	13,09 ± 1,174
Controlo negativo	5,25 ± 2,201	9,39 ± 1,803	19,56 ± 7,594	4,08 ± 1,693	12,43 ± 6,792	34,17 ± 0,351	4,08 ± 1,389	12,77 ± 1,943	7,10 ± 0,239	16,36 ± 3,387	2,43 ± 0,905	16,48 ± 0,380

Com fórmula de cálculo apresentada foi possível comparar a actividade anti-inflamatória do extracto aquoso de *C. citratus* e dos dois controlos positivos usados – Indometacina como AINE padrão e Dexametasona como glucocorticóide padrão – com o Controlo negativo (Figuras 9 a 20). As figuras traduzem, por conseguinte, a relação estabelecida entre os níveis de determinada citocina presente nos grupos analisados e os níveis dessa mesma citocina presentes no modelo *in vivo* de inflamação crónica (Controlo negativo).

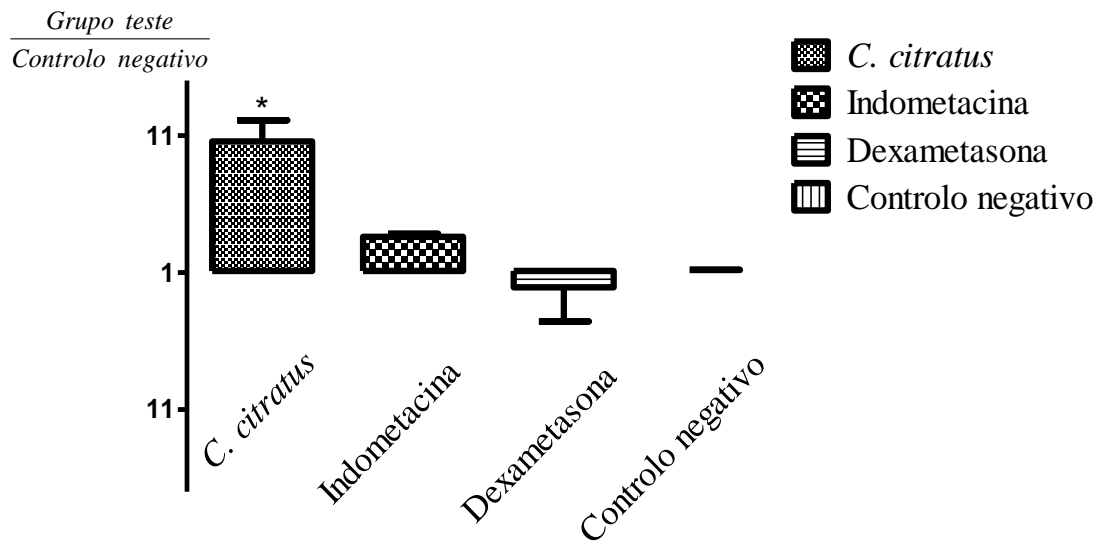
Os resultados da relação descrita para a IL-1 $\alpha$  são apresentados na Figura 9:



**Figura 9** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo.

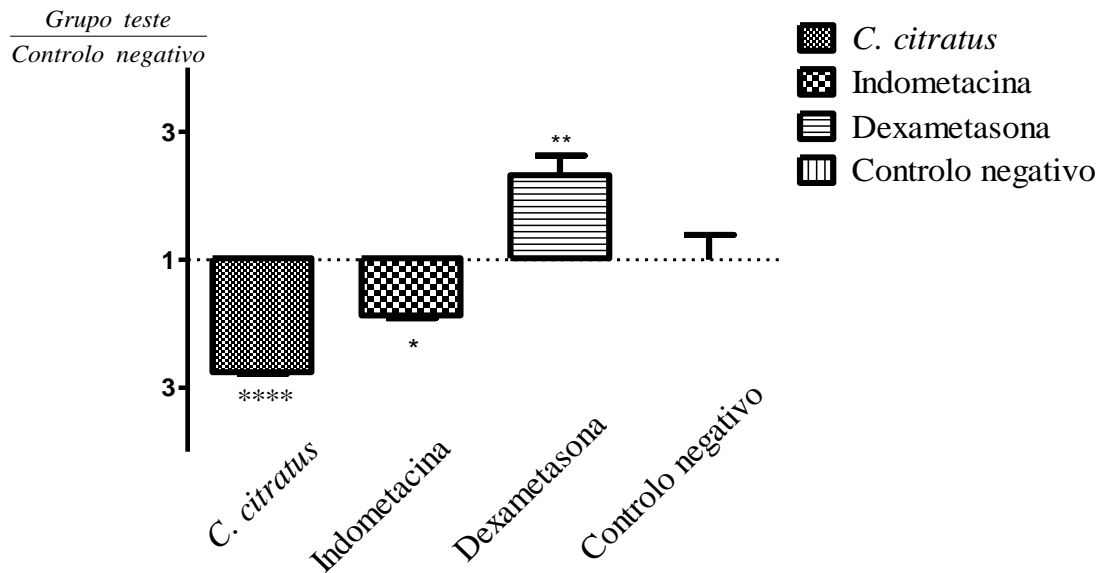


Os resultados da relação descrita para a IL-1 $\beta$  são apresentados na Figura 10:



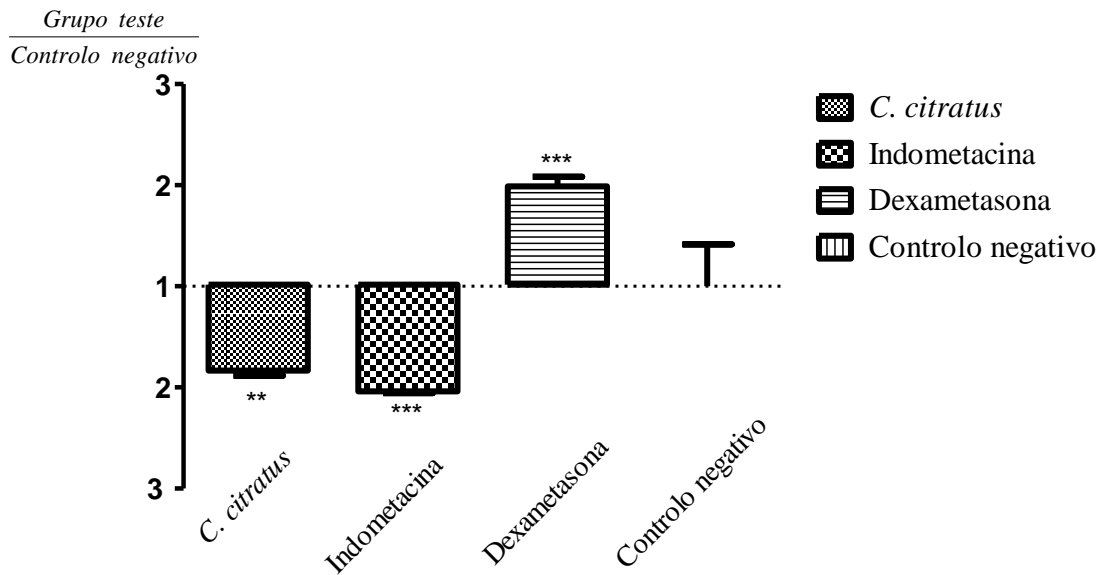
**Figura 10** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\beta$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-2 estão apresentados na Figura 11:



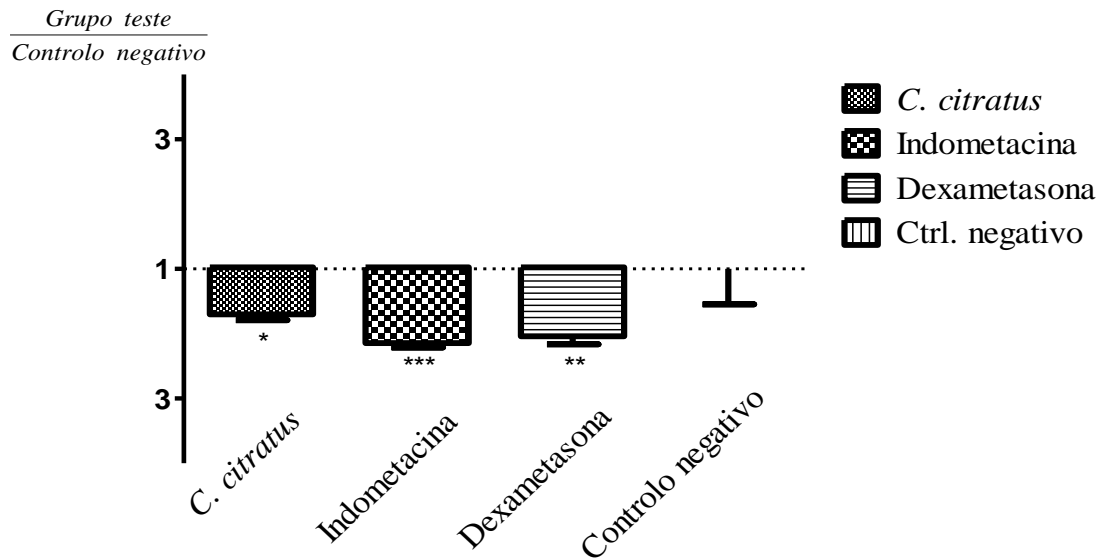
**Figura 11** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-2, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controllo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controllo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-4 são apresentados na Figura 12:



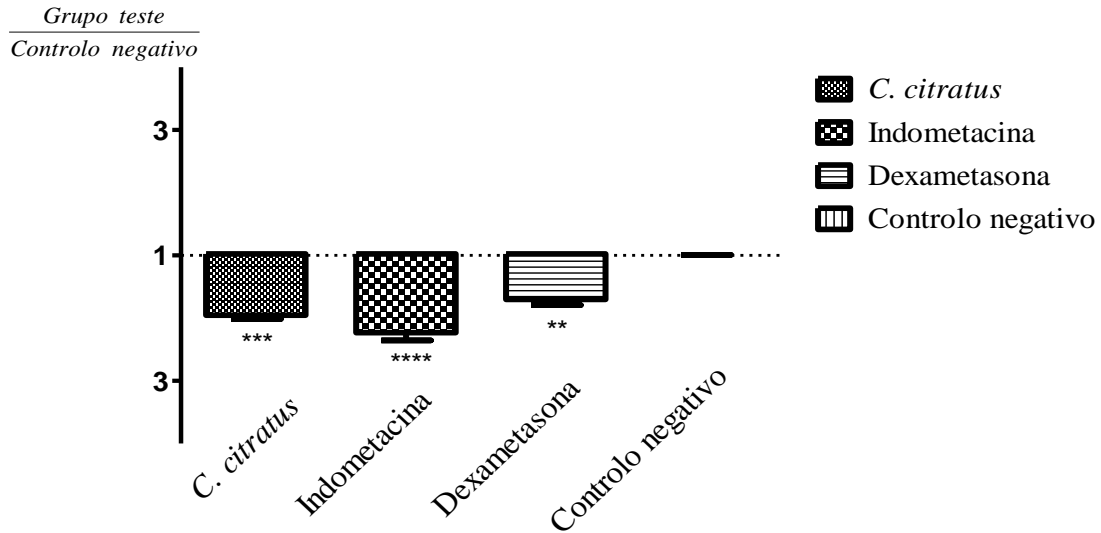
**Figura 12** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-4, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-6 são apresentados na Figura 13:



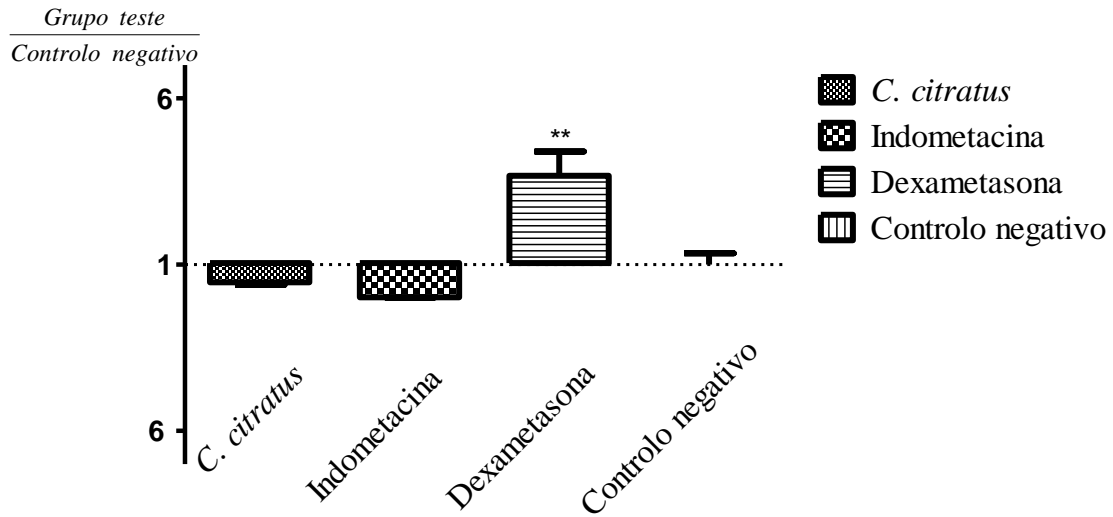
**Figura 13** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-6, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-10 são apresentados na Figura 14:



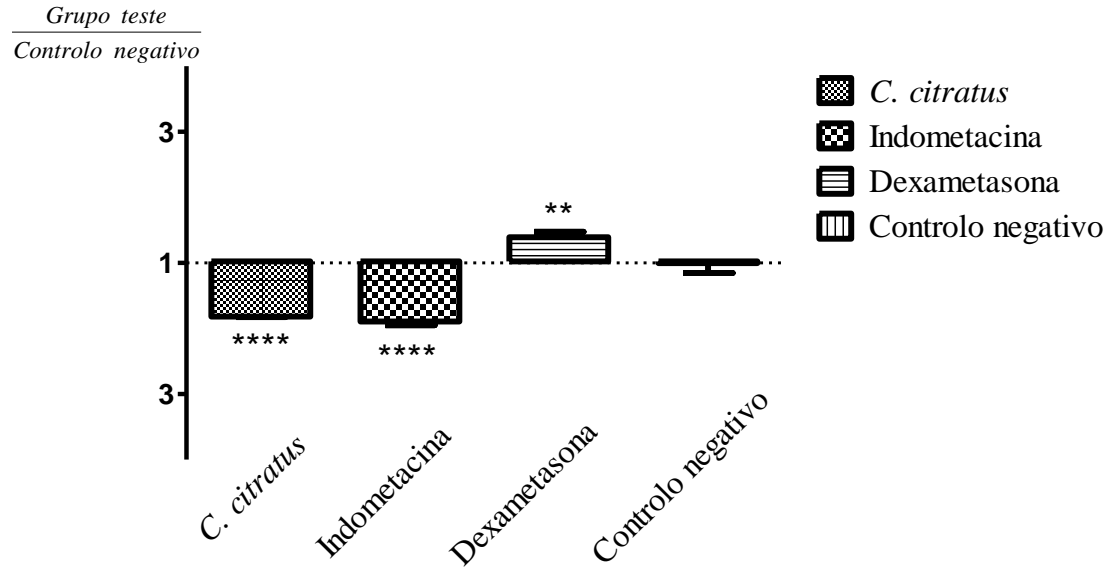
**Figura 14** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-10, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-12 são apresentados na Figura 15:



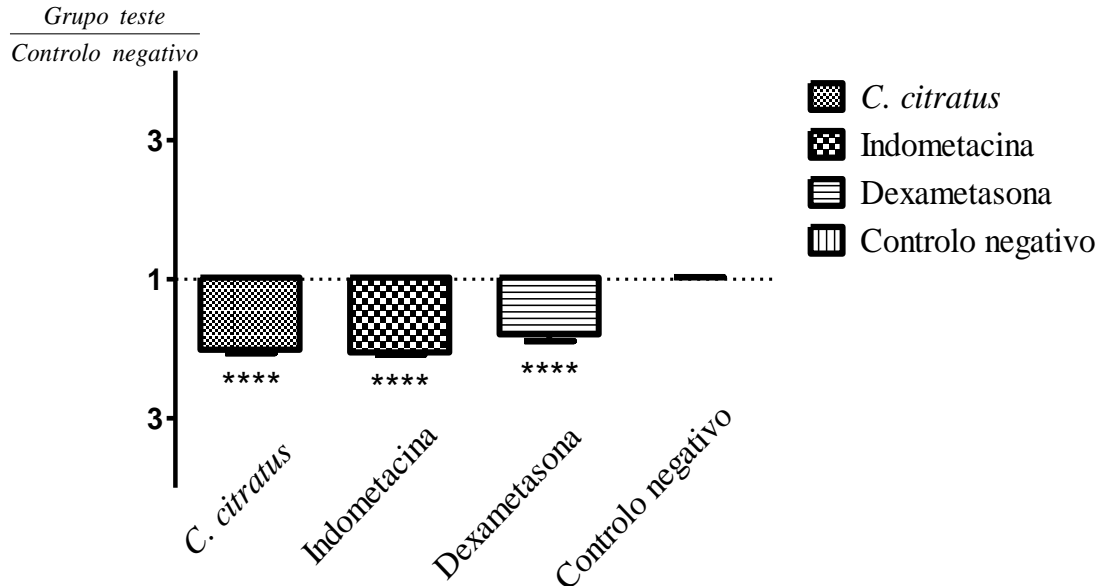
**Figura 15** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-12, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média ± EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-13 são apresentados na Figura 16:



**Figura 16** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-13, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controllo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controllo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

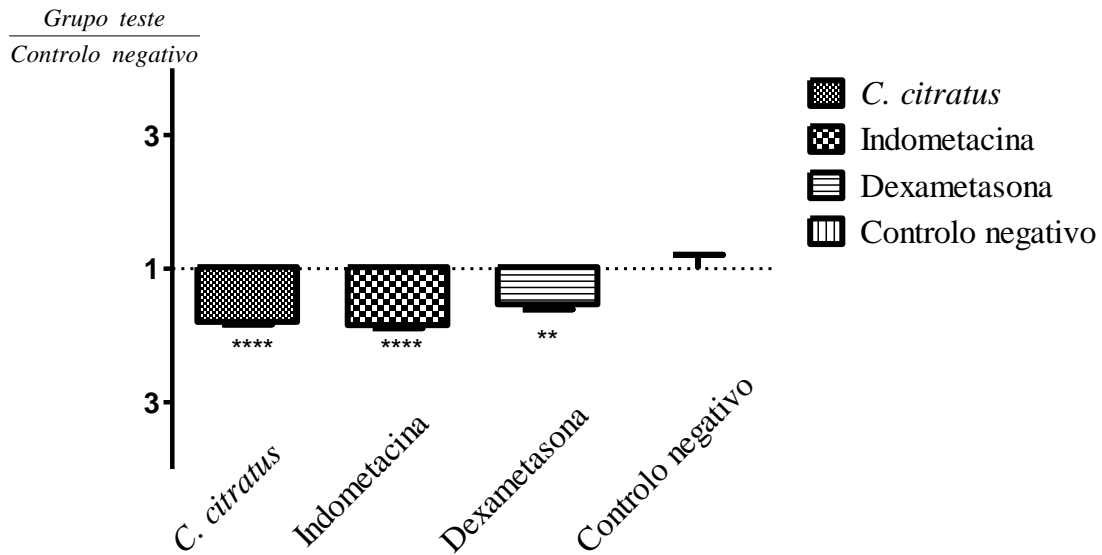
Os resultados da relação descrita para a IFN- $\gamma$  são apresentados na Figura 17:



**Figura 17** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do IFN- $\gamma$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

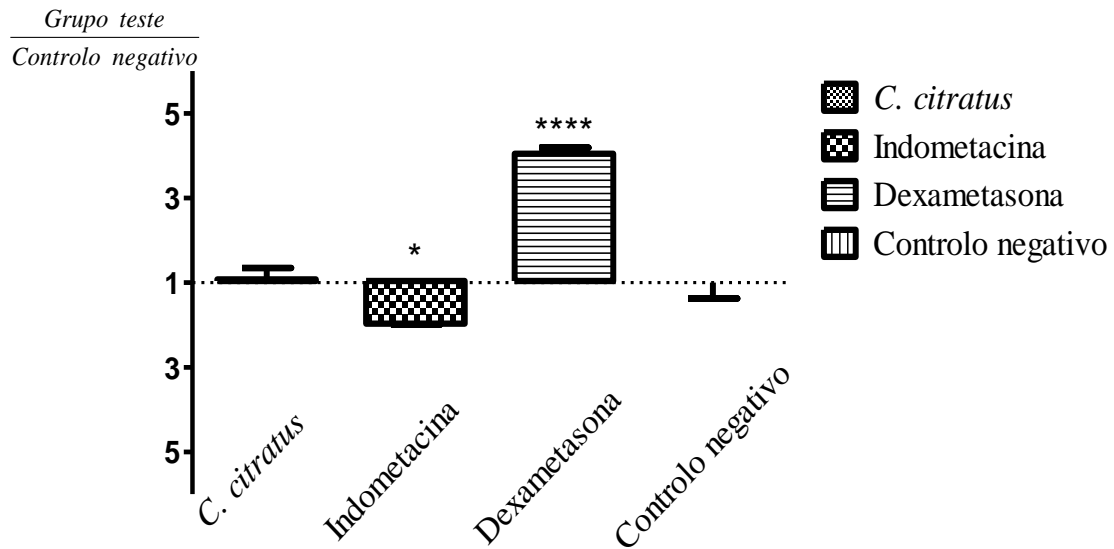


Os resultados da relação descrita para a TNF- $\alpha$  são apresentados na Figura 18:



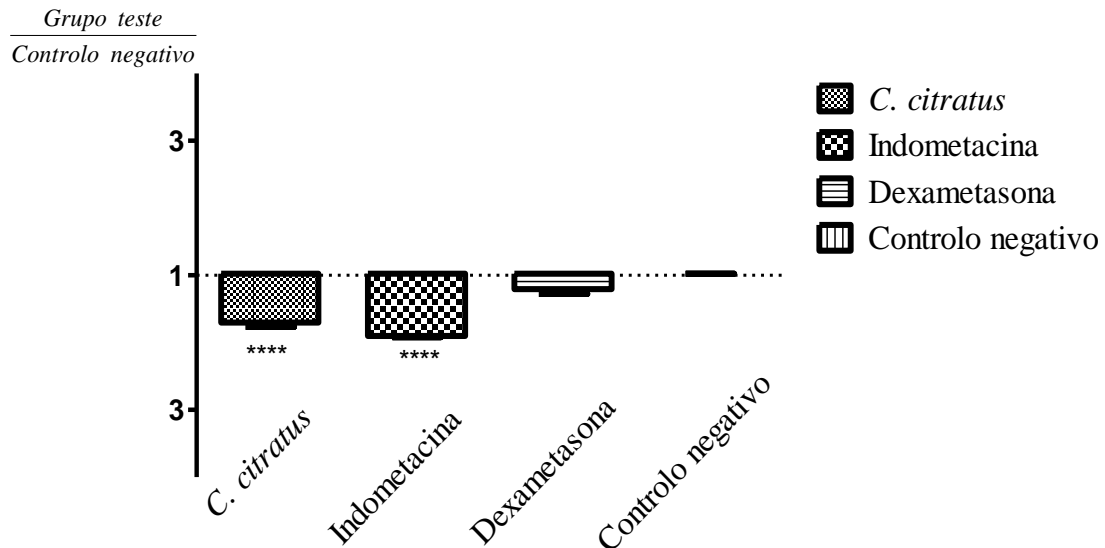
**Figura 18** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do TNF- $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a GM-FEC são apresentados na Figura 19:



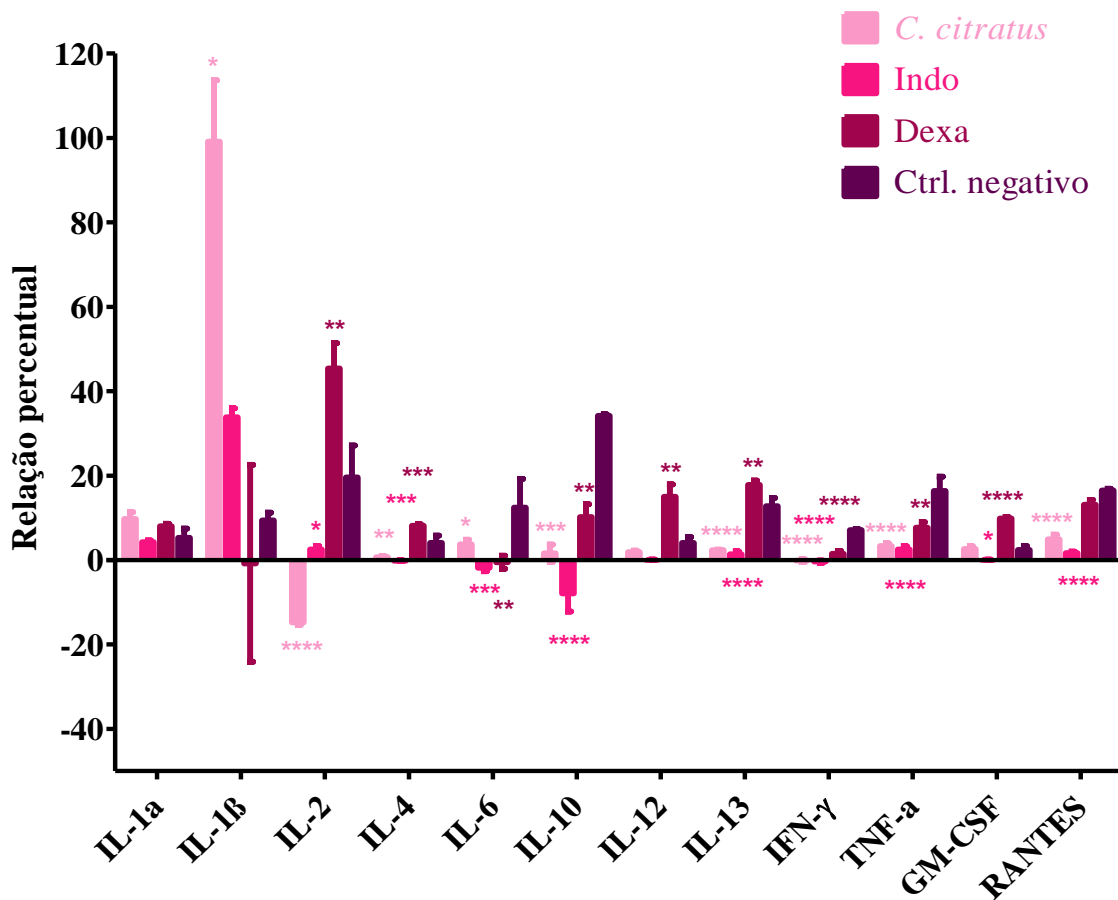
**Figura 19** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do GM-FEC, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a RANTES são apresentados na Figura 20:



**Figura 20** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do RANTES, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Na Figura vinte e um encontra-se um gráfico que representa os níveis relativos de todas as citocinas presentes no foco inflamatório crónico de cada grupo analisado: as colunas a rosa claro representam os níveis de citocinas do grupo teste, tratado com o extracto aquoso do *C. citratus*; a rosa forte as citocinas do grupo de animais aos quais foi administrado um AINE padrão (indometacina, 1mg/Kg); a rosa escuro o grupo teste tratado com o glucocorticóide padrão (dexametasona, 2,5 mg/Kg); a lilás o grupo controlo negativo, ao qual apenas foi administrado o veículo.



**Figura 21** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1mg/Kg e Dexametacina, 2,5 mg/Kg) na presença localizada do leque de citocinas analisadas neste estudo, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). Cada coluna representa a absorvância obtida para cada citocina de cada grupo analisado, normalizada com os controlos intrínsecos ao *kit* utilizado. A normalização foi determinada em percentagem, de acordo com a fórmula:  $((\text{média de absorvância do grupo teste} - \text{absorvância do controlo negativo intrínseco ao kit}) / (\text{absorvância do controlo positivo do kit} - \text{absorvância do controlo negativo do kit})) \times 100$ . Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinado por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

## 4.2. Monitorização da temperatura basal

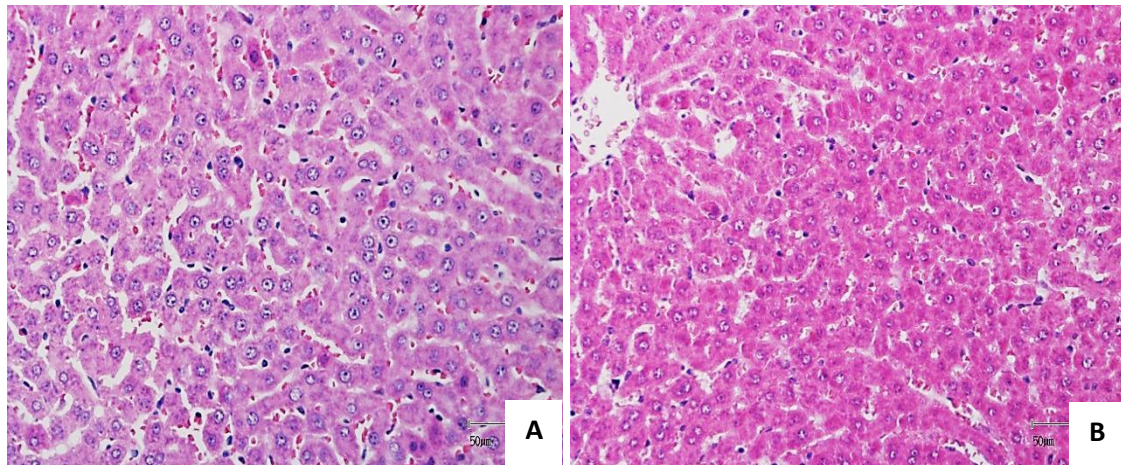
Com o objectivo de averiguar eventuais alterações à temperatura basal dos animais dos grupos experimentais subsequentes à técnica de indução de processo inflamatório crónico, a temperatura basal dos animais foi medida em dois momentos distintos: antes do processo de indução e no decorrer do quinto dia de processo inflamatório crónico (Tabela IV).

**Tabela IV** - Monitorização da temperatura basal dos animais antes e cinco dias após o processo de indução. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e estatisticamente analisados por ANOVA, segundo o teste de Bonferroni.

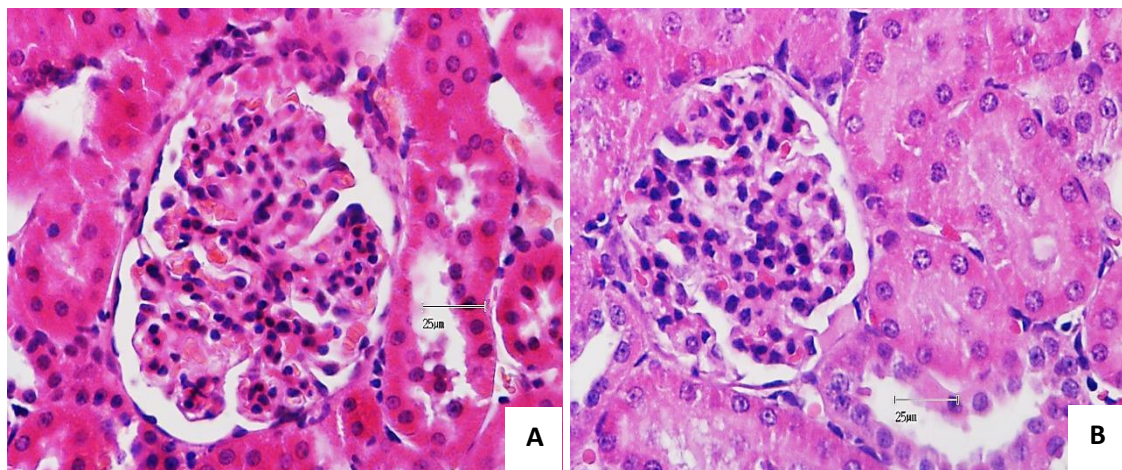
	Número de animais do grupo	Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm \text{EPM}$ ) antes e cinco dias após indução do processo inflamatório crónico	
		Antes	Após cinco dias
Grupo teste	6	37,03 $\pm$ 0,251	36,35 $\pm$ 0,109
Grupo positivo de indometacina	6	37,15 $\pm$ 0,270	37,13 $\pm$ 0,167
Grupo positivo de dexametasona	5	36,90 $\pm$ 0,197	37,07 $\pm$ 0,123
Controlo negativo	7	37,35 $\pm$ 0,263	36,83 $\pm$ 0,222

## 4.3. Análise histológica

As Figuras 22 e 23 apresentam, respectivamente, as imagens histológicas de fígado e de rim dos modelos *in vivo* de inflamação crónica relativas ao grupo controlo negativo (A) e ao grupo tratado com extracto aquoso de *C. citratus* (B).



**Figura 22** - Imagens histológicas de corte de fígado com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.



**Figura 23** - Imagens histológicas de corte de rim com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.

## **Capítulo 5**

### **Discussão**

Com o crescente número de limitações associado a muitos fármacos sintéticos no tratamento de desordens inflamatórias, os fármacos de origem natural (ou derivados) têm ganho lugar de destaque na terapêutica nos últimos anos (Beg *et al.*, 2011).

O *C. citratus* é uma gramínea perene cujo infuso é largamente usado pela medicina tradicional no tratamento de uma variedade de desordens patológicas. Na etnomedicina é usado, entre muitas outras aplicações, como agente anti-séptico, analgésico, ansiolítico, antioxidante, antipirético, tranquilizante, diurético, antimicrobiano, anti-reumático, antifúngico e anti-inflamatório (Negrelle *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2008; Asaolu *et al.*, 2009; Sforcin *et al.*, 2009; Figueirinha *et al.*, 2010; Bachiega *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2011).

Apesar da vasta utilização dos extractos desta espécie, pouco conhecimento existe sobre os mecanismos de acção pelos quais o *C. citratus* exerce os seus efeitos terapêuticos (Figueirinha *et al.*, 2010). Contudo, a maioria das actividades anteriormente descritas tem sido atribuída à presença de compostos que fazem parte dos elementos não voláteis do *C. citratus*, nomeadamente aos constituintes polifenólicos (Figueirinha *et al.*, 2008). Estes têm ganho terreno no que toca à actividade anti-inflamatória, particularmente devido ao seu desempenho como agente antioxidante e sequestrador de radicais livres (Figueirinha *et al.*, 2008).

Este trabalho surge, assim, como uma continuação ao trabalho realizado por Garcia (2010) – que comprovou a actividade anti-inflamatória deste mesmo extracto em modelo experimental *in vivo* de inflamação aguda – com o objectivo de contribuir com mais um passo para a compreensão a nível celular e molecular do uso terapêutico do *C. citratus* pela etnomedicina e, deste modo, justificar o seu uso tradicional em situações de doenças inflamatórias crónicas.

Para atingir esse objectivo foi necessária a utilização de modelos *in vivo* de inflamação crónica onde pesquisar uma possível acção terapêutica do extracto. O modelo escolhido foi o do granuloma induzido por uma pequena porção de algodão (do inglês *cotton pellet-induced granuloma*). A técnica do *cotton pellet* dá origem a um modelo de processo inflamatório crónico largamente utilizado para avaliar a eficácia de fármacos em inibir processos que envolvam proliferação celular e, consequentemente, componentes inerentes a esses processos. Isto deve-se ao facto de, neste modelo, pouco tempo após o início de uma resposta inflamatória aguda ocorrer um desenvolvimento de



células proliferativas (com um infiltrado de monócitos, macrófagos e proliferação de fibroblastos), formando o carácter crónico da inflamação. A implantação do algodão induz um processo inflamatório localizado, caracterizado pela migração de monócitos, acumulação de líquidos, apoptose e danos teciduais nas imediações do *cotton pellet*. Estes acontecimentos permitem um envolvimento das porções em tecido de granulação (Uzkeser *et al.*, 2012).

O protocolo do método do granuloma induzido pela porção de algodão descrito por Winter e seus colaboradores (1957) foi adoptado quase na sua totalidade. Este resumiu-se à implantação subcutânea de porções de algodão, previamente esterilizadas, de cerca de 10 mg, por um período de cinco dias. O valor da massa dos *cotton pellets*, bem como a duração de implantação destes, foram diminuídos em comparação com os do método originalmente descrito. Esta diminuição deveu-se, essencialmente, a uma atenção redobrada para com o bem-estar dos animais.

Um processo inflamatório está fortemente correlacionado com a presença de um elevado número de mediadores inflamatórios, nomeadamente de citocinas (Feghali *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2010a). Ligada à acção destas encontram-se, muitas vezes, alterações à temperatura corporal do organismo onde o processo inflamatório ocorre.

A temperatura corporal é um parâmetro objectivo do estado fisiológico de determinado organismo homeotérmico, uma vez que se encontra estritamente associada a uma importante reacção de defesa conservada ao longo da evolução – a febre (Pinto, 2009). De facto, a febre é, provavelmente, o mais bem conhecido sintoma e o mais usado indicador de diagnóstico de muitas desordens clínicas, particularmente as que resultam de infecção (Luheshi, 1996). A febre, ou pirexia, é um sinal de doença que traduz uma alteração da termorregulação causada por múltiplas e variadas causas, como infecções (bacterianas ou virais), neoplasias, hemorragias, episódios inflamatórios agudos, entre outros. As substâncias que provocam febre designam-se por pirogénios endógenos – como as citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 – ou exógenos – como bacterias e vírus (Pinto, 2009).

Os pirogénios, uma vez no sangue, exercem as suas funções após deslocamento para o hipotálamo onde, sem penetrarem no sistema nervoso central, activam as células endoteliais dos órgãos que possuem certos receptores específicos. A activação daqui resultante determina a produção de PG a partir do ácido araquidónico pela activação da COX-2. A PGE2, a principal PG responsável por este processo, ao penetrar no

hipotálamo, estimula as células hipotalâmicas a sintetizar neurotransmissores – como o AMPc, cuja função reside no aumento do limiar de temperatura do termostato hipotalâmico. O hipotálamo, por sua vez, activa os neurónios periféricos responsáveis pela vasoconstrição cutânea e contracção muscular, levando ao aumento da produção de calor e elevação da temperatura sanguínea, ao novo nível fixado pelo hipotálamo (Pinto, 2009).

Embora fracamente associado ao processo inflamatório crónico, este efeito sistémico é fortemente associado a processos infecciosos. De facto, foi essencialmente por esta evidência que se decidiu monitorizar a temperatura basal dos animais da experiência. É necessário salientar o facto do valor de temperatura corporal determinado ser o valor sistémico e não o sentido no foco inflamatório.

Alterações na temperatura corporal poderiam ser evidências que ao mesmo tempo que um processo inflamatório crónico estaria a ocorrer, um processo infeccioso o poderia estar a acompanhar, podendo, por isso, levar a resultados científicos não fiáveis.

Como se pode observar na Tabela IV, tal facto parece não ter ocorrido, já que não existiram alterações significativas entre os valores de temperatura medidos duas semanas antes do procedimento de indução e a temperatura corporal sentida no quinto dia de decorrência do processo inflamatório crónico, em qualquer dos grupos em estudo, nem no controlo negativo. Este resultado permite, pois, validar a metodologia utilizada, nomeadamente no que respeita à ausência de processo infeccioso.

O modelo *in vivo* de inflamação crónica acima descrito permitiu a avaliação do perfil imunomodulador do extracto aquoso, livre de compostos voláteis, do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Imunomoduladores podem ser definidos como agentes que afectam o sistema imunitário através de moléculas reguladoras – como as citocinas – estimulando ou inibindo eventos da resposta imunitária (Bachiega *et al.*, 2011). Esta definição foi a base condutora da investigação da acção imunomoduladora do *C. citratus* na produção de citocinas. As citocinas, como anteriormente descrito, têm um papel central na inflamação, ao serem responsáveis pela condução de dada resposta inflamatória a uma imunidade protectora ou à indução de imunopatologias, sendo que os resultados clínicos desta condução são parcialmente determinados pelo balanço entre o carácter pró- e anti-inflamatório dessas moléculas (Francisco *et al.*, 2013).

O estudo da acção imunomodeladora, proporcionado pelo modelo *in vivo* de inflamação crónica utilizado, permitiu avaliar a eficácia deste extracto vegetal como um possível agente anti-inflamatório. Com este intuito, o solubilizado do *cotton pellet* foi analisado com vista à determinação de doze citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES – através da utilização de um *kit* comercial. O *kit Multi-analyte ELISArray* utiliza a técnica clássica de ELISA, que oferece uma rápida e simples avaliação de alterações na expressão proteica, e está desenhado para, simultaneamente, traçar o perfil do nível de múltiplas citocinas. O motivo pelo qual se sujeitaram as amostras à pesquisa de um tão elevado número de elementos proteicos recaiu no facto do pouco conhecimento que ainda existe em relação a esta espécie vegetal, possibilitando desta forma maior quantidade e informação mais diversificada. O *kit* inclui ainda dois controlos intrínsecos, um positivo e um negativo, para maior segurança nos resultados. Contudo, este *kit* não permite uma quantificação do nível de citocinas, possibilitando apenas a detecção de alterações relativas entre determinadas amostras pela leitura da densidade óptica a 450 nm.

Os resultados foram apresentados de dois modos: (1) tabela e gráfico gerais (Tabela IV e Figura 21, respectivamente), cujos valores foram apresentados como relações percentuais da presença das citocinas, conseguidas por normalização com os controlos intrínsecos ao *kit* empregue e (2) relações entre os grupos teste e o controlo negativo, permitindo responder à questão se os grupos teste influenciam, positiva ou negativamente, a presença de determinada citocina.

Os resultados obtidos da análise anteriormente referida revelam que o tratamento oral com extracto aquoso de *C. citratus* possui, de facto, um efeito imunomodelador. A administração do extracto aquoso de *C. citratus* reduziu, significativamente, os índices da maioria das citocinas pró-inflamatórias, à excepção das isoformas da IL-1.

Na inflamação crónica, o elemento de destaque da família de citocinas do tipo I é a IL-6. Esta proteína é sintetizada no foco inflamatório para favorecer a acumulação de células mononucleares nesse local (Gabay, 2006). Como a IL-6, outras citocinas pró-inflamatórias importantes ao processo inflamatório crónico foram reduzidas, tais como o TNF- $\alpha$  e o RANTES. A redução verificada pela administração do extracto aquoso de *C. citratus* evidencia, pois, o seu potencial anti-inflamatório. Contudo, como já referido, o mesmo extracto parece estimular a síntese das isoformas da IL-1 – citocinas pró-inflamatórias de grande importância nestes estudos, já que a principal característica se prende com a indução da síntese de outras citocinas pró-inflamatórias.

A presença das citocinas anti-inflamatórias no foco agredido foi igualmente inibida, entre elas a IL-10. A “anti-citocina” é uma proteína anti-inflamatória e imunossupressora, devido essencialmente à actividade inibidora para com a síntese de outras citocinas (Meager *et al.*, 2007; Shaikh, 2011). Comparando os níveis destas citocinas anti-inflamatórias – IL-4, IL-10 e IL-13 – e os valores encontrados nos animais sob tratamento com os fármacos padrão utilizados, pode-se verificar que, apesar de não se confirmar com o *C. citratus* um efeito semelhante ao da dexametasona, que aumenta os níveis da IL-4 e da IL-13, também não se verificou uma diminuição tão acentuada como a que se verificou para a indometacina, o que sugere um maior efeito protector do *C. citratus* em comparação com os AINEs.

Com já referido, os valores obtidos para o nível percentual de citocinas no granuloma foram ainda analisados pela comparação com dois grupos controlos positivos – indometacina (1 mg/Kg) e dexametasona (2,5 mg/Kg). Estes dois fármacos foram escolhidos porque a sua acção no modelo *in vivo* de inflamação crónica está descrita: num processo inflamatório crónico granulomatoso, induzido por *cotton pellet*, tanto a indometacina como a dexametasona exercem os seus efeitos anti-inflamatórios, maioritariamente pela inibição do desenvolvimento do granuloma ao suprimirem a infiltração celular (Bailey *et al.*, 1982). A indometacina é um AINE bem conhecido, cuja acção anti-inflamatória está comprovada por inibirem a via das COX. Contudo, estes intervêm também, embora indirectamente, ao nível de outros mecanismos inflamatórios, nomeadamente na síntese de certas citocinas (Rang *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2013). De facto, a IL-1 $\beta$  induz a síntese de PGE<sub>2</sub>, que por sua vez estimula a libertação da IL-6 e IL-10 (Bour *et al.*, 2000). Como seria de esperar, estas duas citocinas foram as mais afectadas por parte da indometacina. Já a dexametasona é um glucocorticóide amplamente utilizado em episódios de inflamação crónica, prendendo-se o seu mecanismo de acção com uma vastidão de redes biológicas. O seu efeito no nível de citocinas está dependente da natureza da proteína, ou seja, é inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias mas estimulador da produção das anti-inflamatórias (Barnes, 2010). Os resultados obtidos revelam esta tendência.

Os resultados obtidos no presente estudo são consistentes com os obtidos por Tiwari e seus colaboradores (2010), Bachiega e seus colaboradores (2011) e Francisco e seus colaboradores (2013), mas totalmente inconsistentes com Sforcin e seus colaboradores (2009).

Neste último, Sforcin e seus colaboradores (2009) observaram que o tratamento de ratinhos com o extracto aquoso do *C. citratus* inibia a produção *ex vivo* de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos mas induzia a produção de IL-6 por estas células. Contudo, no mesmo laboratório em 2011, Bachiega e seus colaboradores investigaram o efeito do extracto aquoso do *C. citratus* na produção das mesmas citocinas IL-1 $\beta$ , L-6 e ainda da IL-10, por macrófagos de ratinho *in vitro*. Após estímulo inflamatório por LPS, o extracto de *C. citratus* diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória IL-6, bem como da anti-inflamatória IL-10. No mesmo estudo, os níveis basais de IL-1 $\beta$  aumentaram com baixas concentrações de extracto, enquanto que a concentração mais alta não afectou significativamente a sua produção.

Os resultados de Francisco e seus colaboradores (2013) estão em conformidade com este trabalho no que toca à produção das importantes citocinas TNF- $\alpha$  e RANTES. Tal como os deste trabalho, os níveis destas citocinas, produzidas *in vitro* por macrófagos humanos perante estímulos inflamatórios, diminuem com a administração do extracto de *C. citratus*. Tiwari e os seus colaboradores (2010) obtiveram, em semelhança, uma redução no mediador TNF- $\alpha$ , quando trataram macrófagos alveolares de ratinho, inflamatóriamente estimulados, com um extracto alcoólico de *C. citratus*.

Para validar a prática da medicina tradicional, uma das análises mais relevante prende-se com os resultados histológicos. As imagens obtidas (Figuras 22 e 23) mostram uma aparência de órgãos saudáveis nos animais tratados quando comparados com o controlo negativo. Os hepatócitos, bem como as células renais, apresentam morfologia normal, sem sinais de necrose ou estase – marcadores de toxicidade, tanto a nível hepático como renal. Esta análise histológica ao fígado (órgão metabólico) e ao rim (órgão excretor) sugere a inexistência de citotoxicidade por parte do extracto aquoso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. quando administrada em toma crónica.

Recentes investigações reforçam a importância de plantas medicinais, vegetais, frutas e outros extractos naturais como potenciais compostos activos na medicina alternativa ou complementar, no tratamento de uma variedade de patologias (Tiwari *et al.*, 2010).

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho vem, por isso, juntar-se aos parâmetros que evidenciam a actividade anti-inflamatória do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Contudo, este trabalho não só vem sugerir um bom uso terapêutico desta espécie como também a sua segurança. Esta ficou comprovada pela análise histológica realizada, que demonstrou que, mesmo com a toma crónica administrada (duas vezes ao dia, durante os cinco dias de tratamento) não traz consequências citotóxicas para os animais.

Farmacologicamente, este trabalho veio comprovar o largo efeito imunomodulador desempenhado pelo *C. citratus*, pois este foi responsável não só pela inibição de um elevado leque de citocinas – em particular da IL-6 – como também evidenciou um efeito protector em comparação com os AINEs, no que às citocinas anti-inflamatórias. Contudo, é de ressaltar a dificuldade deste tipo de estudos que envolvem estas proteínas. Além da redundância funcional e pleiotropismo associado, as citocinas são caracterizadas por actuarem numa rede biológica intensa, onde fenómenos de sinergismo, antagonismo, regulação positiva e negativa têm lugar (Wilson *et al.*, 2009). Tudo isto torna difícil uma avaliação conclusiva, quando é feita uma análise individual das citocinas.

Uma das grandes questões à volta desta espécie recai sobre o mecanismo de acção desencadeado pelo *Cymbopogon citratus* para atingir o seu efeito terapêutico. Apesar de algumas incoerências nos resultados, este estudo sugere que o mecanismo anti-inflamatório do *C. citratus* esteja, maioritariamente, associado a acções dos seus compostos não voláteis na via de sinalização do NF- $\kappa$ B. Este aspecto foi suportado recentemente pela literatura, onde já há evidências concretas que as propriedades anti-inflamatórias do *C. citratus* ocorrem pela inibição do proteossoma – complexo proteico responsável pela degradação do I $\kappa$ B – estrutura envolvida na via do NF- $\kappa$ B, que reflecte a não expressão de várias citocinas (Francisco *et al.*, 2013).

O NF- $\kappa$ B é um dos principais factores de transcrição induzíveis, com um papel essencial nas respostas inflamatórias de carácter crónico (Bremner *et al.*, 2002). No entanto, a complexidade do seu mecanismo leva a uma imensidão de alvos, onde agentes inibitórios podem actuar: degradação do I $\kappa$ B, a nível do complexo IKK, na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e ainda na sua ligação ao DNA (Bremner *et al.*, 2002). Contudo, tanto o potencial imunomodulador isolado, como o relacionado com a

actividade anti-inflamatória do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., devem ainda ser explorados futuramente, de modo a obter um conhecimento mais aprofundado sobre essas características.

# **Capítulo 6**

## **Conclusões**



O presente trabalho de investigação, o qual se propôs a avaliar a actividade anti-inflamatória do infuso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. em modelo *in vivo* de inflamação crónica, permite agora concluir que:

1. O extracto aquoso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. aparenta possuir actividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação crónica;
2. Esta actividade farmacológica parece estar dependente, pelo menos em parte, do efeito imunomodulador desempenhado pelo extracto;
3. O efeito imunomodulador e, conseqüentemente, anti-inflamatório, poderão estar associados à via do NF- $\kappa$ B num processo crónico;
4. O extracto aquoso de *C. citratus*, mesmo em dose crónica, não mostrou ser citotóxico.

Este trabalho permite, assim, dar um importante passo no “imenso mundo” que poderá ser a relação *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf./processo inflamatório crónico. De facto, os resultados obtidos neste estudo permitem edificar uma base condutora a investigações futuras com o intuito da total confirmação do efeito aqui verificado, bem como os compostos não voláteis que se encontram na base desta propriedade terapêutica.

**Capítulo 7**  
**Referências bibliográficas**

- Agostini-Costa T., Vieira R., Bizzo H., Silveira D., Gimenes M. (2012). *Secondary metabolites*. Chromatography and its applications, Dr. Sasikumar Dhanarasu (Ed.).
- Ahmed S., Anuntiyo J., Malemud C., Haqqi T. (2005). Biological basis for the use of Botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *eBCAM*, 2(3):301-308.
- Akira S., Takeda K. (2004). Toll-like receptor signaling, *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.
- Asaolu M., Oyeyemi O., Olanlokun J. (2009). Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus*. *Pak J Nutr*, 8 (12), 1920-1922.
- Bachiega T., Sforcin J. (2011). Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J Ethnopharmacol*, 137, 909-913.
- Bailey P., Sturm A., Lopez-Ramos B. (1982). A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. *Biochem Pharmacol*, 31 (7), 1213-1218.
- Barbosa L., Pereira U., Martinazzo A., Maltha C., Teixeira R., Melo E. (2008). Evaluation of the chemical composition of Brazilian comercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. *Molecules*, 13, 1864-1874.
- Barnes P. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci*, 94, 557-572.
- Barnes P. (2010). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 120, 76-85.
- Barreto R., Franco E., Brasileiro C., de Oliveira A., Dimech G., Malta D., Cazuzu J., Leite A., da Silva T., Maia M. (2012). Early undernutrition is associated with attenuated inflammatory response and alteration in pharmacological efficacy of indomethacin in rats. *Eur J Pharm Sci*, 46, 56-63.
- Bassolé I., Lamien-Meda A., Bayala B., Obame L., Iiboudo A., Franz C., Novak J., Nebié R., Dicko M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18 (12), 1070-1074.
- Baud V., Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11 (9), 372-377.
- Beg S., Swain S., Hasan H., Barkat M., Hussain Md. (2011). Systemic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspective. *Pharmacogn Rev*, 5 (10), 120-137.

- Bour A., Westendorp R., Laterveer J., Bollen E., Remarque E. (2000). Interaction of indomethacin with cytokine production in whole blood. Potential mechanism for brain-protective effect. *Exp Gerontol*, 35 (8), 1017-1024.
- Brauschädel M., Boschert V., Krippner-Heidenreich A. (2007). Tumor necrosis factors. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-12.
- Bravo J., Heath J. (2000). Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J*, 19 (11), 2399-2411.
- Bremner P., Heinrich M. (2002). Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *J Pharm Pharmacol*, 54, 453-472.
- Carlini E., Contar J., Silva-Filho A., Silveira-Filho N., Frochtengarten M., Bueno O. (1986). Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J Ethnopharmacol*, 17, 37-64.
- Chapman K., Coutinho A., Zhang Z., Kipari T. (2013). Changing glucocorticoid action: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Cheel J., Theoduloz C., Rodríguez J., Schmeda-Hirschmenn G. (2005). Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agricult Food Chem*, 53 (7), 2511-2517.
- Chensue S. (2013). Chemokines in innate and adaptative granuloma formation. *Front Immunol*, 4 (43), 1-9.
- Corwin E. (2008). *Handbook of pathophysiology*, 3<sup>rd</sup> Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Cotran R., Kumar V., Collins T. (1999). *Robbins, Pathologic Basis of Disease*. 6<sup>th</sup> Edition, Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Croizer A., Jaganath I., Clifford M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26, 1001-1043.
- Cunha A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- De Bosscher K., Berghe W., Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr rev*, 24 (4), 488-522.
- Dinarello C. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 20 (27), S1-S13.

- Dinareello C. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev of Immunol*, 27, 519-550.
- Drexler S., Foxwell B. (2010). The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 506-518.
- EUFDA (2005). Guidance for Industry- Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics on adult healthy volunteers. *U S Food and Drug Administration*.
- Feghali C., Wright T. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, 12-26.
- Ferreira J. (2011). Avaliação in vivo das actividades anti-inflamatória e analgésica de uma fracção enriquecida em proantocianidinas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Tese de Mestrado.
- Figueirinha A., Paranhos A., Pérez-Alonso J., Santos-Buelga C., Batista M. T. (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem*, 110, 718-728.
- Figueirinha A., Cruz M., Francisco V., Lopes M., Batista M. (2010). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *J Med Food*, 13 (3), 681-690.
- Foster D., Parrish-Novak J., Fox B., Xu W. (2004). Cytokine-receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 160-170.
- Francisco V., Figueirinha A., Neves B., García-Rodríguez C., Lopes M., Cruz M., Batista M. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Ethnopharmacol*, 133, 818-827.
- Francisco V., Costa G., Figueirinha A., Marques C., Pereira P., Neves B., Lopes M., García-Rodríguez C., Cruz M., Batista M. (2013). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *J Ethnopharmacol*.
- Gabay C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 8(2), S3.
- Garcia R. (2010). Avaliação da actividade anti-inflamatória e analgésica do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. em modelos experimentais *in vivo*. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Tese de Mestrado.

- Garcia R., Ferreira J., Costa G., Santos T., Branco F., Caramona M., de Carvalho R., Dinis A., Batista T., Castel-Branco M., Figueiredo I. (2013). Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf leaves infusion on *in vivo* models – polyphenols contribution. Artigo submetido.
- Guimarães S., Moura D., da Silva P. *et al.* (2006). *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas - Manual de farmacologia e farmacoterapia*. 5ª Edição. Porto, Porto Editora.
- Haddad J., Abdel-Karim N. (2011). NF- $\kappa$ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: Therapeutic pattern or pseudoregulation. *Cell Immunol*, 271, 5-14.
- Huang Y., Erdmann N., Hexum T., Zheng J. (2008). Cytokines and chemokines. *J Neuroimmune Pharmacol*, 15, 183-205.
- Juan M., Colobran R. (2009). Chemokines and chemokine receptors. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-11.
- Kasali, A., Oyedeji A., Ashilokun A. (2001). Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour Frag J*, 16 (5), 377-278.
- Koelink P., Overbeek A., Braber S., de Kruijf P., Folkerts G., Smit M., Kraneveld A. (2012). Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: An extensive review. *Pharmacol Ther*, 133, 1-18.
- Kotenko S., Pestka, S. (2000). Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*, 19, 2557-2565.
- Kumar V., Abbas A., Fausto N. (2005). *Robbins e Cotran, Patologia-Bases Patológicas das Doenças*. Tradução da 7ª Edição. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Kumar V., Abbas A., Fausto N., Aster J. (2010b). *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease*. 8ª Edição, Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Kumar R., Wakefield D. (2010a). Inflammation: Chronic. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS) - John Wiley & Sons*, 1-7
- Lamoureux J., Bradley D. (2007). Inflammatory mediators. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-5.
- Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF- $\kappa$ B Pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, 1-10.

- Lee P., Li Y., Kumagai Y., Xu Y., Wwinstein J., Kellner E., Nacionales D., Butfiloski E., Rooijen N., Akira S., Sobel E., Satoh M., Reeves W. (2009). Type I Interferon Modulates Monocyte Recruitment and Maturation in Chronic Inflammation. *Am J Pathol*, 175 (5), 2023-2033.
- Liongue C., Ward A. (2007). Evolution of class I cytokine receptors. *BMC Evol Biol*, 7 (120).
- Luheshi (1996). Cytokines and fever – Mechanisms and sites of action. *Int Arch Allergy Immunol*, 109 (4), 301-307.
- Meager A., Wadhwa M. (2007). Interleukins. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-19.
- Miranda C., Maier C. Stevens J. (2012). Flavonoids. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-13.
- Mythreyi R., Sasikala E., Geetha A., Madhavan V. (2008). Antipyretic activity of leaves of *Cadaba fruticosa* (L.) Druce. *Pharmacologyonline*, 3, 136-142.
- Nagar A., Shukla A., Bigoniya, P. (2011). Anti-inflammatory potential of *Spinacia oleracea* leaf extract, *J Nat Pharm*, 2, 80-87.
- Negrelle R., Gomes E. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.: chemical composition and biological activities. *Rev Bras Pl Med*, 9(1), 80-92.
- Novoselova E., Lunin S., Novoselova T., Khrenov M., Glushkova O., Avkhacheva N., Safronova V., Fesenko E. (2009). Naturally occurring antioxidant nutrients reduce inflammatory response in mice. *Eur J Pharmacol*, 615 (1-3), 234-240.
- Nowak T., Handford A. (2004). *Pathophysiology – Concepts and Applications for Health Care Professionals*. 3<sup>rd</sup> Edition, McGraw-Hill.
- Nyiredy S. (2004). Separation strategies of plant constituents - current status. *J Chromatogr B*, 812, 35-51.
- Orlando R., Gonzales A., Hunsaker L., Franco C., Royer R., Jagt D., Jagt D. (2010). Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression by aqueous extracts of hispanic medicinal herbs. *J Med Food*, 13 (4), 888-895.
- Paschapur M., Patil M., Kumar R., Patil S. (2009). Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) in experimental animals. *J Med Plants Res*, 3(2), 49-54.
- Pinto A. (2009). *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações*. Lisboa, LIDEL.

- Portaria 1005/92 de 23 de Outubro. *Diário da República n°245/92 – I Série*. Ministério da Agricultura, da Educação, da Saúde e do Comércio e Turismo. Lisboa.
- Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. (2007). *Farmacologia*. Tradução da 6ª Edição. Elsevier.
- Rhen T., Cidlowski J. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 353, 1711-23.
- Roy S., Bagchi D., Raychaudhuri S. (2013). *Chronic inflammation - Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions*. Florida, CRC Press.
- Schaneberg B., Khan I. (2002). Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. *J Agricult Food Chem*, 50 (6), 1345-1349.
- Schindler C., Levy D., Decker T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 282 (28), 20059-20063.
- Seta F., Bachschmid M. (2012). Cyclooxygenase pathway of the arachidonate cascade. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-12.
- Sforcin J., Amaral J., Fernandes Jr A., Sousa J., Bastos J. (2009). Lemongrass effects on IL-1 $\beta$  and IL-6 production by macrophages. *Nat Prod Res*, 23 (12), 1151-1159.
- Shah G., Shri R., Panchal V., Sharma N., Singh B., Mann A. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemongrass). *J Adv Pharm Technol Res.*, 2 (1), 3-8.
- Shaikh P. (2011). Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *Int J of Pharm & Life Sci*, 2 (11), 1247-1263.
- Smoak K., Cidlowski A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, 125, 697-706.
- Spector W. G. (1989). *An Introduction to General Pathology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Michigan, Churchill Livingstone.
- Suralkar A., Sarda P., Ghaisas M., Thakare V., Deshpande A. (2008). In Vivo Animal Models for Evaluation of Anti-Inflammatory Activity. *Latest Reviews*, 6 (2).
- Tavares A., Zuzarte M., Salgueiro L. (2009). *Plantas - Aromáticas e Medicinais*, Escola Médica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.



- Tiwari M., Dwivedi U., Kakkar P. (2010). Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* DC. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages, *Food Chem Toxicol*, 48, 2913-2919.
- Tomazetti J., Ávila D., Ferreira A., Martins J., Souza F., Royer C., Rubin M., Oliveira M., Bonacorso H., Martins M., Zanatta N., Mello C. (2005), Baker yeast-induced fever in young rats: Characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Meth*, 147, 29-35.
- Underwood J., Cross S. (2009) *General and Systematic Pathology*. 5<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone/Elsevier.
- Uzkeser H., Cadirci E., Halici Z., Odabasoglu F., Polat B., Yuksel T., Ozaltin S., Atalay F. (2012). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of salbutamol on acute and chronic models of inflammation in rats: involvement of an antioxidant mechanism. *Mediat Inflamm*, 2012, 1-10.
- Vane J., Botting R. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104 (3A), 2S-8S.
- Victoria S., Das S., Lahlhenmawia H., Phuoco L., Shantabi L. (2012). Study of analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of the leaves of *Thunbergia coccinea* Wall. *IAMURE*, 2( 2), 83-88.
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
- Wang X., Lupardus P., LaPorte S., Garcia K. (2009) Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*, 27, 29-60.
- Wilson H., Barker R. (2009). Cytokines. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-7.
- Winter C., Porter C. (1957). Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocortisone esters. *J Am Pharm Assoc*, 46 (9), 515-519.
- Wojcikowshi K., Bobe G. (2013). Animal studies on medicinal herbs: Predictability, dose conversion and potential value. *Phytother Res*, (wileyonlinelibrary.com).
- Wu Y., Zhou C., Song L., Li X., Shi S., Mo J., Chen H., Bai H., Wu X., Zhao J., Zhang R., Hao X., Sun H., Zhao Y. (2006). Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol*, 108, 243-250.

Zlotnik A., Yoshie O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36, 705-716.

## **Agradecimentos**

Aos laboratórios de Farmacologia e de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, locais onde se realizou este trabalho experimental, no nome da Professora Doutora Maria Margarida Caramona e da Professora Doutora Maria Teresa Batista, pelo acolhimento e por terem proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho um agradecimento muito sincero.

À Professora Doutora Isabel Vitória Figueiredo e à Professora Doutora Maria Margarida Castel-Branco, orientadoras desta dissertação, agradeço a orientação científica, ensinamentos, disponibilidade, incentivo e confiança dada ao longo deste trabalho. Agradeço ainda a oportunidade dada pra integrar este projecto.

Ao laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, no nome do Professor Doutor António Cabrita, pelos serviços de histologia.

Ao Professor Doutor Rui de Carvalho, agradeço a disponibilidade e a co-orientação deste trabalho.

Ao João, pelos ensinamentos, dedicação e paciência ao longo de todo este ano, o meu muito obrigado.

Ao Rafael, à Beatriz, à Lúcia e à Dona Helena agradeço pelo apoio laboratorial e boa disposição sempre demonstrada ao longo deste trabalho.

Aos meus “mais que tudo”, Mãe, Pai e “Hique”. Obrigada pelo amor, preocupação, paciência e apoio, factores cruciais para que conseguisse atingir o final desta fase da minha vida. Obrigada pela pessoa que sou hoje, que sem o vosso carinho, ensinamentos e educação não o seria. Mano, além disso, obrigada por tornares a minha vida numa diversão constante.

Ao Luís, obrigada pela amizade, carinho, força e, sobretudo, paciência. Obrigada por permaneceres ao meu lado em todos os momentos.

A todos os amigos, mas em especial à Ana, Marisa e Joana. Pela amizade incondicional, diversão, carinho, força e dias intensivos de companhia na biblioteca.

## Resumo

A inflamação crónica, fortemente associada a várias doenças da actualidade, afecta drasticamente a qualidade de vida de uma grande parte da população mundial. Actualmente, o tratamento de tais patologias prende-se com terapêuticas aliadas a várias limitações, entre as quais graves efeitos secundários. Com o intuito de ultrapassar essas adversidades, a procura de compostos de origem natural, com potencial terapêutico e reduzidos efeitos secundários, tem sido incessante.

O infuso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., espécie com grande distribuição geográfica, tem sido amplamente usado pela medicina tradicional no tratamento de diversas patologias, entre as quais condições inflamatórias. Contudo, pouco conhecimento existe ainda sobre as suas reais acções terapêuticas, e subsequentes mecanismos de acção.

Este trabalho surge, deste modo, com o objectivo de investigar o efeito do extracto aquoso de *C. citratus* (livre de óleo essencial) num processo inflamatório crónico. Para tal, o estudo utilizou um modelo *in vivo* desse processo induzido pelo método de *cotton pellet* (*cotton pellet-induced granuloma*), realizado em ratos *Wistar* machos. Este modelo foi tratado com o extracto de *C. citratus* por um período de cinco dias, após o qual se procedeu à análise do efeito imunomodulador. O procedimento referido também foi utilizado para os controlos do estudo (indometacina, 1 mg/Kg; dexametasona, 2,5 mg/Kg; veículo).

As relações percentuais de citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES, no foco inflamatório crónico, foram comparadas entre os grupos teste e controlo negativo pela técnica de ELISA.

O *C. citratus* reduziu a expressão da maioria dos elementos proteicos pró-inflamatórios analisados, à excepção das isoformas da IL-1. O efeito nas citocinas anti-inflamatórias foi igualmente uma redução, embora não se tenha verificado uma diminuição tão acentuada como a que se verificou para a indometacina. Daqui pode concluir-se que, de facto, o extracto aquoso de *C. citratus* possui um efeito imunomodulador e um maior efeito protector em comparação com os AINES, evidenciando, por isso, uma possível actividade anti-inflamatória crónica.

Além disso, os resultados da análise histológica efectuada não evidenciaram qualquer citotoxicidade associada à administração da toma crónica.

Os resultados obtidos no presente estudo constituem, deste modo, fortes indicadores de efeito terapêutico do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. no que toca a desordens inflamatórias de carácter crónico, edificando, desta forma, uma base a futuros estudos que possam confirmar totalmente a propriedade originalmente descrita pela etnomedicina.

**Palavras-chave:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., processo inflamatório crónico, citocinas, etnomedicina.

## Abstract

Today, chronic inflammation is strongly linked to several diseases that dramatically affect a large portion of the world population's life quality. Currently, treatment of these pathologies relates to therapeutic coupled to several limitations, including severe side effects. In order to overcome these adversities, the exploration for natural compounds with therapeutic potential and reduced side effects, has been unremitting.

*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. leaves infusion, species with wide geographic distribution, is used in traditional medicine for the treatment of several diseases, including inflammatory conditions. However, there is little knowledge about the real therapeutic actions and mechanisms of the species.

Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of essential oil-free infusion of *C. citratus* in chronic inflammatory process. For this, we used an *in vivo* model of chronic inflammation by cotton pellet-induced granuloma, in male Wistar rats. This model was treated with aqueous extract of *C. citratus* for five days. After this, we examined the immunomodulatory effect of this vegetal specimen on granuloma. The above procedure also used for controls (indomethacin 1 mg/Kg; dexamethasone, 2.5 mg/Kg; vehicle).

The relationship of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF and RANTES in granuloma were performed by comparison between test group and negative control using the ELISA technique.

*C. citratus* inhibited the most of cytokines, with exception of IL-1's isoforms. The effect on anti-inflammatory cytokines was also reduced. Although the reduction, the effect was lower than indomethacin's effect. This supports the immunomodulatory and protective effect of oil-free infusion of *C. citratus* compared with NSAIDs. And, so it evidenced the chronic anti-inflammatory properties. Furthermore, histological analysis's results showed that the extract was not found to be cytotoxic in chronic doses.

The results of this study are strong indicators of therapeutic effect of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., in chronic inflammatory diseases and it may become a basis for future studies in order to confirm this property, described originally by folk medicine.

**Keywords:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., chronic inflammation, cytokines, ethnomedicine.

## Abreviaturas

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AINEs:** anti-inflamatórios não-esteróides

**AMPc:** monofostato cíclico de adenosina

**ARNm:** ácido ribonucleico mensageiro

**C:** cisteínas

**CAIR:** moléculas cinases associadas ao receptor da interleucina 1

**CMH:** complexo maior de histocompatibilidade

**COX:** enzima ciclo-oxigenase

**DM:** domínio de morte

**DMATR:** proteína de domínio de morte associada ao receptor do factor de necrose tumoral

**ELISA:** *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

**EPM:** erro padrão da média

**ERG:** elementos de resposta a glucocorticóides

**FADM:** proteína adaptadora do domínio de morte

**FATR:** factor associado ao receptor do factor de necrose tumoral

**FCDP:** factor de crescimento derivado de plaquetas

**FCE:** factor de crescimento epidérmico

**FCF:** factor de crescimento dos fibroblastos

**FCFb:** factor de crescimento dos fibroblastos básico

**FCVE:** factor de crescimento vascular endotelial

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FTC- $\beta$ :** factor de transformação de crescimento  $\beta$

**GDP:** guanina di-fosfato

**GM-FEC:** factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos

**GTP:** guanina tri-fosfato

**IFN:** interferão

**IFN-R:** receptor de interferão

**I $\kappa$ B:** inibidor citoplasmático do NF- $\kappa$ B

**IKK:** factor inibitório do NF- $\kappa$ B cinase

**IL:** interleucina

**IL-1Ra:** antagonista do receptor da IL-1

**IL-1R:** receptor da interleucina 1

**IL-2R:** receptor da interleucina 2

**IL-4R:** receptor da interleucina 4

**IL-6R:** receptor da interleucina 6

**IL-10R:** receptor da interleucina 10



**JAK:** família de tirosinas cinases *Janus*  
**JNK:** cinases c-jun  
**KAL:** células *killer* activadas por linfocinas  
**kDa:** quilodalton  
**LCD40:** ligando indutor de apoptose relacionado com o factor de necrose tumoral  
**LFas:** ligando fas  
**M-FEC:** factor estimulador de colónias de macrófagos  
**MyD88:** proteína de resposta primária à diferenciação mielóide 88  
**NK:** células *natural killer*  
**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor  $\kappa$ B*  
**PA-1:** proteína 1 activadora  
**PG:** prostaglandina  
**PI3C:** via da fosfatidilinositol-3 cinase  
**PIM-1:** proteína 1 inflamatória de macrófagos  
**PIR-1:** proteína 1 de interacção com o receptor  
**PRF:** peroxidase de raiz-forte  
**RANTES:** *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*  
**RAPG:** receptores acoplados à proteína G  
**RG:** receptor glucocorticóide  
**RHC:** região de homologia responsável pela ligação às citocinas  
**SDM:** proteína silenciadora do domínio de morte  
**SH:** domínio de homologia Src  
**STAT:** família de transdutores de sinal e activadores de transcrição  
**TIR:** domínio citoplasmático *Toll*/receptor da interleucina-1  
**TLRs:** *Toll-like receptors*  
**TMB:** 3,3,5,5-tetrametilbenzidina  
**TNF:** *Tumor necrosis factor*  
**TNFR:** receptor do factor de necrose tumoral  
**WSXWS:** sequência de aminoácidos triptofano-serina-X-triptofano-serina

# Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Abreviaturas.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xiv
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
Introdução.....	1
1.1. Processo inflamatório.....	2
1.1.1. Processo inflamatório crónico.....	4
1.1.2. Mediadores inflamatórios.....	6
1.1.2.1. As citocinas.....	7
1.1.2.1.1. Famílias de citocinas mais relevantes, seus receptores e vias de sinalização intracelular.....	9
1.1.2.1.1.1. Superfamília de citocinas do tipo I.....	10
1.1.2.1.1.2. Superfamília de citocinas do tipo II.....	14
1.1.2.1.1.3. Superfamília de factores de necrose tumoral.....	16
1.1.2.1.1.4. Superfamília de quimiocinas.....	19
1.1.2.1.1.5. Superfamília da interleucina-1.....	21
1.2. Terapêutica anti-inflamatória.....	24
1.2.1. Fármacos sintéticos.....	24
1.2.1.1. Anti-inflamatórios não esteróides.....	24
1.2.1.2. Glucocorticóides.....	26
1.2.2. Fármacos de origem natural.....	29
1.2.2.1. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	29
1.2.2.1.1. Composição do óleo essencial.....	31
1.2.2.1.2. Composição em compostos não-voláteis.....	32
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>35</b>
Objectivos.....	35
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>37</b>
Materiais e métodos.....	37

Materiais e métodos.....	37
3.1. Material.....	38
3.1.1. Material botânico.....	38
3.1.2. Animais de laboratório.....	38
3.1.3. Fármacos/Reagentes químicos.....	38
3.1.4. Material físico e <i>software</i> .....	39
3.2. Métodos.....	40
3.2.1. Preparação do extracto botânico de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf....	40
3.2.2. Doses botânicas administradas aos animais.....	40
3.2.3. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelo <i>in vivo</i> de inflamação crónica.....	41
3.2.3.1. Desenho experimental.....	41
3.2.3.2. Indução do processo inflamatório crónico nos animais.....	42
3.2.3.3. Análise da actividade anti-inflamatória em modelos <i>in vivo</i> .....	43
3.2.3.3.1. Determinação do nível de citocinas.....	43
3.2.4. Monitorização da temperatura basal.....	44
3.2.5. Análise histológica.....	45
3.2.6. Análise estatística.....	45
<b>Capítulo 4</b> .....	46
Resultados.....	46
4.1. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelos <i>in vivo</i> de inflamação crónica.....	47
4.1.1. Quantificação do nível de citocinas.....	47
4.2. Monitorização da temperatura basal.....	62
4.3. Análise histológica.....	62
<b>Capítulo 5</b> .....	64
Discussão.....	64
<b>Capítulo 6</b> .....	73
Conclusões.....	73
<b>Capítulo 7</b> .....	75
Referências bibliográficas.....	75

## Índice de Figuras

**Figura 1** - Representação do domínio extracelular conservado que dá origem à classificação das diferentes famílias de citocinas. Adaptado de Wilson *et al.*, 2009.

**Figura 2** - Representação esquemática da via de transdução de sinal da família de citocinas IL-1. Adaptado de Dinarello, 2002.

**Figura 3** - Classificação científica de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

**Figura 4** - *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Fotografia gentilmente cedida pela ERVITAL, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda., sediada em Mezio, Castro Daire, Portugal.

**Figura 5** - Principais elementos químicos que compõem o óleo essencial. Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

**Figura 6** - Principais componentes não-voláteis do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Crozier *et al.*, 2009; Ferreira, 2011; Shah *et al.*, 2011; Agostini-Costa *et al.*, 2012.

**Figura 7** - Representação da placa fornecida pelo *kit*. A placa de ELISA de 96 poços está indicada para a detecção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES (colunas 1a 12). As linhas A a H fornecem a possibilidade da detecção de cada citocina em seis amostras e em dois controlos intrínsecos. Adaptado do protocolo fornecido pelo *kit Multi-Analyte ELISArray*, da QIAGEN.

**Figura 8** - Esquema representativo dos passos cruciais ao protocolo da técnica de ELISA empregue.

**Figura 9** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo.

**Figura 10** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\beta$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 11** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-2, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\*

diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 12** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-4, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 13** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-6, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 14** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-10, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 15** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-12, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 16** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-13, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo.

\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e  
\*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 17** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do IFN- $\gamma$ , quando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 18** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do TNF- $\alpha$ , quando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 19** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do GM-FEC, quando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 20** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do RANTES, quando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 21** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1mg/Kg e Dexametacina, 2,5 mg/Kg) na presença localizada do leque de citocinas analisadas neste estudo, quando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). Cada coluna representa a absorvância obtida para cada citocina de cada grupo analisado, normalizada com os controlos intrínsecos ao *kit* utilizado. A normalização foi determinada em percentagem, de acordo com a fórmula:  $((\text{média de absorvância do grupo teste} - \text{absorvância do controlo negativo intrínseco ao kit}) / (\text{absorvância do controlo positivo do kit} - \text{absorvância do controlo negativo do kit})) \times 100$ . Os dados representam a média  $\pm$  EPM

de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinado por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

**Figura 22** - Imagens histológicas de corte de fígado com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.

**Figura 23** - Imagens histológicas de corte de rim com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.

## Índice de Tabelas

**Tabela I** - Imensidão funcional das citocinas, onde se pode verificar a redundância das suas funções. Adaptada de Wilson *et al.*, 2009.

**Tabela II** - Relação entre a dose humana utilizada na medicina tradicional e a dose de rato equivalente (Carlini *et al.*, 1986; EUFDA, 2005; Wojcikowshi *et al.*, 2013).

**Tabela III** - Relação percentual do nível de citocinas de cada grupo analisado. A relação foi calculada pela normalização com os correspondentes controlos intrínsecos ao *kit Multianalyte ELISArray*, da QIAGEN Sciences. A normalização foi determinada em percentagem de acordo com a seguinte fórmula, ((média das absorvâncias do grupo teste – absorvância do controlo negativo intrínseco ao *kit*)/(absorvância do controlo positivo do *kit* – absorvância do controlo negativo do *kit* ) x 100. Os dados são expressos como média ± EPM de 5-7 ensaios similares.

**Tabela IV** - Monitorização da temperatura basal dos animais antes e cinco dias após o processo de indução. Os dados são expressos como média ± EPM de 5-7 ensaios similares e estatisticamente analisados por ANOVA, segundo o teste de Bonferroni.



# **Capítulo 1**

## **Introdução**

## 1.1. Processo inflamatório

Os invertebrados, por não possuírem sistema vascular, reagem a um agente agressor digerindo-o através de hemócitos ou, caso não seja possível a sua digestão, a porção tecidual agredida é rejeitada e substituída através de processos de regeneração. O mesmo não acontece em formas de vida mais evoluídas, como é o caso da espécie humana. Nestas, a reacção fisiológica a um dano é realizada através de mecanismos complexos, dada a existência do sistema circulatório, sendo o processo inflamatório ou inflamação uma das primeiras linhas de defesa destes organismos (Spector, 1989).

O processo inflamatório é um mecanismo de protecção e de defesa do organismo, baseando-se numa resposta biológica e fisiológica dos tecidos vivos a qualquer tipo de agressão por forma a restabelecer a homeostasia. Este processo é desencadeado por agressões causadas por infecções (bacterianas, fúngicas e/ou virais), por traumatismos corporais (danos químicos, térmicos e/ou incisões), por corpos estranhos ou por distúrbios imunológicos (Kumar *et al.*, 2005; Suralkar, 2008; Pinto, 2009). Embora qualquer tecido possa sofrer danos, a inflamação caracteriza-se essencialmente por ser uma reacção que envolve a microcirculação (arteríolas, vénulas, capilares e vasos linfáticos) e os seus componentes (leucócitos, eritrócitos, plaquetas e plasma) (Spector, 1989).

O processo inflamatório, tendo em consideração o tempo e a resposta à agressão, é caracterizado por duas fases distintas: uma fase aguda e uma fase crónica. Inicialmente, sugeria-se até que os dois processos tivessem origem em causas distintas devido à actividade das diferentes células e mediadores envolvidos, o que resultava em diferentes quadros patológicos. Contudo, actualmente reconhece-se que ambos os processos estão interligados (Roy *et al.*, 2013).

A resposta aguda é uma resposta rápida e de curta duração (Spector, 1989), encarregue de conduzir mediadores até ao local da lesão e aí neutralizar o agressor. Devido a este propósito, ela é representada por três eventos principais: alteração do calibre dos vasos sanguíneos e alterações estruturais na microcirculação – fase vascular da inflamação – e migração dos leucócitos até ao foco inflamatório, com a finalidade de neutralizar o agente nocivo – fase celular da inflamação (Kumar *et al.*, 2005; Corwin, 2008). Deste modo, a resposta inflamatória aguda evolui a partir da fase vascular que tem início logo após a agressão. De facto, imediatamente após a agressão ocorre uma vasodilatação local e um recrutamento de capilares adicionais, o que provoca um

aumento da permeabilidade vascular. Estas etapas são mediadas por aminas vasoativas, tais como a histamina e a serotonina, libertadas por mastócitos e monócitos, pouco tempo após a agressão.

As alterações vasculares verificadas proporcionam um aumento do fluxo sanguíneo local, processo que justifica o rubor e o calor da inflamação, e ainda um aumento da permeabilidade vascular. Em consequência, saem para o espaço extravascular proteínas, água, elementos dos sistemas de complemento, da coagulação e das cininas, bem como leucócitos, por um processo denominado exsudação. Este processo consubstancia-se num aumento da movimentação de um filtrado plasmático para o espaço intersticial, razão da formação do edema (Corwin, 2008).

Uma das características capitais da inflamação aguda é o extravasamento de leucócitos. Este processo, juntamente com um gradiente de substâncias quimiotáticas, permite a sua chegada e activação celular no tecido alvo. Uma vez no local da lesão, os leucócitos, em particular os neutrófilos (leucócitos polinucleares), tentam neutralizar o agente patogénico, geralmente através de mecanismos fagocíticos e enzimáticos, reparando a lesão (Pinto, 2009; Kumar *et al.*, 2010a).

O processo inflamatório agudo pode ter, contudo, três resultados finais: (1) uma resolução completa, ocorrendo quando a lesão é limitada e a destruição dos tecidos foi pouco significativa e, assim, as células são regeneradas, sucedendo-se fenómenos de retorno à homeostase; (2) uma cicatrização com tecido conjuntivo (fibrose), quando o processo provoca uma destruição considerável dos tecidos, ou a lesão instigada envolve tecidos incapazes de regenerar, ou quando existe um grande exsudato de fibrina, terminando com uma reabsorção do tecido assolado sendo substituído por fibrose; (3) progressão para um processo inflamatório crónico, sendo esta transição caracterizada pela permanência do agente lesivo ou pela interferência no processo normal de cicatrização.

Assim, um processo inflamatório crónico é representado por um longo intervalo temporal, histologicamente pela presença de células mononucleares (linfócitos e macrófagos), proliferação de vasos sanguíneos, desenvolvimento de respostas imunitárias específicas (humorais e celulares), fibrose e necrose tecidular (Cotran *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2005; Gabay, 2006; Pinto, 2009). Este processo constitui, assim, um pilar de vários estados patológicos crónicos comuns, como artrite reumatóide, aterosclerose (Roy *et al.*, 2013), fibrose pulmonar (Cotran *et al.*, 1999; Kumar *et al.*,

2005; Pinto, 2009), asma, psoríase (Roy *et al.*, 2013), tuberculose e esclerose múltipla, entre muitos outros (Kumar *et al.*, 2010a).

Embora um processo inflamatório crónico partilhe várias características, envolva, por vezes, os mesmos tipos celulares de uma inflamação aguda e inclua mesmo fases agudas no seu decorrer (Spector, 1989), a constituição de uma resposta inflamatória crónica compreende uma resposta diferente da inflamação aguda a determinada causa (Kumar *et al.*, 2010a). Desta forma, não sendo o propósito deste trabalho a inflamação aguda, iremos focar-nos apenas no terceiro ponto dos resultados obtidos da resposta inflamatória: o processo inflamatório crónico (Cotran *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2010b).

### 1.1.1. Processo inflamatório crónico

Um processo inflamatório crónico tem como factores etiológicos a não neutralização de um agente agressor que causou inicialmente uma inflamação aguda, a interferência no processo normal de recuperação desta, antigénios endógenos que desencadeiam respostas auto-imunes (Lee *et al.*, 2009), a exposição prolongada a substâncias tóxicas ou não degradáveis (Underwood *et al.*, 2009) ou, de uma forma subtil, pela persistência de agentes crónicos de baixa intensidade que não invocam um processo inflamatório agudo significativo. É possível, então, definir um processo inflamatório crónico como sendo uma resposta inflamatória de longa duração e ininterrupta, que ocorre simultaneamente com uma destruição tecidual (Kumar *et al.*, 2010b) e com sucessivas tentativas de reparação tecidual (Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

O processo inflamatório crónico possui características morfológicas diferentes de um processo inflamatório agudo. Na inflamação aguda ocorrem alterações vasculares, edema e infiltração de neutrófilos, ao passo que na inflamação crónica predomina um infiltrado de células mononucleares (macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células plasmáticas) e uma destruição tecidual (induzida pelo próprio agressor e pelas células inflamatórias), acompanhada de tentativas de cicatrização do tecido devastado (substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo acompanhada de angiogénese e fibrose) (Kumar *et al.*, 2010b).

O processo de reparação, conseguido pelo crescimento de tecido de granulação, está intimamente associado à inflamação crónica, visto que uma das características deste processo é a destruição da arquitectura tecidual. O tecido de granulação consubstancia-

se em tecido conjuntivo fibroso composto, principalmente, por macrófagos, fibroblastos e novos vasos sanguíneos (Kumar *et al.*, 2010a).

Uma outra característica da inflamação crónica que a distingue do processo inflamatório agudo é a presença de uma exsudação não muito pronunciada, o que leva a um maior envolvimento celular, resultado da elevada mobilização e proliferação local (Nowak *et al.*, 2004).

Num qualquer processo inflamatório crónico o tipo celular predominante é o macrófago, sendo a sua acumulação uma importante característica do processo. Desse modo, dependendo da organização espacial dos macrófagos e da participação de outros tipos celulares, pode classificar-se a inflamação crónica em não-granulomatosa (não específica ou difusa) ou em granulomatosa (específica) (Nowak *et al.*, 2004). O conceito granuloma tem origem no termo “tumores de aparência granular” e é definido como sendo um agregado celular denso e localizado de macrófagos activos em conjunto com os seus derivados, numa tentativa de reter o agente ofensivo (Spector, 1989; Kumar *et al.*, 2010a; Kumar *et al.*, 2010b).

Um processo inflamatório crónico não-específico é assim designado devido à sua aparência microscópica difusa. Isto deve-se à presença simultânea de neutrófilos (que continuam a ser recrutados para manterem uma resposta aguda), de macrófagos e de linfócitos. A zona lesada é delimitada por tecido de granulação e, quando presente uma estimulação por citocinas, há síntese de colagénio, cercando a lesão com uma espécie de tecido cicatrizado. Este tipo de inflamação crónica está associado ao que ocorre na sucessão de um processo inflamatório agudo (Spector, 1989), e é o tipo mais comum de inflamação crónica. Como exemplos temos a artrite reumatóide e outras doenças auto-imunes (Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

Opostamente, agentes crónicos inatos incluem corpos estranhos inertes (como microrganismos) e reacções inflamatórias imunológicas descritas como sendo reacções de hipersensibilidade tardia. Este tipo de agentes desencadeia uma inflamação crónica granulomatosa, que se caracteriza pela presença de poucos neutrófilos e pela predominância de macrófagos, levando à formação de uma lesão específica, denominada granuloma (Spector, 1989; Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

Dentro do tipo granulomatoso, os granulomas podem ainda ser classificados em dois tipos, consoante a capacidade do agente agressor ser ou não reconhecido pelo sistema imunitário e a sua diferente patogénese (Kumar *et al.*, 2010b). Caso se tratem de corpos estranhos inertes e passem despercebidos ao sistema imunitário, os granulomas

daí resultantes designam-se de “granulomas de corpo estranho” – apresentam-se pequenos, e os únicos elementos observados são células gigantes multinucleadas formadas por fusão; se o agente agressor desencadear uma resposta imunitária celular, há a formação de “granulomas imunes” – caracterizam-se por uma estrutura composta por macrófagos modificados (grande área citoplasmática e finas delimitações celulares) conhecidos por células epitelióides e por células gigantes multinucleadas, cercadas por leucócitos mononucleares (linfócitos T e células plasmáticas) (Kumar *et al.*, 2010a; Kumar *et al.*, 2010b). Pode ainda suceder que, em alguns casos de inflamação granulomatosa, o centro do granuloma se encontre necrosado (Nowak *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010a).

Apesar da distinção que é feita entre inflamação crónica difusa e granulomatosa, existem patologias que se desenvolvem partilhando características de ambos os tipos inflamatórios (Kumar *et al.*, 2010a).

### 1.1.2. Mediadores inflamatórios

O processo inflamatório, tal como descrito anteriormente, é uma resposta complexa dos tecidos vivos ao dano, caracterizando-se por uma fase aguda e uma fase crónica. A organização de todos os eventos de um processo inflamatório, que envolva o recrutamento ou activação celular é responsabilidade dos chamados mediadores inflamatórios (Kumar *et al.*, 2010a).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados dentro de quatro categorias (Feghali *et al.*, 1997):

- Os mediadores lipídicos, como o factor de activação plaquetário e derivados do ácido araquidónico, como as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas, sintetizados a partir de fosfolípidos membranares;
- Peptídeos pró-inflamatórios provenientes de quatro cascatas biológicas – cascata da coagulação, sistema do complemento, sistema das cininas e sistema fibronolítico;
- Óxido nítrico, um vasodilatador endógeno;
- Grupo de polipeptídeos sintetizados de novo com origem celular, conhecidos por citocinas, que constituem o maior leque de moléculas com influência na resposta inflamatória devido ao seu papel crucial na migração e activação celular.

No processo inflamatório crónico, as citocinas têm um papel fundamental em vários procedimentos, entre eles, o recrutamento, activação e replicação local de macrófagos e células T, sobrevivência das células inflamatórias pela inibição do processo apoptótico, na concepção de uma resposta imunitária e na síntese de tecido de granulação e fibrose (Kumar *et al.*, 2010a).

### 1.1.2.1. As citocinas

As citocinas podem ser definidas como proteínas de baixo peso molecular (7-80 kDa) principalmente produzidas por leucócitos, mas também o podem ser por células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (Lamoureux *et al.*, 2007). As citocinas exercem a sua função local ou sistemicamente sobretudo de duas formas: de uma forma autócrina, quando se ligam a receptores da superfície da célula onde são sintetizadas: de uma forma parácrina, quando actuam em células adjacentes às que as produziram (Feghali *et al.*, 1997; Lamoureux *et al.*, 2007). Contudo, quando são sintetizadas em elevada quantidade, elas também podem actuar endocrinamente, ao entrarem na circulação e efectuarem funções em lugares distantes do seu local de origem (Kumar *et al.*, 2010a). Todas as formas de produção subjacentes ao seu método de actuação são altamente reguladas (Wilson *et al.*, 2009).

A família de citocinas inclui moléculas proferidas por uma grande diversidade de denominações, como interleucinas, interferões, quimiocinas, factores estimuladores de colónias, factores de crescimento e todas as proteínas cujo nome englobe a palavra factor (Kumar *et al.*, 2010a).

O modo de acção das citocinas está, na maioria das vezes, dependente da ligação a receptores específicos da superfície celular, da qual resulta um sinal que, dando início a uma cascata de sinalização, leva essencialmente a alterações na transcrição genética. Fenotipicamente, estas alterações podem traduzir-se na regulação da comunicação entre células envolvidas tanto em processos fisiológicos como patológicos. Os processos invadidos por estas são a imunidade, inflamação, hematopoiese, embriogénese, quimiotaxia, apoptose e crescimento, função e diferenciação de várias células durante a inflamação e respostas imunitárias tardias, como demonstra a Tabela I (Lamoureux *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2009).

**Tabela I:** Imensidão funcional das citocinas, onde se pode verificar a redundância das suas funções. Adaptada de Wilson *et al.*, 2009.

Função	Citocinas envolvidas
<b>Pró-inflamatória</b>	IL-12, IL-17, IL-18, IL-23, IL-27
<b>Anti-inflamatória</b>	IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, IL-25, FTC- $\beta$
<b>Antiviral</b>	IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$
<b>Factores de crescimento das células T</b>	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21
<b>Factores de crescimento das células B</b>	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL-14, IL-21
<b>Factores hematopoiéticos</b>	IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, GM-FEC, M-FEC, factor das células estaminais
<b>Factores quimiotáticos</b>	CXCL1, CXCL8 (IL-8), CCL2, CCL5, CCL11
<b>Embriogénese</b>	FCVE, FCF, FTC- $\beta$
<b>Reparação tecidual/cicatrização</b>	FTC- $\alpha$ , FTC- $\beta$ , FCE, PDGF, FCFb
<b>Imunidade inata</b>	TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, IL-15, IL-18, IL-23, IL-27
<b>Imunidade adquirida</b>	IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , FTC- $\beta$ , IL-10, IL-12, IL-13, IL-17

Em condições fisiológicas, o controlo *in vivo* da rede de citocinas envolve diversos processos. Muitas vezes esse controlo é tão complexo que acaba por desencadear produção ou activação excessiva de citocinas, originando processos patológicos. De facto, as citocinas, para além de apresentarem tempos de semi-vida curtos, são estritamente reguladas espacialmente. Algumas citocinas necessitam de sofrer uma clivagem para se tornarem activas. Ademais, as citocinas podem induzir ou inibir a produção de outras e dos seus receptores e podem actuar sinérgica ou antagonisticamente. As citocinas podem ainda antagonizar receptores específicos, não transmitindo sinal. Um outro tipo de regulação envolve a presença de inibidores das vias de sinalização inerentes às citocinas (Wilson *et al.*, 2009).

Por todos estes motivos, o estudo destas moléculas de baixo peso molecular prende-se com várias dificuldades. Além do pleiotropismo por elas verificado por executarem múltiplas funções dependendo do tipo celular com que interagem, raramente são produzidas ou agem individualmente. Este facto conduz, muitas vezes, a eventos de sinergismo ou antagonismo. Há ainda a acrescentar o facto da redundância funcional verificada pela partilha de várias funções (Tabela I) (Wilson *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010a).

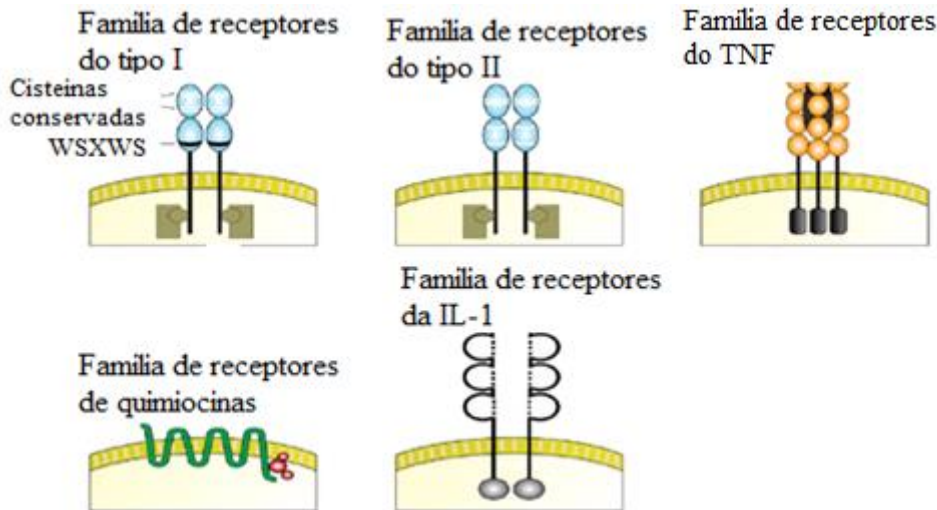


Apesar da redundância e pleiotropismo das citocinas, estas podem ser divididas, em termos latos, em dois grandes grupos: as envolvidas na inflamação aguda e as responsáveis por mediar a inflamação crónica (Feghali *et al.*, 1997), em que cada grupo pode ainda ser subdividido consoante o seu envolvimento na patogénese – pró-inflamatórias, ou protecção contra/término da resposta inflamatória – anti-inflamatórias. No entanto, é necessário ter em conta que algumas citocinas contribuem significativamente para ambos os processos. Daqui pode concluir-se que as citocinas desenvolvem uma rede de acções extensa, onde fenómenos de sinergismo, antagonismo, regulação positiva e negativa têm lugar, o que torna o estudo de determinado processo inflamatório um verdadeiro desafio (Wilson *et al.*, 2009).

### **1.1.2.1.1. Famílias de citocinas mais relevantes, seus receptores e vias de sinalização intracelular**

Com a expansiva descoberta das citocinas, tornou-se evidente a possibilidade de as classificar em subgrupos, ou em famílias, tendo por base a partilha de características estruturais, localizações cromossomais ou mesmo de subunidades dos respectivos receptores (Meager *et al.*, 2007). Como a redundância funcional e o pleiomorfismo das citocinas são, na maioria das vezes, uma consequência da homologia dos seus receptores é, frequentemente, feita a classificação destas proteínas com suporte no receptor a que se ligam e, consequentemente, no mecanismo de sinalização intracelular por elas induzido.

Todas as famílias de receptores de citocinas partilham uma estrutura proteica tridimensional. O padrão comum dos receptores de citocinas é constituído por uma subunidade específica e única para a ligação de determinada citocina e outras subunidades comuns a todos. Esta igualdade de subunidades pode explicar, ainda que parcialmente, a redundância funcional das citocinas. Por exemplo, a IL-6, a IL-11 e a oncostatina M, por possuírem uma subunidade gp130, actuam de forma similar nas células hepáticas; contudo, em certas células, cada uma tem uma função única. Esta diferença provavelmente será consequência da expressão diferencial de receptores específicos ao ligando. É possível, então, classificar as citocinas em cinco grupos com base na homologia estrutural do domínio de ligação extracelular do receptor e o seu respectivo mecanismo de sinalização (Figura 1).



**Figura 1** - Representação do domínio extracelular conservado que dá origem à classificação das diferentes famílias de citocinas. Adaptado de Wilson *et al.*, 2009.

#### 1.1.2.1.1.1. Superfamília de citocinas do tipo I

A maior família de citocinas, classificada com base nas características comuns dos seus receptores, é designada por família de citocinas do tipo I. Esta família engloba cerca de 27 membros, incluindo as citocinas helicais IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 e o GM-FEC (Foster *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2009). A origem da sua designação advém da classe de receptores a que se ligam – a família de receptores do tipo I.

Os receptores do tipo I são proteínas membranares do tipo I, cuja estrutura pode ser essencialmente considerada na forma modular (Bravo *et al.*, 2000). No segmento extracelular, o módulo crucial envolve uma região de homologia responsável pela ligação às citocinas (RHC) constituída por, pelo menos, dois domínios de fibronectina do tipo III. O domínio RHC básico, um domínio com uma sequência conservada WSXWS, o domínio transmembranar e um domínio intracelular conservado (Liongue *et al.*, 2007) estão presentes em todos os receptores do tipo aqui abordado, os quais, para alguns membros, são o suficiente para que ocorra a sinalização intracelular pretendida. Contudo, a maioria dos receptores do tipo I requer domínios auxiliares, como domínios do tipo imunoglobulina ou moléculas de fibronectina adicionais, para que a respectiva sinalização ocorra (Wang *et al.*, 2009).

De um modo geral, os receptores da superfície celular interagem com os seus ligandos através de interações altamente específicas; contudo, isso não acontece com

os receptores de citocinas, uma vez que, são receptores poli-específicos capazes de interagirem com um espectro considerável de ligandos. Na família de receptores de citocinas do tipo I existem três receptores principais partilhados pelas citocinas da família: a cadeia comum gamma ( $\gamma_c$ ), o gp130 e a cadeia comum beta ( $\beta_c$ ). É, no entanto, necessário salientar a baixa, ou nenhuma, afinidade que cada um destes, sozinho, possui com as citocinas, formando apenas complexos de alta afinidade na presença de receptores não sinalizadores específicos para elas (Wang *et al.*, 2009).

A formação do complexo de alta afinidade entre o ligando e o receptor alvo é o evento inicial na activação da cascata de transdução de sinal intracelular. De facto, isto leva à formação de um complexo proteico de sinalização, que pode incluir a família de tirosinas cinases citoplasmáticas JAK e a família de factores de transcrição STAT (transdutores de sinal e activadores de transcrição). Os membros destas famílias (quatro membros JAK e sete membros STAT (Schindler *et al.*, 2007)) são caracterizados pela exibição de diferentes afinidades para com distintos receptores. Este facto oferece diferentes combinações para darem resposta, ao mesmo tempo, às funções sobrepostas e únicas das citocinas (Wilson *et al.*, 2009). Isto significa que a composição do complexo sinalizador, e o conseqüente sinal, estão dependentes da identidade e composição dos receptores complexados pelo ligando (Bravo *et al.*, 2000).

Assim, a ligação da citocina ao receptor induz uma oligomerização responsável pela justaposição dos domínios intracelulares das subunidades de sinalização. Não tendo actividade enzimática intrínseca, os receptores de citocinas do tipo I estão constitutivamente associados a tirosinas cinases da família *Janus*. Esta associação faz com que as JAK sejam activadas pela oligomerização sofrida pelo complexo receptor. A activação enzimática das JAK faz com que se auto-fosforilem e aos domínios do receptor a elas coligados. Nesta medida, os resíduos de tirosina fosforilados funcionam como locais de acoplamento para a segunda família de proteínas envolvida: os STATs. A ligação dos STATs ao complexo leva-os à sua fosforilação e conseqüente dissociação dos receptores. Os STATs dissociados formam dímeros que, após translocação nuclear, ligam a sequências de ADN e actuam como factores de transcrição (Bravo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2009).

Apesar de principal, a via JAK/STAT não é a única pela qual as citocinas do tipo I sinalizam, utilizando por vezes vias como a via PI3C e a via RAS-PCAM (Wang *et al.*, 2009). Resumidamente, a via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3C) leva à fosforilação e activação da proteína cinase B. Esta, por sua vez, activa a fosforilação do

complexo IKK, resultando na degradação do I $\kappa$ B e consequente libertação do factor nuclear (NF- $\kappa$ B) (mecanismo descrito mais à frente). A via RAS-PCAM leva à translocação nuclear da proteína cinase activa por mitogénio (PCAM), juntamente com outros factores e co-activadores de transcrição, que dão início à transcrição de uma variedade de genes (Huang *et al.*, 2008).

Os receptores partilhados permitem subagrupar os complexos de receptores de citocinas do tipo I em três subclasses: os complexos que usam o receptor partilhado gp130, os que usam o receptor  $\gamma$ c e, por fim, os que usam a cadeia  $\beta$ c.

O gp130 é o componente comum aos complexos receptores associados à designada “superfamília de citocinas gp130” ou IL-6/IL-12, composta por 10 membros, dos quais se salientam a IL-6 e a IL-12 (Wang *et al.*, 2009). A IL-6 é sintetizada no foco inflamatório por fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos, incitada por diversas citocinas mas inibida por glucocorticosteróides (Meager *et al.*, 2007). Na resposta inflamatória aguda, a IL-6 altera a concentração de muitas proteínas de fase aguda, de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Já quanto à sua presença num processo inflamatório crónico, a IL-6 não só incita as reacções de fase aguda como também conduz ao desenvolvimento de respostas imunitárias celulares e humorais específicas (Gabay, 2006), ao actuar como factor de crescimento e diferenciação de células B e activador e diferenciador de células T (Feghali *et al.*, 1997). A IL-6 tem um efeito ambíguo: quando presente em determinados níveis (inflamação aguda), tem uma acção protectora; em episódios de cronicidade, tem uma acção pró-inflamatória ao favorecer a acumulação de células mononucleares no foco inflamatório (Gabay, 2006). Já a IL-12, citocina envolvida na resposta inflamatória crónica mediada por células, é sintetizada essencialmente por células B activas e macrófagos. Biologicamente, ela é responsável pela promoção da síntese e activação de células T citotóxicas, pelo aumento da actividade citolítica, pela proliferação de células *natural killer* (NK) e células *killer* activadas por linfocinas (KAL) e pela maturação de células dendríticas e linfócitos Th1 (Feghali *et al.*, 1997; Meager *et al.*, 2007; Shaikh, 2011). Tanto a IL-6, como a IL-12, exercem as suas funções biológicas através da ligação a receptores heterodiméricos de alta afinidade. Estes são, estruturalmente, definidos pela cadeia receptora específica para a citocina IL-6R $\alpha$  e IL-12R $\beta$ 1, e pela cadeia sinalizadora partilhada gp130 e IL-12R $\beta$ 2, respectivamente. Ambas as cadeias sinalizadoras estão associadas à proteína Tyk2 (Schindler *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009). Já os membros da família STAT, responsáveis pela sinalização feita por estas citocinas, são distintos: o STAT3, factor

associado à indução de expressão de genes anti-inflamatórios e pró-proliferativos, anti-apoptóticos e codificantes de proteínas de fase aguda, é induzido pela IL-6; já a IL-12 leva à activação do STAT4, proteína que alveja genes pró-inflamatórios e antagonistas da proliferação (Schindler *et al.*, 2007).

A cadeia  $\beta_c$ , uma proteína transmembranar do tipo I, é composta por quatro domínios de fibronectina que formam dois pares de módulos RHC contíguos (Wang *et al.*, 2009). Esta cadeia receptora partilhada é funcional apenas com a presença das cadeias  $\alpha$  específicas da citocina, como ocorre com o GM-FEC. Esta citocina pertence à classe dos factores estimuladores de colónias (FEC), assim designado pela sua capacidade de indução de formação de colónias de macrófagos e granulócitos em culturas de medula óssea. O GM-FEC é sintetizado por monócitos, células T, fibroblastos e células endoteliais quando activas por produtos de macrófagos (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e a sua acção principal prende-se com a inflamação aguda. Nesta, o GM-FEC estimula as funções efectoras dos neutrófilos, eosinófilos e fagócitos mononucleares (Feghali *et al.*, 1997). Estas funções são dependentes da ligação do GM-FEC ao seu complexo receptor, ao qual está associado a molécula JAK2 e a proteína STAT5 (Schindler *et al.*, 2007).

Finalmente, a cadeia  $\gamma_c$  está presente na sinalização feita por citocinas como a IL-2, IL-4 e IL-13 (Wang *et al.*, 2009). Ao ser sintetizada, mormente por linfócitos T, a IL-2 actua como factor de crescimento/activador de células T, NK e B e como promotora do desenvolvimento de células KAL. A IL-2 possui ainda um papel crítico tanto na regulação da resposta inflamatória crónica humoral como na celular. Isto porque a ligação da IL-2 ao receptor da IL-2 (IL-2R) nos linfócitos T leva à proliferação celular, bem como ao aumento da secreção de linfocinas e expressão de moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (CMH II) (Feghali *et al.*, 1997, Shaikh, 2011). Os receptores de alta afinidade para a IL-2, encontrados principalmente nos linfócitos T, consistem em três cadeias polipeptídicas – IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ , ambas expressas em células T não activas, e IL-2R $\alpha$ , expressa aquando da sua activação (Meager *et al.*, 2007). A ligação da IL-2 ao seu receptor activa a JAK-3 e a STAT-5, factor este associado à eritropoiese e linfopoiese (Schindler *et al.*, 2007). A IL-4, por sua vez, tem origem a partir de células CD4+, mastócitos e basófilos e está envolvida na resposta inflamatória humoral. Este papel é traduzido pelas funções por ela desempenhadas, entre elas a indução da diferenciação de células T (Th0) a células Th2 (responsáveis pela secreção de citocinas de diferenciação), a inibição do

desenvolvimento de células Th1 (células que segregam citocinas ativadoras dos macrófagos) e a indução da diferenciação de monócitos a macrófagos, ao mesmo tempo que inibe o crescimento dos últimos. Além disso, a IL-4 é um antagonista das funções desempenhadas pelo IFN- $\gamma$  e vice-versa (Feghali *et al.*, 1997). A IL-13, com origem principalmente nas células T, é uma citocina anti-inflamatória por inibir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e a activação do NF- $\kappa$ B nos macrófagos. Além disso, controla positivamente a diferenciação e proliferação dos linfócitos B. Os IL-4R, expressos em escasso número, são partilhados pela IL-4 e pela IL-13. Este complexo receptor é constituído por uma cadeia receptora específica para a IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) e pela  $\gamma_c$ , a subunidade comum de alta afinidade (Meager *et al.*, 2007). A ligação da IL-4, ou da IL-13, ao IL-4R activa a via JAK/STAT através da JAK3, e subsequentemente do STAT6, homodímero implicado na activação genética proliferativa e diferenciativa, como a de células B e mastócitos (Schindler *et al.*, 2007).

#### **1.1.2.1.1.2. Superfamília de citocinas do tipo II**

A família de citocinas do tipo II é assim chamada devido à sua semelhança com a família anteriormente descrita, ou seja, tendo por base o padrão de aminoácidos conservados do domínio extracelular da família de receptores a ela associados (Kotenko *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2009). Esta família engloba os interferões do tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$ ), os do tipo II (IFN- $\gamma$ ) e os membros da família IL-10 (como a IL-10, IL-19 e IL-20) (Feghali *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2009). Os ligandos, que utilizam os receptores de citocinas da classe II para sinalizar, em particular, os IFNs e a IL-10, são importantes imunomoduladores capazes de induzir um largo espectro de respostas biológicas dependendo do tipo celular, das condições e/ou co-estimuladores presentes (Kotenko *et al.*, 2000). Os interferões do tipo I são vitais ao desenvolvimento de respostas antivirais e anti proliferativas. Já o IFN- $\gamma$ , membro dos interferões do tipo II, é um homodímero sintetizado nas células T activas e por células NK. Este último tipo é crucial à promoção de respostas imunitárias celulares ao elevar os níveis de expressão de moléculas do CMH I e II em células nucleadas e é, ainda, um estimulador de funções efectoras dos fagócitos mononucleares. A IL-10, sintetizada por células T e B activas, é, por outro lado, uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora e, por essa razão, é vulgarmente conhecida por “anti-citocina” (Shaikh, 2011). Esta propriedade está patente nas acções que tem sobre os monócitos activos. A IL-10 inibe a síntese de várias citocinas, como IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e a expressão de várias moléculas do

CMH II, bem como impede fortemente a apresentação de antígenos pelas mesmas células, que conduz à inibição das respostas celulares (Meager *et al.*, 2007). A “anti-citocina” é ainda capaz de interditar a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e de promover a degradação do ARNm codificante de citocinas pró-inflamatórias (Shaikh, 2011). A IL-10 é ainda capaz, sinergisticamente, de promover a proliferação e a diferenciação de células B, bem como a hematopoiese (Feghali *et al.*, 1997; Meager *et al.*, 2007).

A família de receptores de citocinas do tipo II é composta por sete membros funcionais: o factor tecidual e três pares de subunidades receptoras, que compõem os complexos individuais dos receptores em virtude dos IFN do tipo I (subunidades IFN- $\alpha$ R1 e IFN- $\alpha$ R2), dos IFN do tipo II (IFN- $\gamma$ R1 e IFN- $\gamma$ R2) e da IL-10 (IL-10R1 e IL-10R2). Estruturalmente, os receptores de citocinas do tipo II são semelhantes aos receptores do tipo I, caracterizando-se por um domínio extracelular com moléculas de fibronectina do tipo III mas pela ausência da sequência WSXWS (Kotenko *et al.*, 2000). Já o domínio intracelular está associado a uma molécula tirosina cinase pertencente à família das *Janus* cinase, através da qual é transmitido o sinal pela via de sinalização JAK/STAT (Wilson *et al.*, 2009).

A estrutura similar exibida pelos complexos dos receptores IL-10 e IFN- $\gamma$  sugere que a sinalização feita pelos ligandos respectivos envolve, em geral, os mesmos eventos. Tanto o homodímero IFN- $\gamma$  como o homodímero IL-10 estabelecem ligação a duas moléculas das cadeias dos respectivos receptores (duas cadeias IFN- $\gamma$ R1 e duas IL-10R1). Este evento inicial é, contudo, insuficiente para que haja sinalização intracelular e, por isso, as segundas cadeias são recrutadas (IFN- $\gamma$ R2 e IL-10R2) (Meager *et al.*, 2007). Tal como já mencionado, ao domínio intracelular dos membros desta família está inerente uma molécula tirosina cinase que, no caso das cadeias IFN- $\gamma$ R1 e IL-10R1, se denomina JAK1, mas que são distintas no caso das segundas cadeias (à IFN- $\gamma$ R2 está associada a JAK2 e à IL-10R2 a TyK2) (Kotenko *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2007).

A ligação do ligando ao seu receptor específico induz uma oligomerização dos componentes do receptor que resulta na activação das JAKs. Devido à activação ocorre fosforilação dos resíduos de tirosina dos domínios intracelulares das cadeias R1 (Kotenko *et al.*, 2000). Os resíduos fosfotirosil do receptor dali resultantes recrutam, directamente, STATs específicos (devido a interacções com SH2), que se tornam substrato para as JAKs. Nas células não estimuladas, as STATs encontram-se no citoplasma como homodímeros inactivos. As moléculas STAT são fosforiladas e, por

isso, tornam-se activas. Estas são libertadas do receptor devido à sua reorientação em dímero antiparalelo, que permite a ligação dos domínios SH2 de uma STAT à fosfotirosina da outra STAT. Os dímeros daqui resultantes translocam-se para o núcleo, onde interagem com elementos promotores de transcrição genética específicos (Schindler *et al.*, 2007).

Os STATs activados pela sinalização feita por IFN- $\gamma$  são distintos dos activos pela IL-10. O IFN- $\gamma$  promove a activação do STAT-1, cujos genes alvo promovem a inflamação e antagonizam a proliferação. Pelo contrário, a sinalização feita pela IL-10 conduz à activação das STAT3, cujos genes por elas direccionados são caracterizados por actividade anti-inflamatória e pró-proliferativa. Interessantemente, pode-se notar uma acção antagonista entre o IFN- $\gamma$  e a IL-10, particularmente na regulação de respostas Th1 e Th2 e ainda, na activação de macrófagos, desempenhada pelo IFN- $\gamma$  que é inibida pela IL-10 (Kotenko *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 2007).

#### **1.1.2.1.1.3. Superfamília de factores de necrose tumoral**

A descoberta de uma molécula com actividade anti-tumoral, há cerca de 30 anos, resultou numa outra superfamília de citocinas – a família dos Factores de necrose tumoral (TNF). Esta grande família compreende membros como o TNF- $\alpha$ , o membro prototípico da família (Wajant *et al.*, 2003), a linfotoxina- $\alpha$ , o ligando Fas (LFas), o ligando CD 40 (LCD40) e o ligando indutor de apoptose relacionado com o TNF (LIART), entre outros (Baud *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008).

Embora numerosos, os membros TNF exercem um estreito leque de bioactividades relativamente ao TNF- $\alpha$ . O LIART e o LFas induzem, maioritariamente, apoptose e não um processo inflamatório (Wajant *et al.*, 2003); já o LCD40 previne a morte celular programada e induz proliferação celular (Baud *et al.*, 2001). Por sua vez, o TNF- $\alpha$  pode ser considerado o principal mediador pró-inflamatório, com capacidade facultativa de induzir apoptose. Em situações fisiopatológicas, o TNF- $\alpha$  demonstra uma dualidade funcional, ao estar fortemente comprometido tanto com processos regenerativos como com a destruição tecidual (Wajant *et al.*, 2003). Particularmente, o TNF- $\alpha$  é responsável pela indução da migração e activação de linfócitos e leucócitos, pela febre (devido ao aumento da concentração de prostaglandinas (PG) no hipotálamo), pela síntese de proteínas de fase aguda, pela proliferação e diferenciação celular, pela expressão genética e, entre outras, pela apoptose (Baud *et al.*, 2001). Sendo que, ao contrário do que acontece com a generalidade das citocinas, o TNF- $\alpha$ , tal como a IL-1,



exerce o seu efeito sistemicamente, quer quando sintetizado em grande quantidade na inflamação aguda, quer na inflamação crónica, produzido em menor nível (Shaikh, 2011). A dualidade funcional pode ser explicada através de importantes parâmetros influenciadores do efeito *net* do TNF, tais como a especificidade tecidual, o contexto celular, os níveis de expressão de receptores e a duração de acção do mediador (Baud *et al.*, 2001; Wajant *et al.*, 2003).

O FNT- $\alpha$  é, principalmente, sintetizado por macrófagos, mas também por células linfóides, mastócitos, fibroblastos e células endoteliais (Feghali *et al.*, 1997), como sendo uma proteína transmembranar do tipo II, estabilizada estruturalmente como homotrímico. No entanto, uma forma solúvel homotrimérica é sintetizada proteoliticamente a partir da forma transmembranar pela enzima conversora de TNF- $\alpha$ . A bioactividade da última está dependente da sua concentração, uma vez que tende a dissociar-se a concentrações abaixo da escala nanomolar, e da sua baixa afinidade aos receptores.

Os membros da família TNF praticam as suas funções biológicas através da interacção com receptores membranares específicos, os receptores da família TNF. Especificamente, o TNF- $\alpha$  sinaliza através de dois receptores distintos: o TNF-R1, constitutivamente expresso na maioria dos tecidos, e o TNF-R2, tipicamente encontrado em células do sistema imunitário, como os macrófagos.

Estruturalmente, ambos os receptores são constituídos, extracelularmente, por quatro domínios ricos em cisteínas que lhes conferem uma estrutura alongada, responsável pela interacção com o ligando (Wajant *et al.*, 2003; Brauschädel *et al.*, 2007). Já o domínio intracelular tem uma particularidade que subdivide a família TNF-R em receptores que contêm um domínio de morte (DM) e receptores que interagem com FATR (factores associados ao receptor TNF). Com a ligação do TNF- $\alpha$  ao TNF-R1, o DM conduz a sinalização a um programa de morte celular, através de proteases pró-apoptóticas, embora este receptor também seja um forte activador de expressão genética através do recrutamento indirecto de membros da família FATR. Já o TNF-R2 recruta directamente o membro FATR-2, com consequente indução genética.

A expressão genética induzida por TNF é desencadeada principalmente por proteínas da família NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um grupo de factores de transcrição, constituídos pela família NF- $\kappa$ B/Rel, envolvidos na activação transcripcional de genes inflamatórios em resposta a citocinas ou outros factores estimulantes (Wajant *et al.*,

2003). A via NF- $\kappa$ B há muito que é considerada a via de sinalização pró-inflamatória prototípica (Lawrence, 2009).

Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B encontra-se inactivo no citoplasma devido à ligação de uma proteína inibitória de 43 kDa – a I $\kappa$ B – que lhe mascara a sequência de localização nuclear (Haddad *et al.*, 2011). Em resposta ao TNF- $\alpha$ , bem como a outros agonistas, as I $\kappa$ B podem sofrer degradação proteolítica, consequência da sua ubiquitinação induzida pela fosforilação pelo complexo inibitório da NF- $\kappa$ B cinase (IKK). O complexo IKK acredita-se ser composto por um heterómero de duas cinases (IKK-1 ou  $\alpha$  e IKK-2 ou  $\beta$ ), uma proteína reguladora IKK $\gamma$  (NEMO) (Lawrence, 2009) e um homodímero de proteína de choque térmico 90.

O primeiro passo na activação do complexo IKK é a reorganização dos membros do TNF-R1, devido às alterações estruturais induzidas pela ligação do ligando. O DM é capaz de se auto-agregar e, assim, sinalizar, independentemente da presença de um ligando. Contudo, esta propriedade intrínseca é silenciada por uma proteína silenciadora do DM (SDM). Após a ligação do ligando, a SDM dissocia-se do complexo TNF-R1 e a proteína de DM associada ao TNF-R1 (DMATR) é conscrita para o DM do TNF-R1. A ligação do DMATR ao TNF-R1 serve assim como plataforma para ligação de outras duas moléculas efectoras: o factor 2 associado ao TNF-R (FATR2), responsável pelo recrutamento do complexo IKK, e a proteína 1 de interacção com o receptor (PIR1), necessária à activação do mesmo.

Contudo, outras vias secundárias parecem ter também lugar: a PIR1 parece activar indirectamente a IKK através da via PCAM e ainda, a molécula FATR6 relacionada com a FATR2 é capaz de interagir com uma proteína cinase C atípica, que também está implicada na activação do NF- $\kappa$ B. De facto, embora o conhecimento das múltiplas funções do TNF- $\alpha$  *in vivo*, bem como as vias que levam da interacção TNF/TNF-R1 à activação do complexo IKK e do NF- $\kappa$ B, estejam bem compreendidos, os mecanismos dos últimos eventos da resposta do NF- $\kappa$ B ainda se encontram por definir (Wajant *et al.*, 2003).

Além do NF- $\kappa$ B, o TNF- $\alpha$  induz igualmente a activação de cinases do grupo das proteínas cinase activadas por *stress*/cinase c-jun (JNK). Após activação, as cinases JNK translocam-se para o núcleo aumentando a actividade transcripcional de factores, como o c-Jun, através da sua fosforilação. O c-Jun pertence a um grupo de proteínas que se dimerizam para formar factores de transcrição, conhecidos como proteína 1

ativadora (PA-1). A PA-1 está comprometida com processos celulares, como proliferação, diferenciação e prevenção de processos apoptóticos.

Ademais à transcrição genética, o TNF é capaz de induzir mecanismos moleculares de morte celular, através do DM citoplasmático do seu receptor. Não obstante, este processo é minoritário em relação à sua função reguladora em processos inflamatórios, até, por vezes, inibindo-se mutuamente. Apesar de não ser o único meio de indução de apoptose, diversos estudos têm comprometido a presença de uma proteína adaptadora FADM, ligada à DMATR, e de caspases ao processo indutor de morte celular (Wajant *et al.*, 2003). A FADM recruta moléculas caspases 8 para a sua proximidade, local onde ocorre a sua activação auto-proteoliticamente. A activação comporta a activação de cascatas de caspases que, por fim, conduzem à clivagem de um largo número de proteínas celulares, resultando na morte da célula (Baud *et al.*, 2001).

Assim, o TNF- $\alpha$  tem um papel essencial na regulação do balanço entre respostas pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas e, ao mesmo tempo, na proliferação celular e inflamação. Embora o conhecimento actual da sinalização feita pelo TNF- $\alpha$  seja extenso, não está ainda completo. A sua conclusão pode vir a ser relevante na intervenção terapêutica de doenças inflamatórias crónicas, como a doença de Crohn, artrite reumatóide, esclerose múltipla e Alzheimer (Baud *et al.*, 2001).

#### **1.1.2.1.1.4. Superfamília de quimiocinas**

Desde a descoberta da CXCL8 (IL-8) e da CCL2 (PIM-1), no final dos anos 80, que a superfamília das quimiocinas tem sido largamente expandida (Zlotnik *et al.*, 2012). As quimiocinas abrangem um grupo de proteínas solúveis, de baixo peso molecular, ímpares entre as citocinas pelas suas propriedades quimiotácticas (Wilson *et al.*, 2009). Produzidas e alvejadas por uma variedade múltipla de células são, contudo, essencialmente, endereçadas à quimioatração leucocitária e ao tráfego de células imunes para todo o organismo (Huang *et al.*, 2008).

Funcionalmente, as cerca de 40 quimiocinas descritas (Chensue, 2013) podem ser divididas em três categorias: as quimiocinas responsáveis pela manutenção da homeostasia, as que induzem processos inflamatórios e as de dupla função, ou seja, quimiocinas que medeiam ambos os processos (Huang *et al.*, 2008; Zlotnik *et al.*, 2012).

As quimiocinas homeostáticas, expressas constitutivamente mas limitadas ao tipo celular, estão envolvidas na organização e regulação do sistema imunitário ao

mediar a migração homeostática de linfócitos e células dendríticas (células envolvidas na imunidade adquirida). Pelo contrário, as quimiocinas inflamatórias são produzidas apenas perante situações de infecção, ou inflamatórias, desencadeando o recrutamento de células como macrófagos e neutrófilos para o foco inflamatório (Huang *et al.*, 2008; Zlotnik *et al.*, 2012).

A assinatura molecular das quimiocinas baseia-se em quatro resíduos de cisteína conservados intercalados por ligações dissulfito (Zlotnik *et al.*, 2012). Com base na presença e posicionamento dos dois resíduos de cisteína do N-terminal, as quimiocinas podem ser agrupadas em quatro subfamílias: CXC, CC, (X)C e CX<sub>3</sub>C. Nas quimiocinas CXC, um único aminoácido não conservado (X) separa a primeira da segunda cisteína, enquanto a subfamília CC possui as suas cisteínas adjacentes; as citocinas CX<sub>3</sub>C possuem três aminoácidos entre as suas cisteínas e a subfamília (X)C distingue-se por não conter a primeira e a terceira cisteína (Zlotnik *et al.*, 2012).

A actividade das quimiocinas é mediada pela ligação à família de receptores acoplados à proteína G (RAPG), mais concretamente a um subgrupo da classe A, a classe G $\alpha$ i das proteínas G heterotriméricas (Zlotnik *et al.*, 2012). A classe A do receptor RAPG, também designada por receptores rodopsina, é uma subfamília geralmente subdividida em quatro grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Em geral, os RAPGs interagem com as, e sinalizam através de, proteínas heterotriméricas reguladoras, capazes de interagirem com o nucleotídeo guanina (proteína G). Após estimulação pelo ligando, o RAPG sofre uma alteração conformacional capaz de activar a proteína G pelo processo fosforilativo de GDP a GTP. A activação da proteína G induz o seu desacoplamento ao receptor e, conseqüentemente, o desencadeamento de uma cascata de eventos de sinalização que regulam várias funções celulares (Huang *et al.*, 2008). As quimiocinas partilham ainda outra característica com as demais citocinas: a sobreposição de outras vias de sinalização como a JAK/STAT e a PI3C (Huang *et al.*, 2008). Com vista à quimiotaxia ocorrem processos celulares dependentes de actina, síntese de moléculas de adesão, aumento dos níveis intracelulares de cálcio, reorganização do citoesqueleto e extensão de pseudópodes; nos leucócitos há a promoção de processos fagocíticos e de desgranulação (Juan *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009; Koelink *et al.*, 2012).

A nomenclatura dos receptores é determinada de acordo com a principal subfamília por eles ligada. Estão descritos cerca de 20 receptores de quimiocinas com actividade quimiotáctica dependente de G $\alpha$ i, embora cinco receptores atípicos tenham sido também descritos. Estes últimos são estruturalmente semelhantes, embora as suas

funções se prendam com o sequestro de quimiocinas, evitando a sinalização, ou então, para a estabilização da concentração destas, para uma mais eficiente quimiotaxia (Juan *et al.*, 2009; Zlotnik *et al.*, 2012; Chensua, 2013).

Este tipo de citocinas parece ter uma ampla acção na inflamação crónica, já que este processo é caracterizado pela contínua activação das células imunes residentes e contínua infiltração de células circulantes (Koelink *et al.*, 2012).

Uma das quimiocinas mais versáteis pertence à subfamília CC, o CCL5, ou tradicionalmente conhecido como RANTES. O CCL5 é armazenado em grandes concentrações nos grânulos plaquetários e das células T CD8+, mas libertado rapidamente sob activação celular (Zlotnik *et al.*, 2012). Este, tal como os membros da sua subfamília, activa principalmente monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos (Juan *et al.*, 2009).

#### **1.1.2.1.1.5. Superfamília da interleucina-1**

Historicamente, a família IL-1, também conhecida por superfamília imunoglobulina, compreendia duas proteínas: a IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (Meager *et al.*, 2007). Contudo, actualmente, é composta por 11 membros, dos quais se destacam as duas referidas e o antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra), como os mais bem estudados (Dinarello, 2002; Huang *et al.*, 2008; Dinarello, 2009). A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são membros agonistas da família, enquanto a IL-1Ra é um antagonista do receptor específico para a IL-1 $\alpha$  e para a IL-1 $\beta$ . Esta propriedade, única da família IL-1, pode levar à neutralização do efeito pró-inflamatório das isoformas IL-1, já que este inibidor endógeno compete pelo receptor IL-1 (Feghali *et al.*, 1997; Dinarello, 2002).

A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são sintetizadas como pró-formas, em que apenas a da IL-1 $\alpha$  é biologicamente activa quando apresentada na membrana celular. As respectivas pró-formas são clivadas por proteases específicas (calpaína para a IL-1 $\alpha$  e a enzima conversora de IL-1 $\beta$ ) para produzir as formas maduras de 17,5 kDa e 17,3 kDa, respectivamente (Meager *et al.*, 2007).

Os principais membros da família, à excepção da IL-1Ra, são essencialmente citocinas pró-inflamatórias, devido à sua habilidade estimulatória de expressão de genes associados à inflamação e doenças auto-imunes (Dinarello, 2002). Ambas as isoformas são produzidas por uma grande variedade celular incluindo os monócitos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos T e B. Responsáveis por efeitos num vasto leque de células, dão origem a um elevado número de actividades biológicas. A abundância de efeitos tem

origem, principalmente, na capacidade que a IL-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) tem para induzir a síntese de outras citocinas, que assim exercem as suas próprias funções (Meager *et al.*, 2007). A IL-1 é encarregue da indução do processo pirogénico através da estimulação da COX-2 e fosfolipase A2, e ainda actua, sinergisticamente, com factores de crescimento hematopoiéticos resultando no estímulo proliferativo de células T (Feghali *et al.*, 1997; Dinarello, 2002; Shaikh, 2011).

A família de receptores IL-1 é codificada por cerca de nove genes distintos. Contudo, bem como os membros desta família de citocinas, muitos dos receptores a ela associado encontram-se ainda com funções por definir. Aos três principais membros estão associados os receptores IL-1R1 (ou IL-1RI), IL-1R2 (ou IL-1RII) e IL-1R3 (ou IL-1R AcP). Dos três membros referidos, o IL-1 $\beta$  possui a menor afinidade para o receptor membranar do IL-1RI, e ainda menor para com a sua forma solúvel. A IL-1 $\beta$  liga-se com maior afinidade ao receptor IL-1RII, que se caracteriza por não possuir maquinaria de sinalização, designado por receptor negativo ou *decoy*, sendo considerada uma interacção quase irreversível devido ao longo tempo de dissociação. Já o IL-1Ra é o membro com maior afinidade a IL-1RI, tornando a ligação praticamente irreversível (Dinarello, 2002).

Os receptores da superfamília IL-1 são, extracelularmente, caracterizados por três domínios conservados do tipo imunoglobulina (Akira *et al.*, 2004; Drexler *et al.*, 2010), confiados ao reconhecimento dos membros da família, ao passo que o domínio intracelular do IL-1R é partilhado pelos *Toll-like receptors (TLRs)*, designando-se por domínio citoplasmático *Toll/receptor da IL-1 (TIR)*. O domínio TIR é responsável pela sinalização desencadeada pelos membros da superfamília IL-1, à excepção do IL-1RII, que não o possui (Figura 2).

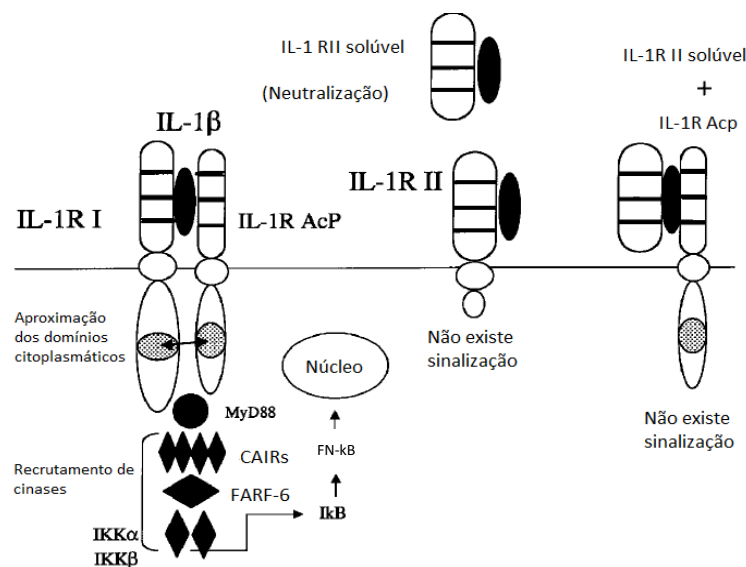
Após a ligação do ligando ao domínio extracelular, o complexo *TLR/IL-1R* dimeriza, sofrendo uma alteração conformacional indispensável ao recrutamento de moléculas necessárias à cascata sinalizadora. Destas destaca-se a proteína de resposta primária à diferenciação mielóide 88 – MyD88. Esta molécula é comum a vários receptores *TLR* para a transdução de sinal e, para isso, recruta moléculas cinases associadas ao receptor da IL-1 (CAIR-1 e CAIR-4) para que interajam com o “domínio de morte” a ela associado. Uma vez aí, o complexo CAIR-1/CAIR-4 sofre um processo fosforilativo, pelo qual uma molécula FARF6 se associa à CAIR-1 fosforilada. O complexo formado por CAIR-1 e por FARF6 dissocia-se do receptor e activa o complexo IKK - responsável pela fosforilação do I $\kappa$ B (processo que conduz à sua

ubiquitinação e consequente degradação por um proteossoma). Daqui advém a translocação dos dímeros do NF- $\kappa$ B (p50/p65) para o núcleo e consequente indução da expressão de genes pró-inflamatórios com locais de ligação para o NF- $\kappa$ B (Dinarello, 2002; Akira *et al.*, 2004; Drexler *et al.*, 2010). O NF- $\kappa$ B é uma família de factores de transcrição induzíveis largamente estudados que regula a expressão de mediadores inflamatórios (Haddad *et al.*, 2011).

Afora o envolvimento e indução do NF- $\kappa$ B, esta via tem um outro alvo, ao levar à activação de cascatas de PCAM, onde se incluem a PCAM p38, a proteína cinase regulada por sinais extracelulares e a proteína *JNK*, que aduz igualmente a um aumento da ligação de factores de transcrição ao ADN (Akira *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2009; Drexler *et al.*, 2010).

Quando há ligação ao IL-1RII, não ocorre transdução de sinal, já que o receptor *decoy* não possui domínio citoplasmático. Por sua vez, este receptor é responsável pela prevenção da ligação da IL-1 $\beta$  ao receptor do tipo I e consequente sinalização.

O receptor solúvel da IL-1RII também é capaz de ligar membros IL-1, embora a sua ligação tenha como intuito a neutralização desse membro ou sequestração de cadeias essenciais (ex. IL-1RI AcP) necessárias à transdução pelo IL-1 RI (Dinarello, 2002).



**Figura 2** - Representação esquemática da via de transdução de sinal da família de citocinas IL-1. Adaptado de Dinarello, 2002.

## 1.2. Terapêutica anti-inflamatória

### 1.2.1. Fármacos sintéticos

São inúmeras as doenças que evoluem com episódios de dor, febre e inflamação e, por esse facto, desde muito cedo incessantemente se procuraram compostos que aliviassem esses sintomas e tratassem os distúrbios inflamatórios. Actualmente, os fármacos mais utilizados, para esse fim, são os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e os anti-inflamatórios esteróides, também denominados glucocorticóides ou corticosteróides (Guimarães *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2007).

Os AINEs são um grupo heterogéneo de compostos químicos que partilham não só propriedades anti-inflamatórias como também propriedades analgésicas e antipiréticas (Roy *et al.*, 2013). Estes compostos são os escolhidos entre os dois principais grupos para o alívio sintomático da dor e inflamação em várias enfermidades crónicas, como na artrite reumatóide, em afecções inflamatórias mais agudas, como fracturas e entorses, mas também no alívio de outras dores, como a pós-operatória, a dental e enxaquecas. A sua extensa utilização está, contudo, demarcada por diversos efeitos adversos.

Os glucocorticóides são os fármacos anti-inflamatórios por excelência, pois actuam no processo inflamatório tanto na fase aguda – nas manifestações precoces de rubor, calor, dor e edema – como na fase crónica – nas manifestações mais tardias de cicatrização, reparação da lesão e reacções proliferativas da inflamação crónica (Rang *et al.*, 2007). A eficácia deste grupo de agentes terapêuticos resulta dos efeitos pleiotrópicos do receptor glucocorticóide em diversas vias de sinalização. Contudo, estes efeitos pleiotrópicos desencadeiam igualmente efeitos adversos, como retardamento no crescimento infantil, imunossupressão, hipertensão, osteoporose e distúrbios metabólicos, entre outros (Rhen *et al.*, 2005).

#### 1.2.1.1. Anti-inflamatórios não esteróides

Remonta ao antigo Egipto a utilização de plantas para combater dores reumáticas e febre, que mais tarde se veio a saber terem salicilatos na sua constituição. Em 1860, o ácido salicílico torna-se extensamente útil como anti-séptico, antipirético, anti-reumático, analgésico e anti-inflamatório. Esta vasta lista de efeitos terapêuticos promove uma revolução no desenvolvimento de novos fármacos com acções farmacológicas mimetizadas, incluindo o acetilsalicilato (aspirina) da Bayer®. Os



agentes daqui resultados passam a constituir um grupo designado por “fármacos tipo aspirina” ou por “anti-inflamatórios não esteróides” (Vane *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2006). A grande variedade de estruturas e formulações não reflectem, porém, propriedades terapêuticas díspares. De facto, todos os AINEs aliviam inchaço, rubor e dor inflamatória, febre e enxaquecas (Vane *et al.*, 1998). Todavia, a utilização a longo prazo destes fármacos é acompanhada de efeitos secundários dose-dependentes, destacando-se, entre eles, as complicações cardiovasculares, gastrointestinais e renais (Guimarães *et al.*, 2006).

A partilha não só dos mesmos efeitos terapêuticos como também dos efeitos secundários fez com que os especialistas conjecturassem que o mecanismo de acção dos AINEs se baseasse numa só intervenção bioquímica (Vane *et al.*, 1998). Em 1960, Vane e os seus colaboradores determinaram a base de acção deste grupo de agentes terapêuticos: a inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COXs). As COXs são enzimas responsáveis pela conversão do ácido araquidónico em mediadores pró-inflamatórios, como as PGs e os tromboxanos, e em mediadores homeostáticos, como a prostaciclina (Orlando *et al.*, 2010).

A enzima ciclo-oxigenase possui três isoformas – COX-1, COX-2 e COX-3 – embora o conhecimento sobre a última seja ainda bastante limitado (Roy *et al.*, 2013). As outras duas isoformas, apesar de partilharem 60% de identidade e a mesma actividade catalítica, distinguem-se na expressão tecidual e regulação (Guimarães *et al.*, 2006). A COX-1, por ser uma enzima constitutiva na maioria dos tecidos, opera como regulador homeostático, sendo responsável pela integridade da mucosa gástrica, função plaquetária e fluxo renal; já a COX-2 é uma forma induzível da enzima, não se exprimindo em condições fisiológicas na generalidade dos tecidos, com algumas excepções. De facto, a COX-2 é expressa, constitutiva e fisiologicamente, no rim, cérebro, ossos e cartilagem (Guimarães *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2013).

Os níveis de COX-2, que são em geral baixos nas células, são intensamente regulados por vários estímulos mitogénicos e inflamatórios, como citocinas e mensageiros intracelulares (Vane *et al.*, 1998). A COX-2, por ter notabilidade em situações patológicas, em particular na inflamação, está associada à acção anti-inflamatória dos AINEs. Por outro lado, os indesejáveis efeitos secundários são devidos à inibição da homeostática COX-1 e da COX-2 fisiológica (Vane *et al.*, 1998).

Tanto a COX-1 como a COX-2 exercem as suas funções biológicas como homodímero, constituído por dois domínios catalíticos intrínsecos: o de dioxigenase e o

de peroxidase. A via das ciclo-oxigenases, que conduz a biotransformação do ácido araquidónico (clivado dos fosfolípidos membranares pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub>) a prostanóides, tem início com a adição de duas moléculas de oxigénio ao ácido araquidónico pela COX. Daí resultam intermediários que, pela acção do domínio catalítico de peroxidase, guiam a formação de distintos prostanóides, envolvidos tanto na patogénese como na regulação homeostática.

Esta enzima bifuncional é composta por três unidades estruturais: um domínio do tipo factor de crescimento epidermal, um domínio de ligação à membrana e um domínio enzimático (Vane *et al.*, 1998). O domínio de ligação à membrana forma a estrutura em canal hidrofóbico, característica das COX, através do qual tanto substratos como inibidores acedem ao local activo da COX (Seta *et al.*, 2012).

Em geral, os AINEs são ácidos fracos que previnem, reversível ou irreversivelmente, a biossíntese de prostanóides, pela obstrução do acesso do ácido araquidónico ao domínio catalítico da COX. A obstrução é realizada através da inserção do AINE no canal onde permanece através de ligações de hidrogénio a resíduos de arginina. A grande variedade estrutural dos AINEs prende-se com vários graus de selectividade no que toca à inibição da COX-1 ou da COX-2 (Seta *et al.*, 2012). Este facto permite dividir os AINEs em duas classes: os AINEs clássicos, ou não selectivos, que abrangem os fármacos que inibem ambas as isoformas das enzimas e os *Coxibs*, que englobam os agentes que bloqueiam preferencialmente a COX-2. Contudo, os últimos estão largamente associados a um grande risco de ocorrência de eventos cardiovasculares trombóticos (Roy *et al.*, 2013).

Os AINEs podem também intervir, minoritariamente, a nível de outros mecanismos inflamatórios, como na remoção de espécies reactivas de oxigénio, na diminuição da síntese de IL-1 e nos eventos intracelulares mediados pelo cálcio (Rang *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2013).

### 1.2.1.2. Glucocorticóides

No processo inflamatório, as citocinas não são só responsáveis pela activação de componentes do sistema inflamatório. Indirectamente, elas também influenciam a síntese e secreção de glucocorticóides pelas células do córtex adrenal (Smoak *et al.*, 2004).

Ao actuar num universo enorme de tipos celulares, os glucocorticóides exercem os seus efeitos anti-inflamatórios e imunossuppressores tanto em processos inflamatórios

agudos como crónicos (Chapman *et al.*, 2013). Estes actuam ao nível da activação e repressão de genes anti e pró-inflamatórios, respectivamente, bem como a nível pós-transcricional (Barnes, 2010). De facto, desde a descoberta da cortisona em 1940 e do seu sucesso inicial no tratamento da artrite reumatóide, que os glucocorticóides sintéticos constituem a terapia anti-inflamatória mais eficaz para muitas doenças crónicas (Barnes, 2010; Chapman *et al.*, 2013).

Devido à sua natureza lipofílica, os glucocorticóides entram para o meio intracelular por um processo de difusão passiva. Aí, exercem as suas funções pela interacção com o receptor glucocorticóide (RG), membro da superfamília de receptores de factores de transcrição nuclear (De Bosscher *et al.*, 2003). Das duas isoformas do RG humanas,  $RG\alpha$  e  $RG\beta$ , apenas a  $RG\alpha$  liga glucocorticóides e tem actividade na transcrição genética. O  $RG\beta$ , por sua vez, interage com o ADN, mas não com os glucocorticóides, e está teoricamente associada à inibição da  $RG\alpha$  e à resistência deste tipo de fármacos (Smoak *et al.*, 2004; Barnes, 2010). Em células não estimuladas, o  $RG\alpha$  encontra-se sequestrado no citoplasma por um complexo proteico que lhe mascara a sequência de localização nuclear. Após interacção com o ligando, o  $RG\alpha$  activo é rapidamente translocado para o núcleo, local onde modula, estimulando ou inibindo, processos transcripcionais de genes inflamatórios, pela ligação directa ao ADN ou por interacções com outros factores de transcrição (Smoak *et al.*, 2004).

A activação transcripcional requer a homodimerização do RG. Enquanto homodímero, o RG complexado ao glucocorticóide interage com elementos de resposta a glucocorticóides (ERG) presentes no promotor dos genes positivamente regulados. A ligação a ERG induz uma alteração conformacional do RG que promove o recrutamento de várias moléculas co-activadoras para o complexo GR-ADN. Estas moléculas, como a proteína de ligação a elementos de resposta a AMPc, possuem actividade de acetiltransferase de histonas, intrínseca. A acção destas provoca uma acetilação de histonas, que induz um rearranjo nucleossomal relaxado e, por isso, um fácil acesso da maquinaria de transcrição ao promotor alvo. Os genes que são modulados positivamente pelos glucocorticóides, codificam proteínas anti-inflamatórias como o IL-1Ra, a IL-10 e a lipocortina-1, uma proteína com efeito inibitório na enzima fosfolipase  $A_2$  e consequente inibição da produção de mediadores lipídicos pela cascata do ácido araquidónico (Barnes, 1998; De Bosscher *et al.*, 2003).

Contudo, os glucocorticóides exercem o seu maior efeito anti-inflamatório pela repressão transcripcional. Para isso, o  $RG\alpha$  pode reprimir os genes pela ligação directa a

ERG negativos, embora a repressão genética esteja maioritariamente associada a interacções com outros factores de transcrição (NF- $\kappa$ B e PA-1) (Smoak *et al.*, 2004; De Bosscher *et al.*, 2003). Neste último mecanismo, o RG- $\alpha$  activo interage com moléculas co-repressoras que atenuam a actividade co-activadora de moléculas promovidas pelo NF- $\kappa$ B. O complexo RG-glucocorticóide recruta a enzima desacetilase-2 de histonas que, ao estruturar a compactação do ADN, evitando o acesso dos factores de transcrição aos seus locais de ligação, incita a repressão genética (Barnes, 2010). Entre outras formas, este tipo de formulação farmacológica pode também suprimir a actividade do NF- $\kappa$ B através da activação do gene codificador do inibidor I $\kappa$ B (De Bosscher *et al.*, 2003). Os mecanismos de repressão expostos levam à repressão da síntese das citocinas como TNF- $\alpha$ , GM-FEC, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, RANTES e enzimas, COX-2 e isoforma indutível da óxido nítrico sintetase (Smoak *et al.*, 2004).

Apesar dos meios pelos quais RGe antagoniza PA-1 não estarem completamente descritos, pensa-se que tenham a mesma base de acção dos utilizados na inibição do NF- $\kappa$ B. Entre eles, a interacção directa com o complexo de c-jun e c-fos, bem como a inibição das fosforilações da cascata PCAM necessárias à activação do c-Jun (Smoak *et al.*, 2004; Rhen *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2006).

Os glucocorticóides podem ainda exercer efeitos na pós-transcrição genética. Alguns genes pró-inflamatórios codificam sequências de ARNm instáveis, que necessitam de estímulos inflamatórios para os estabilizar. A via p38 PCAM é um exemplo deste mecanismo, ao estabilizar os ARNm de proteínas como a COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-6. Os glucocorticóides reprimem este efeito através da indução de inibidores da PCAM ou por aumento da transcrição de ribonucleases específicas, resultando numa rápida degradação do ARNm e consequente diminuição de secreção proteica (Barnes, 1998; Rhen *et al.*, 2005; Barnes, 2010).

A eficácia dos glucocorticóides no alívio de desordens inflamatórias, devido ao pleiotropismo do seu receptor, faz com que sejam bastante úteis clinicamente. Contudo, essa mesma característica é responsável por um elevado número de efeitos secundários, o que faz com que a sua utilização seja limitada. Efeitos secundários comuns prendem-se com hipertensão, hiperglicémia, imunossupressão e aterosclerose (Chapman, 2013). De facto, esta é a principal razão pela qual imensos esforços têm sido aplicados nesta área, para o possível desenvolvimento de compostos esteróides menos ofensivos e que permitam terapias mais específicas (Barnes, 1998; De Bosscher *et al.*, 2003; Rhen *et al.*, 2005).

## 1.2.2. Fármacos de origem natural

Actualmente, o tratamento maioritário de enfermidades associadas a desordens inflamatórias crónicas prende-se com terapêuticas aliadas a várias limitações, como graves efeitos secundários, falta de eficácia e elevados custos de produção (Francisco *et al.*, 2011). Com um grande interesse em ultrapassar estes contratempos, tanto a medicina convencional como os próprios doentes, têm recorrido cada vez mais ao uso da medicina complementar e da medicina tradicional, como é o caso do uso de extractos de plantas medicinais.

A fitoterapia, para além de ser a base dos sistemas de medicina tradicional mundiais, consubstancia 25% dos fármacos actualmente comercializados (de constituição vegetal bruta) e 25% dos fármacos derivados de extractos vegetais quimicamente modificados (Ahmed *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o mundo ocidental tem renovado o interesse pela utilização das plantas com fim terapêutico, constituindo um crucial auxílio nos cuidados de saúde, não só como complemento à medicina clássica, como também no desenvolvimento de novos compostos terapêuticos (Cunha, 2005; Francisco *et al.*, 2011).

Estima-se que cerca de 1200 espécies vegetais apresentem propriedades medicinais. No entanto, menos de 10% destas foram alvo de investigação sobre as suas características fitoquímicas e farmacológicas (Nyireddy, 2004). Por este facto, há necessidade de finalizar o conhecimento científico sobre o mecanismo de acção pelo qual estas espécies têm actividade, de modo a garantir um uso terapêutico de qualidade, seguro e eficaz (Cunha, 2005).

Inserir-se aqui o interesse em avaliar o efeito do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., espécie botânica largamente utilizada tradicionalmente no “combate” a várias patologias, especialmente nas que envolvem um processo inflamatório crónico.

### 1.2.2.1. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., espécie anteriormente descrita por *Andropogon citratus* por De Candolle e reclassificada por Otto Stapf, pertence à família Poaceae (comummente conhecida por gramíneas), que compreende cerca de 660 géneros e 9000 espécies vegetais (Figura 3) (Kasali *et al.*, 2001). A designação *Cymbopogon* tem origem nas palavras gregas *kymbe* e *pogon*, significando “arranjo de flores em espiga” (Shah *et al.*, 2011); já *citratus*, com origem latina, refere-se ao sabor a

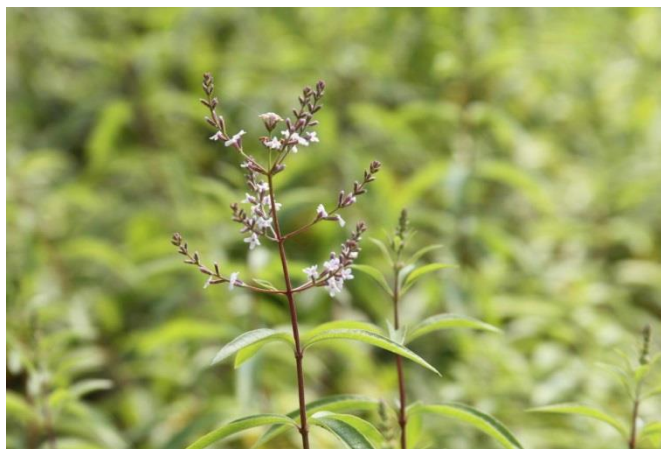
**Reino:** Plantae  
**Sub-reino:** Tracheobionta  
**Superdivisão:** Spermatophyta  
**Divisão:** Magnoliophyta  
**Classe:** Liliopsida  
**Subclasse:** Commelinidae

**Figura 3** - Classificação científica de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.  
Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

limão característico das folhas desta espécie. Em Portugal, é vulgarmente conhecido por Erva-príncipe (Negrelle *et al.*, 2007).

Apesar de nativo do sudoeste asiático, o *C. citratus* cresce espontaneamente por todo o mundo, embora com preferência por regiões tropicais ou de savana (Figueirinha *et al.*, 2008). A erva-príncipe é uma gramínea perene com rizoma, azul-esverdeada, de caules fortes, folhas lineares (Figura 4) e com agradável aroma a limão (devido ao seu óleo essencial), cujo crescimento pode atingir três metros de altura (Negrelle *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2009; Francisco *et al.*, 2011).

Além da habitual utilização em bebidas aromáticas e na culinária (Figueirinha *et al.*, 2008), os infusos e os decoctos preparadas com base nas folhas, secas ou frescas, deste espécime há muito que são usados na medicina tradicional. A ampla distribuição mundial faz com que esta prática seja utilizada para um largo espectro de finalidades terapêuticas. A etnomedicina aconselha, terapeuticamente, o “chá” de *C. citratus* para



**Figura 4** - *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Fotografia gentilmente cedida pela ERVITAL, Plantas Aromáticas e Medicinais, Lda., sediada em Mezio, Castro Daire, Portugal.

distúrbios gastrointestinais e nervosos e como agente ansiolítico, relaxante, antipirético, anti-séptico, antioxidante, analgésico, antiasmático, antiespasmódico, anti-reumático e anti-inflamatório (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Asaolu *et al.*, 2009).

Apesar do seu disseminado uso e aceitação, pouca informação existe sobre o mecanismo de acção pelo qual o *C. citratus* exerce as suas actividades biológicas (Negrelle *et al.*, 2007; Orlando *et al.*, 2010).

### 1.2.2.1.1. Composição do óleo essencial

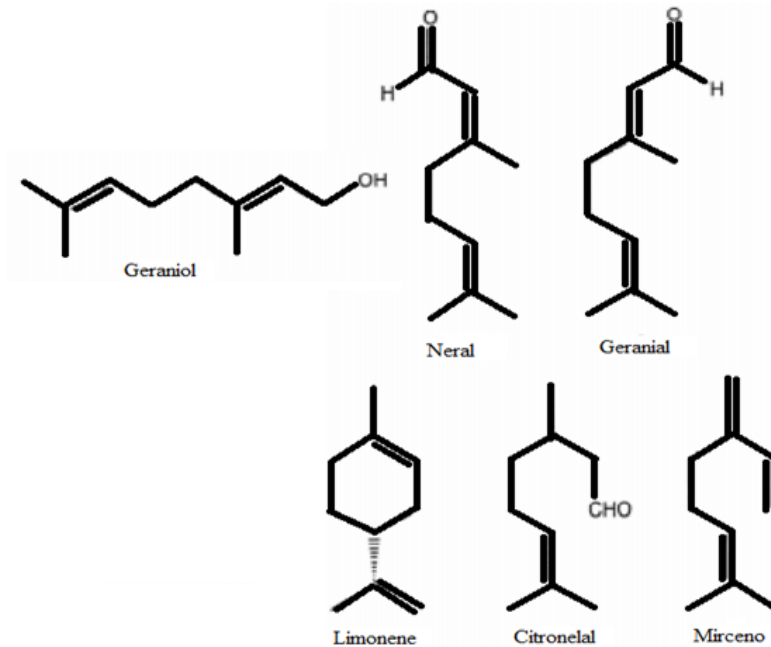
Além das infusões e decocções das folhas utilizadas pela medicina tradicional, outras substâncias originárias desta espécie têm grande utilidade, em especial o óleo essencial que exubera no *C. citratus* (Negrelle *et al.*, 2007).

Na medicina tradicional, o óleo essencial é utilizado no tratamento da acne, pé-de-atleta, enxaquecas, câibras musculares e como agente anti-inflamatório, antimicrobiano, antibacteriano e insecticida (Schaneberg *et al.*, 2002). Já industrialmente, o óleo essencial é muito utilizado na indústria alimentícia, de perfumaria e cosmética (Negrelle *et al.*, 2007; Asaolu *et al.*, 2009; Bassolé *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2011).

Devido ao seu grande proveito económico, há uma maior incidência de estudos fitoquímicos centrados nos compostos voláteis de *C. citratus* e, conseqüentemente, um maior conhecimento sobre eles em comparação com os compostos não-voláteis (Figueirinha *et al.*, 2008).

A composição química do óleo essencial de *C. citratus* apresenta variabilidade qualitativa e quantitativa. Isto acontece devido à dependência da composição química de factores como a origem geográfica, método de cultivo, idade da espécie e fotoperíodo (Negrelle *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2008). Os compostos voláteis das plantas são, em geral, líquidos lipofílicos com alta pressão de vapor (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Porém, independentemente da origem geográfica e dos outros factores, o óleo essencial do *C. citratus* é composto maioritariamente por citral (Figura 5), designação dada à mistura dos aldeídos guanial (citral A) e neral (citral B) (Barbosa *et al.*, 2008; Bassolé *et al.*, 2011). Esta mistura, onde predomina o geranial, representa de 30 a 93,74% da composição do óleo essencial da erva-príncipe, e é responsável pelo característico aroma a limão da espécie (Negrelle *et al.*, 2007).

Além dos compostos maioritários – os aldeídos – o óleo essencial é ainda composto por terpenos (dos quais se destacam o mirceno e o limonene), outros aldeídos, como o citronelal e álcoois e esterres, como o geraniol (Figura 5) (Negrelle *et al.*, 2007).



**Figura 5** - Principais elementos químicos que compõem o óleo essencial. Adaptado de Negrelle *et al.*, 2007.

### 1.2.2.1.2. Composição em compostos não-voláteis

As folhas de *C. citratus* constituem a fonte de óleo essencial, o composto mais bem estudado fitoquimicamente. Mas, como as propriedades terapêuticas têm vindo a ser atribuídas aos compostos não-voláteis, alguma atenção, embora pouca, tem vindo a ser dada a esses elementos (Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010).

As folhas e raízes são constituídas, tal como todo o reino Plantae, por metabolitos secundários. Os metabolitos secundários são os fitoconstituintes cujo papel na planta não se prende com processos de fotossíntese, respiração, crescimento ou desenvolvimento, mas que apesar disso se encontram presentes em elevadas concentrações (Croizer *et al.*, 2009). Dentro dos metabolitos secundários encontram-se, na erva-príncipe, essencialmente polifenóis, dos quais ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, alcalóides, terpenos e álcoois (Figura 6) (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010). Todos estes elementos são conhecidos por vários efeitos terapêuticos e protectores intrínsecos (Asaolu *et al.*, 2009).

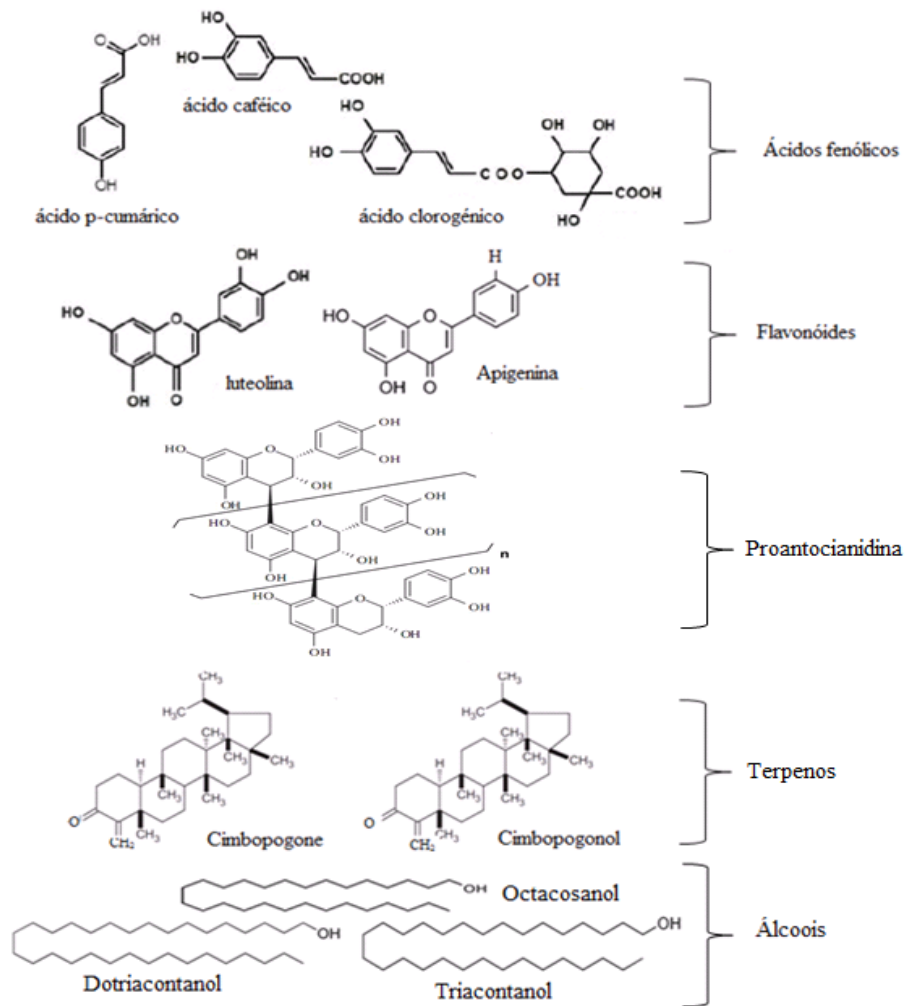


Os polifenóis e os seus derivados constituem os compostos não-voláteis maioritários da planta *C. citratus*, bem como do infuso preparado a partir desta (Figueirinha *et al.*, 2008). Os polifenóis são caracterizados por possuírem na sua estrutura pelo menos um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilo conjugados, estrutura que toma a designação de fenol (Cunha, 2005; Agostini-Costa *et al.*, 2012). A presença destes compostos está associada à inibição de mediadores inflamatórios por repressão genética e enzimática e ao sequestro de espécies reactivas de oxigénio; consequentemente, a presença destes compostos prende-se com as actividades anti-inflamatória, antioxidante e anti carcinogénica (Cheel *et al.*, 2002; Cunha, 2005; Figueirinha *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2012). Dentro desta família sobressaem os ácidos fenólicos, compostos de baixo peso molecular (Croizier *et al.*, 2009) dos quais se destacam o ácido caféico, o ácido *p*-cumárico, o ácido clorogénico e seus derivados (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008); os flavonóides, polifenóis de peso molecular intermédio, dos quais se salientam a luteolina e a apigenina (Negrelle *et al.*, 2007; Figueirinha *et al.*, 2008; Croizier *et al.*, 2009); e por fim os taninos, em que os taninos condensados, também designados por proantocianidinas (polímeros de longa cadeia) se evidenciam (Cunha, 2005; Figueirinha *et al.*, 2008; Agostini-Costa *et al.*, 2012).

Os alcalóides são compostos com um ou mais átomos de azoto heterocíclicos derivados, essencialmente, de aminoácidos (Agostini-Costa *et al.*, 2012). As actividades terapêuticas atribuídas aos alcalóides estão associadas a efeitos sedativos, antiespasmódicos e hipnóticos (Cunha, 2005).

Os terpenos são a maior e a mais diversa família de produtos naturais, compreendendo desde compostos com estruturas lineares a moléculas policíclicas e de moléculas de cinco carbonos (isopreno) a compostos com milhares de unidades de isoprenos. Todos os terpenos são sintetizados pela condensação de unidades de isopreno e classificados pelo número desses conjuntos no núcleo estrutural (Agostini-Costa *et al.*, 2012). O *C. citratus* contém dois triterpenos (30 carbonos): o cimbopogone e o cimbopogonol (Figura 6) (Negrelle *et al.*, 2007).

Os álcoois presentes nas folhas da erva-príncipe são o octacosanol, o dotriacontanol e o triacontanol (Negrelle *et al.*, 2007).



**Figura 6** - Principais componentes não-voláteis do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. Adaptado de Crozier *et al.*, 2009; Ferreira, 2011; Shah *et al.*, 2011; Agostini-Costa *et al.*, 2012.

## **Capítulo 2**

### **Objetivos**

Actualmente, a terapêutica anti-inflamatória crónica disponível afecta a qualidade de vida dos doentes. Isto leva a que cada vez mais se procurem fármacos alternativos, com semelhante eficácia mas maior segurança. Há, conseqüentemente, um crescente número de estudos procurando alternativas terapêuticas em compostos de origem natural.

Depois de se ter comprovado a acção anti-inflamatória do infuso, livre do óleo essencial, de *C. citratus*, em modelo animal de inflamação aguda (Garcia, 2010; Garcia *et al.*, 2013), é objectivo do presente estudo averiguar a actividade anti-inflamatória do mesmo infuso num modelo animal de inflamação crónica, procurando desta forma justificar o seu uso tradicional em situações de doenças inflamatórias crónicas.

Desta forma, os principais objectivos deste estudo foram:

1. Avaliar a actividade anti-inflamatória do extracto de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. num modelo experimental *in vivo* de inflamação crónica.
2. Contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na referida actividade anti-inflamatória do *Cymbopogon citratus*.
3. Avaliar a toxicidade crónica do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

# **Capítulo 3**

## **Materiais e métodos**

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Material botânico

O estudo avaliativo realizado teve como interveniente a espécie botânica *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. As folhas secas utilizadas deste espécime foram adquiridas à ERVITAL, Plantas Aromáticas e Mediciniais, Lda., sediada em Mezio, Castro Daire, Portugal. Este local está situado a 1000 metros acima do nível das águas do mar, onde a espécie foi cultivada em estufa. Não obstante, foi confirmada a sua identidade pelo Professor Doutor Jorge Paiva, do Centro de Ecologia Funcional do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra. Um exemplar deste material encontra-se confiado ao Herbanário da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

#### 3.1.2. Animais de laboratório

Neste estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar albinos, machos, com peso compreendido entre 250-300 g, adquiridos na Charles River Inc., Espanha. Os processos de alojamento, de manutenção e utilização de todos os animais experimentados (n=30) seguiram em conformidade com a Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro e com prévia aprovação pela Direcção Geral de Veterinária para este estabelecimento de utilização. Segundo as directrizes da portaria acima referida, os animais foram alojados em gaiolas individuais mantidas num Rack (Allentown®) com adequada ventilação (taxa de ventilação de 59-60 renovações de ar/hora), temperatura (22-23°C) e iluminação (ciclo luz-obscuridade de 12/12 horas). O acesso à dieta padronizada para roedores (4 RF 21/I, Mucedola, Itália) e à água foi *ad libitum*.

#### 3.1.3. Fármacos/Reagentes químicos

Para a execução do protocolo experimental foi administrada, por via intramuscular, uma mistura de cetamina (50 mg/mL, Ketalar®, Parke-Daves, Pfizer, Seixal, Portugal) e cloropromazina (2,5%, Largatil®, Phône-Poulenc Rorer, Laboratórios Vitória, Amadora, Portugal) nas doses de 50 mg/Kg e 2,3 mg/Kg, respectivamente.

Como fármaco anti-inflamatório não esteróide padrão foi utilizada, por via oral, a indometacina (1 mg/mL, 25 mg, Indocid®, *IROKO products Ltd.*, Londres, Reino Unido) numa dose diária de 2 mg/Kg (Barreto *et al.*, 2012).

Como fármaco padrão da classe dos glucocorticóides foi utilizada, por via oral, a dexametasona ( $\geq 97\%$ , 25 mg, SIGMA-Aldrich®, Sintra, Portugal) numa dose diária de 2,5 mg/Kg (Wu *et al.*, 2006).

Como anti-séptico de largo espectro nas intervenções cirúrgicas realizadas foi utilizado o iodopovidona (Betadine®, Viatrix, Lisboa, Portugal).

De entre os reagentes químicos utilizados durante os ensaios salientam-se o *n*-hexano (Carlo Erba Reagenti SpA, Milão, Itália) – hidrocarboneto usado na remoção dos constituintes lipídicos, aquando da preparação do extracto aquoso de *C. citratus* – e o conjunto de reagentes químicos, com origem QIAGEN Sciences (Maryland, EUA) utilizado na execução do *kit* de quantificação de citocinas (*Multianalyte ELISArray*).

#### 3.1.4. Material físico e software

Material físico	Fabricante
gaiolas individuais ventiladas	Allentown®
<i>Rack</i>	Allentown®
evaporador rotativo	Buchi®, R-114
ultra-sons	Brandon®, 2200
termómetro digital de microsonda	Physitemp®, <i>model Bat-12</i>
sonda térmica	Physitemp®
centrifugador	SIGMA®, 2-5
estufa de esterilização	Jouan®
leitor de placas de ELISA	BioSurplus®, SLT. Spectra
processador de tecidos	Shandon®, Citadel 1000
micrótomo	Shandon®, AS325
microscópico óptico	Nikon®, Eclipse E600
Software	Fabricante
editor de fotografias histológicas	Abobe®, Photoshop CS3
construtor digital de gráficos	GraphPad®, Prism 5

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparação do extracto botânico de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

O método utilizado na preparação do extracto de *C. citratus* seguiu em conformidade com o proposto por Figueirinha e seus colaboradores (2008).

O extracto foi preparado pela adição de 150 mL de água fervente a 5 g de folhas secas de *C. citratus*, previamente pulverizadas. A infusão foi deixada repousar por 15 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, o infuso foi filtrado sob vácuo, e o volume de 150 mL perfeito com o mesmo solvente. Após filtrado, o infuso foi repetidamente tratado com *n*-hexano, para a remoção dos seus componentes apolares. De seguida, a fase aquosa, livre de óleo essencial, foi concentrada por evaporação rotativa, liofilizada, e o resultado armazenado a - 4°C até ser necessário (Garcia, 2010).

Aquando dos ensaios com os modelos animais procedeu-se à ressuspensão, diária, do extracto liofilizado em água destilada. As ressuspensões foram feitas para um extracto aquoso final de concentração 50 mg/mL.

### 3.2.2. Doses botânicas administradas aos animais

Com o objectivo de avaliar o uso terapêutico do extracto aquoso de *C. citratus* utilizado na etnomedicina procurou adaptar-se a dose humana referenciada ao modelo animal do estudo. Tradicionalmente, a infusão é preparada com a adição de 150 mL de água a duas folhas frescas ou a 2 g de folhas secas do espécime em estudo. Esta preparação corresponde a uma dose de 2 mL de infuso por Kg de massa corporal (Carlini *et al.*, 1986) e a 27 mg de folha por Kg de massa corporal.

A conversão para doses animais foi realizada com base nas directrizes recomendadas pela FDA (*Food and Drug Administration*). Esta conversão é necessária para compensar o facto de que a espécie humana ou, outros animais de grande porte, tem, em geral, uma taxa metabólica mais baixa e, por conseguinte, requerem uma menor dose (mg) por Kg de massa corporal (Wojcikowshi *et al.*, 2013). Segundo o guia para a indústria da FDA, no cálculo da dose de extracto a administrar a ratos considerou-se o factor 6 (EUFDA, 2005). Considerando os factores supramencionados e o rendimento de extracção obtido (16,6%) foi preparada uma solução de extracto aquoso de *C. citratus* de concentração final de 50 mg/mL. Desta solução foram administradas doses crónicas (duplas) bi-diárias de 68 mg/Kg de massa corporal do animal (Tabela II). A



duplicação da dose seguiu em conformidade com os resultados de Garcia e seus colaboradores (2010), que verificaram um maior efeito anti-inflamatório deste espécime aquando da administração de dose dupla em relação à indicada pela medicina tradicional (efeito dose-dependente).

**Tabela III** - Relação entre a dose humana utilizada na medicina tradicional e a dose de rato equivalente (Carlini *et al.*, 1986; EUFDA, 2005; Wojcikowshi *et al.*, 2013).

Espécie	Massa corporal (Kg)	Factor de conversão (Km)	Dose (mg/Kg)
Humano adulto	60	37	27
Rato	0,150	6	68 (x2)

### 3.2.3. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelo *in vivo* de inflamação crónica

#### 3.2.3.1. Desenho experimental

O estudo da actividade anti-inflamatória crónica do extracto de *C. citratus* requereu quatro grupos experimentais: um grupo-teste englobando os animais aos quais foi administrado o extracto botânico nas doses acima referidas (n=12); um primeiro grupo controlo-positivo referente aos animais que receberam a indometacina como AINE padrão (n=6); um segundo grupo controlo-positivo referente aos animais que receberam a dexametasona como glucocorticóide padrão (n=5); um quarto e último grupo controlo-negativo ao qual foi administrado água destilada como veículo (n=7). Nos quatro casos, a administração foi executada oralmente, por gavagem orogástrica.

A administração do extracto aquoso de *C. citratus*, bem como a administração do veículo, ocorreu duas vezes por dia (de manhã e ao final do dia), nos cinco dias consecutivos após o dia de indução do processo inflamatório crónico. Como supracitado, a administração seguiu em conformidade com a executada pela medicina tradicional, desse modo, a dose bi-diária foi requisito desta última. Já a administração de ambos os fármacos anti-inflamatórios aos animais do grupo correspondente ocorreu em dose única diária, nos mesmos dias de experiência, conforme a indicação terapêutica dos mesmos.

### 3.2.3.2. Indução do processo inflamatório crónico nos animais

Um qualquer estudo realizado *in vivo* necessita dos seus respectivos modelos animais. Para averiguar o efeito anti-inflamatório crónico do extracto aquoso de *C. citratus* foi concebido um modelo *in vivo* de inflamação crónica. O método empregue foi uma modificação do utilizado por Winter e seus colaboradores (1957) – o método da “porção de algodão” (do inglês *Cotton Pellet*). Esta técnica induz inflamação crónica sob a forma de granuloma, permitindo avaliar a proliferação dos componentes envolvidos neste processo (Paschapur *et al.*, 2009), incluindo mediadores anti- e pró-inflamatórios. Neste teste, a migração de monócitos/macrófagos, a proliferação de fibroblastos, a apoptose e todos os componentes associados à inflamação crónica ocorrem nas imediações do *cotton pellet*, envolvendo-o em tecido de granulação (Uzkeser *et al.*, 2012).

O procedimento iniciou-se anestesiando os animais com a mistura anestésica acima descrita (Nagar *et al.*, 2005). De seguida, uma porção de cerca de  $10 \pm 0,49$  mg de algodão, previamente esterilizada por autoclavagem, foi inserida na região interescapular de cada animal (Paschapur *et al.*, 2009). A esterilização do material cirúrgico, bem como das porções de algodão, foi realizada em estufa de esterilização a 180°C. O processo de microcirurgia realizou-se após tricotomia da zona dorsal dos animais, zona na qual se efectuou uma pequena incisão subcutânea para a inserção do algodão. A incisão foi suturada com linha estéril.

Após cinco dias da execução desta técnica, os animais foram novamente anestesiados e os *cotton pellets* removidos cirurgicamente, bem como os tecidos circundantes (Winter *et al.*, 1957; Suralkar *et al.*, 2008; Paschapur *et al.*, 2009; Nagar *et al.*, 2011).

Este procedimento permitiu a utilização de método de avaliação que consistiu na solubilização do granuloma em tampão de diluição (fornecido pelo *kit*) para a avaliação do nível de citocinas através da técnica de *ELISA*.

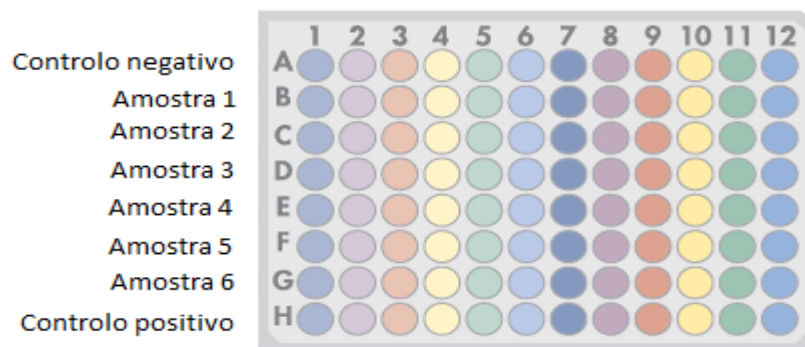
### 3.2.3.3. Análise da actividade anti-inflamatória em modelos *in vivo*

#### 3.2.3.3.1. Determinação do nível de citocinas

A relação do nível de citocinas nas amostras do solubilizado do granuloma, em conjunto com a porção de algodão, foi determinada pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Lee *et al.*, 2009; Novoselova *et al.*, 2009).

Ao quinto dia após a indução do processo inflamatório crónico, o granuloma foi cirurgicamente removido. Esta estrutura tecidular, bem como a porção de algodão que lhe deu origem, foram solubilizadas em 2 mL de tampão de diluição provido pelo *kit Multi-Analyte ELISArray*, da QIAGEN. Após recolha do solubilizado, este sofreu uma diluição 1:2 com o mesmo tampão. De seguida, foi executado o *kit* colorimétrico em questão, seguindo as instruções do fornecedor (Figura 7).

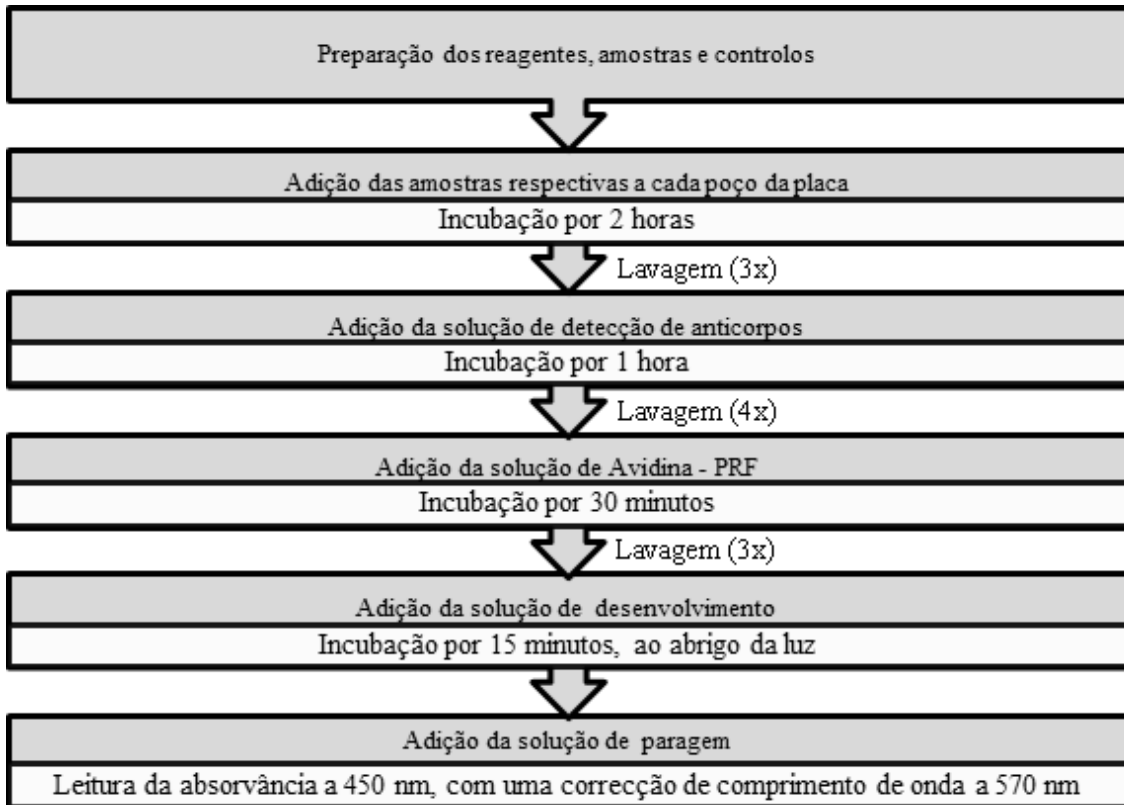
Resumidamente, o procedimento teve início com a preparação de todos os reagentes necessários, amostras e controlos. De seguida, adicionou-se 50 µL de tampão de ensaio em cada poço da placa, ao qual se somou 50 µL das amostras/controlos, nos



**Figura 7** - Representação da placa fornecida pelo *kit*. A placa de ELISA de 96 poços está indicada para a detecção das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES (colunas 1a 12). As linhas A a H fornecem a possibilidade da detecção de cada citocina em seis amostras e em dois controlos intrínsecos. Adaptado do protocolo fornecido pelo *kit Multi-Analyte ELISArray*, da QIAGEN.

respectivos poços. Depois de uma breve agitação, incubou-se a placa por 2 horas. Após esse período, procedeu-se a três lavagens e à adição de 100 µL da solução de detecção de anticorpos, a qual exige uma incubação de 1 hora. Foram novamente feitas três lavagens, às quais se seguiu a adição de 100 µL de avidina-PRF (peroxidase de raiz-forte) e uma incubação de 30 minutos. Seguiram-se quatro lavagens. Adicionou-se, sucessivamente, 100 µL de solução de desenvolvimento e uma incubação por 15

minutos ao abrigo da luz. Após este tempo foi adicionada a mesma quantidade de solução de paragem. Finalmente, dentro dos 30 minutos de reacção da última solução, foi lida a absorvância a 450 nm, com uma correcção de comprimento de onda de 570 nm para corrigir imperfeições ópticas existentes na placa de ELISA (plástico) (Figura 8).



**Figura 8** - Esquema representativo dos passos cruciais ao protocolo da técnica de ELISA empregue.

### 3.2.4. Monitorização da temperatura basal

A febre é um efeito sistémico estritamente associado a processos inflamatórios e provido, maioritariamente, pela acção de citocinas. Para monitorizar possíveis alterações na temperatura corporal dos modelos animais em estudo e, por isso, a existência de uma possível acção antipirética associada ao extracto aquoso do *C. citratus* ou um processo infeccioso, determinou-se a temperatura corporal dos animais em estudo.

A medição da temperatura basal foi realizada cerca de 2 semanas antes dos ensaios de indução, enquanto que a temperatura tida com um processo inflamatório crónico a decorrer foi determinada no dia do sacrifício dos animais.

Para o procedimento, os animais foram anestesiados com a mistura anestésica referida anteriormente. A sonda térmica foi inserida 3-4 cm no recto do animal, e aí permaneceu por 2 minutos, permitindo neste período a estabilização da temperatura. O nível de pirexia foi ostentado por um termómetro digital e registado manualmente (Tomazetti *et al.*, 2005; Mythreyi *et al.*, 2008; Victoria *et al.*, 2012).

### 3.2.5. Análise histológica

Após a recolha do granuloma foram sacrificados por deslocamento cervical e sujeitos a necropsia (todos os grupos num total de n=30). Neste procedimento foram recolhidos os rins e fígado para posterior análise histológica. A preparação das peças consistiu na formulação de fragmentos de espessura 0,5 cm, cortados transversalmente, com ulterior imersão em formaldeído 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram processados pela substituição do formaldeído por parafina, que permite uma maior firmeza aquando da necessidade de corte. Após inclusão em blocos de parafina, os fragmentos foram armazenados a -20°C. Dos fragmentos congelados foi possível realizar um corte de 4 µm de espessura. A fracção daqui originária foi colocada em lâminas, desparafinada com xilol e etanol e colorada com hematoxilina e eosina. A hematoxilina cora os núcleos celulares de azul, enquanto a eosina cora o citoplasma com tom vermelho rosado. As lâminas prontas foram observadas com auxílio de uma microscópio óptico de luz, com objectivas de 20x e 40x, adaptado a uma máquina digital (Ferreira, 2011).

### 3.2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com testes de cinco ou mais experiências independentes (n≥5). Os dados obtidos foram analisados segundo a aplicação ANOVA *one-way* seguida pela correcção de Bonferroni. Os mesmos dados foram considerados estatisticamente significativos se p<0,05 para a probabilidade de ocorrência de probabilidade nula. O *Prism 5,0 (GraphPad Software)* foi usado para todas as análises estatísticas.

# **Capítulo 4**

## **Resultados**

## **4.1. Avaliação da actividade anti-inflamatória em modelos *in vivo* de inflamação crónica**

### **4.1.1. Quantificação do nível de citocinas**

Após execução do protocolo experimental, os níveis relativos de um conjunto de citocinas presentes no granuloma formado foram pesquisados pela técnica de ELISA.

Na Tabela III podem observar-se os resultados da análise realizada ao nível das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES presentes no granuloma induzido por *cotton pellet* nos diferentes grupos teste – *C. citratus*, indometacina e dexametasona e no grupo controlo negativo.

Foram determinados os níveis percentuais das citocinas através da normalização da média de absorvâncias dos grupos analisados com os valores de absorvância dos controlos intrínsecos ao *kit* utilizado.

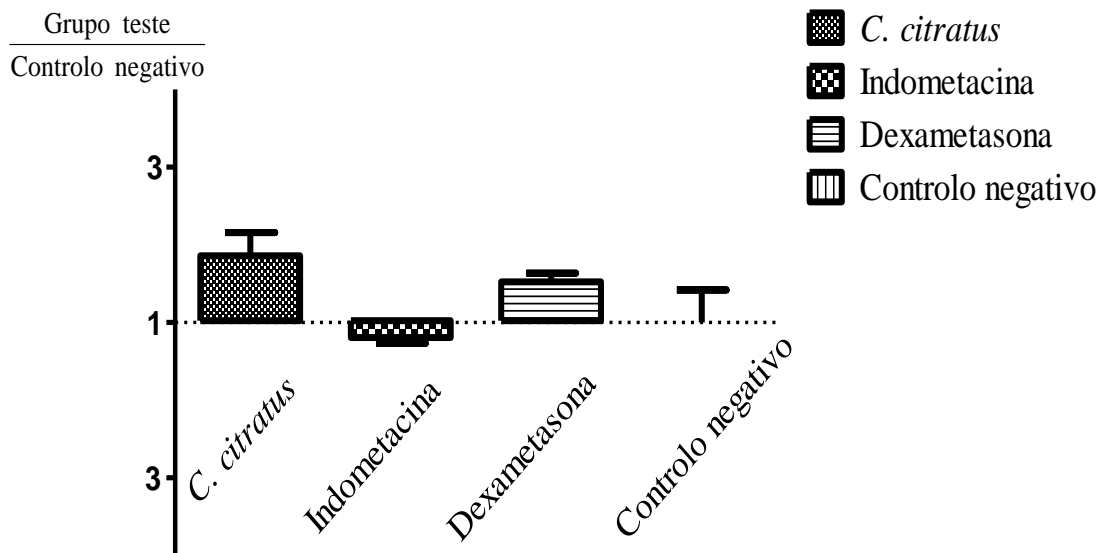
**Tabela III** - Relação percentual do nível de citocinas de cada grupo analisado. A relação foi calculada pela normalização com os correspondentes controlos intrínsecos ao *kit Multianalyte ELISArray*, da *QIAGEN Sciences*. A normalização foi determinada em percentagem de acordo com a seguinte fórmula: ((média das absorvâncias do grupo teste – absorvância do controlo negativo intrínseco ao *kit*)/(absorvância do controlo positivo do *kit* – absorvância do controlo negativo do *kit*)) x 100. Os dados são expressos como média ± EPM de 5-7 ensaios similares.

Relação percentual do nível de citocinas (% ± EPM)												
	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	IL-13	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	GM-FEC	RANTES
<i>C. citratus</i>	9,75 ±	99,13 ±	-14,75 ±	0,68 ±	3,70 ±	1,61 ±	1,91 ±	2,35 ±	-0,10 ±	3,35 ±	2,62 ±	4,95 ±
	1,579	14,564	0,594	0,211	1,108	2,071	0,319	0,136	0,344	0,585	0,649	1,051
Indometacina	4,23 ±	33,85 ±	2,51 ±	-0,16 ±	-1,82 ±	-7,92 ±	0,07 ±	1,36 ±	-0,37 ±	2,53 ±	0,076 ±	1,65 ±
	0,381	2,099	0,788	0,075	0,810	4,247	0,036	0,71	0,238	0,713	0,060	0,334
Dexametasona	7,99 ±	-0,79 ±	45,38 ±	8,11 ±	-0,51 ±	10,17 ±	14,97 ±	17,78 ±	1,48 ±	7,69 ±	9,84 ±	13,09 ±
	0,599	23,327	6,032	0,391	1,539	3,065	2,967	1,064	0,687	1,284	0,352	1,174
Controlo negativo	5,25 ±	9,39 ±	19,56 ±	4,08 ±	12,43 ±	34,17 ±	4,08 ±	12,77 ±	7,10 ±	16,36 ±	2,43 ±	16,48 ±
	2,201	1,803	7,594	1,693	6,792	0,351	1,389	1,943	0,239	3,387	0,905	0,380



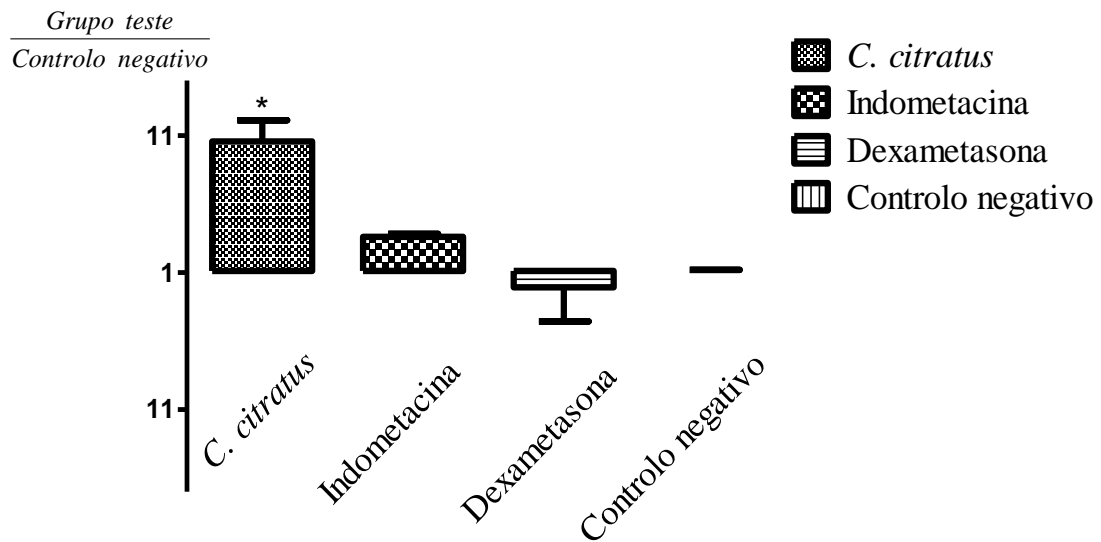
Com fórmula de cálculo apresentada foi possível comparar a actividade anti-inflamatória do extracto aquoso de *C. citratus* e dos dois controlos positivos usados – Indometacina como AINE padrão e Dexametasona como glucocorticóide padrão – com o Controlo negativo (Figuras 9 a 20). As figuras traduzem, por conseguinte, a relação estabelecida entre os níveis de determinada citocina presente nos grupos analisados e os níveis dessa mesma citocina presentes no modelo *in vivo* de inflamação crónica (Controlo negativo).

Os resultados da relação descrita para a IL-1 $\alpha$  são apresentados na Figura 9:



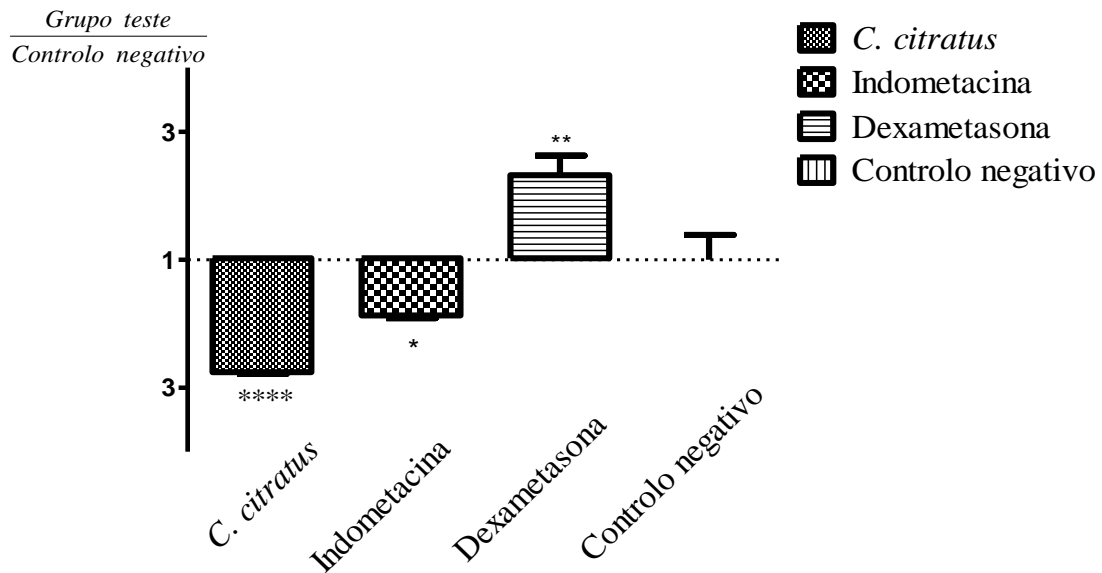
**Figura 9** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo.

Os resultados da relação descrita para a IL-1 $\beta$  são apresentados na Figura 10:



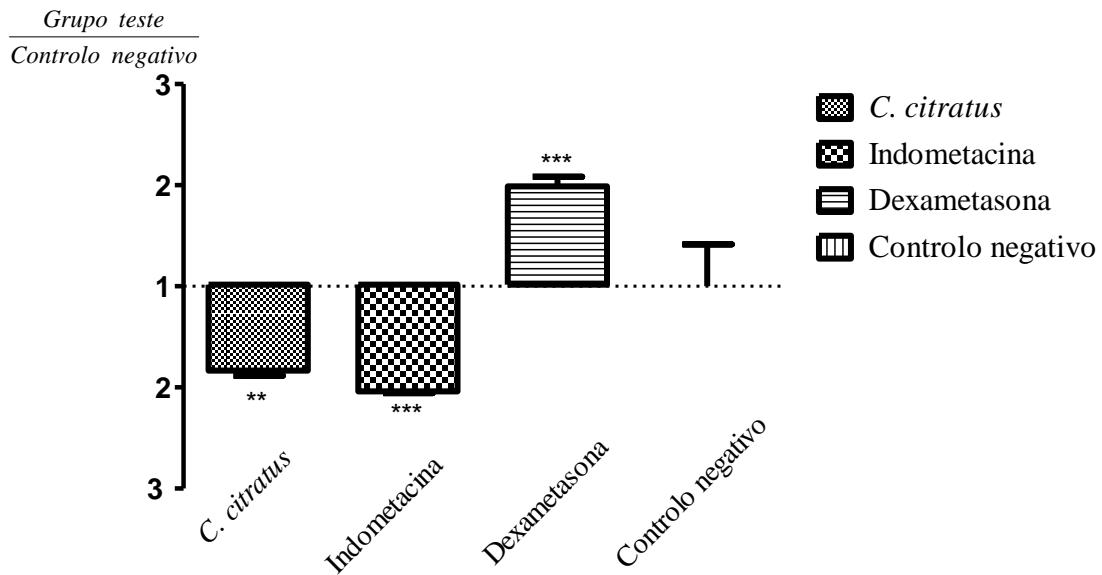
**Figura 10** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-1 $\beta$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-2 estão apresentados na Figura 11:



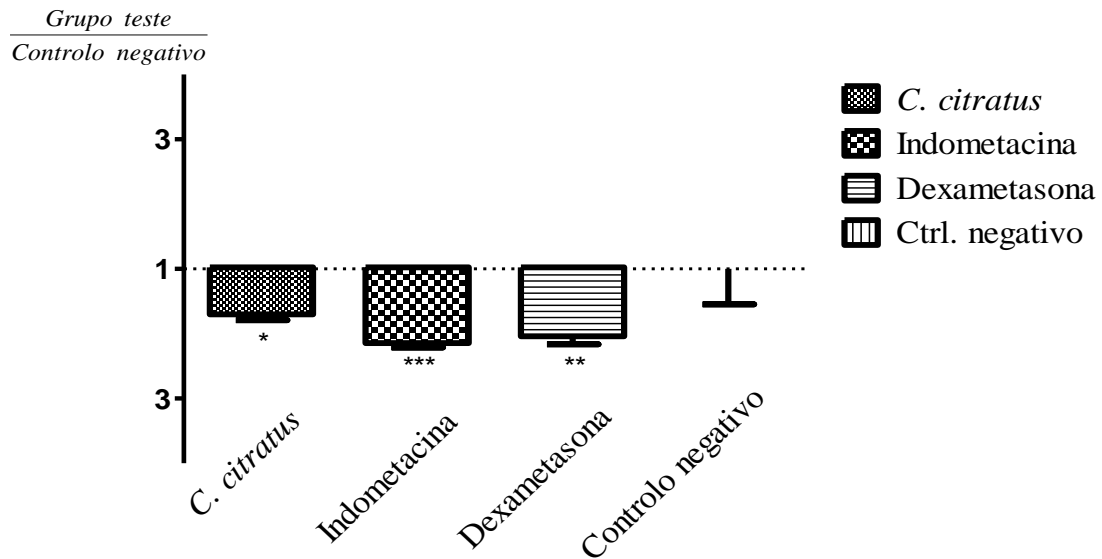
**Figura 11** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-2, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controllo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controllo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-4 são apresentados na Figura 12:



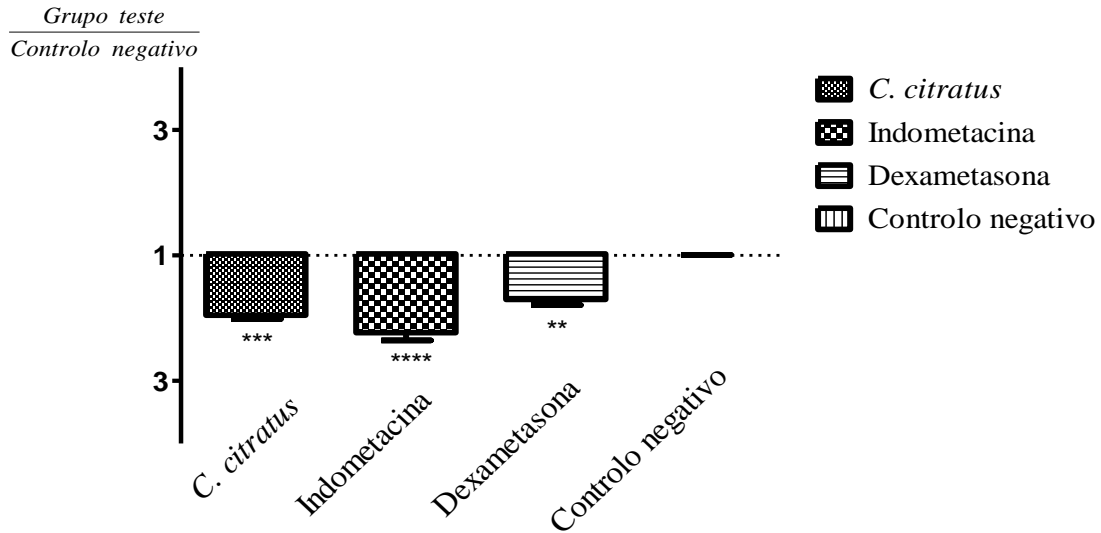
**Figura 12** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-4, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-6 são apresentados na Figura 13:



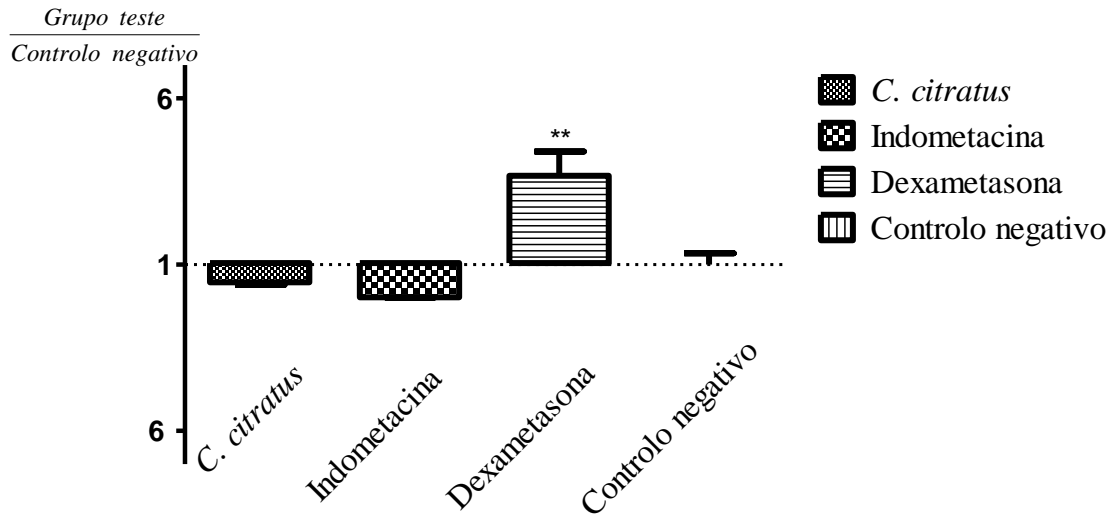
**Figura 13** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-6, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-10 são apresentados na Figura 14:



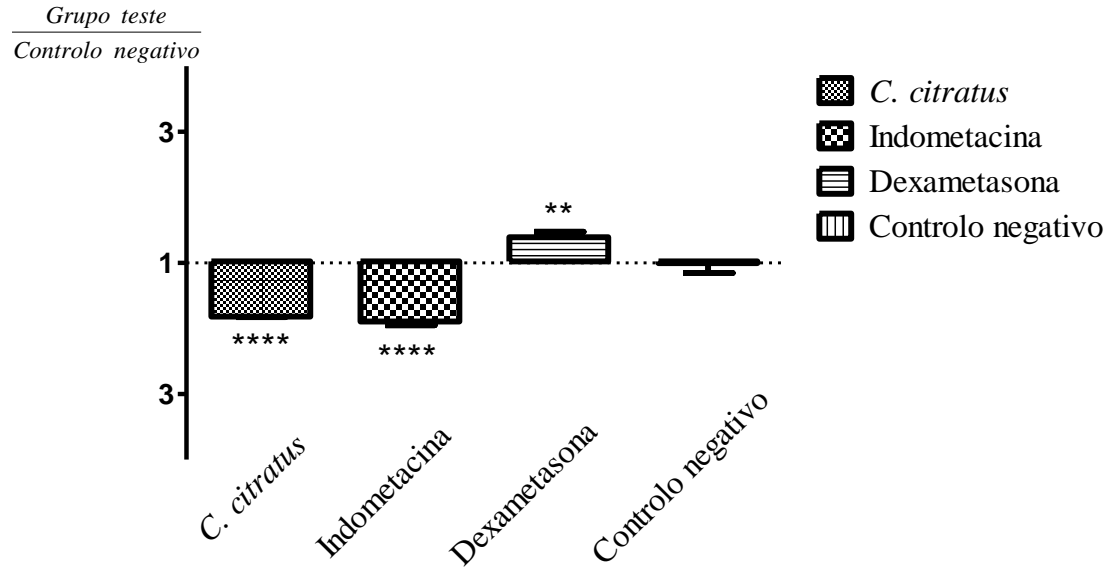
**Figura 14** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-10, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a IL-12 são apresentados na Figura 15:



**Figura 15** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-12, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

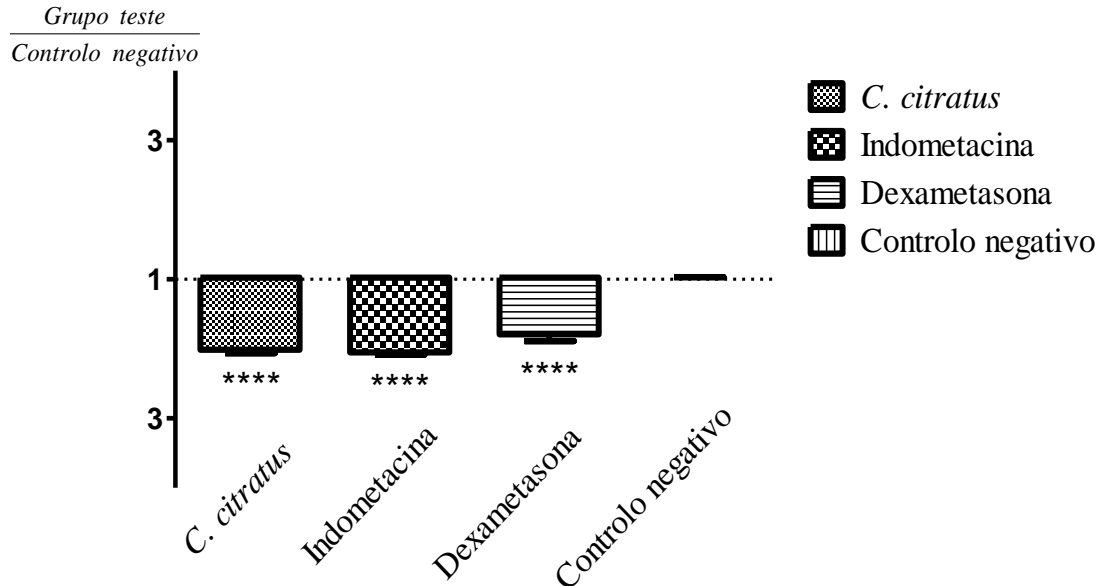
Os resultados da relação descrita para a IL-13 são apresentados na Figura 16:



**Figura 16** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese da citocina IL-13, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

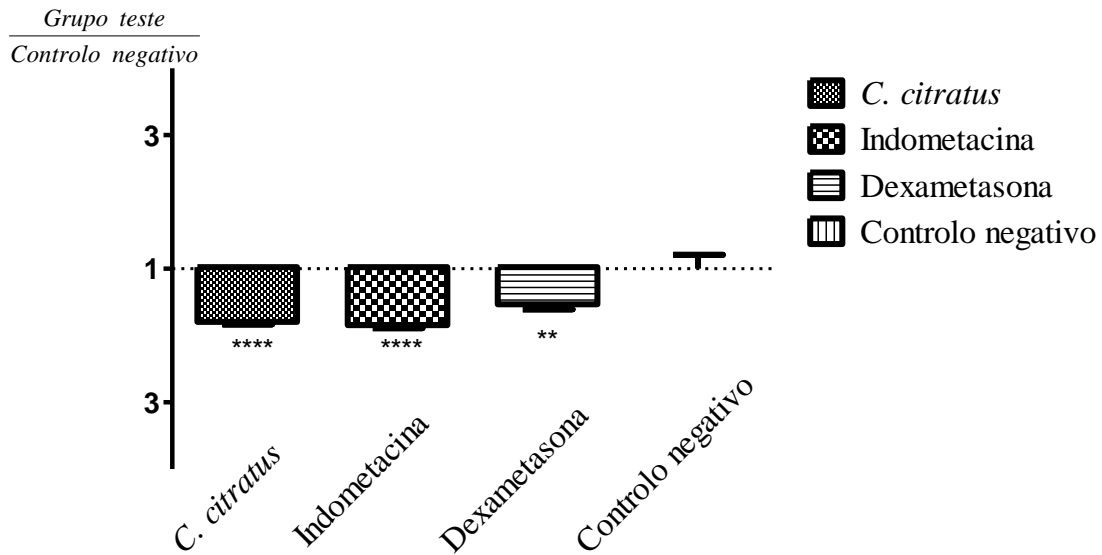


Os resultados da relação descrita para a IFN- $\gamma$  são apresentados na Figura 17:



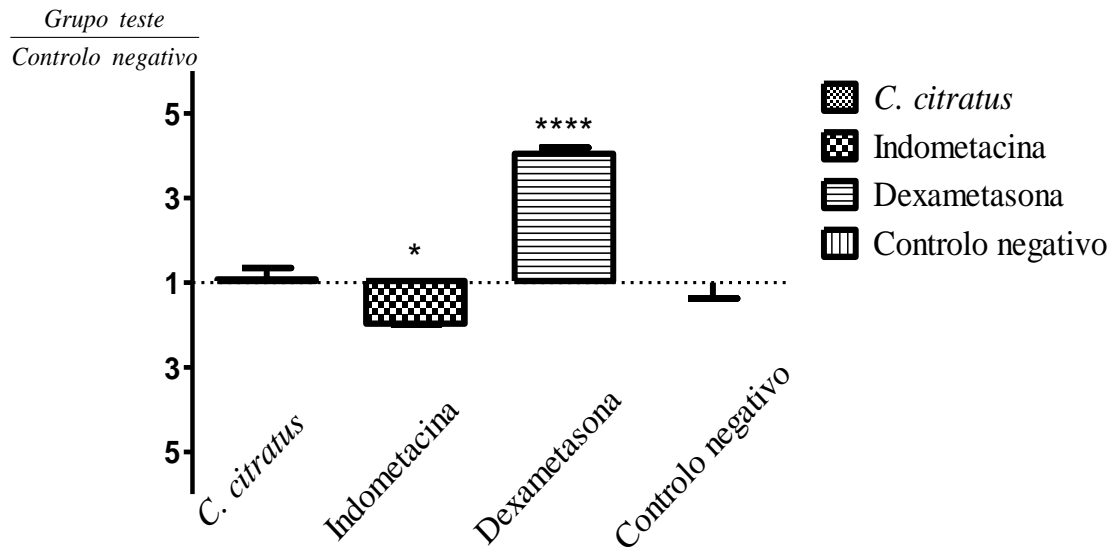
**Figura 17** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do IFN- $\gamma$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a TNF- $\alpha$  são apresentados na Figura 18:



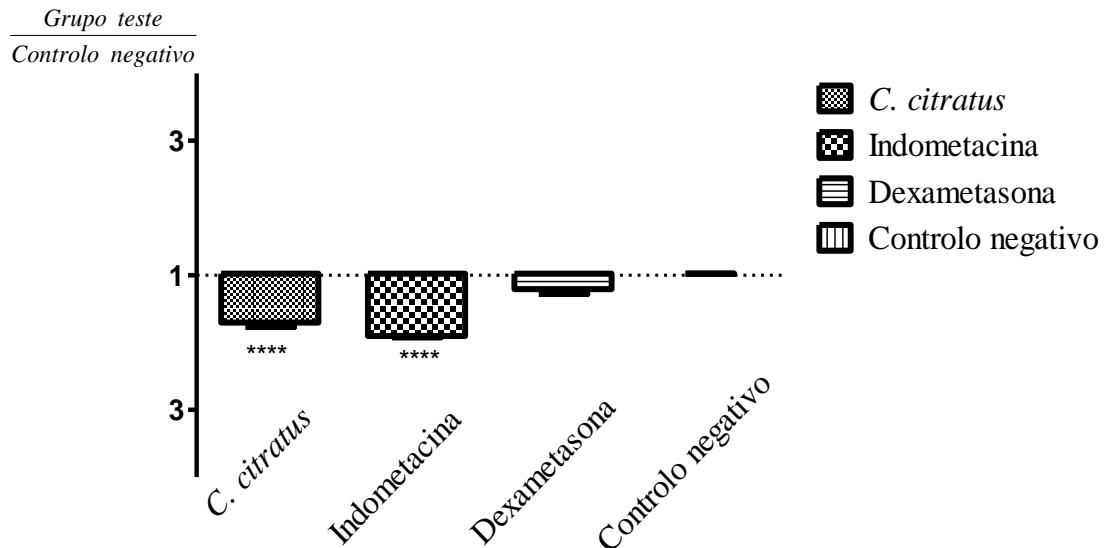
**Figura 18** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do TNF- $\alpha$ , aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos, comparados com o Controlo negativo. \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a GM-FEC são apresentados na Figura 19:



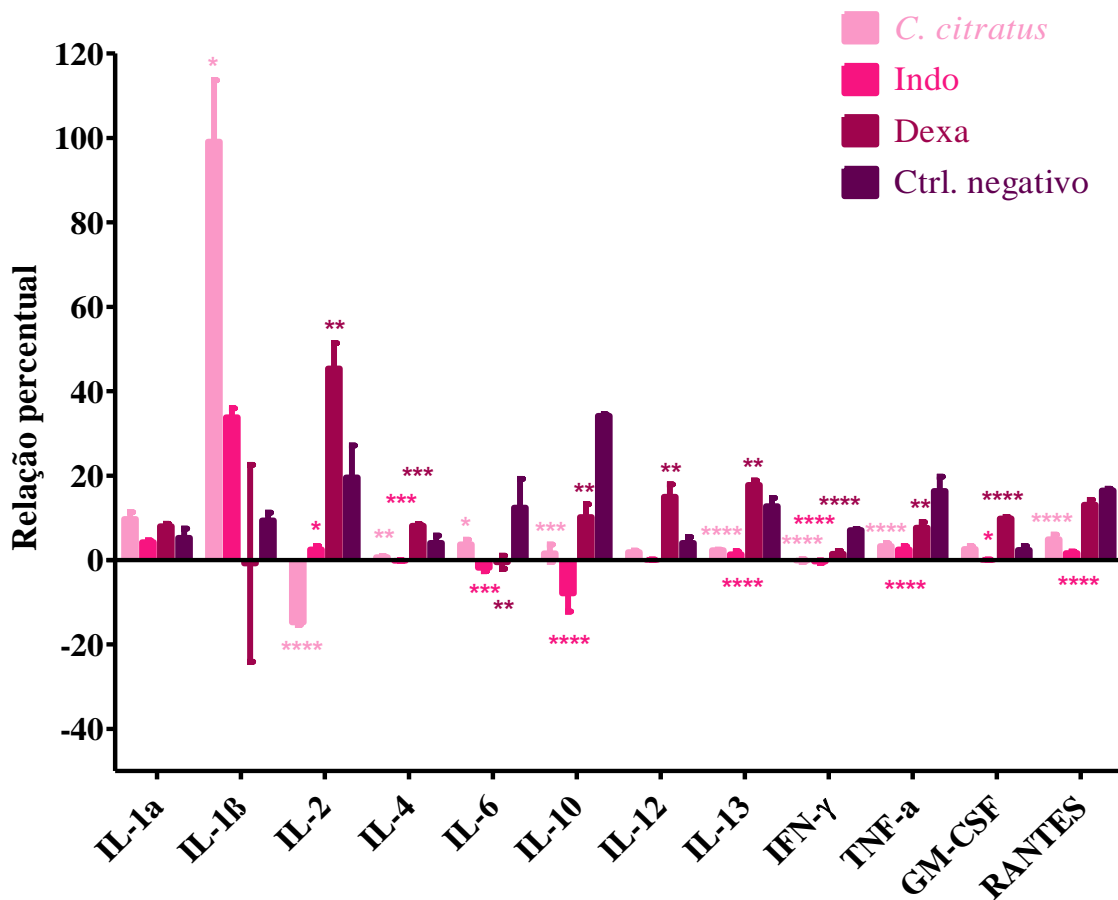
**Figura 19** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do GM-FEC, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Os resultados da relação descrita para a RANTES são apresentados na Figura 20:



**Figura 20** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1 mg/Kg e Dexametasona, 2,5 mg/Kg) na síntese do RANTES, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). O grupo de animais ao qual apenas se administrou o veículo foi usado como Controlo negativo. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \*\*\*\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinada por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

Na Figura vinte e um encontra-se um gráfico que representa os níveis relativos de todas as citocinas presentes no foco inflamatório crónico de cada grupo analisado: as colunas a rosa claro representam os níveis de citocinas do grupo teste, tratado com o extracto aquoso do *C. citratus*; a rosa forte as citocinas do grupo de animais aos quais foi administrado um AINE padrão (indometacina, 1mg/Kg); a rosa escuro o grupo teste tratado com o glucocorticóide padrão (dexametasona, 2,5 mg/Kg); a lilás o grupo controlo negativo, ao qual apenas foi administrado o veículo.



**Figura 21** - Efeito da administração do extracto aquoso de *C. citratus* e dos controlos positivos (Indometacina, 1mg/Kg e Dexametacina, 2,5 mg/Kg) na presença localizada do leque de citocinas analisadas neste estudo, aquando da presença de um processo inflamatório crónico (método do *cotton-pellet induced granuloma*). Cada coluna representa a absorvância obtida para cada citocina de cada grupo analisado, normalizada com os controlos intrínsecos ao *kit* utilizado. A normalização foi determinada em percentagem, de acordo com a fórmula:  $((\text{média de absorvância do grupo teste} - \text{absorvância do controlo negativo intrínseco ao kit}) / (\text{absorvância do controlo positivo do kit} - \text{absorvância do controlo negativo do kit})) \times 100$ . Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e são expressos como valores relativos comparados com o Controlo negativo. \* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,05$ ), \*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,01$ ), \*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,001$ ) e \*\*\*\* diferença estatisticamente significativa em relação ao controlo negativo ( $p < 0,0001$ ), como determinado por ANOVA, seguindo o teste de Bonferroni.

## 4.2. Monitorização da temperatura basal

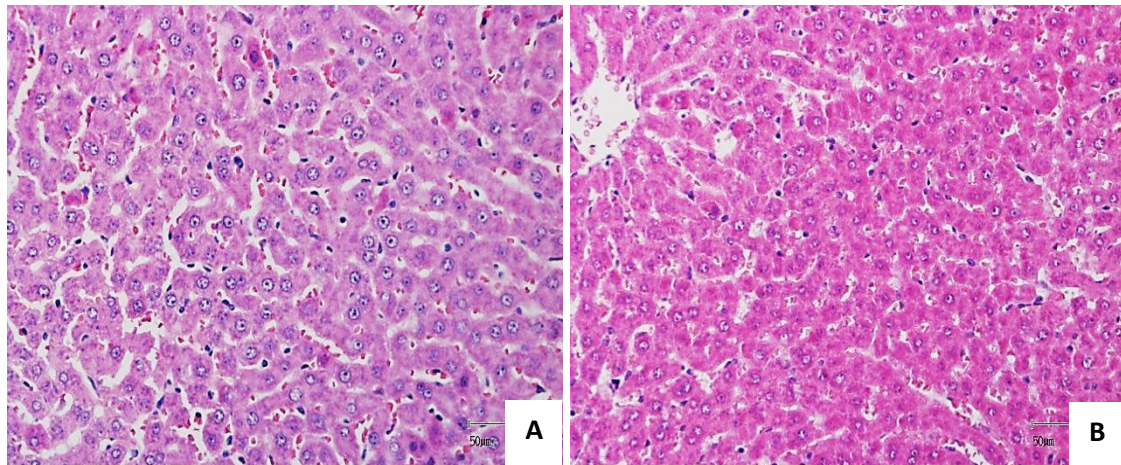
Com o objectivo de averiguar eventuais alterações à temperatura basal dos animais dos grupos experimentais subsequentes à técnica de indução de processo inflamatório crónico, a temperatura basal dos animais foi medida em dois momentos distintos: antes do processo de indução e no decorrer do quinto dia de processo inflamatório crónico (Tabela IV).

**Tabela IV** - Monitorização da temperatura basal dos animais antes e cinco dias após o processo de indução. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 ensaios similares e estatisticamente analisados por ANOVA, segundo o teste de Bonferroni.

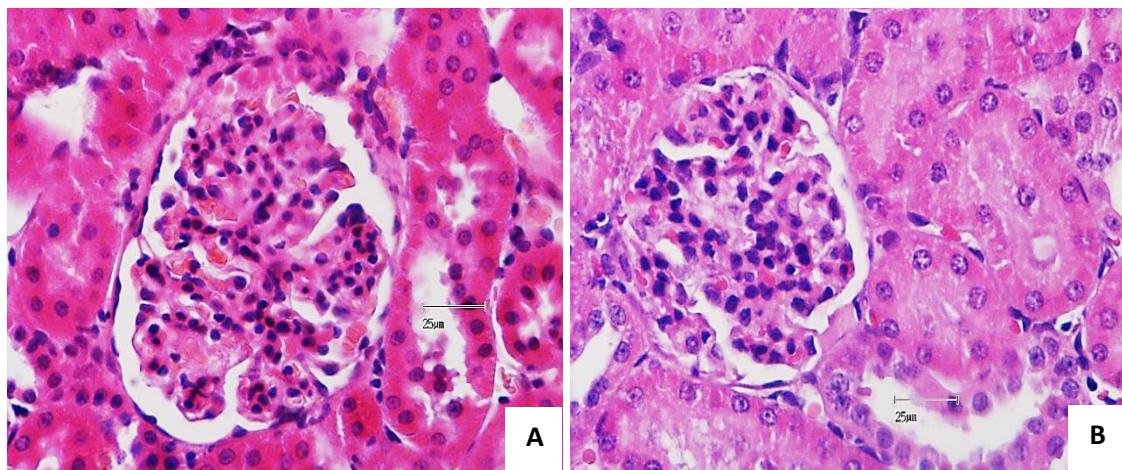
	Número de animais do grupo	Temperatura ( $^{\circ}\text{C} \pm \text{EPM}$ ) antes e cinco dias após indução do processo inflamatório crónico	
		Antes	Após cinco dias
Grupo teste	6	37,03 $\pm$ 0,251	36,35 $\pm$ 0,109
Grupo positivo de indometacina	6	37,15 $\pm$ 0,270	37,13 $\pm$ 0,167
Grupo positivo de dexametasona	5	36,90 $\pm$ 0,197	37,07 $\pm$ 0,123
Controlo negativo	7	37,35 $\pm$ 0,263	36,83 $\pm$ 0,222

## 4.3. Análise histológica

As Figuras 22 e 23 apresentam, respectivamente, as imagens histológicas de fígado e de rim dos modelos *in vivo* de inflamação crónica relativas ao grupo controlo negativo (A) e ao grupo tratado com extracto aquoso de *C. citratus* (B).



**Figura 22** - Imagens histológicas de corte de fígado com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.



**Figura 23** - Imagens histológicas de corte de rim com coloração de hematoxilina (núcleos celulares a azul) e eosina (coloração do citoplasma a vermelho rosado). A: Controlo negativo; B: grupo teste tratado com a dose crónica de *C. citratus*.

## **Capítulo 5**

### **Discussão**



Com o crescente número de limitações associado a muitos fármacos sintéticos no tratamento de desordens inflamatórias, os fármacos de origem natural (ou derivados) têm ganho lugar de destaque na terapêutica nos últimos anos (Beg *et al.*, 2011).

O *C. citratus* é uma gramínea perene cujo infuso é largamente usado pela medicina tradicional no tratamento de uma variedade de desordens patológicas. Na etnomedicina é usado, entre muitas outras aplicações, como agente anti-séptico, analgésico, ansiolítico, antioxidante, antipirético, tranquilizante, diurético, antimicrobiano, anti-reumático, antifúngico e anti-inflamatório (Negrelle *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2008; Figueirinha *et al.*, 2008; Asaolu *et al.*, 2009; Sforcin *et al.*, 2009; Figueirinha *et al.*, 2010; Bachiega *et al.*, 2011; Francisco *et al.*, 2011).

Apesar da vasta utilização dos extractos desta espécie, pouco conhecimento existe sobre os mecanismos de acção pelos quais o *C. citratus* exerce os seus efeitos terapêuticos (Figueirinha *et al.*, 2010). Contudo, a maioria das actividades anteriormente descritas tem sido atribuída à presença de compostos que fazem parte dos elementos não voláteis do *C. citratus*, nomeadamente aos constituintes polifenólicos (Figueirinha *et al.*, 2008). Estes têm ganho terreno no que toca à actividade anti-inflamatória, particularmente devido ao seu desempenho como agente antioxidante e sequestrador de radicais livres (Figueirinha *et al.*, 2008).

Este trabalho surge, assim, como uma continuação ao trabalho realizado por Garcia (2010) – que comprovou a actividade anti-inflamatória deste mesmo extracto em modelo experimental *in vivo* de inflamação aguda – com o objectivo de contribuir com mais um passo para a compreensão a nível celular e molecular do uso terapêutico do *C. citratus* pela etnomedicina e, deste modo, justificar o seu uso tradicional em situações de doenças inflamatórias crónicas.

Para atingir esse objectivo foi necessária a utilização de modelos *in vivo* de inflamação crónica onde pesquisar uma possível acção terapêutica do extracto. O modelo escolhido foi o do granuloma induzido por uma pequena porção de algodão (do inglês *cotton pellet-induced granuloma*). A técnica do *cotton pellet* dá origem a um modelo de processo inflamatório crónico largamente utilizado para avaliar a eficácia de fármacos em inibir processos que envolvam proliferação celular e, consequentemente, componentes inerentes a esses processos. Isto deve-se ao facto de, neste modelo, pouco tempo após o início de uma resposta inflamatória aguda ocorrer um desenvolvimento de

células proliferativas (com um infiltrado de monócitos, macrófagos e proliferação de fibroblastos), formando o carácter crónico da inflamação. A implantação do algodão induz um processo inflamatório localizado, caracterizado pela migração de monócitos, acumulação de líquidos, apoptose e danos teciduais nas imediações do *cotton pellet*. Estes acontecimentos permitem um envolvimento das porções em tecido de granulação (Uzkeser *et al.*, 2012).

O protocolo do método do granuloma induzido pela porção de algodão descrito por Winter e seus colaboradores (1957) foi adoptado quase na sua totalidade. Este resumiu-se à implantação subcutânea de porções de algodão, previamente esterilizadas, de cerca de 10 mg, por um período de cinco dias. O valor da massa dos *cotton pellets*, bem como a duração de implantação destes, foram diminuídos em comparação com os do método originalmente descrito. Esta diminuição deveu-se, essencialmente, a uma atenção redobrada para com o bem-estar dos animais.

Um processo inflamatório está fortemente correlacionado com a presença de um elevado número de mediadores inflamatórios, nomeadamente de citocinas (Feghali *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2010a). Ligada à acção destas encontram-se, muitas vezes, alterações à temperatura corporal do organismo onde o processo inflamatório ocorre.

A temperatura corporal é um parâmetro objectivo do estado fisiológico de determinado organismo homeotérmico, uma vez que se encontra estritamente associada a uma importante reacção de defesa conservada ao longo da evolução – a febre (Pinto, 2009). De facto, a febre é, provavelmente, o mais bem conhecido sintoma e o mais usado indicador de diagnóstico de muitas desordens clínicas, particularmente as que resultam de infecção (Luheshi, 1996). A febre, ou pirexia, é um sinal de doença que traduz uma alteração da termorregulação causada por múltiplas e variadas causas, como infecções (bacterianas ou virais), neoplasias, hemorragias, episódios inflamatórios agudos, entre outros. As substâncias que provocam febre designam-se por pirogénios endógenos – como as citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 – ou exógenos – como bacterias e vírus (Pinto, 2009).

Os pirogénios, uma vez no sangue, exercem as suas funções após deslocamento para o hipotálamo onde, sem penetrarem no sistema nervoso central, activam as células endoteliais dos órgãos que possuem certos receptores específicos. A activação daqui resultante determina a produção de PG a partir do ácido araquidónico pela activação da COX-2. A PGE2, a principal PG responsável por este processo, ao penetrar no

hipotálamo, estimula as células hipotalâmicas a sintetizar neurotransmissores – como o AMPc, cuja função reside no aumento do limiar de temperatura do termostato hipotalâmico. O hipotálamo, por sua vez, activa os neurónios periféricos responsáveis pela vasoconstrição cutânea e contracção muscular, levando ao aumento da produção de calor e elevação da temperatura sanguínea, ao novo nível fixado pelo hipotálamo (Pinto, 2009).

Embora fracamente associado ao processo inflamatório crónico, este efeito sistémico é fortemente associado a processos infecciosos. De facto, foi essencialmente por esta evidência que se decidiu monitorizar a temperatura basal dos animais da experiência. É necessário salientar o facto do valor de temperatura corporal determinado ser o valor sistémico e não o sentido no foco inflamatório.

Alterações na temperatura corporal poderiam ser evidências que ao mesmo tempo que um processo inflamatório crónico estaria a ocorrer, um processo infeccioso o poderia estar a acompanhar, podendo, por isso, levar a resultados científicos não fiáveis.

Como se pode observar na Tabela IV, tal facto parece não ter ocorrido, já que não existiram alterações significativas entre os valores de temperatura medidos duas semanas antes do procedimento de indução e a temperatura corporal sentida no quinto dia de decorrência do processo inflamatório crónico, em qualquer dos grupos em estudo, nem no controlo negativo. Este resultado permite, pois, validar a metodologia utilizada, nomeadamente no que respeita à ausência de processo infeccioso.

O modelo *in vivo* de inflamação crónica acima descrito permitiu a avaliação do perfil imunomodulador do extracto aquoso, livre de compostos voláteis, do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Imunomoduladores podem ser definidos como agentes que afectam o sistema imunitário através de moléculas reguladoras – como as citocinas – estimulando ou inibindo eventos da resposta imunitária (Bachiega *et al.*, 2011). Esta definição foi a base condutora da investigação da acção imunomoduladora do *C. citratus* na produção de citocinas. As citocinas, como anteriormente descrito, têm um papel central na inflamação, ao serem responsáveis pela condução de dada resposta inflamatória a uma imunidade protectora ou à indução de imunopatologias, sendo que os resultados clínicos desta condução são parcialmente determinados pelo balanço entre o carácter pró- e anti-inflamatório dessas moléculas (Francisco *et al.*, 2013).

O estudo da acção imunomoduladora, proporcionado pelo modelo *in vivo* de inflamação crónica utilizado, permitiu avaliar a eficácia deste extracto vegetal como um possível agente anti-inflamatório. Com este intuito, o solubilizado do *cotton pellet* foi analisado com vista à determinação de doze citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-FEC e RANTES – através da utilização de um *kit* comercial. O *kit Multi-analyte ELISArray* utiliza a técnica clássica de ELISA, que oferece uma rápida e simples avaliação de alterações na expressão proteica, e está desenhado para, simultaneamente, traçar o perfil do nível de múltiplas citocinas. O motivo pelo qual se sujeitaram as amostras à pesquisa de um tão elevado número de elementos proteicos recaiu no facto do pouco conhecimento que ainda existe em relação a esta espécie vegetal, possibilitando desta forma maior quantidade e informação mais diversificada. O *kit* inclui ainda dois controlos intrínsecos, um positivo e um negativo, para maior segurança nos resultados. Contudo, este *kit* não permite uma quantificação do nível de citocinas, possibilitando apenas a detecção de alterações relativas entre determinadas amostras pela leitura da densidade óptica a 450 nm.

Os resultados foram apresentados de dois modos: (1) tabela e gráfico gerais (Tabela IV e Figura 21, respectivamente), cujos valores foram apresentados como relações percentuais da presença das citocinas, conseguidas por normalização com os controlos intrínsecos ao *kit* empregue e (2) relações entre os grupos teste e o controlo negativo, permitindo responder à questão se os grupos teste influenciam, positiva ou negativamente, a presença de determinada citocina.

Os resultados obtidos da análise anteriormente referida revelam que o tratamento oral com extracto aquoso de *C. citratus* possui, de facto, um efeito imunomodulador. A administração do extracto aquoso de *C. citratus* reduziu, significativamente, os índices da maioria das citocinas pró-inflamatórias, à excepção das isoformas da IL-1.

Na inflamação crónica, o elemento de destaque da família de citocinas do tipo I é a IL-6. Esta proteína é sintetizada no foco inflamatório para favorecer a acumulação de células mononucleares nesse local (Gabay, 2006). Como a IL-6, outras citocinas pró-inflamatórias importantes ao processo inflamatório crónico foram reduzidas, tais como o TNF- $\alpha$  e o RANTES. A redução verificada pela administração do extracto aquoso de *C. citratus* evidencia, pois, o seu potencial anti-inflamatório. Contudo, como já referido, o mesmo extracto parece estimular a síntese das isoformas da IL-1 – citocinas pró-inflamatórias de grande importância nestes estudos, já que a principal característica se prende com a indução da síntese de outras citocinas pró-inflamatórias.

A presença das citocinas anti-inflamatórias no foco agredido foi igualmente inibida, entre elas a IL-10. A “anti-citocina” é uma proteína anti-inflamatória e imunossupressora, devido essencialmente à actividade inibidora para com a síntese de outras citocinas (Meager *et al.*, 2007; Shaikh, 2011). Comparando os níveis destas citocinas anti-inflamatórias – IL-4, IL-10 e IL-13 – e os valores encontrados nos animais sob tratamento com os fármacos padrão utilizados, pode-se verificar que, apesar de não se confirmar com o *C. citratus* um efeito semelhante ao da dexametasona, que aumenta os níveis da IL-4 e da IL-13, também não se verificou uma diminuição tão acentuada como a que se verificou para a indometacina, o que sugere um maior efeito protector do *C. citratus* em comparação com os AINEs.

Com já referido, os valores obtidos para o nível percentual de citocinas no granuloma foram ainda analisados pela comparação com dois grupos controlos positivos – indometacina (1 mg/Kg) e dexametasona (2,5 mg/Kg). Estes dois fármacos foram escolhidos porque a sua acção no modelo *in vivo* de inflamação crónica está descrita: num processo inflamatório crónico granulomatoso, induzido por *cotton pellet*, tanto a indometacina como a dexametasona exercem os seus efeitos anti-inflamatórios, maioritariamente pela inibição do desenvolvimento do granuloma ao suprimirem a infiltração celular (Bailey *et al.*, 1982). A indometacina é um AINE bem conhecido, cuja acção anti-inflamatória está comprovada por inibirem a via das COX. Contudo, estes intervêm também, embora indirectamente, ao nível de outros mecanismos inflamatórios, nomeadamente na síntese de certas citocinas (Rang *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2013). De facto, a IL-1 $\beta$  induz a síntese de PGE<sub>2</sub>, que por sua vez estimula a libertação da IL-6 e IL-10 (Bour *et al.*, 2000). Como seria de esperar, estas duas citocinas foram as mais afectadas por parte da indometacina. Já a dexametasona é um glucocorticóide amplamente utilizado em episódios de inflamação crónica, prendendo-se o seu mecanismo de acção com uma vastidão de redes biológicas. O seu efeito no nível de citocinas está dependente da natureza da proteína, ou seja, é inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias mas estimulador da produção das anti-inflamatórias (Barnes, 2010). Os resultados obtidos revelam esta tendência.

Os resultados obtidos no presente estudo são consistentes com os obtidos por Tiwari e seus colaboradores (2010), Bachiega e seus colaboradores (2011) e Francisco e seus colaboradores (2013), mas totalmente inconsistentes com Sforcin e seus colaboradores (2009).

Neste último, Sforcin e seus colaboradores (2009) observaram que o tratamento de ratinhos com o extracto aquoso do *C. citratus* inibia a produção *ex vivo* de IL-1 $\beta$  pelos macrófagos mas induzia a produção de IL-6 por estas células. Contudo, no mesmo laboratório em 2011, Bachiega e seus colaboradores investigaram o efeito do extracto aquoso do *C. citratus* na produção das mesmas citocinas IL-1 $\beta$ , L-6 e ainda da IL-10, por macrófagos de ratinho *in vitro*. Após estímulo inflamatório por LPS, o extracto de *C. citratus* diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória IL-6, bem como da anti-inflamatória IL-10. No mesmo estudo, os níveis basais de IL-1 $\beta$  aumentaram com baixas concentrações de extracto, enquanto que a concentração mais alta não afectou significativamente a sua produção.

Os resultados de Francisco e seus colaboradores (2013) estão em conformidade com este trabalho no que toca à produção das importantes citocinas TNF- $\alpha$  e RANTES. Tal como os deste trabalho, os níveis destas citocinas, produzidas *in vitro* por macrófagos humanos perante estímulos inflamatórios, diminuem com a administração do extracto de *C. citratus*. Tiwari e os seus colaboradores (2010) obtiveram, em semelhança, uma redução no mediador TNF- $\alpha$ , quando trataram macrófagos alveolares de ratinho, inflamatóriamente estimulados, com um extracto alcoólico de *C. citratus*.

Para validar a prática da medicina tradicional, uma das análises mais relevante prende-se com os resultados histológicos. As imagens obtidas (Figuras 22 e 23) mostram uma aparência de órgãos saudáveis nos animais tratados quando comparados com o controlo negativo. Os hepatócitos, bem como as células renais, apresentam morfologia normal, sem sinais de necrose ou estase – marcadores de toxicidade, tanto a nível hepático como renal. Esta análise histológica ao fígado (órgão metabólico) e ao rim (órgão excretor) sugere a inexistência de citotoxicidade por parte do extracto aquoso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. quando administrada em toma crónica.

Recentes investigações reforçam a importância de plantas medicinais, vegetais, frutas e outros extractos naturais como potenciais compostos activos na medicina alternativa ou complementar, no tratamento de uma variedade de patologias (Tiwari *et al.*, 2010).

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho vem, por isso, juntar-se aos parâmetros que evidenciam a actividade anti-inflamatória do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.

Contudo, este trabalho não só vem sugerir um bom uso terapêutico desta espécie como também a sua segurança. Esta ficou comprovada pela análise histológica realizada, que demonstrou que, mesmo com a toma crónica administrada (duas vezes ao dia, durante os cinco dias de tratamento) não traz consequências citotóxicas para os animais.

Farmacologicamente, este trabalho veio comprovar o largo efeito imunomodulador desempenhado pelo *C. citratus*, pois este foi responsável não só pela inibição de um elevado leque de citocinas – em particular da IL-6 – como também evidenciou um efeito protector em comparação com os AINEs, no que às citocinas anti-inflamatórias. Contudo, é de ressaltar a dificuldade deste tipo de estudos que envolvem estas proteínas. Além da redundância funcional e pleiotropismo associado, as citocinas são caracterizadas por actuarem numa rede biológica intensa, onde fenómenos de sinergismo, antagonismo, regulação positiva e negativa têm lugar (Wilson *et al.*, 2009). Tudo isto torna difícil uma avaliação conclusiva, quando é feita uma análise individual das citocinas.

Uma das grandes questões à volta desta espécie recai sobre o mecanismo de acção desencadeado pelo *Cymbopogon citratus* para atingir o seu efeito terapêutico. Apesar de algumas incoerências nos resultados, este estudo sugere que o mecanismo anti-inflamatório do *C. citratus* esteja, maioritariamente, associado a acções dos seus compostos não voláteis na via de sinalização do NF- $\kappa$ B. Este aspecto foi suportado recentemente pela literatura, onde já há evidências concretas que as propriedades anti-inflamatórias do *C. citratus* ocorrem pela inibição do proteossoma – complexo proteico responsável pela degradação do I $\kappa$ B – estrutura envolvida na via do NF- $\kappa$ B, que reflecte a não expressão de várias citocinas (Francisco *et al.*, 2013).

O NF- $\kappa$ B é um dos principais factores de transcrição induzíveis, com um papel essencial nas respostas inflamatórias de carácter crónico (Bremner *et al.*, 2002). No entanto, a complexidade do seu mecanismo leva a uma imensidão de alvos, onde agentes inibitórios podem actuar: degradação do I $\kappa$ B, a nível do complexo IKK, na translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e ainda na sua ligação ao DNA (Bremner *et al.*, 2002). Contudo, tanto o potencial imunomodulador isolado, como o relacionado com a

actividade anti-inflamatória do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., devem ainda ser explorados futuramente, de modo a obter um conhecimento mais aprofundado sobre essas características.



# **Capítulo 6**

## **Conclusões**

O presente trabalho de investigação, o qual se propôs a avaliar a actividade anti-inflamatória do infuso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. em modelo *in vivo* de inflamação crónica, permite agora concluir que:

1. O extracto aquoso de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. aparenta possuir actividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação crónica;
2. Esta actividade farmacológica parece estar dependente, pelo menos em parte, do efeito imunomodulador desempenhado pelo extracto;
3. O efeito imunomodulador e, conseqüentemente, anti-inflamatório, poderão estar associados à via do NF- $\kappa$ B num processo crónico;
4. O extracto aquoso de *C. citratus*, mesmo em dose crónica, não mostrou ser citotóxico.

Este trabalho permite, assim, dar um importante passo no “imenso mundo” que poderá ser a relação *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf./processo inflamatório crónico. De facto, os resultados obtidos neste estudo permitem edificar uma base condutora a investigações futuras com o intuito da total confirmação do efeito aqui verificado, bem como os compostos não voláteis que se encontram na base desta propriedade terapêutica.

**Capítulo 7**  
**Referências bibliográficas**

- Agostini-Costa T., Vieira R., Bizzo H., Silveira D., Gimenes M. (2012). *Secondary metabolites*. Chromatography and its applications, Dr. Sasikumar Dhanarasu (Ed.).
- Ahmed S., Anuntiyo J., Malemud C., Haqqi T. (2005). Biological basis for the use of Botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *eBCAM*, 2(3):301-308.
- Akira S., Takeda K. (2004). Toll-like receptor signaling, *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.
- Asaolu M., Oyeyemi O., Olanlokun J. (2009). Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus*. *Pak J Nutr*, 8 (12), 1920-1922.
- Bachiega T., Sforcin J. (2011). Lemongrass and citral effect on cytokines production by murine macrophages. *J Ethnopharmacol*, 137, 909-913.
- Bailey P., Sturm A., Lopez-Ramos B. (1982). A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. *Biochem Pharmacol*, 31 (7), 1213-1218.
- Barbosa L., Pereira U., Martinazzo A., Maltha C., Teixeira R., Melo E. (2008). Evaluation of the chemical composition of Brazilian comercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. *Molecules*, 13, 1864-1874.
- Barnes P. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci*, 94, 557-572.
- Barnes P. (2010). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 120, 76-85.
- Barreto R., Franco E., Brasileiro C., de Oliveira A., Dimech G., Malta D., Cazuzu J., Leite A., da Silva T., Maia M. (2012). Early undernutrition is associated with attenuated inflammatory response and alteration in pharmacological efficacy of indomethacin in rats. *Eur J Pharm Sci*, 46, 56-63.
- Bassolé I., Lamien-Meda A., Bayala B., Obame L., Iiboudo A., Franz C., Novak J., Nebié R., Dicko M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18 (12), 1070-1074.
- Baud V., Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11 (9), 372-377.
- Beg S., Swain S., Hasan H., Barkat M., Hussain Md. (2011). Systemic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspective. *Pharmacogn Rev*, 5 (10), 120-137.

- Bour A., Westendorp R., Laterveer J., Bollen E., Remarque E. (2000). Interaction of indomethacin with cytokine production in whole blood. Potential mechanism for brain-protective effect. *Exp Gerontol*, 35 (8), 1017-1024.
- Brauschädel M., Boschert V., Krippner-Heidenreich A. (2007). Tumor necrosis factors. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-12.
- Bravo J., Heath J. (2000). Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J*, 19 (11), 2399-2411.
- Bremner P., Heinrich M. (2002). Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *J Pharm Pharmacol*, 54, 453-472.
- Carlini E., Contar J., Silva-Filho A., Silveira-Filho N., Frochtengarten M., Bueno O. (1986). Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J Ethnopharmacol*, 17, 37-64.
- Chapman K., Coutinho A., Zhang Z., Kipari T. (2013). Changing glucocorticoid action: 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Cheel J., Theoduloz C., Rodríguez J., Schmeda-Hirschmenn G. (2005). Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agricult Food Chem*, 53 (7), 2511-2517.
- Chensue S. (2013). Chemokines in innate and adaptative granuloma formation. *Front Immunol*, 4 (43), 1-9.
- Corwin E. (2008). *Handbook of pathophysiology*, 3<sup>rd</sup> Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Cotran R., Kumar V., Collins T. (1999). *Robbins, Pathologic Basis of Disease*. 6<sup>th</sup> Edition, Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Croizer A., Jaganath I., Clifford M. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*, 26, 1001-1043.
- Cunha A. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- De Bosscher K., Berghe W., Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- $\kappa$ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr rev*, 24 (4), 488-522.
- Dinarello C. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 20 (27), S1-S13.

- Dinareello C. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev of Immunol*, 27, 519-550.
- Drexler S., Foxwell B. (2010). The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 506-518.
- EUFDA (2005). Guidance for Industry- Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics on adult healthy volunteers. *U S Food and Drug Administration*.
- Feghali C., Wright T. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci*, 2, 12-26.
- Ferreira J. (2011). Avaliação in vivo das actividades anti-inflamatória e analgésica de uma fracção enriquecida em proantocianidinas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Tese de Mestrado.
- Figueirinha A., Paranhos A., Pérez-Alonso J., Santos-Buelga C., Batista M. T. (2008). *Cymbopogon citratus* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem*, 110, 718-728.
- Figueirinha A., Cruz M., Francisco V., Lopes M., Batista M. (2010). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *J Med Food*, 13 (3), 681-690.
- Foster D., Parrish-Novak J., Fox B., Xu W. (2004). Cytokine-receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 160-170.
- Francisco V., Figueirinha A., Neves B., García-Rodríguez C., Lopes M., Cruz M., Batista M. (2011). *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Ethnopharmacol*, 133, 818-827.
- Francisco V., Costa G., Figueirinha A., Marques C., Pereira P., Neves B., Lopes M., García-Rodríguez C., Cruz M., Batista M. (2013). Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- $\kappa$ B pathway inhibition: Contribution of chlorogenic acid. *J Ethnopharmacol*.
- Gabay C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther*, 8(2), S3.
- Garcia R. (2010). Avaliação da actividade anti-inflamatória e analgésica do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. em modelos experimentais *in vivo*. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra. Tese de Mestrado.

- Garcia R., Ferreira J., Costa G., Santos T., Branco F., Caramona M., de Carvalho R., Dinis A., Batista T., Castel-Branco M., Figueiredo I. (2013). Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf leaves infusion on *in vivo* models – polyphenols contribution. Artigo submetido.
- Guimarães S., Moura D., da Silva P. *et al.* (2006). *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas - Manual de farmacologia e farmacoterapia*. 5ª Edição. Porto, Porto Editora.
- Haddad J., Abdel-Karim N. (2011). NF- $\kappa$ B cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: Therapeutic pattern or pseudoregulation. *Cell Immunol*, 271, 5-14.
- Huang Y., Erdmann N., Hexum T., Zheng J. (2008). Cytokines and chemokines. *J Neuroimmune Pharmacol*, 15, 183-205.
- Juan M., Colobran R. (2009). Chemokines and chemokine receptors. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-11.
- Kasali, A., Oyedeji A., Ashilokun A. (2001). Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. *Flavour Frag J*, 16 (5), 377-278.
- Koelink P., Overbeek A., Braber S., de Kruijf P., Folkerts G., Smit M., Kraneveld A. (2012). Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: An extensive review. *Pharmacol Ther*, 133, 1-18.
- Kotenko S., Pestka, S. (2000). Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes. *Oncogene*, 19, 2557-2565.
- Kumar V., Abbas A., Fausto N. (2005). *Robbins e Cotran, Patologia-Bases Patológicas das Doenças*. Tradução da 7ª Edição. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Kumar V., Abbas A., Fausto N., Aster J. (2010b). *Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease*. 8ª Edição, Philadelphia, W. B. Saunders Company.
- Kumar R., Wakefield D. (2010a). Inflammation: Chronic. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS) - John Wiley & Sons*, 1-7
- Lamoureux J., Bradley D. (2007). Inflammatory mediators. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-5.
- Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF- $\kappa$ B Pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, 1-10.

- Lee P., Li Y., Kumagai Y., Xu Y., Wwinstein J., Kellner E., Nacionales D., Butfiloski E., Rooijen N., Akira S., Sobel E., Satoh M., Reeves W. (2009). Type I Interferon Modulates Monocyte Recruitment and Maturation in Chronic Inflammation. *Am J Pathol*, 175 (5), 2023-2033.
- Liongue C., Ward A. (2007). Evolution of class I cytokine receptors. *BMC Evol Biol*, 7 (120).
- Luheshi (1996). Cytokines and fever – Mechanisms and sites of action. *Int Arch Allergy Immunol*, 109 (4), 301-307.
- Meager A., Wadhwa M. (2007). Interleukins. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-19.
- Miranda C., Maier C. Stevens J. (2012). Flavonoids. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-13.
- Mythreyi R., Sasikala E., Geetha A., Madhavan V. (2008). Antipyretic activity of leaves of *Cadaba fruticosa* (L.) Druce. *Pharmacologyonline*, 3, 136-142.
- Nagar A., Shukla A., Bigoniya, P. (2011). Anti-inflammatory potential of *Spinacia oleracea* leaf extract, *J Nat Pharm*, 2, 80-87.
- Negrelle R., Gomes E. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.: chemical composition and biological activities. *Rev Bras Pl Med*, 9(1), 80-92.
- Novoselova E., Lunin S., Novoselova T., Khrenov M., Glushkova O., Avkhacheva N., Safronova V., Fesenko E. (2009). Naturally occurring antioxidant nutrients reduce inflammatory response in mice. *Eur J Pharmacol*, 615 (1-3), 234-240.
- Nowak T., Handford A. (2004). *Pathophysiology – Concepts and Applications for Health Care Professionals*. 3<sup>rd</sup> Edition, McGraw-Hill.
- Nyireddy S. (2004). Separation strategies of plant constituents - current status. *J Chromatogr B*, 812, 35-51.
- Orlando R., Gonzales A., Hunsaker L., Franco C., Royer R., Jagt D., Jagt D. (2010). Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression by aqueous extracts of hispanic medicinal herbs. *J Med Food*, 13 (4), 888-895.
- Paschapur M., Patil M., Kumar R., Patil S. (2009). Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) in experimental animals. *J Med Plants Res*, 3(2), 49-54.
- Pinto A. (2009). *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações*. Lisboa, LIDEL.



- Portaria 1005/92 de 23 de Outubro. *Diário da República n°245/92 – I Série*. Ministério da Agricultura, da Educação, da Saúde e do Comércio e Turismo. Lisboa.
- Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. (2007). *Farmacologia*. Tradução da 6ª Edição. Elsevier.
- Rhen T., Cidlowski J. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 353, 1711-23.
- Roy S., Bagchi D., Raychaudhuri S. (2013). *Chronic inflammation - Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions*. Florida, CRC Press.
- Schaneberg B., Khan I. (2002). Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. *J Agricult Food Chem*, 50 (6), 1345-1349.
- Schindler C., Levy D., Decker T. (2007). JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem*, 282 (28), 20059-20063.
- Seta F., Bachschmid M. (2012). Cyclooxygenase pathway of the arachidonate cascade. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-12.
- Sforcin J., Amaral J., Fernandes Jr A., Sousa J., Bastos J. (2009). Lemongrass effects on IL-1 $\beta$  and IL-6 production by macrophages. *Nat Prod Res*, 23 (12), 1151-1159.
- Shah G., Shri R., Panchal V., Sharma N., Singh B., Mann A. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemongrass). *J Adv Pharm Technol Res.*, 2 (1), 3-8.
- Shaikh P. (2011). Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *Int J of Pharm & Life Sci*, 2 (11), 1247-1263.
- Smoak K., Cidlowski A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, 125, 697-706.
- Spector W. G. (1989). *An Introduction to General Pathology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Michigan, Churchill Livingstone.
- Suralkar A., Sarda P., Ghaisas M., Thakare V., Deshpande A. (2008). In Vivo Animal Models for Evaluation of Anti-Inflammatory Activity. *Latest Reviews*, 6 (2).
- Tavares A., Zuzarte M., Salgueiro L. (2009). *Plantas - Aromáticas e Medicinais*, Escola Médica do Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra.

- Tiwari M., Dwivedi U., Kakkar P. (2010). Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* DC. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages, *Food Chem Toxicol*, 48, 2913-2919.
- Tomazetti J., Ávila D., Ferreira A., Martins J., Souza F., Royer C., Rubin M., Oliveira M., Bonacorso H., Martins M., Zanatta N., Mello C. (2005), Baker yeast-induced fever in young rats: Characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Meth*, 147, 29-35.
- Underwood J., Cross S. (2009) *General and Systematic Pathology*. 5<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone/Elsevier.
- Uzkeser H., Cadirci E., Halici Z., Odabasoglu F., Polat B., Yuksel T., Ozaltin S., Atalay F. (2012). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of salbutamol on acute and chronic models of inflammation in rats: involvement of an antioxidant mechanism. *Mediat Inflamm*, 2012, 1-10.
- Vane J., Botting R. (1998). Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, 104 (3A), 2S-8S.
- Victoria S., Das S., Lahlhenmawia H., Phuoco L., Shantabi L. (2012). Study of analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of the leaves of *Thunbergia coccinea* Wall. *IAMURE*, 2( 2), 83-88.
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 10, 45-65.
- Wang X., Lupardus P., LaPorte S., Garcia K. (2009) Structural biology of shared cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*, 27, 29-60.
- Wilson H., Barker R. (2009). Cytokines. *Encyclopedia of Life Sciences - John Wiley & Sons*, 1-7.
- Winter C., Porter C. (1957). Effect of alterations in side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocortisone esters. *J Am Pharm Assoc*, 46 (9), 515-519.
- Wojcikowshi K., Bobe G. (2013). Animal studies on medicinal herbs: Predictability, dose conversion and potential value. *Phytother Res*, (wileyonlinelibrary.com).
- Wu Y., Zhou C., Song L., Li X., Shi S., Mo J., Chen H., Bai H., Wu X., Zhao J., Zhang R., Hao X., Sun H., Zhao Y. (2006). Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol*, 108, 243-250.

Zlotnik A., Yoshie O. (2012). The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36, 705-716.