

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DA BRAILINA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO E ASMA**

RENAN FERNANDES DO ESPÍRITO SANTO

**Salvador - Bahia
2021**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DA BRILINA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO E ASMA**

RENAN FERNANDES DO ESPÍRITO SANTO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga

**Salvador - Bahia
2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

E77c Espírito Santo, Renan Fernandes do

Caracterização farmacológica pré-clínica da brailina em modelos experimentais de inflamação e asma. / Renan Fernandes do Espírito Santo. _ Salvador, 2021.

92 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Imunomodulação. 2. Brailina. 3. Asma. I. Título.

CDU 615

"CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DA BRILINA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO E ASMA"

RENAN FERNANDES DO ESPÍRITO SANTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 11 de março de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

André Luiz Santos São Pedro

Dr. André Luiz Santos São Pedro
Pesquisador
CRISTÁLIA

Ryan dos Santos Costa

Dr. Ryan dos Santos Costa
Professor Adjunto
UFBA

Daniel Pereira Bezerra

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
Fundação de Amparo a Pesquisas do estado da Bahia (FAPESB).

Dedico este trabalho a todos que acreditam na ciência e na educação como formas de transformar o mundo e melhorar a vida das pessoas.

AGRADECIMENTOS

É impossível não agradecer primeiramente a Deus pela força que me deu ao longo desta caminhada, mesmo quando eu achava não mais possuí-la e pelas pessoas maravilhosas que colocou na minha vida.

Também agradeço à minha esposa Laís pela paciência, carinho, cuidado e todo amor de sempre, só nós sabemos o quão difícil foi chegarmos até aqui.

Obrigado ao meu filho Alexandre que nem nasceu ainda e já me enche de coragem para acordar a cada dia e enfrentar as dificuldades da vida para que o mundo seja seu. Espero que um dia você leia este trabalho e tenha certeza cada vez mais do que eu te falei todos os dias: te amo muito.

Agradeço aos meus pais Raul e Cida pelos incontáveis sacrifícios realizados ao longo da minha vida para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos. Será que posso parar de estudar agora pai? Promessa cumprida?

À professora Cristiane Villarreal, que eu considero muito mais do que uma orientadora, é uma mãe para mim, uma amiga, uma confidente. É impossível existir alguém que chegue perto da influência da senhora na minha vida acadêmica, pessoal e profissional. E eu sou muito grato, por estes longos 9 anos de parceria de sucesso.

Ao professor Alexandre do Espírito Santo, que foi a minha primeira inspiração acadêmica no início da faculdade e me abriu as portas da pesquisa para que eu pudesse descobrir meu sonho de ser professor.

Muito obrigado professor Eudes Veloso, pela oportunidade de recriarmos um vínculo de amizade depois de um início bem conturbado. Isso só demonstra o tamanho do ser humano que o senhor é. Saudades das conversas científicas ou não, receba com imenso carinho esta simples homenagem.

Agradeço à Dra. Milena Soares pela atenção, disponibilidade e preocupação em meio às suas infinitas atividades. Admiro muito a sua inteligência, senso de justiça e coragem que pude desfrutar nos últimos anos.

Ao professor Fábio Formiga pelo acolhimento em seu laboratório e colaboração na co-orientação deste trabalho.

Ao Dr. Diogo Moreira pelos incontáveis momentos agradáveis que compartilhamos por muito tempo e pelas provocações científicas que sempre vinham acompanhadas com seu humor característico.

Meu amigo Cassinho, muito obrigado por sempre ser tão gentil, solícito, paciente e parceiro.

Não existe uma pessoa no mundo com o tamanho do seu coração e você separou um pedacinho dele para me guardar. Sou muito grato por isso. Você é uma lenda meu irmão.

Ao Brenão, que eu considero um irmão mais novo e me abraçou como um companheiro para todos os momentos. Mesmo nos meus piores dias, ele sempre queria saber como e onde eu estava. Muito obrigado pelo carinho.

Sou grato ao Rafael Costa e ao Lucas Abreu, essa dupla que mesmo longe fisicamente um do outro serão para sempre inseparáveis. Meus manos, vocês foram combustíveis para o meu desenvolvimento e eu sinto muita falta disso. Torcer pelo sucesso de vocês é mais fácil do que torcer pelo Palmeiras.

Ao mestre Iura, por me brindar com sua infinita sabedoria, gosto musical refinado e amizade.

À Mari Borges pela amizade que transcendeu ao ambiente laboral e de uma forma espontânea e inevitável se tornou uma pessoa que me fez muito bem e atualmente faz muita falta no meu dia-a-dia.

Obrigado Carolzinha, Lene, Sarinha e Rômulo que sabe Deus como, conseguimos formar um grupo de amigos inacreditáveis, uma família de praia. Que este momento de afastamento acabe logo porque quero estar com vocês o mais rápido possível.

Também agradeço à Jéssica Vieira por sempre se colocar disposta a conversar e ouvir meus desabafos, decepções e frustrações acadêmicas e me entender de uma forma ímpar. Somos guerreiros e vamos vencer.

Wagno, Flávia Lima, Flavinha, Afrânio, Olívia, Luíza, Pedro, Letícia, Anna Lethícia, Gisele, Dourivaldo, Gessica e Diego, meus companheiros de LAFTE. Muito obrigado por terem feito parte da minha vida, da minha história e contribuído para a minha construção como ser humano e pesquisador.

Um obrigado especial aos meus amigos de vida Vítor Sousa e Fabrício Meireles, irmãos de coração que me fazem feliz, me inspiram e me ajudaram a terminar este ciclo trazendo leveza aos meus dias.

Agradeço também a todos os alunos que tive a oportunidade de compartilhar conhecimento ao longo destes anos pelos ensinamentos que me proporcionaram.

Um abraço especial a ex-coordenadora do PgBSMI, Professora Theolis Bessa e a atual Deborah Fraga pela compreensão e atenção, estendendo-o à secretária Simone Farias.

“[...] ela me disse: “Filho, você irá longe na vida. Se fizer isso certo, amarás o lugar onde está. Apenas saiba, onde quer que vá, Você sempre pode voltar para casa [...]”

“[...] ele me disse: “Filho, às vezes pode parecer escuro. Mas a ausência de luz é uma parte necessária. Apenas saiba, que você nunca estará sozinho. Você sempre pode voltar para casa[...]”

Livre tradução de “93 Million Miles” (**Jason Mraz**).

ESPÍRITO SANTO, Renan Fernandes do. **Caracterização farmacológica pré-clínica da brailina em modelos experimentais de inflamação e asma**. 2021. 92 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021

RESUMO

A inflamação é um quadro patológico resultante de um conjunto de ações do organismo em resposta a agentes irritantes ou causadores de lesão tecidual; esse quadro pode levar à perda da função do órgão afetado. Entre as diversas doenças inflamatórias respiratórias crônicas, a asma é um importante problema de saúde pública que afeta 334 milhões de pessoas no mundo e mata cerca de 5 pessoas diariamente. O tratamento da asma é baseado na utilização de agonistas β 2-adrenérgicos, glicocorticoides e inibidores de fosfodiesterase 4. No entanto, os efeitos adversos a esses medicamentos, sobretudo mediante uso crônico, são as principais limitações terapêuticas enfrentadas pelos pacientes. Os produtos naturais são fontes de moléculas bioativas amplamente empregados no desenvolvimento de novos fármacos; seu uso histórico permanece relevante nos dias atuais. A brailina, uma cumarina natural, apresenta consistentes propriedades anti-inflamatórias associadas a mecanismos que sugerem seu potencial no controle da asma. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial terapêutico da brailina em modelo murino de asma, bem como seu mecanismo imunomodulador. A atividade imunomoduladora da brailina foi avaliada em cultura de macrófagos estimulados com LPS+INF γ quantificando-se os níveis de nitrito, IL-1 β , TNF- α e IL-6. O mecanismo de ação foi investigado pela inibição farmacológica do efeito da brailina pelo antagonista glicocorticoide (RU-486) e por análise *in silico* de acoplamento molecular. A atividade da brailina por via inalatória foi determinada em modelo experimental de asma induzida por ovalbumina em camundongos C57BL/6 BALB/c, machos, 20-25 g (CEUA/FIOCRUZ/L-IGM-015/2013). Foram realizadas as contagens total e diferencial de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA), quantificação de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), avaliação do filtrado inflamatório e da produção de muco pelas células caliciformes. Em ensaios *in vitro*, a brailina exibiu atividade supressora dependente da concentração em macrófagos ativadas. Brailina (10–40 μ M) reduziu a produção de nitrito, IL-1 β , TNF- α e IL-6 em células J774 e em macrófagos de exsudato peritoneal estimulados com LPS e IFN- γ ($p < 0,05$). Resultados do acoplamento molecular sugeriram que a brailina apresenta uma pose de interação para atuar como um ligante do receptor de glicocorticoide. Corroborando essa ideia, o efeito inibitório da brailina sobre os macrófagos foi prevenido pelo RU486, um antagonista do receptor de glicocorticoide ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento com brailina reduziu fortemente a atividade transcricional dependente de NF- κ B em células RAW 264.7 ($p < 0,05$). A administração inalatória de brailina (50mg/Kg) reduziu a celularidade total no LBA em 45,32% e reduziu a quantidade de neutrófilos e eosinófilos em relação ao tratamento com veículo ($p < 0,05$); esses efeitos foram similares aos da administração sistêmica de dexametasona (30mg/kg, padrão ouro). A liberação de citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) também foi reduzida nos animais tratados com brailina ou dexametasona ($p < 0,05$). No tecido pulmonar, a brailina e a dexametasona reduziram o infiltrado de células inflamatórias e diminuíram a produção de muco em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Em conclusão, a brailina promoveu uma importante atividade imunomoduladora em macrófagos via receptor glicocorticoide; ademais, o tratamento inalatório com brailina reduziu diferentes parâmetros da asma experimental em camundongos, indicando que este composto tem potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle da asma.

Palavras-chave: Imunomodulação. Brailina. Asma.

ESPÍRITO SANTO, Renan Fernandes do. **Preclinical pharmacological characterization of braylin in experimental models of inflammation and asthma**. 2021. 101 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021

ABSTRACT

Inflammation is a pathological condition that results from a set of reactions from the organism to irritant or damaging agents; this condition can lead to the loss of function of the affected organ. Among the several chronic inflammatory disorders of the airways, asthma is a serious public health issue that affects 334 million people worldwide, killing approximately 5 people daily. The treatment of asthma is based on β 2-adrenergic agonists, glucocorticoids, and phosphodiesterase-4 inhibitors. However, the adverse effects of these drugs are a major therapeutic limitation faced by patients, specially after chronic exposure. Natural products are rich sources of bioactive molecules widely used in the development of new drugs; their historical use is still currently relevant. Braylin, a natural coumarin, has consistent anti-inflammatory properties associated with mechanisms that indicate its potential in the treatment of asthma. Therefore, the aim of this study was to investigate the therapeutical potential of braylin in a murine model of asthma, as well as its immunomodulatory mechanism. The immunomodulatory action of braylin was evaluated in cultivated macrophages stimulated with LPS+INF γ by quantifying the levels of nitrite, IL-1 β , TNF- α , and IL-6. The mechanism of action was investigated by the pharmacological inhibition of braylin's effect by the glucocorticoid antagonist (RU-486) and by *in silico* analysis of molecular docking. The effect of braylin by inhalation route was determined in an experimental ovalbumin-induced model of asthma in male BALB/c mice weighting 20-25 g (permit number CEUA/FIOCRUZ/L- IGM-015/2013). Total and differential counts of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) were performed, along with quantification of cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13), evaluation of the inflammatory filtrate, and evaluation of mucus production by goblet cells. In *in vitro* assays, braylin exhibited concentration-dependent suppressive activity on activated macrophages. Braylin (10–40 μ M) reduced the production of nitrite, IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in J774 cells and in macrophages from peritoneal exudate stimulated with LPS and IFN- γ ($p < 0.05$). The results from molecular docking suggested that braylin presents an interaction pose to act as a ligand of glucocorticoid receptor. Corroborating this idea, the inhibitory effect of braylin on macrophages was prevented by RU486, a glucocorticoid receptor antagonist ($p < 0.05$). Moreover, the treatment with braylin strongly reduced NF- κ B-dependent transcriptional activity in RAW 264.7 cells ($p < 0.05$). The inhalation of braylin (50 mg/kg) reduced the total cellularity in BAL by 45.32% and reduced the number of neutrophils and eosinophils when compared to vehicle-treated mice ($p < 0.05$); these effects were similar to those induced by systemic dexamethasone (30 mg/kg, reference drug). The release of Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) was also reduced in animals treated with braylin or dexamethasone ($p < 0.05$). In the pulmonary tissue, both braylin and dexamethasone reduced the inflammatory cells infiltrate and decreased mucus production when compared to the control group ($p < 0.05$). In conclusion, braylin promoted a significant immunomodulatory activity on macrophages via glucocorticoid receptors; moreover, the inhalation treatment with braylin reduced different parameters of experimental asthma in mice, indicating that this compound has a potential for the development of new drugs for asthma control.

Keywords: Immunomodulation. Braylin. Asthma.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	INFLAMAÇÃO E CITOCINAS	15
2.2	ASMA	16
2.2.1	Epidemiologia	16
2.2.2	Patogênese	17
2.2.3	Tratamento	19
2.3	UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	RESULTADOS	25
4.1	ARTIGO 1 - THE ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF BRAYLIN: PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND MECHANISMS BY IN SILICO, IN VITRO AND IN VIVO APPROACHES	25
4.2	ARTIGO 2 - ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA BRILINA EM MODELO DE ASMA INDUZIDA POR OVALBUMINA	45
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Inflamação é uma resposta protetora do corpo contra condições nocivas e interrupção da integridade tecidual. Entretanto, o resultado deste mecanismo de defesa pode ser prejudicial quando evolui para estados de inflamação crônica, favorecendo ao desenvolvimento de doenças graves como aterosclerose, câncer, asma, entre outras (OKIN; MEDZHITOV, 2012; ROIFMAN et al., 2011).

A asma é considerada um problema de saúde pública mundial, que afeta populações de todo o planeta, sendo considerada a 14ª mais importante doença no mundo em termos de extensão e persistência da incapacitação. Apenas no Brasil, ocorrem cerca de 5 óbitos por dia e mais de 120.00 hospitalizações/ano decorrentes da asma levando a um gasto de 170 milhões de dólares a cada ano.

A farmacoterapia atual das doenças inflamatórias é baseada nos anti- inflamatórios não esteroidais e glicocorticoides. O tratamento adequado das desordens inflamatórias deve ser capaz de controlar a inflamação, prevenindo danos aos tecidos e alcançando remissão da doença. Entretanto, os tratamentos disponíveis não atendem plenamente essa demanda, exibindo limitações de eficácia e apresentando efeitos adversos. Esse panorama é ainda mais crítico para as condições crônicas, como a asma, pois o uso prolongado dos glicocorticoides é associado a efeitos adversos graves, que limitam a adesão do paciente ao medicamento aumentando as taxas de hospitalização (DAUGHERTY et al., 2018; HUSCHER et al., 2009). Esse panorama torna evidente a demanda por estudos focados no desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e com menos efeitos adversos para o tratamento das doenças inflamatórias e asma.

Produtos naturais são fontes relevantes de moléculas com atividade anti- inflamatória e imunomoduladora. Essas atividades puderam ser observadas em inúmeras classes químicas como: alcaloides (WATZL, 2008), glicosídeos (CHEENPRACHA et al., 2010) , flavonoides (KIM et al. , 2004), óleos essenciais (MIGUEL, 2010) e cumarinas (FYLAKTAKIDOU et al., 2004) que apresentaram diferentes vias de modulação da resposta inflamatória e imune (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016). A brailina que é uma molécula da classe das cumarinas apresenta algumas atividades farmacológicas á descritas: anti-agregante plaquetária, vaso relaxante, anti-HIV, e inibidora de fosfodiesterase 4, onde a inibição da fosfodiesterase 4 foi demonstrada em um ensaio in vitro junto com 21 outras cumarinas, todas de origem natural (TSAI et al., 1997; RAKOTOARISON et al., 2003; XIE et al., 1999; LIN et al., 2014). Considerando que inibidores da fosfodiesterase 4 vem sendo considerados

promissores no tratamento de doenças inflamatórias e respiratórias, o presente estudo foi delineado para investigar o potencial farmacológico dessa cumarina em modelos experimentais de inflamação e asma. Dados desse estudo podem contribuir para a identificação de moléculas protótipos para o processo de desenvolvimento de novos fármacos voltados ao tratamento da inflamação e asma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO E CITOCINAS

A inflamação foi inicialmente caracterizada com base na observação de seus chamados “sinais cardinais” que são rubor, tumor, calor, dor e perda de função. Os quatro primeiros sinais cardinais de inflamação foram nomeados por Celsus na Roma antiga (30-38 a.C.) e o último por Galeno (130-200 d.C.) (MEDZHITOV, 2010; RATHER, 1971; TRACY, 2006). Mais recentemente a inflamação foi descrita como “uma sucessão de mudanças que ocorre num tecido vivo quando este for danificado, desde que a lesão não seja de tal grau, capaz de destruir sua estrutura e vitalidade” (PUNCHARD; WHELAN; ADCOCK, 2004). Após a ocorrência da lesão tecidual, muitos mediadores químicos são produzidos e liberados pelas células lesadas e por células do sistema imune recrutadas, criando uma “sopa inflamatória” que contém citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, bradicininas, fatores de crescimento do nervo, purinas, aminas, íons e muitos outros (DRAY; URBAN; DICKENSON, 1994; HADDAD, 2007).

O termo citocinas foi proposto por Cohen et al. em 1974 para substituir o termo linfocinas, que caracterizava no final da década de 60 as “proteínas solúveis derivadas de linfócitos que possuíam efeitos imunológicos” (DUMONDE et al., 1969). As citocinas são moléculas pertencentes a um grande grupo de hormônios proteicos não enzimáticos, cujas ações são diversificadas e sobrepostas que atuam em diferentes células-alvo desencadeando respostas e funções fisiológicas (KELSO, 1998). (SHUBAYEV; KATO; MYERS, 2010) ainda acrescenta que as citocinas são proteínas reguladoras liberadas por uma ampla variedade de células com o objetivo de modular interações célula-célula desempenhando funções importantes na dor, inflamação e resposta imune. Estas moléculas participam de quase todos os processos biológicos, como o desenvolvimento embrionário, patogênese de doenças, resposta não específica às infecções, resposta específica à antígenos, alterações nas funções cognitivas e progressão dos processos degenerativos do envelhecimento, ou seja, desde a formação até a morte do indivíduo (DINARELLO, 2018).

Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam tanto por mecanismos parácrinos (células vizinhas) quanto autócrinos (próprias células produtoras) (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). De acordo com Zhang (ZHANG; AN, 2007), diferentes tipos de células podem secretar a mesma citocina, e uma mesma citocina pode atuar em diferentes tipos de células, fenômeno chamado de

pleiotropia. Com frequência, uma citocina estimula as células-alvo a produzirem uma outra citocina, ou modulam sua própria síntese, iniciando um fenômeno em cascata.

Com relação à sua participação nos processos inflamatórios, as citocinas podem ser divididas em pró-inflamatórias como por exemplo, interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), e anti-inflamatórias como interleucina-10 (IL-10), interleucina-13 (IL-13), fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) (DINARELLO, 2018). Durante o curso da inflamação, tanto citocinas pró quanto anti-inflamatórias são produzidas, e o seu balanço determina a magnitude da resposta inflamatória (VERRI et al., 2006). As citocinas anti-inflamatórias modulam os eventos imunes e inflamatórios, inibindo a produção e a atividade das citocinas pró-inflamatórias.

2.2 ASMA

No início da década de 90 a asma era definida como uma síndrome caracterizada por variáveis e reversíveis obstruções das vias aéreas, acompanhadas de um anormal aumento da hiperresponsividade das mesmas à vários estímulos, porém apesar da existência de uma definição, o autor ressalta que ainda não existia uma definição consensual para a doença, devido às diferentes causas, mecanismos e respostas às terapias (BOUSQUET et al., 1990). Com o grande avanço do conhecimento no campo da imunologia, tem sido possível elucidar diversos pontos de interrogação deixados nos anos anteriores e atualmente, de acordo com o National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) a asma é uma doença pulmonar crônica que inflama e contrai as vias aéreas sendo comum observarmos em pacientes asmáticos períodos recorrentes de sibilância, aperto no peito, falta de ar e tosse (NIH, 2007). Já as diretrizes para manejo da asma da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia acrescenta em sua definição que para além da cronicidade e inflamação tecidual na asma existe a participação de muitas células e elementos celulares (SBPT, 2012).

2.2.1 Epidemiologia

A asma entre outras diversas doenças respiratórias crônicas é um importante problema de saúde pública tendo um grande impacto negativo na população (BOUSQUET; GODARD; DAURES, 2005). Os números referentes à prevalência de asma no mundo são impressionantes e de acordo com o Global Asthma Network (2014) afetam 334 milhões de pessoas, sendo a 14^a mais importante doença no mundo em termos de extensão e duração da

incapacidade provocada, além de ser mais difícil o controle em crianças e idosos.

No Brasil, de acordo com Cardoso et al. (2017), em 2013, último ano pesquisado, ocorreram aproximadamente 5 óbitos por dia e mais de 120.000 hospitalizações. A taxa de mortalidade da asma em pacientes hospitalizados é de 0,5% e o tempo de hospitalização gira em torno de 3 dias. Também é importante ressaltar que as hospitalizações referentes à asma geraram um custo ao sistema público de saúde quase 170 milhões de dólares. Sendo que a Bahia é o estado com a maior taxa de hospitalização dentre todos os estados brasileiros, chegando a cerca de 250 por 100.000 habitantes o que daria um gasto de mais de 5 milhões de reais apenas no estado (CARDOSO et al., 2017), talvez este número maior de hospitalizações na Bahia possas atribuído a um programa de tratamento e distribuição de medicamentos para pacientes asmáticos que se tornou referência para o Brasil, resultando em melhora do controle, da qualidade de vida e da renda familiar (FRANCO et al., 2009) e que faz com que a Bahia tenha o menor número de óbitos ligados à asma em todo o Brasil.

Sabe-se também que o gasto com a utilização de serviços de saúde e com medicações gastas dos pacientes asmáticos é o dobro entre pacientes com asma não controlada que entre aqueles com asma controlada, sendo a falta de controle da asma o fator de maior influência na utilização dos serviços de saúde, aumentando os gastos proporcionalmente à gravidade da doença (SBPT, 2012). Com relação ao impacto da asma na renda familiar, atualmente, os gastos chegam à 25% em pacientes de classes menos favorecidas, o que é 20% maior do que a recomendação da Organização Mundial da Saúde que é de esses gastos não ultrapassem 20%.

2.2.2 Patogênese

A asma está associada à resposta imune do tipo Th2, envolvendo eosinofilia, mastocitose e elevação dos níveis de IgE desencadeada por alérgenos (SILVEIRA et al., 2002). O alérgeno quando entra em contato com as células apresentadoras de antígeno, é capturado e processado, permitindo a sua apresentação para linfócitos T CD4+ via MHCII, levando à ativação e à diferenciação destes em linfócitos Th2 (SILVA; VARGAFTIG, 2005). A recirculação de linfócitos entre diferentes superfícies mucosas é um dos componentes mais importantes do sistema imune pois permite que as respostas locais sejam integradas em rede.

Segundo Kumar e colaboradores (2000), a sequência de eventos que desencadeiam a asma, inicia-se com a produção de IgE pelos linfócitos B em resposta à primeira exposição ao antígeno, chamada de sensibilização. Esta produção elevada de IgE é atribuída à interação entre

linfócitos T e B que resulta no amadurecimento dos linfócitos B e na sua diferenciação em células secretoras de anticorpos. Durante a diferenciação, a célula B altera a expressão da classe da cadeia pesada, deixando de ser uma célula produtora de IgM para ser secretora de IgE. A mudança de classe para IgE é dependente das citocinas IL-4 e IL-13 secretadas pelos linfócitos Th2 ativados, que se ligam a seus receptores na superfície dos linfócitos B, desencadeando vias de sinalização intracelular que culminam com a translocação para o núcleo de fatores de transcrição que se ligam ao gene codificante da região constante da cadeia pesada do isotipo IgE (PAGE, 1993). Além desse primeiro sinal, é necessária a interação entre a proteína transmembrana CD40L na superfície dos linfócitos T ativados com o receptor CD40, molécula co-estimulatória dos linfócitos B, para promover um desvio de produção de anticorpos da classe IgM para IgE nos linfócitos B e sua proliferação (MADORE; LAPRISE, 2010).

Durante uma posterior exposição do organismo ao alérgeno, ocorre a ligação cruzada entre o alérgeno-IgE específico e a IgE ligada ao seu receptor Fc de alta afinidade (Fc ϵ) na superfície dos mastócitos e basófilos, ativando-os e causando liberação de mediadores químicos. Além das citocinas IL-4 e IL-13, há o aumento da produção de IL-1, IL-5, IL-8 e de TNF- α (BABU; NUTMAN, 2003; BARNES, 2001).

Entre as múltiplas substâncias liberadas imediatamente ou secretadas logo após a ativação dos mastócitos, incluem-se a histamina, a substância de reação lenta da anafilaxia, substâncias quimiotáticas para eosinófilos e neutrófilos, proteases, heparina e fatores de ativação plaquetária. Esses fatores causam fenômenos como dilatação de vasos sanguíneos locais, atração de eosinófilos e neutrófilos para o local da reação, lesão de tecidos locais pela protease, aumento da permeabilidade capilar e perda de líquidos para os tecidos, e contração de células musculares lisas locais, que, coletivamente, causam o aumento da permeabilidade vascular, broncoconstricção, contração da musculatura lisa, aumento na produção de muco e inflamação local (KELLER; RODRIGUEZ; RUSSO, 2005; PAWANKAR, 1999). O eosinófilo desempenha um papel central na patogênese das doenças alérgicas por ser uma potente célula efetora citotóxica. Este tipo celular possui um reservatório de proteínas básicas, assim como de mediadores lipídicos e radicais de oxigênio, com grande poder de destruição tecidual e parasitário, podendo causar lesão tecidual (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). Sua função é estimulada por mediadores lipídicos e citocinas liberadas por outras células desencadeando eventos que ocorrem tanto na fase aguda quanto na fase tardia da asma, que leva a broncoconstricção, edema e inflamação.

2.2.3 Tratamento

Ao se pensar a respeito do tratamento de um paciente asmático, deve-se levar em consideração que o objetivo do mesmo é melhorar a qualidade de vida do paciente, que pode ser alcançado por meio do controle dos sintomas e melhora ou estabilização da função pulmonar. Atualmente, o tratamento deve incluir, obrigatoriamente, medidas não medicamentosas, associada à farmacoterapia (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No que diz respeito ao tratamento não farmacológico, algumas recomendações são essenciais, como, a redução a fatores desencadeantes como alérgeno respiratórios e medicamentos, devendo o paciente receber orientação e reforço na educação em saúde além de orientações quanto à identificação precoce dos sintomas. A educação do paciente é fundamental no controle da asma e deve-se levar em conta a histórico do paciente, seus aspectos socioculturais e ambientais, compreendendo o contexto em que o paciente está inserido (BATEMAN et al., 2014; GIBSON et al., 2002). Adicionalmente, o tratamento farmacológico da asma tem evoluído muito ao longo dos últimos anos, principalmente com a inserção da imunoterapia no portfólio de opções ao lado dos corticosteroides e agonistas β_2 adrenérgicos (SCHOFIELD, 2014).

Os agonistas β_2 adrenérgicos atuam via interação seletiva com os receptores β_2 presentes no músculo liso bronquiolar, provocando um aumento do AMPc intracelular, que resulta em relaxamento da musculatura lisa, aumento da frequência do batimento ciliar e a redução da viscosidade do muco (CARDOSO, 2005). Com isso, os agonistas β_2 promovem broncodilatação, aliviando os sintomas decorrentes da constrição bronquiolar e diminuindo a resistência à entrada de ar durante a respiração (FIREMAN, 1995). Esta classe é dividida entre agonistas β_2 de curta e de longa ação. Os agonistas β_2 de curta ação são preferencialmente utilizados nas exacerbações asmáticas agudas como um rápido broncodilatador, sendo que, seu uso regular não é recomendado devido à possibilidade de desenvolvimento de dor de cabeça, tremor, palpitações, taquicardia, além de aumentar a hiperresponsividade (ABRAMSON; WALTERS; WALTERS, 2003; SCHOFIELD, 2014). Já os agonistas β_2 de longa ação promovem cerca de 12 horas de broncodilatação, provavelmente devido à sua interação com lipídios do músculo liso das vias aéreas e formando pequenos depósitos da droga, que acaba sendo liberada gradativamente, mantendo a ação esperada (CAZZOLA et al., 2013).

Durante 40 anos os corticosteroides inalatórios têm sido utilizados na asma e hoje, seu domínio é incontestável e as conquistas alcançadas com seu uso difícil de serem desafiadas

cientificamente (SUISSA et al., 2000). Dentre elas, pode-se destacar do a redução do risco de morte por asma e a diminuição de admissões hospitalares decorrentes da doença (DONAHUE et al., 1997). Além da ação broncodilatadora dos antagonistas β_2 adrenérgicos, a atividade anti-inflamatória é outra atividade que tem impacto positivo no tratamento da asma, sendo os corticosteroides inalatórios os mais escolhidos desta classe (BATEMAN et al., 2014). A preferência pela via inalatória visa a tentativa de diminuir os diversos efeitos adversos já conhecidos desta classe (hipertensão, hiperglicemia, ganho de peso, entre outros) ainda mais quando falamos de uso crônico, no entanto, mesmo por esta via, os seus efeitos adversos não podem ser ignorados (CHARRIOT et al., 2016). No entanto, vale ressaltar que por serem efeitos adversos mais raros, nesta via, o risco/benefício do uso de corticosteroide inalatório é favorável ao benefício para pacientes asmáticos (DAHL, 2006; KELLY; NELSON, 2003). Com a capacidade de reduzir a reatividade brônquica e recuperar a integridade das vias aéreas, o tratamento à base de corticosteroides é o mais eficaz, atuando por diferentes mecanismos de ação, como inibindo a produção de citocinas e quimiocinas, suprimindo a produção de proteínas inflamatórias e de fatores de transcrição (BARNES, 2001; BOYTON; ALTMANN, 2004). Uma das desvantagens tratamento com corticosteroides inalatórios na asma é o fato dos seus efeitos farmacológicos desaparecerem rapidamente quando o tratamento é interrompido (GUILBERT et al., 2006).

Ao longo dos últimos anos fármacos biológicos como os anticorpos monoclonais tem ganhado espaço na terapia contra a asma. Através da engenharia genética, proteínas que possuem como alvo mediadores específicos e importantes no processo da doença podem ser modulados (CALHOUN, 2015). Os medicamentos biológicos mais utilizados para o tratamento da asma são o omalizumab (anti-IgE) e o mepolizumab (anti-IL-5). Sendo aprovado em 2003 pelo FDA para uso em casos de asma grave não controlada com altas doses de corticosteroides e com evidência de desencadeadores alérgicos, os biológicos anti-IgE atuam bloqueando os sítios de alta e baixa afinidade dos receptores de IgE, impedindo que o IgE livre se ligue aos receptores presentes na superfície de mastócitos e basófilos (MENZIES-GOW et al., 2003). Já os biológicos anti-IL-5 foram aprovados em 2014 pelo FDA como alternativa à manutenção do tratamento para pacientes com asma eosinofílica grave. Apesar de não apresentar melhora no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) dos pacientes asmáticos em mais de um ensaio clínico, a quantidade de eosinófilos no sangue e no escarro diminuíram significativamente, o que já era esperado devido ao papel do IL-5 na população eosinofílica (HALDAR et al., 2014; ORTEGA et al., 2014). Os principais problemas associados à terapia biológica têm sido o valor do tratamento e algumas

reações alérgicas importantes (CHARRIOT et al., 2016).

Apesar das diferentes estratégias para o tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes asmáticos, a multifatorialidade que pode levar ao desencadeamento da doença a torna cada dia mais desafiadora para os pesquisadores. Com isso, novos esforços continuam a serem dispensados para o controle da asma, seja na descoberta de novas moléculas ativas, novas estratégias biológicas ou até novos sistemas de liberação de fármacos.

2.3 UTILIZAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

O uso medicinal de produtos naturais - compostos ou produtos derivados de fontes naturais como plantas, animais ou micro-organismos - precede o que se conhece da história humana, provavelmente por milhares de anos. Por exemplo, estudos antropológicos descobriram em uma caverna do Iraque, evidências de que há mais de 60.000 os Neandertais tinham conhecimento das propriedades medicinais de produtos naturais, pois foram encontrados depósitos de pólen próximos a sepulturas no local. Ao longo dos milênios que se seguiram a humanidade foi descobrindo¹⁴ e fazendo uso terapêutico de milhares de compostos naturais, ao ponto de possuímos hoje mais de 214.000 registros no dicionário de produtos naturais (JI; LI; ZHANG, 2009).

Os produtos naturais são, ainda nos dias atuais, muito importantes na descoberta de fármacos. A metade dos 20 medicamentos mais vendidos no mundo são oriundos de produtos naturais, e movimentam com suas vendas cerca de 16 bilhões de dólares anualmente (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Além do montante financeiro envolvido na comercialização de medicamentos de origem natural, a importância dos mesmos no tratamento de doenças humanas foi analisada por Newman e Cragg (NEWMAN; CRAGG, 2020). Os autores verificaram que das 1881 novas substâncias químicas descobertas no período de 1981 a 2019, cerca de 65% possuía algum tipo de ligação com os produtos de origem natural. Outro dado importante é que entre todas as novas entidades moleculares já aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) para fins terapêuticos, os produtos naturais e seus derivados representam mais de um terço (PATRIDGE et al., 2016). Apesar do histórico de sucesso dos produtos naturais na descoberta de novos medicamentos, ainda há muitos recursos naturais para serem explorados. O dicionário de produtos naturais contém cerca de 170.000 estruturas únicas de metabólitos secundários, contudo, somente 15% dos ensaios clínicos registrados no site americano clinicaltrials.gov, que controla a maioria dos ensaios clínicos para novos medicamentos no mundo, estão relacionados a plantas. Entre as moléculas em

estudo, 60% é obtida de apenas 10 famílias taxonômicas, o que mostra que inúmeras plantas de diferentes famílias ainda necessitam de uma investigação sistemática (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Essa constatação evidencia que o enorme potencial farmacológico dos produtos naturais ainda permanece pouco explorado.

Especificamente considerando a capacidade de modular a resposta inflamatória e imune, os produtos naturais consistem em relevantes fontes para o desenvolvimento de anti-inflamatórios e imunomoduladores, como evidenciado pelo clássico exemplo do isolamento do ácido salicílico que culminou com o desenvolvimento da classe dos AINE. Durante o período de 1981 a 2019, 53 novas entidades químicas foram aprovadas pelo FDA para utilização como anti-inflamatórios, 19 como analgésicos e 20 como imunossupressores/imunomoduladores, todos derivados ou inspirados em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020). O que demonstra a importância da investigação de propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras em moléculas obtidas a partir de produtos naturais.

Uma classe de moléculas com inúmeras propriedades farmacológicas já descritas é a classe das cumarinas, que são consideradas uma das mais importantes dentre os compostos naturais. Essas moléculas são heterociclos de carbono contendo oxigênio, também conhecidas como benzopironas, com seu primeiro representante descoberto em 1820 (MALIKOV; SAIDKHODZHAEV; ARIPOV, 1998). Desde então, diversas propriedades farmacológicas têm sido atribuídas a esta classe, como atividades anticoagulantes, antirretrovirais, antiparasitárias, antitumorais (GOMEZ-OUTES et al., 2012; OGUNGBE; ERWIN; SETZER, 2014; SCIO et al., 2003; WITAICENIS et al., 2014), além das propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras já demonstradas por nosso e outros grupos de pesquisa (BARROS et al., 2010; DE LIMA et al., 2011; DESAI; DESAI; DESAI, 2008; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005; MORE; MAHULIKAR, 2011). Atualmente, o principal uso das cumarinas na indústria farmacêutica é o fornecimento do núcleo químico para síntese de compostos com atividades antitumorais (KUPALI AKKOL et al., 2020), além de serem a classe química de um importante anticoagulante antagonista da vitamina K, o dicumarol (SUN et al., 2020).

A brailina (C₁₅H₁₄O₄) é uma molécula representante da classe das cumarinas e apesar de ter sido descrita pela primeira vez em 1949 (ANEJA; MUKERJEE; SESHADRI, 1958), existem poucos estudos sobre suas propriedades farmacológicas. Atividades antiagregante plaquetária, vaso relaxante, anti-HIV, e inibição de fosfodiesterase 4 (LIN; et al., 2014; RAKOTOARISON et al., 2003; TSAI et al., 1998) já foram descritas para a

brailina. Diante do exposto, considerando a relevância das propriedades bioativas da classe das cumarinas, e sobretudo, a atividade de inibição de fosfodiesterase 4 previamente descrita para a brailina, o presente trabalho foi delineado para investigar o potencial farmacológico dessa cumarina natural em modelos experimentais de inflamação e asma.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as propriedades farmacológicas da brailina em modelos experimentais de inflamação e asma, avaliando possíveis mecanismos de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial anti-inflamatório da brailina *in vitro*;
- Identificar e caracterizar as propriedades farmacológicas da brailina em modelos experimentais de inflamação e dor *in vivo*;
- Investigar a possível interação da brailina com receptores de glicocorticoide por análises *in silico*;
- Avaliar a contribuição de receptores de glicocorticoide para os efeitos anti-inflamatórios da brailina;
- Identificar se a brailina preserva suas propriedades farmacológicas por via inalatória;
- Identificar e caracterizar as propriedades farmacológicas da brailina em modelo experimental de asma.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 - THE ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF BRAYLIN: PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND MECHANISMS BY *IN SILICO*, *IN VITRO* AND *IN VIVO* APPROACHES



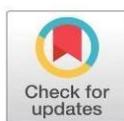
RESEARCH ARTICLE

The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches

Renan Fernandes Espírito-Santo¹, Cassio Santana Meira², Rafael dos Santos Costa¹, Otávio Passos Souza Filho¹, Afranio Ferreira Evangelista², Gustavo Henrique Goulart Trossini³, Glaucio Monteiro Ferreira³, Eudes da Silva Velozo¹, Cristiane Flora Villarreal^{1,2*}, Milena Botelho Pereira Soares^{2,4}

1 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil, **3** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **4** Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, Brazil

* cfv@ufba.br



OPEN ACCESS

Citation: Espírito-Santo RF, Meira CS, Costa RdS, Souza Filho OP, Evangelista AF, Trossini GHG, et al. (2017) The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches. PLoS ONE 12(6): e0179174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174>

Editor: Zhengqi Wang, Emory University, UNITED STATES

Received: February 12, 2017

Accepted: May 24, 2017

Published: June 8, 2017

Copyright: © 2017 Espírito-Santo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia — FAPESB, grant numbers: DTE 0046/2011 CFV, PNX0009/2009 MBPS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Braylin belongs to the group of natural coumarins, a group of compounds with a wide range of pharmacological properties. Here we characterized the pharmacological properties of braylin *in vitro*, *in silico* and *in vivo* in models of inflammatory/immune responses. In *in vitro* assays, braylin exhibited concentration-dependent suppressive activity on activated macrophages. Braylin (10–40 μ M) reduced the production of nitrite, IL-1 β , TNF- α and IL-6 by J774 cells or peritoneal exudate macrophages stimulated with LPS and IFN- γ . Molecular docking calculations suggested that braylin present an interaction pose to act as a glucocorticoid receptor ligand. Corroborating this idea, the inhibitory effect of braylin on macrophages was prevented by RU486, a glucocorticoid receptor antagonist. Furthermore, treatment with braylin strongly reduced the NF- κ B-dependent transcriptional activity on RAW 264.7 cells. Using the complete Freund's adjuvant (CFA)-induced paw inflammation model in mice, the pharmacological properties of braylin were demonstrated *in vivo*. Braylin (12.5–100 mg/kg) produced dose-related antinociceptive and antiedematogenic effects on CFA model. Braylin did not produce antinociception on the tail flick and hot plate tests in mice, suggesting that braylin-induced antinociception is not a centrally-mediated action. Braylin exhibited immunomodulatory properties on the CFA model, inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6, while increased the anti-inflammatory cytokine TGF- β . Our results show, for the first time, anti-inflammatory, antinociceptive and immunomodulatory effects of braylin, which possibly act through the glucocorticoid receptor activation and by inhibition of the transcriptional activity of NF- κ B. Because braylin is a phosphodiesterase-4 inhibitor, this coumarin could represent an ideal prototype of glucocorticoid receptor ligand, able to induce synergic immunomodulatory effects.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Immune-mediated disorders, such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, asthma and ulcerative colitis, are a group of diseases associated with inflammatory pathogenetic mechanisms that involve an inappropriate or excessive immune response [1]. They affect approximately 5–7 percent of the population in Western countries [2,3]. The immune dysregulation causes inflammatory injury in various organs, resulting in morbidity, reduced quality of life and premature death [3]. The ideal drug to treat immune-mediated inflammatory disorders needs to establish early control of inflammation, preventing the tissue damage, parallel to a favorable profile of adverse effects. Currently, the available anti-inflammatory drugs do not meet these requirements, often displaying more adverse effects than is acceptable, less therapeutic effects than desirable, or both.

Natural products have been considered a plentiful source in the search for new chemical entities that modulate the immune system with reduced adverse effects. Plant secondary metabolites are important for flavoring of food, resistance against pests and as drugs, including substances with immunosuppressive activity [4]. Coumarins, a group of plant-derived polyphenolic compounds, have attracted intense interest in recent years due to their diverse and potent pharmacological properties. The structural characteristic of coumarins depicts a framework consisting of fused benzene and α -pyrone ring systems [5]. This type of special benzo-pyrone structure enables its derivatives to exert noncovalent interactions with various active sites in organisms, such as enzymes and receptors, and thus display a wide range of biological activities [6]. In fact, these compounds have been considered to possess wide potential as medicinal drugs and have served as valuable leads for further design and synthesis of more active analogues.

Among the multiple pharmacological properties of coumarins, their potent anti-inflammatory activity has been evidenced [7]. The anti-inflammatory properties of coumarin are associated with several mechanisms, including reduction of inflammatory molecules expression, inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase enzymes and inhibition of nuclear translocation of the transcription factor κ B, NF- κ B [7–10]. Braylin (Fig 1) is a coumarin first described in 1949, with limited data on their pharmacological properties already described [11]. Recently, Lin et al. showed that braylin presents potent phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitory activity [12]. Phosphodiesterases are enzymes that regulate the cellular levels of the second messengers cAMP and cGMP, by controlling their rates of degradation [13]. PDE4 is the predominant cyclic AMP degrading enzyme in a variety of inflammatory cells, and its inhibition elevates intracellular cAMP, which in turn down-regulates the inflammatory response [14,15]. Thus, this enzyme has been identified as a therapeutic target of high interest for immune-mediated inflammatory diseases [15–18]. Therefore, the present study was designed to evaluate whether braylin presents anti-inflammatory and immunomodulatory properties. Using *in vitro*, *in silico* and *in vivo* assays, we show here the pharmacological properties of braylin, including its possible mechanisms of action.

Materials and Methods

Extraction and isolation of braylin

Braylin was isolated from the roots of *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil (Rutaceae) collected in August 2009 in Feira de Santana, Brazil, 12° 12' 52.9" S, 38° 52' 44.1" W. A voucher specimen (n°. 88005) has been identified and deposited at the Herbarium Alexandre Leal Costa (ALCB) of the Federal University of Bahia, Brazil. Braylin (837 mg) was isolated from the root bark (76.423 g) of *Zanthoxylum tingoassuiba* as a yellow amorphous solid and was identified by

in 96-well tissue culture plates at 2×10^5 cells per 0.2 mL per well. After 2 hours of incubation at 37°C, non-adherent cells were removed by two washes with DMEM. Macrophages were then submitted to the protocol of cytotoxicity, cytokine and nitric oxide determinations, as described below.

Cytotoxicity to mammalian cells

To determine the cytotoxicity of braylin, murine macrophage-like cell line J774, kindly provided by Dr. Patricia S. T. Veras (Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz/BA), Raw 264.7 Luc cells or peritoneal exudate macrophages were plated into 96-well plates at a cell density of 2×10^5 cells/well in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO), and 50 µg/mL of gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil) and incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Braylin was added at four concentrations ranging from 10 to 80 µM in four replicates, and plates were incubated for 72 hours. Twenty µL/well of Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to the plates during 12 hours. Colorimetric readings were performed at 570 and 600 nm. Gentian violet (Synth, São Paulo, Brazil) at 10 µM was used as positive control. Three independent experiments were performed.

Measurement of cytokine and nitric oxide concentrations on macrophages

For cytokine and nitric oxide (NO) determinations, J774 cells or peritoneal exudate macrophages were seeded in 96-well tissue culture plates at 2×10^5 cells/well in DMEM medium supplemented with 10% of FBS and 50 µg/mL of gentamycin for 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Cells were then stimulated with LPS (500 ng/mL, Sigma) and IFN-γ (5 ng/mL; Sigma) in the presence of braylin, vehicle or dexamethasone at different concentrations, and incubated at 37°C. Cell-free supernatants were collected 4 hours (for TNF-α measurement) and 24 hours (for IL-1β, IL-6 and nitrite quantification) and kept at -80°C. Cytokine concentrations in supernatants from macrophage cultures were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the DuoSet kit from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. For the antagonism assay, the glucocorticoid receptor antagonist RU486 was added in some cultures at a final concentration of 10 µM. Quantification of nitric oxide was done using the Griess method [20].

NF-κB luciferase assay

The murine mouse leukemic monocyte macrophage cell line Raw 264.7 Luc cells bearing the pBIIX-luciferase (pBIIX-luc) targeting vector containing the firefly luciferase gene (luc) driven by two NF-κB binding sites from the kappa light chain enhancer in front of a minimal fos promoter [21] was kindly provided by Maria Célia Jamur (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil). Cells were cultured in RPMI medium (Sigma) supplemented with 20% FBS and 50 µg/mL of gentamycin at 37°C in a humidified environment containing 5% CO₂. For luciferase reporter assays, 5×10^5 cells/ml were pretreated with different concentrations of braylin (40, 20 or 10 µM) for 1 hour prior to stimulated with LPS (500 ng/mL) and IFN-γ (5 ng/mL) for 3 hours. Then each well was washed with cold-PBS and cells were incubated with TNT lysis buffer (200 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 1% Triton X-100) for 20 minutes at 4°C. The luciferase activity in the cell lysates was determined using the Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA). The samples were analyzed in a Globomax 20/20 luminometer (Promega). Data were then expressed as relative light units.

Molecular docking

Molecular docking and scoring protocols were used as implemented in GOLD version 5.2 (CCDC, Cambridge, UK) [22] to investigate the possible ligand binding conformations within the glucocorticoid receptor (GR) binding pocket. X-ray crystallographic data for GR complexed with R486 group 2.3 A (PDB ID 1NHZ) used in the docking simulations were retrieved from the Protein Data Bank (PDB). The ligand and water molecules were removed from the binding pocket and hydrogen atoms were added in standard geometry using the Biopolymer module implemented in SYBYL 2.0 (Sybyl x 2.1. Tripos, 2010). The residues within the binding sites were manually checked for possible flipped orientation, protonation, and tautomeric states with Pymol 1.3 (Delano Scientific, San Carlos, USA) side-chain wizard script. The binding sites were defined as all the amino acid residues encompassed within a 10.0 Å radius sphere centered on catalytic. Docking method was validated by redocking of the GR structure to crystal structure (PDB: 1NHZ) with R486.

Animals

Experiments were performed on male Swiss Webster mice obtained from the Animal Facilities at the Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ; Salvador, Brazil). Animals (22–28 g) were housed in temperature-controlled rooms (22–25°C), under a 12:12 hours light-dark cycle, with access to water and food ad libitum until experimental initiation. All behavioral tests were performed between 8:00 a.m. and 5:00 p.m., and animals were only used once. Animal care and handling procedures were in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and Brazilian College of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Ethics Committee for Animal Experimentation of FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ, Permit Number: L-IGM-015/2013). Every effort was made to minimize the number of animals used and any discomfort. Behavioral tests were performed without knowing to which experimental group each mouse belonged. Results shown are from two independent experiments performed.

Inflammatory model

Mice were lightly anesthetized with halothane and received 20 µL of complete Freund's adjuvant (CFA 1 mg/mL of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in 85% paraffin oil and 15% mannideimonoleate; Sigma) in the plantar region of the right hind paw, according to a previously reported method [23]. Inflammatory hyperalgesia, edema, and local cytokines levels were measured by von Frey filaments, plethysmometer and ELISA, respectively, as described below. Mice were injected with braylin (12.5 to 100 mg/kg), vehicle (50% propylene glycol in physiological saline; control group) or dexamethasone (2 mg/kg, reference drug) by ip route 40 minutes before CFA.

Inflammatory hyperalgesia evaluation

The threshold to mechanical stimulation was measured with von Frey filaments (Stoelting, Chicago, IL, USA). In a quiet room, mice were placed in acrylic cages (12×10×17 cm) with wire grid floors, 30 minutes before the beginning of the test. This consisted of evoking a hind paw flexion reflex with one of a series of filaments with logarithmically incremental stiffness (0.0045–28.84 g). A positive response was characterized by the removal of the paw followed by clear flinching movements. A tilted mirror placed under the grid provided a clear view of the

hind paws of the mice. An up-down method was used to record the threshold, which was represented as the filament weight (g) in which the animal responds in 50% of presentations [24].

Plethysmometer test

The volume of each mouse paw was measured (mm^3) with a plethysmometer (Ugo Basile, Comerio, Italy) before (V_0) and after (V_T) the CFA injection, as described previously [23]. The amount of paw swelling was determined for each mouse and data were represented as paw volume variation (Δ , mm^3).

Cytokine measurement by ELISA

The paw levels of cytokines were determined as previously described [25]. Treatments were performed 40 minutes before the CFA injection. Skin tissues were removed from the paws 2, 4, 8 or 24 hours after CFA, in mice terminally anesthetized with halothane from each experimental group. Tissue proteins were extracted from 100 mg tissue/mL phosphate buffered saline (PBS) to which 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 and protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KI aprotinin A/100 ml) were added (Sigma). The samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 g and the supernatant was frozen at -70°C for later quantification. Interleukin- 1β (IL- 1β), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-13 (IL-13), interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor β (TGF- β) levels were estimated using commercially available immunoassay ELISA kits for mice (R&D System, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The results are expressed as picograms of cytokine per milligram of protein.

Tail flick and hot plate tests

The tail flick test in mice was conducted as described elsewhere [26]. Before the experiment, each animal was habituated to the restraint cylinder for 20 minutes/day for 5 consecutive days. On the day of the experiment, mice were placed in the restraint cylinder and the tail tip (2 cm) was submersion in a water bath at $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The latency of the tail withdrawal reflex was measured in seconds. Each submersion was terminated after 16 seconds to minimize potential skin damage. Tail flick latency was measured before (baseline) and after treatments. The hot plate test in mice was conducted as described elsewhere, with minor modifications [27]. On the experiment day, mice were placed on the equipment (TECA Corporation, Chicago, IL, USA), which was maintained at $52 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and latencies to hind-paw licking or jumping (nociceptive thermal threshold) were recorded with a cut-off time of 16 s. The threshold was measured before (baseline) and after treatments.

Motor function assay

To evaluate possible non-specific muscle-relaxant or sedative effects of braylin, mice were submitted to the rota-rod test, as previously described [26]. The rota-rod apparatus (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) consisted of a bar with a diameter of 3 cm, subdivided into five compartments. The bar rotated at a constant speed of 6 revolutions per minute. The animals were selected 24 hours previously by eliminating those mice that did not remain on the bar for two consecutive periods of 120 s. Animals were treated and 40 minutes afterwards were placed on a rotating rod. The resistance to falling was measured for up to 120 s. The results are expressed as the average time (s) the animals remained on the rota-rod in each group. Diazepam (10 mg/kg) was the reference drug.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm standard error of the means (SEM) of measurements made on 6–9 animals in each group. Comparisons between three or more treatments were made using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, or for repeated measures, two-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test, as appropriate. All data were analyzed using Prism 5 Computer Software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Statistical differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

Results

Initially, the pharmacological effects of braylin were investigated on a set of *in vitro* assays. The effects of braylin on cell viability was determined by a colorimetric Alamar Blue assay 24 hours after treatment. As revealed in Fig 2, braylin at a concentration of 40 μM or lower did not induce cytotoxic effect on J774 cells or peritoneal exudate macrophages, stimulated with LPS

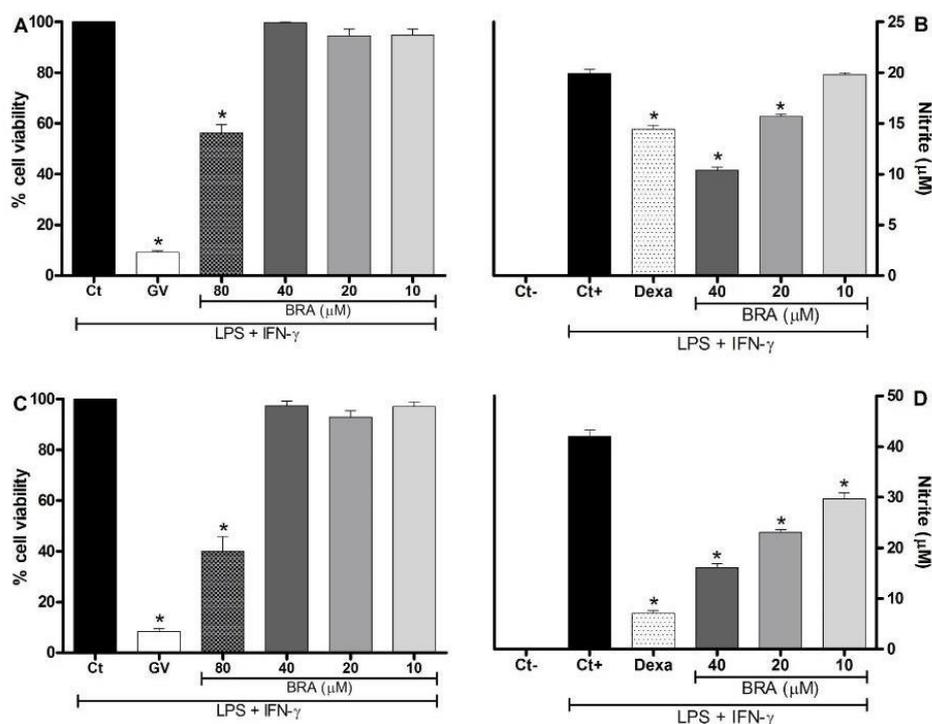


Fig 2. Cytotoxic effect of braylin and its modulation of nitric oxide production on macrophages. Panels A and C: J774 cells (A) or peritoneal exudate macrophages (C) were incubated with vehicle (50% propylene glycol in saline, Ct, control group) or different concentrations of braylin (BRA; 10, 20, 40 or 80 μM) for 72 hours and cell viability was determined by Alamar Blue assay. Gentian violet (GV) was used as positive control. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 9$ determinations per group. *Significantly different from the vehicle treated cultures ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Panels B and D: Concentrations of nitrite were determined in J774 macrophages (B) or peritoneal exudate macrophages (D) treated with vehicle (50% propylene glycol in saline, Ct+, control group), braylin (BRA; 10, 20 or 40 μM) or dexamethasone (Dexa; 40 μM) in the presence of LPS (500 ng/mL) + IFN- γ (5 ng/mL). Cell-free supernatants were collected 24 hours after treatments for nitrite quantification by the Griess method. Ct- shows concentrations of nitrite in unstimulated cells. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 9$ determinations per group. *Significantly different from the vehicle treated cultures stimulated with LPS + IFN- γ ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g002>

and IFN- γ . Therefore, subsequent experiments were performed with braylin at 40 μ M. The modulatory effects of braylin on macrophages were investigated through the quantification of the inflammatory mediators NO and cytokines, produced by activated macrophages. As shown in Fig 2B and 2D, braylin treatment reduced, in a concentration-dependent manner, the production of nitrite on macrophages stimulated with LPS and IFN- γ , suggesting a reduction of NO production. The inhibitory effect of braylin on J774 cells and peritoneal exudate macrophages was statistically significant until 20 and 10 μ M, respectively. Dexamethasone at 40 μ M reduced nitrite production.

Fig 3 shows that braylin treatment was able to reduce, in a concentration-dependent manner, the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by macrophages stimulated with LPS and IFN- γ . Braylin reduced the production of TNF- α on J774 macrophages (Fig 3A) at concentrations of 20 and 40 μ M. The inhibitory effect of braylin on the TNF- α production by peritoneal exudate macrophages was statistically significant at 10, 20 and 40 μ M (Fig 3B). The braylin-induced reduction of IL-1 β (Fig 3C) and IL-6 (Fig 3E) production on J774 macrophages was statistically significant at 10, 20 and 40 μ M. In addition, braylin reduced the production of IL-1 β (Fig 3D) and IL-6 (Fig 3F) on peritoneal exudate macrophages at 20 and 40 μ M. Under the same conditions, dexamethasone (40 μ M) caused a similar reduction of TNF- α , IL-1 β and IL-6 production (Fig 3).

To assess the possible interactions of braylin in the binding pocket of glucocorticoid receptor (GR), docking studies were performed. The validation of the method showed a good superimposition between the crystal pose and the docked pose of RU486, a GR antagonist, suggesting that the docking method is sufficiently robust to determine the correct ligand poses in the active site of GR. The results were compared with docking poses of the antagonist RU486 and the agonist dexamethasone to suggest best fit interactions and supposed mechanism of action. The best poses obtained to RU486, braylin and dexamethasone in the glucocorticoid receptor (PDB: 1HNZ) are showed in Fig 4.

Based on docking studies RU486, dexamethasone and braylin, presented interactions on the same site of the GR. When the occupancy was analyzed, RU486 showed interactions in two different subpockets, which are promoted by groups prop-1-yne and N,N-dimethylaniline. Dexamethasone presented a different subpocket interaction, promoted by ketone group and terminal ring (A) of the molecule. On other hand, braylin occupies only the active site of GR. The analyses of the interaction residues suggested by docking have shown that RU486 presents three hydrogen bonds, with GLN 642, ARG 611 and GLN 570 (Fig 5A). For dexamethasone, the major interactions were observed in relation to dextrane group and two important hydrogen bonds with the carbonyl group of the TRY-735 and GLY-567 (Fig 5B). For braylin, the docking studies suggest the stabilization in the GR by hydrophobic interactions, hydrogen bond with GLY-567 like dexamethasone, and the PHE-623 promote a π -stack with aromatic ring (Fig 5C).

The possible antagonism of RU486 on the braylin-induced inhibitory effect in stimulated macrophage cultures was then evaluated. Addition of RU486 (10 μ M) to J774 macrophage cultures stimulated with LPS and IFN- γ partially prevented the inhibitory effect of braylin (40 μ M) on the TNF- α production (Fig 6A). As expected, in the presence of RU486, the inhibitory effect of dexamethasone (40 μ M) on the TNF- α production by macrophages was reduced.

Next the NF- κ B reporter system, in Raw 264.7 cells transfected with p-NF- κ B-Luc reporter plasmid, was used to evaluate the effect of braylin on NF- κ B activation. Initially, the effects of braylin on Raw 264.7 cell viability was determined. Braylin, at a concentration of 80 μ M or lower, did not induce cytotoxic effect on Raw 264.7 cells 72 hours after treatment (S3 Fig). As revealed in Fig 6B, macrophage cultures stimulated with LPS and IFN- γ showed high levels of NF- κ B dependent transcriptional activity. Treatment with braylin (10, 20 and 40 μ M)

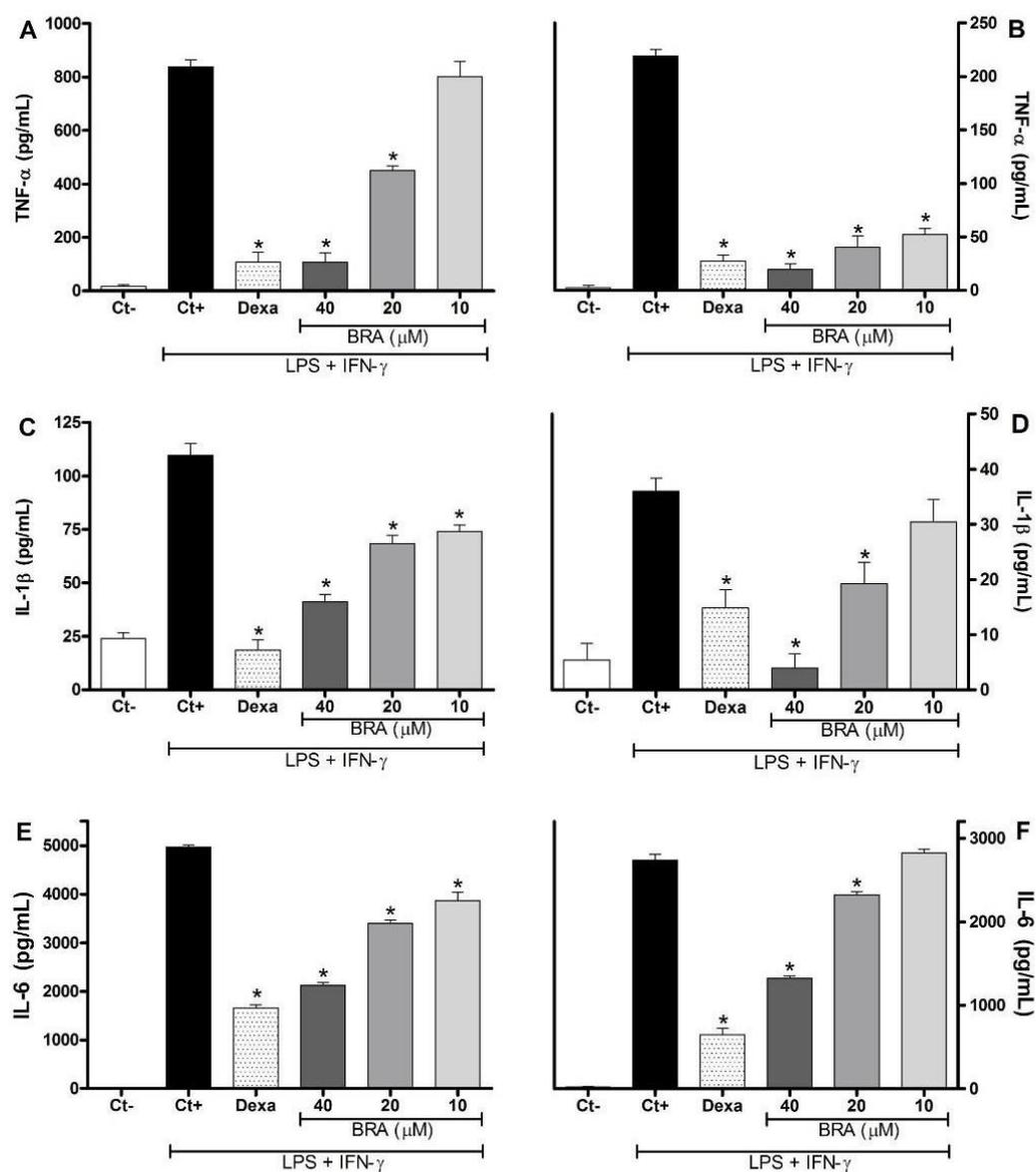


Fig 3. Effect of braylin on cytokine production by activated macrophages. Concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were determined in cultures of J774 macrophages (panels A, C and E) or peritoneal exudate macrophages (panels B, D and F) treated with vehicle (50% propylene glycol in saline, Ct+, control group), braylin (BRA; 10, 20 or 40 μ M) or dexamethasone (Dexa; 40 μ M) in the presence of LPS (500 ng/mL) plus IFN- γ (5 ng/mL). Cell-free supernatants were collected 4 hours (for TNF- α measurement) and 24 hours (for IL-1 β and IL-6) after treatments for ELISA assay. Ct- shows cytokine concentrations in unstimulated cells. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 10$ determinations per group. *Significantly different from the vehicle treated cultures stimulated with LPS + IFN- γ ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g003>

dramatically reduced NF- κ B dependent transcriptional activity when compared with vehicle-treated cultures. Treatment with dexamethasone (40 μ M) also was able to reduce the NF- κ B

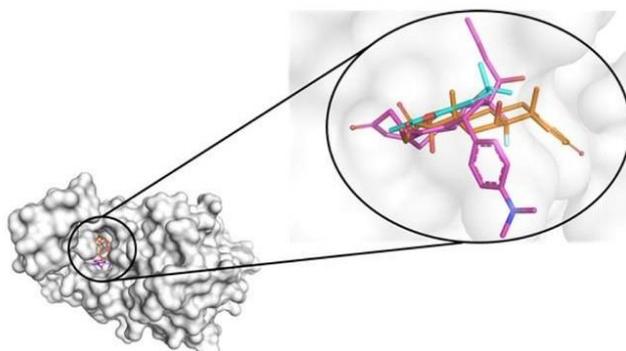


Fig 4. Best poses of the docking results to RU486 (pink), dexamethasone (orange) and braylin (cyan) superimposed in GR (pdb 1NHZ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g004>

dependent transcriptional activity, but the effect of braylin, at all tested concentrations, was higher than that of dexamethasone.

Based on the reliable results from the *in vitro* assays, the potential of braylin as an immunomodulatory agent was next evaluated on the CFA-induced paw inflammation model. The effects of braylin on inflammatory hyperalgesia, paw edema and local levels of cytokines was assessed. Administration of braylin (25–100 mg/kg) by ip route, 40 minutes before CFA, significantly reduced inflammatory hyperalgesia at 2, 4 and 8 hours after the stimulus (Fig 7A). The pre-treatment with braylin (12–100 mg/kg, ip) significantly reduced paw edema 2, 4 and 8 hours post-stimulus (Fig 7B). Supporting data from braylin, vehicle treatment (50% propylene glycol in saline) yielded no activity, while the reference drug, dexamethasone (2 mg/kg), inhibited CFA-induced hyperalgesia and edema. Braylin had a greater efficacy than dexamethasone, considering both hyperalgesia (Fig 7A) and edema (Fig 7B) signs; however, its effects were short-lasting.

The effects of braylin were also evaluated on the tail flick and hot plate tests, which mainly identify central analgesics. The ip administration of braylin (100 mg/kg) did not alter the latency time in the tail-flick (Fig 8A) and hot plate (Fig 8B) tests. The administration of morphine (5 mg/kg ip), the reference drug, resulted in a significant increase in the latency time at both, tail flick and hot plate tests (Fig 8). Moreover, relaxing or motor deficit effects were discarded, since administration of braylin (100 mg/kg, ip) did not affect the motor performance in mice on the rota-rod test (S4 Fig). As expected, diazepam (10 mg/kg ip), a central nervous

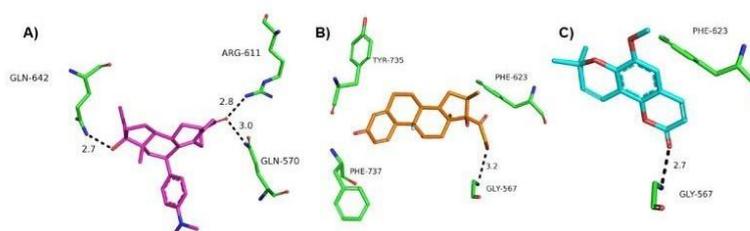


Fig 5. Docking solutions showing the main interactions for (A) RU486 (pink), (B) dexamethasone (orange) and (C) braylin (cyan) superimposed in GR (pdb 1NHZ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g005>

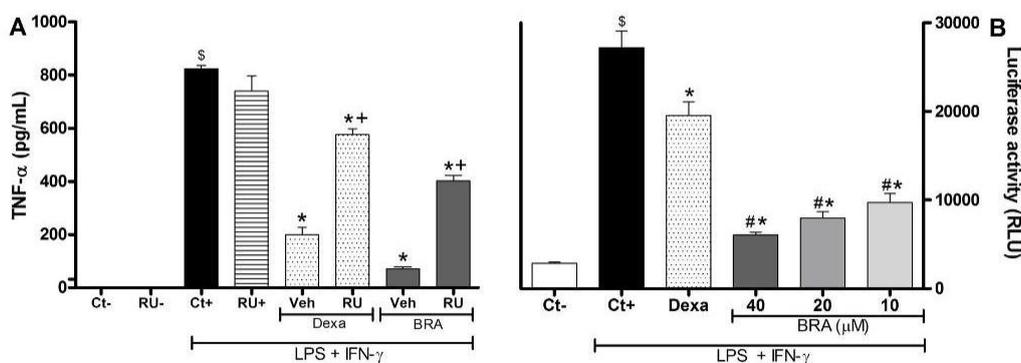


Fig 6. Involvement of glucocorticoid receptors and NF-κB dependent transcriptional activity in the immunomodulatory effect of braylin. Panel A shows data from glucocorticoid receptor antagonism assay. Concentrations of TNF-α were determined in J774 macrophages treated with vehicle (50% propylene glycol in saline, Ct+, control group), braylin (BRA, 40 μM), RU486 (GR antagonist, 10 μM) + braylin 40 μM, dexamethasone (Dexa; 40 μM) or RU486 (10 μM) + dexamethasone (40 μM) in the presence of LPS (500 ng/mL) and IFN-γ (5 ng/mL). Cell-free supernatants were collected 4 hours after treatments for TNF-α measurement by ELISA. Ct- and RU- show concentrations of TNF-α in unstimulated cells, treated with vehicle and RU486, respectively. Data are expressed as means ± SEM; $n = 10$ determinations per group. §Significantly different from the vehicle treated cultures unstimulated ($p < 0.05$); *Significantly different from the vehicle treated cultures stimulated with LPS + IFN-γ ($p < 0.05$). +Significantly different from the group untreated with antagonist ($p < 0.05$). Panel B shows the effect of braylin on the activation of NF-κB on RAW 264.7 Luc macrophages. Cells were pretreated with vehicle (50% propylene glycol in saline, Ct+, control group), braylin (BRA; 10, 20 or 40 μM) or dexamethasone (Dexa; 40 μM) for 1 hour prior to stimulated with LPS (500 ng/mL) and IFN-γ (5 ng/mL) for 3 hours. Ct- shows luciferase activity in unstimulated cells. Luciferase activity was measured in a luminometer. §Significantly different from the vehicle treated cultures unstimulated ($p < 0.05$); *Significantly different from the vehicle treated cultures stimulated with LPS + IFN-γ ($p < 0.05$). #Significantly different from the Dexa group ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g006>

system depressant used as standard drug, reduced the permanence time of mice on the rotarod (S4 Fig).

Considering the inhibitory effect of braylin on macrophage cells, its possible modulatory action on cytokine production during inflammation was evaluated. Data obtained by ELISA analyses shows that braylin (50 mg/kg) and dexamethasone (2 mg/kg) reduced the local levels of IL-1β (Fig 9A), TNF-α (Fig 9B) and IL-6 (Fig 9C) during CFA-induced paw inflammation. The inhibitory effects of braylin on TNF-α and IL-1β levels were statistically significant 2 and 4 hours after CFA, while on IL-6, a significant inhibition was seen 2 hours after stimulus. Dexamethasone reduced the IL-1β and TNF-α levels until 8 hours after stimulus, but the IL-6 level was reduced just until 4 hours. The modulatory effects of braylin on anti-inflammatory cytokines production were also investigated. Treatment with braylin (50 mg/kg) enhanced the paw levels of TGF-β (Fig 9F), while IL-13 (Fig 9D) and IL-10 (Fig 9E) were not modulated by this coumarin. Instead, dexamethasone enhanced IL-10, but not TGF-β or IL-13 concentrations.

Discussion

The present study demonstrated, for the first time, the consistent anti-inflammatory and immunomodulatory properties of braylin. Braylin exhibited low cytotoxicity and consistent suppressive activities on macrophages cultures. Braylin acts, at least in part, through activation of GR, since the GR antagonist RU486 prevented the *in vitro* effects of braylin. Docking data corroborated with this hypothesis. In addition, using the NF-κB luciferase assay, the treatment with braylin dramatically reduced the NF-κB dependent transcriptional activity on macrophages. Systemic administration of braylin inhibited *in vivo* events related to inflammation, namely hyperalgesia and edema. Furthermore, this coumarin induced evident immunomodulatory

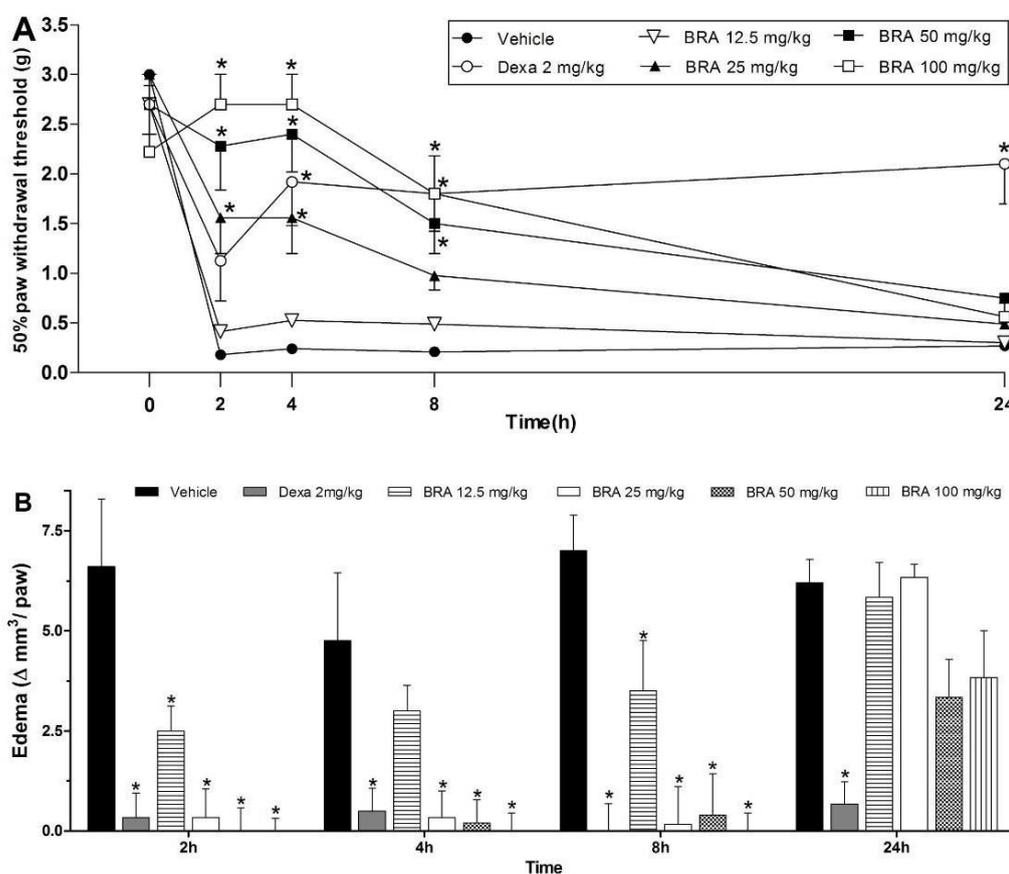


Fig 7. Effects of braylin on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced paw inflammation. Mice were injected with braylin (BRA; 12.5–100 mg/kg), vehicle (50% propylene glycol in saline; control group) or dexamethasone (Dexa; 2 mg/kg; reference drug) by ip route 40 minutes before CFA (injected at time zero). (A) Inflammatory hyperalgesia measured at 2, 4, 8 and 24 hours after the CFA stimulus. The mechanical nociceptive threshold (axis of ordinates) is represented as the filament weight (g) in which the animal responds in 50% of presentations. (B) Paw edema measured at 2, 4, 8 and 24 hours after CFA, represented as paw volume variation. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 6$ mice per group. * Significantly different from the control group ($p < 0.05$). Two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g007>

property *in vivo* through the modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines levels. These results describe the pharmacological properties of braylin, indicating this coumarin as a potential candidate to drug development.

Because macrophages play a central role in the immune regulation and inflammatory responses, the possible suppressive effect of braylin was initially evaluated on these cells. Activated macrophages release cytokines such as IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-18, that coordinate immune/inflammatory responses. They are activated by different signals, including inflammatory cytokines such as TNF- α , and deactivated by anti-inflammatory cytokines, such as TGF- β [28]. Activated macrophages are also capable of releasing high levels of NO, and this mediator has been implicated as a pro-inflammatory agent [29]. Braylin, at non-cytotoxic

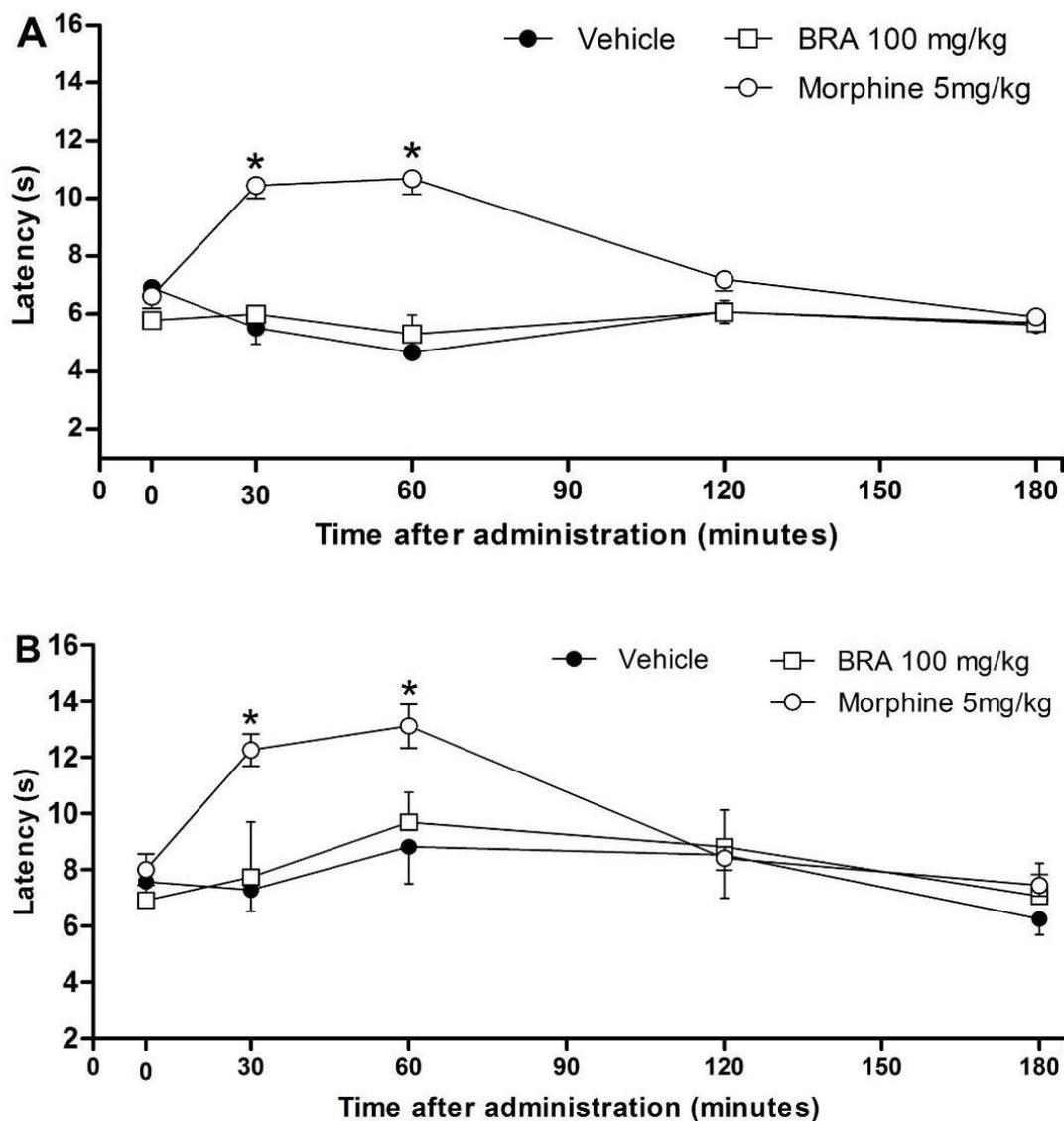


Fig 8. Effects of braylin on tail flick and hot plate tests in mice. Panels representing the latency in seconds in the tail flick (panel A) and hot plate (panel B) tests, after ip injection of braylin (BRA; 100 mg/kg), vehicle (50% propylene glycol in saline; control group) or morphine (5 mg/kg; reference drug). Data are reported as means \pm SEM; $n = 6$ mice per group. * Significantly different from the control group ($p < 0.05$). Two-way ANOVA followed by the Bonferroni's test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g008>

concentrations, reduced the production of nitrite, TNF- α , IL-1 β and IL-6 by stimulated macrophages in a concentration-dependent manner, suggesting the anti-inflammatory and immunomodulatory potential of this coumarin.

To understand how braylin inhibits the production of inflammatory mediators by macrophages, the contribution of glucocorticoid receptor (GR) was first investigated by theoretical

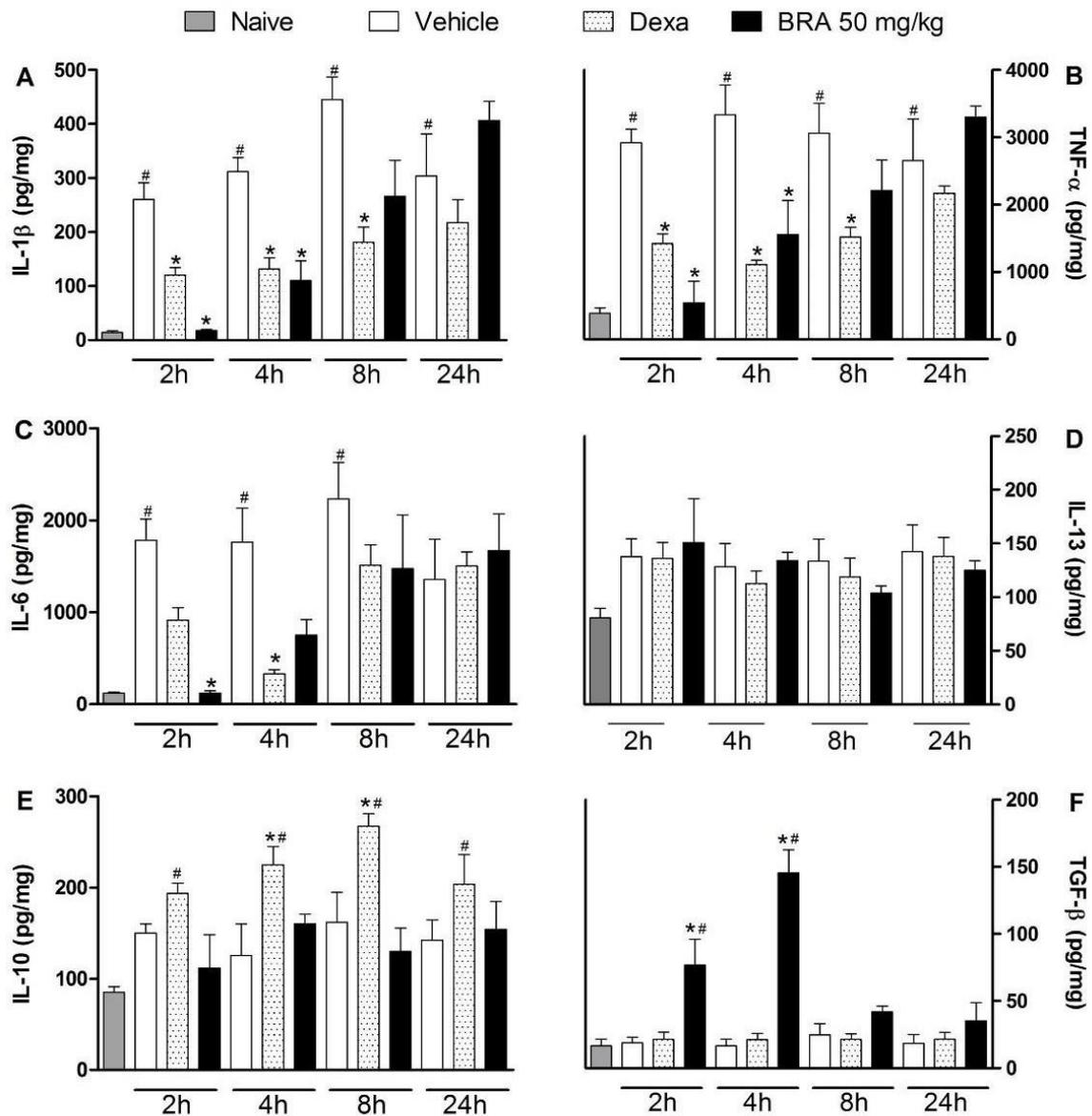


Fig 9. Effects of braylin on cytokines paw levels during CFA-induced inflammation. Mice were injected with braylin (BRA; 50 mg/kg), vehicle (50% propylene glycol in saline; control group) or dexamethasone (Dexa; 2 mg/kg; reference drug) by ip route 40 minutes before CFA (injected at time zero). The naïve group consists of mice that did not receive any experimental manipulation. Panels shows the paw levels of (A) interleukin-1 β (IL-1 β), (B) tumor necrosis factor- α (TNF- α), (C) interleukin-6 (IL-6), (D) interleukin-13 (IL-13), (E) interleukin-10 (IL-10) and (F) transforming growth factor- β (TGF- β), determined in skin tissues samples by ELISA, 3 hours after the CFA injection. The results are expressed as picograms of cytokine per milligram of protein. Data are expressed as means \pm SEM; $n = 6$ mice per group. * Significantly different from the vehicle group in the same time ($p < 0.05$); # significantly different from the naïve group ($p < 0.05$). ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179174.g009>

methods. Based on docking studies RU486, dexamethasone and braylin presented interactions on the same site of the GR. Analyzing the possible mode of interaction between the GR and RU486, dexamethasone and braylin (S2 Fig), it was possible to verify that an important characteristic is the influence of the N,N-dimethylaniline group of RU486, which by steric hindrance displaces an alpha-helix, number 12, as previously observed [30–32]. In the mode of binding of dexamethasone and braylin, however, there is insufficient molecular volume to promote changes in conformation of the 12 alpha-helix due to the absence of groups that can confer this displacement. However, the mode of interaction with GR4, the specific receptor for dexamethasone, showed no withdrawal from this alpha-helix, thus suggesting a selectivity of dexamethasone and braylin by the GR receptor. The contribution of GR activation to the immunomodulatory effect of braylin was confirmed in an antagonism assay, in which RU486 partially prevented the inhibitory effect of braylin on stimulated macrophages.

Although glucocorticoids remain the most effective therapy for inflammatory and immune diseases, their use is associated with side effects and many patients with chronic diseases become resistant to glucocorticoids requiring higher doses [33]. Aiming to overcome this clinical problem, research has been focused on the development of more potent GR agonists or combination pharmacological strategies that target the GR, as well as other targets [34]. On the “combination therapy”, a second drug is added to potentiate the effects of the glucocorticoid. It has been demonstrated that the combined use with phosphodiesterase-4 inhibitors enhance the clinical efficacy of glucocorticoids, probably by elevating intracellular cAMP [35]. Importantly, braylin presents potent phosphodiesterase-4 inhibitory activity [12], in addition to a partially GR-dependent immunomodulatory effect of braylin demonstrated herein. Thus, according to the current goals of drug development, braylin can represent an ideal GR ligand prototype, able to cross-talk with other signaling pathways and inducing synergic immunomodulatory effects.

The GR activation mediates transactivation or transrepression of several genes involved with the reduction of inflammation and immune function [36]. Glucocorticoids induce their transcriptional effects by direct DNA binding of the GR or by binding to other transcription factors, such as NF- κ B and AP-1, to repress their function [34]. In addition, an important signaling pathway used by Toll-like receptors in activated macrophages results in NF- κ B activation. The genes that are expressed in response to NF- κ B transcriptional activation encode several pro-inflammatory proteins, such as IL-1 β , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase [28]. Considering the inhibitory effects of braylin on these mediators, as well as the well-described crosstalk between NF- κ B and glucocorticoid signaling, the effect of braylin on NF- κ B activation was also evaluated.

We found here that braylin treatment was able to intensely reduce the transcriptional activity of NF- κ B. Considering that NF- κ B is a central regulator of inflammatory response, it is possible to propose that the mechanism of action of braylin, involved with its anti-inflammatory and immunomodulatory effects, is through the inhibition of the transcriptional activity of NF- κ B. On the other hand, braylin possesses inhibitory activity on PDE₄ [12], and PDE₄ inhibitors present a broad range of anti-inflammatory activities in experimental and clinical conditions [16,37]. Whether or not the PDE₄ inhibition contributes to the pharmacological effects of braylin presented here is still on investigation.

The potential of braylin as an immunomodulatory agent was also demonstrated *in vivo* using the CFA-induced paw inflammation model, a well-established experimental protocol for study of inflammation and anti-inflammatory drugs. CFA induces local release of mediators, such as cytokines and prostanoids, involved in the inflammatory signs, such as edema, hyperalgesia and vasodilation [38–42]. Importantly, systemic administration of braylin reduced the CFA-induced hyperalgesia with a greater efficacy than dexamethasone, considered the gold

standard drug, showing an important and dose-related antinociceptive effect of braylin. The lack of effects in motor performance of mice on the rota-rod test reinforced the antinociceptive properties of braylin. The tail flick and hot plate tests, which mainly identify central-acting analgesics [43], indicated that the braylin-induced antinociception is not a centrally-mediated action, but likely an effect associated with anti-inflammatory properties.

Peripheral inflammation is associated with the local production of neuroactive inflammatory cytokines and growth factors. It has already been established that the local injection of CFA produces inflammatory hyperalgesia initiated by peripheral nociceptor activation and local release of mediators, such as IL-1 β and TNF- α , which has a major role in the production of inflammatory pain hypersensitivity [38,44]. In addition to the inhibitory effect of braylin on macrophage cells *in vitro*, we showed that braylin reduced the local levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 during CFA-induced paw inflammation. Cytokines play an essential role in the development of inflammatory signs and symptoms, and the first cytokines described as participating in the development of inflammatory pain were IL-1 β , TNF- α and IL-6 [39,45,46]. In addition, upon inflammatory stimulation, the activation of the cytokine pathways precedes the release of final mediators such as prostaglandins, which are involved with nociceptive sensitization, in addition to its ability to trigger acute inflammation producing vasodilatation, vascular permeability and edema [46–51]. Considering the key role of IL-1 β , TNF- α and IL-6 to the inflammatory response, it may be suggested that the antinociceptive and antiedematogenic effects of braylin are related to its ability to inhibit the release of inflammatory cytokines.

During the course of an inflammatory process, pro- and anti-inflammatory mediators are produced and the balance between these two signals determines the magnitude of the inflammatory response. In the present study, the antiedematogenic and antinociceptive effects of braylin were simultaneous to a substantial increase in the production of TGF- β . The TGF- β family members are cytokines that have been implicated in a broad range of biological functions including modulation of cell proliferation or cell differentiation, immunosuppression, tissue repair, and neuroprotection [52–54], and their immune functions are mostly anti-inflammatory. Chen *et al* demonstrated a pivotal role for TGF- β in the regulation of immune response leading to suppression of synovial inflammation and matrix destruction in streptococcal cell wall-induced erosive polyarthritis [55]. Systemic administration of TGF- β prevents the relapse of autoimmune encephalomyelitis [56]. In addition, TGF- β inhibits the proliferation of glial cells and induces anti-inflammatory and immunosuppressive effects on these cells [57,58]. Considering the above described properties of TGF- β , it is possible to propose that the braylin-induced pharmacological effects are mediated by this anti-inflammatory cytokine. In addition, under inflammatory conditions, TGF- β inhibits TNF- α production [59], corroborating the results showed here. In fact, beneficial effects of TGF- β on models of pain have been evidenced. TGF- β induces antinociceptive effect, inhibits the activation and proliferation of microglia and astrocytes and reduces the expression of pro-inflammatory cytokines involved with neuropathic pain maintenance [58,60].

Conclusions

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first *in vivo* demonstration of pharmacological properties of braylin. Using *in vivo* and *in vitro* approach, antinociceptive, anti-inflammatory and immunomodulatory properties of braylin were demonstrated, likely linked to GR activation and its ability to induce inhibition of the transcriptional activity of NF- κ B. Our results demonstrate a strong potential of braylin as a candidate drug for the treatment of immune-inflammatory diseases.

Supporting information

S1 Table. NMR data of braylin (CD3OD, ¹H 500 MHz; ¹³C 125 MHz).
(TIF)

S1 Fig. HPLC/MS analysis of braylin (250 mm; 4.6 mm; 5 μm, flow 0.6 mL/min, 35° C).
(TIF)

S2 Fig. Interactions of (A) RU486 (pink), (B) dexamethasone (orange) and (C) braylin (cyan) with the GR. In A it is possible to see the steric hindrance displaced promoted by N,N-dimethylaniline group of the RU486 in the alpha-helix 12. Dexamethasone and braylin did not induce changes in alpha-helix 12.
(TIFF)

S3 Fig. Cytotoxic effect of braylin on RAW 264.7 Luc macrophages.
(TIF)

S4 Fig. Effects of braylin on motor function assessed by rota-rod test in mice.
(TIF)

Author Contributions

Conceptualization: CFV GHGT MBPS ESV.

Data curation: RFES GHGT ESV CFV MBPS.

Formal analysis: RFES GMF GHGT.

Funding acquisition: ESV CFV MBPS.

Investigation: RFES CSM RSC OPSF AFE GMF.

Methodology: ESV GHGT CFV MBPS.

Project administration: CFV MBPS.

Resources: CFV MBPS ESV.

Software: GMF GHGT.

Supervision: CFV MBPS.

Validation: MBPS ESV GHGT.

Visualization: GHGT CFV.

Writing – original draft: CFV MBPS GHGT.

Writing – review & editing: CFV MBPS.

References

1. Williams JP, Meyers JA. Immune-mediated inflammatory disorders (I.M.I.D.s): the economic and clinical costs. *Am J Manag Care* 2002; 21: S664–681.
2. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001; 345: 340–350. <https://doi.org/10.1056/NEJM200108023450506> PMID: 11484692
3. Kuek A, Hazleman BL, Ostor AJK. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgrad Med J*. 2007; 83: 251–260. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.052688> PMID: 17403952

4. Verpoorte R, Vander Heijden R, Memelink J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res*. 2000; 9: 323–343. PMID: [11131010](#)
5. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int*. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/963248> PMID: [23586066](#)
6. Peng XM, Damu GL, Zhou C. Current developments of coumarin compounds in medicinal chemistry. *Curr Pharm Des*. 2013; 19: 3884–3930. PMID: [23438968](#)
7. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaidis DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current Pharm Design* 2004; 10: 3813–3833.
8. Lima FO, Nonato FR, Couto RD, Barbosa-Filho JM, Nunes XP, Ribeiro dos Santos R, et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin. *J Nat Prod*. 2011; 74: 596–602. <https://doi.org/10.1021/np100621c> PMID: [21417376](#)
9. Li ZP, Hu JF, Sun MN, Ji HJ, Zhao M, Wu DH, et al. Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011; 661: 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.04.024> PMID: [21549112](#)
10. Huang GJ, Deng JS, Liao JC, Hou WC, Wang SY, Sung PJ, et al. Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in anti-inflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*. *J Agric Food Chem*. 2012; 60: 1673–1681. <https://doi.org/10.1021/jf204297e> PMID: [22188242](#)
11. Aneja R, Mukerjee SK, Seshadri TR. Synthesis of benzo-furan derivatives-I: karanj ketone, karanjin and pongapin. *Tetrahedron* 1958; 2: 203–210.
12. Lin TT, Huang YY, Tang GH, Cheng ZB, Liu X, Luo HB, et al. Prenylated coumarins: natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Toddalia asiatica*. *J Nat Prod*. 2014; 77: 955–962. <https://doi.org/10.1021/np401040d> PMID: [24597921](#)
13. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 488–520. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.5> PMID: [16968949](#)
14. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008; 39: 127–132. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0091TR> PMID: [18323530](#)
15. Salari P, Abdollahi M. Phosphodiesterase inhibitors in inflammatory bowel disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21: 261–264. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.658915> PMID: [22303952](#)
16. Houslay MD, Schafer P, Zhang KY. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1503–1519. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03622-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03622-6) PMID: [16257373](#)
17. Baumer W, Hoppmann J, Rundfeldt C, Kietzmann M. Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6: 17–26. PMID: [17352685](#)
18. Strand V, Fiorentino D, Hu C, Day RM, Stevens RM, Papp KA. Improvements in patient-reported outcomes with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in the treatment of moderate to severe psoriasis: results from a phase IIb randomized, controlled study. *Health Qual Life Outcomes* 2013. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-11-82> PMID: [23663752](#)
19. Randrianarivelojosa M, Mulholland DA, Farland KMC. Prenylated coumarins from *Cedrelopsis longibracteata* (Ptaeroxylaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2005; 33: 301–304.
20. Green LC, Wagne DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126: 131–138. PMID: [7181105](#)
21. Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 1997; 89(3): 413–424. PMID: [9150141](#)
22. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 2003; 52: 609–623. <https://doi.org/10.1002/prot.10465> PMID: [12910460](#)
23. Lima MS, Quintans LJ jr, Santana WA, Kaneto CM, Soares MBP, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol*. 2013; 699: 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.040> PMID: [23220159](#)
24. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Meth*. 1994; 53: 55–63.
25. Oliveira CM, Nonato FR, Lima FO, Couto RD, David JP, David JM, et al. Antinociceptive properties of bergenin. *J Nat Prod*. 2011; 74: 2062–2068. <https://doi.org/10.1021/np200232s> PMID: [21939182](#)
26. Gama KB, Quintans JS, Antonioli AR, Quintans LJ Jr, Santana WA, Branco A, et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the antinociceptive effect of hecogenin acetate. *J Nat Prod*. 2013; 76: 559–563. <https://doi.org/10.1021/np3007342> PMID: [23437926](#)

27. Woolfe G, MacDonald A. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Ther.* 1944; 80: 300–307.
28. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 281–286. PMID: [16101534](#)
29. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 471–479. PMID: [16101524](#)
30. Kauppi B, Jakob C, Färmegårdh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M, et al. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a conformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem.* 2003; 278(25): 22748–22754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212711200> PMID: [12686538](#)
31. Edman K, Hosseini A, Bjursell MK, Aagaard A, Wissler L, Gunnarsson A, et al. Ligand Binding Mechanism in Steroid Receptors: From Conserved Plasticity to Differential Evolutionary Constraints. *Structure* 2015; 23(12): 2280–2290. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.012> PMID: [26602186](#)
32. Matsuo Y, Yamada A, Tsukamoto K, Tamura H, Ikezawa H, Nakamura H, et al. A distant evolutionary relationship between bacterial sphingomyelinase and mammalian DNase I. *Protein Sci.* 1996; 5(12): 2459–2467. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051208> PMID: [8976554](#)
33. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009; 373: 1905–1917. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60326-3) PMID: [19482216](#)
34. Hapgood JP, Avenant C, Moliki JM. Glucocorticoid-independent modulation of GR activity: Implications for immunotherapy. *Pharmacol Ther.* 2016; 165: 93–113. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.002> PMID: [27288728](#)
35. Gienbycz MA, Newton R. Potential mechanisms to explain how LABAs and PDE4 inhibitors enhance the clinical efficacy of glucocorticoids in inflammatory lung diseases. *F1000Prime Rep.* 2015. <https://doi.org/10.12703/P7-16> PMID: [25750734](#)
36. Schacke H, Docke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96: 23–43. PMID: [12441176](#)
37. Pagès L, Gavalda A, Lehner MD. PDE4 inhibitors: a review of current developments (2005–2009). *Expert Opin Ther Pat.* 2009; 19: 1501–1519. <https://doi.org/10.1517/13543770903313753> PMID: [19832118](#)
38. Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol.* 1997; 121: 417–424. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701148> PMID: [9179382](#)
39. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503–508. PMID: [10936147](#)
40. Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral hyperalgesic cytokines. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 521: 22–39. PMID: [12617562](#)
41. Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T. Cytokines and fever. *Front Biosci.* 2004; 9: 1433–1449. PMID: [14977558](#)
42. Fehrenbacher JC, Vasko MR, Duarte DB. Models of inflammation: Carrageenan- or complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. *Curr Protoc Pharmacol.* 2012. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0504s56> PMID: [22382999](#)
43. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 597–652. PMID: [11734620](#)
44. Safieh-Garabedian B, Poole S, Allchorne A, Winter J, Woolf CJ. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1995; 115: 1265–1275. PMID: [7582555](#)
45. Faccioli LH, Souza GE, Cunha FQ, Poole S, Ferreira SH. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. *Agents Actions* 1990; 30: 344–349. PMID: [2201176](#)
46. Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006; 112: 116–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001> PMID: [16730375](#)
47. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1992; 107: 660–664. PMID: [1472964](#)
48. Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005; 102: 1755–1760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102> PMID: [15665080](#)
49. Zucali JR, Dinarello CA, Oblon DJ, Gross MA, Anderson L, Weiner RS. Interleukin 1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest.* 1986; 77: 1857–1863. <https://doi.org/10.1172/JCI112512> PMID: [3486886](#)

50. Gitter BD, Labus JM, Lees SL, Scheetz ME. Characteristics of human synovial fibroblast activation by IL-1 beta and TNF alpha. *Immunology* 1989; 66: 196–200. PMID: [2784408](#)
51. Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostanoid receptors and acute inflammation in skin. *Biochimie* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.08.010> PMID: [25179301](#)
52. Letterio JJ, Roberts AB. TGF-beta: A critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; 84: 244–250. PMID: [9281382](#)
53. Grande JP. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997; 214: 27–40. PMID: [9012358](#)
54. Dobolyi A, Vincze C, Pal G, Lovas G. The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 8219–8258. <https://doi.org/10.3390/ijms13078219> PMID: [22942700](#)
55. Chen W, Jin W, Cook M, Weiner HL, Wahl SM. Oral delivery of group a streptococcal cell walls augments circulating TGF-beta and suppresses streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol.* 1998; 161: 6297–6304. PMID: [9834119](#)
56. Jin YX, Xu LY, Guo H, Ishikawa M, Link H, Xiao BG. TGF-beta1 inhibits protracted-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by activating dendritic cells. *J Autoimmun.* 2000; 14: 213–220. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0364> PMID: [10756083](#)
57. Bottner M, Kriegstein K, Unsicker K. Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *J Neurochem.* 2000; 75: 2227–2240. PMID: [11080174](#)
58. Echeverry S, Shi XQ, Haw A, Liu H, Zhang ZW, Zhang J. Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain* 2009. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-16> PMID: [19327151](#)
59. Benveniste EN, Tang LP, Law RM. Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6 and IL-10. *Int J Dev Neurosci.* 1995; 13: 341–349. PMID: [7572286](#)
60. Chen NF, Huang SY, Chen WF, Chen CH, Lu CH, Chen CL, et al. TGF-beta1 attenuates spinal neuroinflammation and the excitatory amino acid system in rats with neuropathic pain. *J Pain* 2013; 14: 1671–1685. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.08.010> PMID: [24290447](#)

4.2 ARTIGO 2 (REDIGIDO PARA PUBLICAÇÃO) - ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA BRILINA EM MODELO DE ASMA INDUZIDA POR OVALBUMINA

Article

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA BRILINA EM MODELO DE ASMA INDUZIDA POR OVALBUMINA

Renan Fernandes do Espírito-Santo¹, Cássio Santana Meira¹, Rafael dos Santos Costa², Eudes Silva Veloso², Fábio Rocha Formiga³, Milena Botelho Pereira Soares^{1,4}, Cristiane Flora Villarreal^{1,2*}

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, 40.296-710, Salvador, BA, Brasil.

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40.170-115, Salvador, BA, Brasil.

³Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, 50.740-465, Recife, PE, Brasil.

⁴SENAI Instituto de Inovação em Sistemas Avançados de Saúde (ISI SAS), Centro Universitário SENAI/CIMATEC, 41650-010, Salvador, BA, Brasil.

* Correspondência: cfv@ufba.br.

Received: date; Accepted: date; Published: date

Resumo: Asma, a doença inflamatória pulmonar mais comum do planeta, acomete as vias aéreas superiores e inferiores, cursando com inflamação e remodelamento estrutural, o que afeta severamente a função respiratória. O tratamento farmacológico atual da asma não tem ação curativa e está associado a efeitos adversos frequentes. Considerando o potencial imunomodulador da brailina, uma cumarina natural, o presente estudo foi delineado para investigar suas propriedades farmacológicas em modelo animal de asma. Camundongos da linhagem BALB/c machos foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina, para o desenvolvimento da asma experimental, e tratados com brailina por via inalatória. Os seguintes parâmetros foram analisados: contagem de células totais e diferenciais no lavado broncoalveolar (LBA), quantificação de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA por ELISA, avaliação do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, produção de muco pelas células de Goblet. A administração inalatória de brailina (50mg/Kg) reduziu a celularidade total no LBA em 45,32% e reduziu a quantidade de neutrófilos e eosinófilos em relação ao tratamento com veículo ($p < 0,05$), assim como a administração sistêmica de dexametasona (30mg/kg, padrão ouro). A liberação de citocinas tipo Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, também foi reduzida nos animais tratados com brailina e dexametasona ($p < 0,05$). No tecido pulmonar, a brailina e a dexametasona reduziram o infiltrado de células inflamatórias e diminuíram a produção de muco em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Em conclusão, os resultados apresentados aqui indicam que o tratamento inalatório com brailina reduz diferentes parâmetros da asma experimental em camundongos, indicando que este composto tem potencial para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o controle da asma.

Palavras-chave: asma; brailina; imunomodulação; citocinas

1. Introdução

A asma é uma doença respiratória heterogênea caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas, em que o paciente apresenta histórico de falta de ar, chiado e aperto no peito, além de tosse que varia com o tempo e intensidade[1]. A heterogeneidade da doença pode ser evidenciada pelo fato de que tanto fatores genéticos quanto a exposição ambiental contribuem para sua fisiopatologia, além

da grande diferença entre os desfechos em pacientes de classes socioeconômicas diferentes[2]. Nos últimos 60 anos, a prevalência da asma tem crescido muito, o que tornou esta doença crônica uma das mais comuns do mundo, principalmente pela transição da população para ambientes cada vez mais urbanizados[3]. Atualmente, mais de 240 milhões de pessoas sofrem com asma ao redor do mundo[4] e a cada ano aproximadamente 43 milhões de novos casos são diagnosticados, sendo ainda associada a uma elevada taxa de mortalidade [5].

As opções de tratamento da asma, apesar de não serem curativas, podem auxiliar no controle dos sintomas, permitindo que o paciente asmático possua uma vida ativa e reduzindo a mortalidade[6, 7]. A escolha das alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença respiratória depende da sua severidade e incluem corticosteroides inalatórios e orais[8], agonistas β_2 adrenérgicos de longa e curta ação[9], antagonistas do receptor de leucotrienos[10] e inibidores da fosfodiesterase-4 (PDE4)[11]. (LAZARINIS; JORGENSEN; EKSTROM; BJERMER *et al.*, 2014; O'BYRNE; NAYA; KALLEN; POSTMA *et al.*, 2008)(GIEMBYCZ; NEWTON, 2015; GRUNDY; PLUMB; KAUR; RAY *et al.*, 2016) Apesar dos nítidos benefícios da terapia farmacológica para pacientes asmáticos, os efeitos adversos dos fármacos utilizados impactam negativamente em sua qualidade de vida. Esses efeitos incluem redução da velocidade de crescimento, osteoporose, diabetes, supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal, catarata e infecções respiratórias pelo uso de glicocorticoides[12], além de hipocalemia, efeitos cronotrópicos cardíacos, náuseas, vômitos[13]. Como principal consequência dos efeitos indesejados, observa-se uma baixa taxa de adesão ao medicamento profilático aumentando as taxas de hospitalização[14].

Uma das estratégias para reduzir efeitos adversos e aumentar a efetividade do tratamento é combinar mais de uma classe farmacológica para obtenção do efeito sinérgico, sendo a associação entre glicocorticoides inalatórios e agonistas β_2 uma das mais comuns para a asma[15, 16]. No entanto, uma associação que vem sendo considerada boa estratégia no tratamento das doenças respiratórias é a utilização de glicocorticoide com inibidores de PDE4[17, 18]. Nesse sentido, a utilização de fármacos com ação dual também tem sido considerada uma boa estratégia terapêutica para melhorar a resposta clínica e reduzir os efeitos adversos, principalmente quando trata-se do uso prolongado em casos de doenças crônicas, como depressão[19] e diabetes[20]. Um exemplo desses fármacos são os inibidores simultâneos de COX e 5-LOX utilizados como tratamento alternativo em algumas doenças inflamatórias[21]. No contexto da asma, no entanto, não está ainda disponível (JAIN, 2004)(WOOLSTON, 2013)um fármaco com ação dual para sua farmacoterapia.

As cumarinas, são compostos com relevantes propriedades farmacológicas[22] e com usos clínicos aprovados como anticoagulante[23], antitumoral [24] e anti-inflamatório[22], sendo considerada uma das classes químicas mais importantes dentre os compostos naturais[25]. A brailina

(6-methoxyseselin) é uma cumarina descrita pela primeira vez em 1949, cujas propriedades farmacológicas foram ainda pouco exploradas[26]. Até os dias atuais, já foram identificadas para essa cumarina atividade antiagregante plaquetária[27], vaso relaxante[28, 29] e inibição da fosfodiesterase 4[30, 31]. Em adição, nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a descrever propriedades farmacológicas da brailina *in vivo*, demonstrando sua ação anti-inflamatória e imunomoduladora em modelos animais, possivelmente, mediadas parcialmente pelo receptor de glicocorticoide[32]. Considerando as propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da brailina, assim como seu potencial para atuar como fármaco dual via receptor de glicocorticoide e via inibição de fosfodiesterase-4, o presente estudo foi delineado para investigar a atividade farmacológica da brailina em modelo animal de asma.

2. Resultados

2.1 Influência da via de administração sobre a bioatividade da brailina no modelo de asma em camundongos

Com o objetivo de estabelecer se a brailina possui atividade farmacológica quando administrada por via inalatória, o efeito da administração inalatória ou intraperitoneal dessa cumarina sobre a contagem de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) foi comparado.

Os camundongos induzidos ao modelo de asma por ovalbumina e tratados com veículo apresentaram aumento no número de células inflamatórias totais no LBA em comparação com animais naive. O número de células inflamatórias no LBA foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos animais doentes tratados com a brailina (50 mg/kg), tanto por via intraperitoneal quanto por via inalatória. Uma inibição significativa desse parâmetro também foi observada em camundongos tratados com o fármaco padrão ouro, dexametasona na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal (Figura 1).

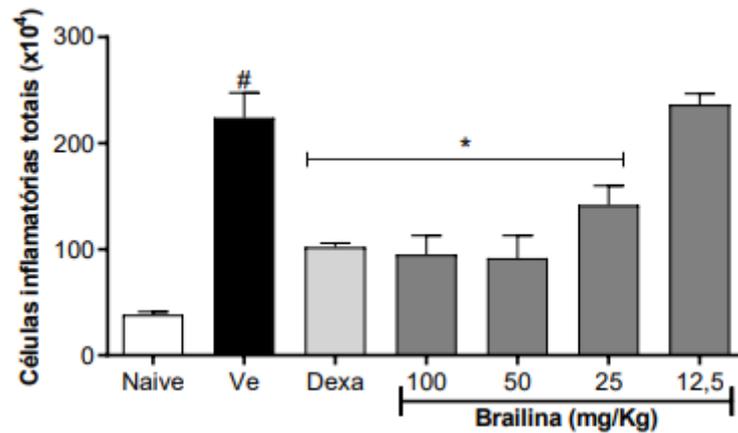


Figura 1. Efeito da brailina administrada por diferentes vias no modelo de asma em camundongos. O eixo X representa os grupos testados: camundongos sem manipulação experimental (Naive), camundongos induzidos ao modelo de asma tratados com veículo (Ve; 10% propilenoglicol em salina), com dexametasona por via intraperitoneal (30 mg/Kg/ip; padrão ouro), com brailina 50 mg/kg por via intraperitoneal (50 ip), e com brailina 50 mg/kg por via inalatória (50 in). O eixo Y mostra a quantidade de células inflamatórias totais (x10⁴) contadas no lavado broncoalveolar. Os tratamentos foram realizados durante 5 dias consecutivos, 2 horas antes do desafio com ovalbumina. O lavado broncoalveolar foi coletado para as quantificações 24 horas após o último desafio. As células foram quantificadas no lavado broncoalveolar em microscópio de luz com o auxílio da câmara de Neubauer. *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo veículo (p<0,05). #Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo naive (p<0,05). Dados representados como média ± desvio padrão com n=5 animais por grupo. Teste de one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey de comparação múltipla.

2.2 Curva dose resposta da brailina inalatória no modelo de asma em camundongos

A relação de dose-dependência do efeito da brailina administrada por via inalatória na faixa de dose de 12,5 a 100 mg/kg foi a seguir avaliada (Figura 2). A brailina inalatória nas doses de 25,50 e 100 mg/Kg reduziu, de modo não dependente da dose, a quantidade de células inflamatórias no LBA de camundongos com asma experimental em comparação com os tratados com veículo (p<0,05). Na dose de 12,5 mg/Kg a brailina não apresentou efeito. O efeito da brailina inalatória teve eficácia similar ao tratamento com dexametasona (30 mg/kg/ip), considerado padrão ouro nesse ensaio.

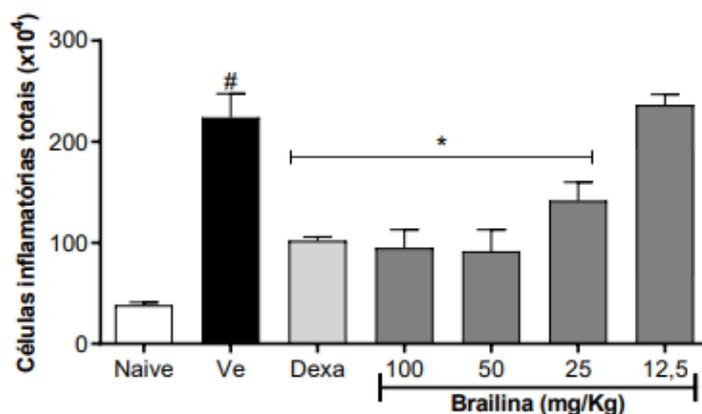


Figura 2. Curva de dose-resposta da brailina inalatória no modelo de asma em camundongos. O eixo X representa os grupos testados: camundongos sem manipulação experimental (Naive), camundongos induzidos ao modelo de asma tratados com veículo (Ve; 10% propilenoglicol em salina) e brailina (12,5 a 100 mg/kg) por via inalatória. Dexametasona (30 mg/kg) por via intraperitoneal foi o padrão ouro. O eixo Y mostra a quantidade de células inflamatórias totais (x10⁴) contadas no lavado broncoalveolar. Os tratamentos foram realizados durante 5 dias consecutivos, 2 horas antes do desafio com ovalbumina. O lavado broncoalveolar foi coletado para as quantificações 24 horas após o último desafio. As células foram quantificadas no lavado broncoalveolar em microscópio de luz com o auxílio da câmara de Neubauer. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo (p<0,05). [#]Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo naive (p<0,05). Dados representados como média ± desvio padrão com n=5 animais por grupo. Teste de one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey de comparação múltipla.

2.3 Brailina reduz a presença de eosinófilos e neutrófilos no lavado broncoalveolar

Além de quantificar o número total de células inflamatórias do lavado broncoalveolar, também foi realizada a quantificação diferencial entre eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares nessas amostras (Figura 3). O tratamento inalatório com brailina (50 mg/Kg) reduziu a quantidade de eosinófilos e neutrófilos presentes no LBA em comparação com o lavado de animais tratados com veículo (p<0,05). A quantidade das células mononucleares dos animais tratados com brailina se aproximou dos valores encontrados nos camundongos do grupo naive, não induzidos à asma experimental. A dexametasona (30 mg/kg/ip) induziu efeito com perfil similar ao da brailina, com redução nos números de eosinófilos e neutrófilos no LBA.

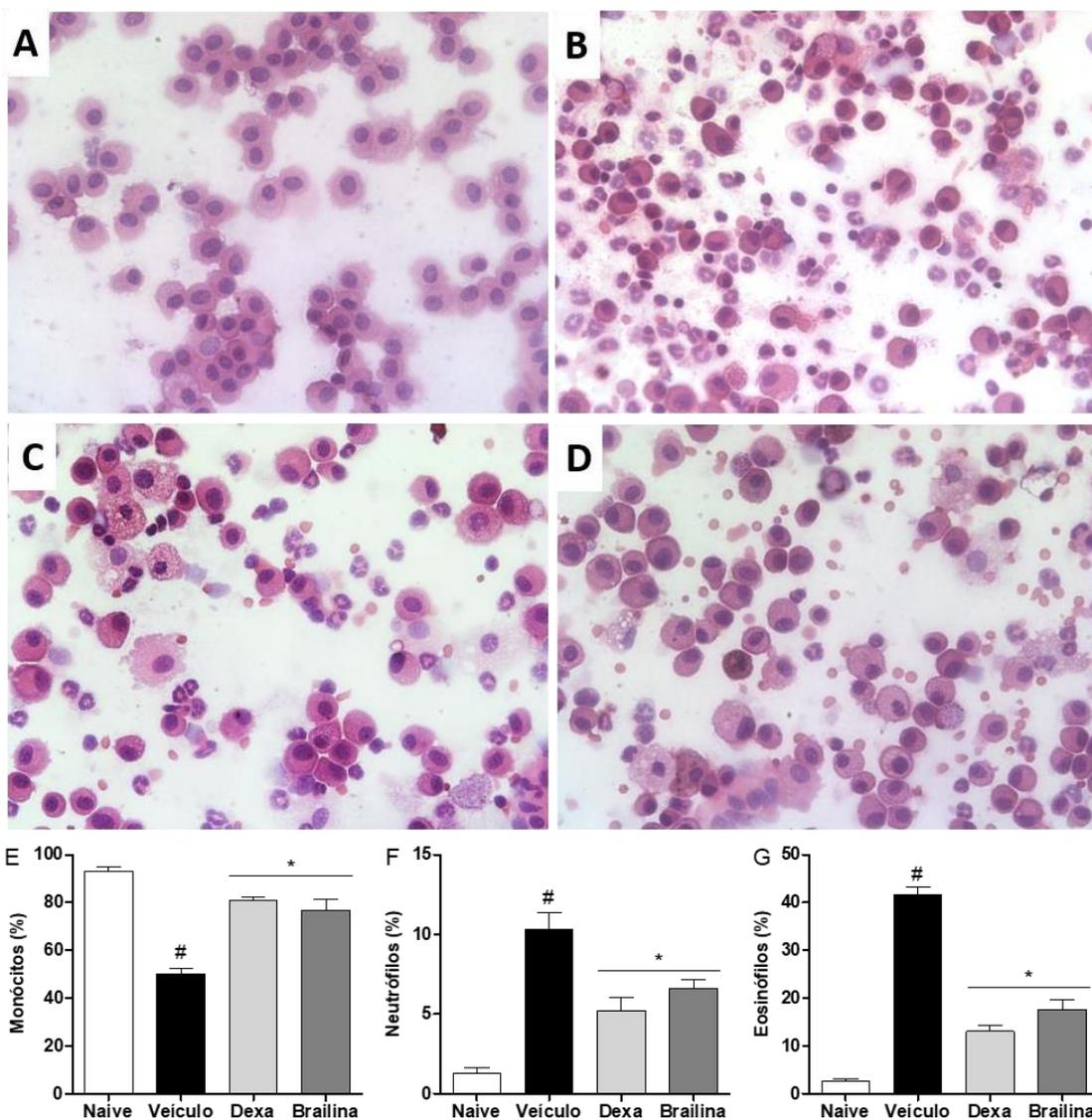


Figura 3. Efeito da brailina sobre a contagem diferencial de células inflamatórias do lavado broncoalveolar no modelo de asma em camundongos. Painéis mostram imagens representativas de células de lavado broncoalveolar de (A) animais naive, (B) animais induzidos ao modelo de asma e tratados com veículo, (C) animais induzidos e tratados com dexametasona (30 mg/kg/ip), e (D) animais induzidos ao modelo e tratados com brailina (50 mg/Kg/in). Material corado com hematoxilina e eosina, aumento de (100X). Quantificação diferencial de monócitos (E), neutrófilos (F) e eosinófilos (G) no lavado broncoalveolar. Dado representado como percentual em relação à contagem total. #diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$). *Diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo veículo ($p < 0,05$). Dados representados como média \pm desvio padrão com $n=5$ animais por grupo. Teste de one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey de comparação múltipla.

2.4 Brailina modula as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13

Os níveis das citocinas que participam da resposta Th2 foram quantificados no lavado broncoalveolar dos camundongos dos diferentes grupos experimentais. Camundongos induzidos ao modelo de asma apresentaram níveis elevados das citocinas de IL4, IL-5 e IL-13 no LBA em relação

aos camundongos naive ($p < 0,05$). Brailina inalatória, nas doses de 25 e 50 mg/Kg, reduziu os níveis de IL4, IL-5 e IL-13 no LBA ($p < 0,05$). No entanto, brailina na dose de 12,5 mg/kg, induziu redução significativa de IL-5 e IL-13, mas não de IL-4, no LBA dos camundongos. Os animais tratados com a dexametasona sistêmica (30 mg/kg/ip) apresentaram redução nos níveis de todas as citocinas quantificadas no LBA (Figura 4), com magnitude similar ao obtido com a brailina inalatória.

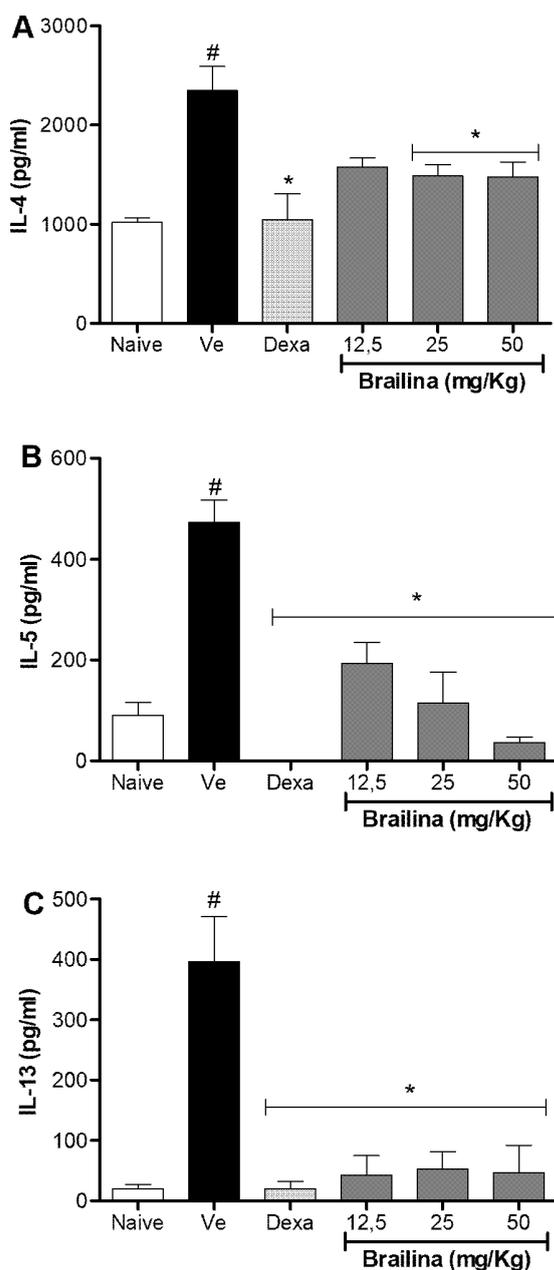


Figura 4. Efeito da brailina sobre os níveis de citocinas no lavado broncoalveolar de camundongos com asma experimental. Painéis mostram os níveis das citocinas (A) IL-4, (B) IL-5 e (C) IL-13 no lavado broncoalveolar de camundongos, determinados por ELISA. O eixo X representa os grupos testados: camundongos sem manipulação experimental (Naive), camundongos induzidos ao modelo de asma tratados com veículo (Ve; 10% propilenoglicol

em salina), dexametasona (30 mg/Kg/ip; padrão ouro), e brailina (12,5, 50 e 100 mg/kg) por via inalatória. Os tratamentos foram realizados durante 5 dias consecutivos, 2 horas antes do desafio com ovalbumina. O lavado broncoalveolar foi coletado para as quantificações 24 horas após o último desafio. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$). #Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$). Dados representados como média \pm desvio padrão com $n=6$ animais por grupo. Teste de one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey de comparação múltipla.

2.4 *Brailina reduz o infiltrado inflamatório pulmonar e a ocorrência de metaplasia das células de Goblet.*

Para caracterizar as alterações teciduais provocadas pela indução do modelo asma e o possível efeito da brailina sobre a migração das células inflamatórias, foram examinados cortes de pulmões corados com HE. Um grande infiltrado celular contendo linfócitos, macrófagos e eosinófilos foi observado nos animais induzidos ao modelo e tratados com veículo. Os camundongos tratados com brailina inalatória a 50 mg/Kg tiveram redução na inflamação pulmonar com diminuição da presença de células inflamatórias em comparação com os animais tratados com veículo ($p < 0,05$, Figura 5I). O tratamento sistêmico com dexametasona (30 mg/Kg/ip) também foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório pulmonar. A ocorrência de metaplasia das células de Goblet no epitélio bronquiolar foi determinada por coloração do tecido com ácido periódico-Schiff (PAS) e evidencia uma maior formação de muco. Os pulmões de camundongos com asma experimental tratados com veículo apresentaram uma maior área corada com PAS ($p < 0,05$, Figura 5J). O tratamento com brailina reduziu a marcação de células de Goblet no epitélio bronquiolar dos animais com asma induzida ($p < 0,05$), indicando sua capacidade de modular a produção de muco. Como esperado, a dexametasona sistêmica também reduziu a presença de muco nas células de Goblet coradas com PAS.

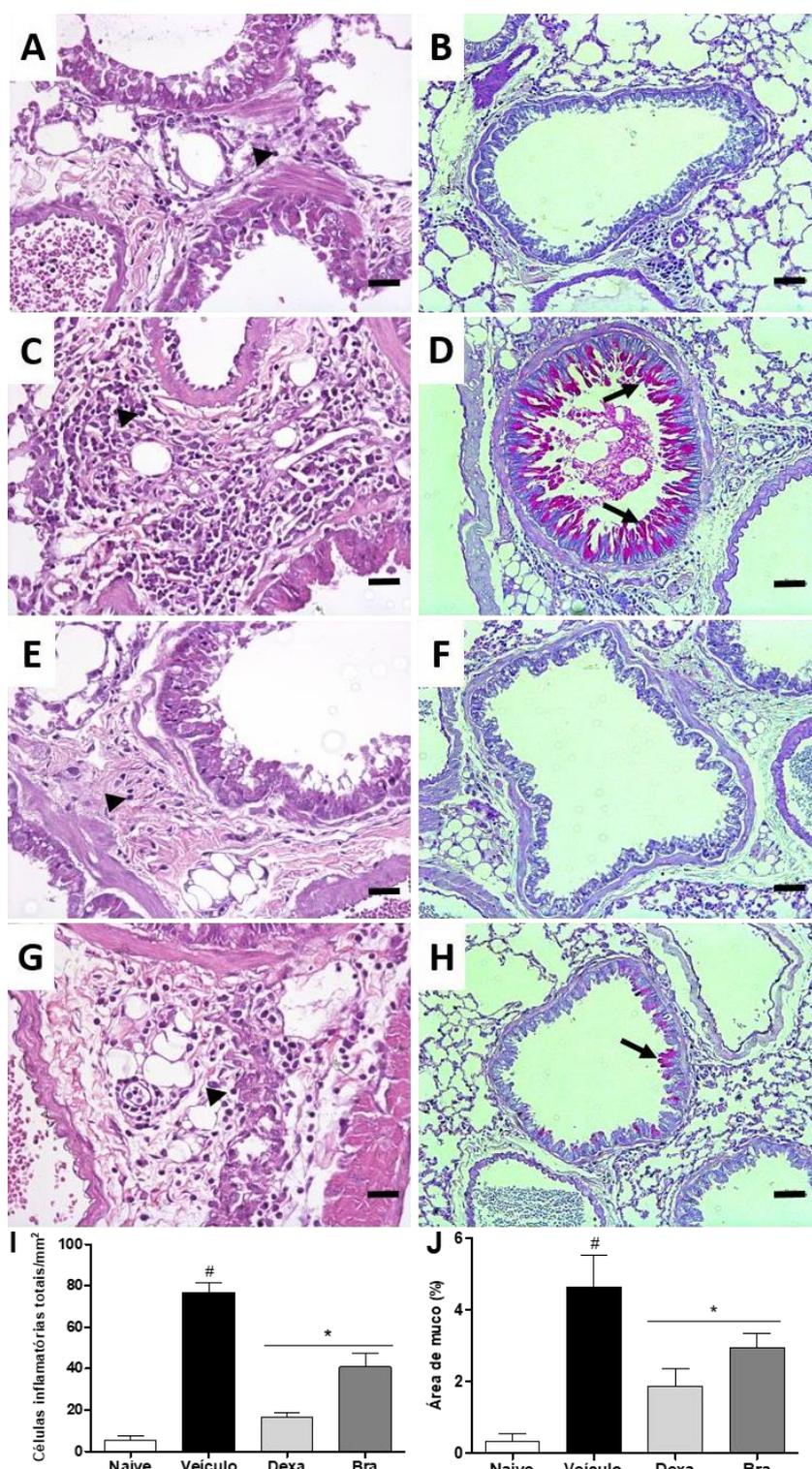


Figura 5. Efeitos da brailina sobre parâmetros teciduais e celulares pulmonares. Painéis mostram imagens representativas de camundongos tratados com veículo (C-D), dexametasona (E-F; 30 mg/kg/ip) ou brailina (G-H; 50 mg/kg/in). Animais não manipulados experimentalmente compreendem o grupo naive (A-B). Pulmões corados com HE (A,C,E,G). Pulmões corados com ácido periódico-Schiff (PAS) (B, D, F, H). Cabeças de seta indicam células do infiltrado inflamatório. Setas indicam as células de Goblet marcadas com PAS. Aumento de 40X, barra de 50 μ m. Painel I mostra a contagem de células no infiltrado inflamatório dos diferentes grupos experimentais,

enquanto o painel J a quantificação de células de Goblet produtoras de muco marcadas com PAS. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo veículo ($p < 0,05$).

#Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo naive ($p < 0,05$). Dados representados como média \pm desvio padrão com $n=5$ animais por grupo. Teste de one-way ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey de comparação múltipla.

3 Discussão

O presente estudo evidenciou a atividade farmacológica da brailina, administrada por via inalatória, em modelo animal de asma induzida por ovalbumina. A brailina modulou relevantes parâmetros associados à fisiopatologia da asma experimental, como a redução do infiltrado inflamatório no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar, a redução da metaplasia das células de Goblet e a inibição da produção de citocinas chaves para o desenvolvimento da resposta imune Th2. Esses resultados indicam que essa cumarina natural tem potencial como candidato à fármaco no processo de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da asma.

A brailina reduziu a celularidade do lavado broncoalveolar em camundongos com asma induzida. O efeito da brailina administrada por via inalatória na dose de 50 mg/Kg teve eficácia similar à da dexametasona sistêmica na dose de 30 mg/kg. Esses resultados apontam que o efeito farmacológico da brailina é relevante, considerando que na faixa de dose sistêmica utilizada aqui, a dexametasona é considerada padrão ouro na asma experimental[33]. Além disso, ter eficácia por via inalatória é uma propriedade extremamente desejada para candidatos a fármacos destinados ao tratamento da asma. O uso crônico de corticoides provoca efeitos adversos graves como osteopenia, hiperglicemia, catarata e hipertensão, limitando seu uso sistêmico [34, 35]. Dessa forma, sua administração inalatória se mostrou uma boa estratégia terapêutica no tratamento da asma pois permite atingir uma alta concentração local do ativo nos pulmões, com reduzida absorção e, conseqüentemente, menos efeitos adversos[36]. De fato, o desenvolvimento dos glicocorticoides inalatórios revolucionou a farmacoterapia da asma a partir dos anos 1950. Mesmo com relatos de tratamentos via inalatória na Índia há 4000 anos atrás, foi em 1956 graças ao inalador dosimetrado que este método de administração foi incorporado no manejo de pacientes asmáticos, sendo hoje considerado peça chave no tratamento desta doença [37].

Além da redução do infiltrado total, uma diminuição da quantidade de neutrófilos e eosinófilos foi observada no LBA dos animais tratados com brailina, sugerindo que essa cumarina induz uma alteração fenotípica benéfica na população de células encontradas no LBA de animais com asma experimental. A presença de neutrófilos é comum e alguns pacientes com asma crônica, sendo as primeiras células recrutadas pós início da reação alérgica. Quando ativados no tecido pulmonar, neutrófilos se tornam aptos a liberar mediadores, como espécies reativas de oxigênio, mieloperoxidases, IL-8,

tromboxanos, elastase e moléculas de adesão, que juntos promovem a broncoconstrição, formação de exsudato, hiperprodução de muco, hiper-reatividade e remodelamento brônquico, prolongando os sintomas da asma[38-44]. De fato, a maioria das pessoas que sofrem de asma severa exibem um aumento da quantidade de neutrófilos no LBA [45, 46]. No que diz respeito aos eosinófilos, sua presença possui uma relação direta com a gravidade da asma, e essas células apresentam um papel central na patogênese da doença. De modo que, quando recrutados e ativados via citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, liberaram leucotrienos e outros mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico, aumentando o estado inflamatório pulmonar, induzindo o hiperresponsividade e remodelamento das vias aéreas[47, 48]. Nesse contexto, a inibição da produção de citocinas de perfil Th2 pela brailina, demonstrada no presente estudo, reforça o potencial dessa cumarina para aplicação futura na farmacoterapia da asma. As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, todas moduladas negativamente pela brailina, estão envolvidas diretamente na sinalização, recrutamento e diferenciação de células envolvidas na fisiopatologia da asma[49]. Foi demonstrado que o aumento da IL-5 em indivíduos asmáticos está diretamente relacionado à diferenciação, recrutamento e ativação de eosinófilos nos pulmões[50], assim como IL-4 e IL-13 são responsáveis pela liberação de IgE via ativação de células B, e atuam diretamente na musculatura lisa e epitélio das vias aéreas provocando a hiper-reatividade das mesmas[47]. De fato, a capacidade das cumarinas de modular a produção de citocinas que fazem parte da resposta Th2 já foi demonstrada por Li e Wu[51], que demonstraram que cumarinas reduzem a liberação de histamina por mastócitos, de IL-4 e a ativação do fator de transcrição NFkB. Chiang e colaboradores também demonstraram a atividade da cumarina ostoleem modelo de asma induzida por OVA com redução da produção de IL-4, IL-5 e IL-13, do infiltrado inflamatório e da produção de muco no tecido pulmonar[52].

No presente estudo, o tratamento inalatório com brailina também foi capaz de reduzir a produção de muco pelas células de Goblet no tecido pulmonar. Estudos anteriores correlacionaram a redução da produção de muco com a redução da resposta alérgica em modelo de asma[33, 53, 54]. Esta correlação ressalta a importância da modulação da metaplasia das células de Goblet, um parâmetro característico do quadro asmático. A metaplasia destas células caliciformes e aumento da produção de muco são responsáveis pela primeira linha de defesa contra substâncias tóxicas, alérgenos ou detritos que acessam as vias aéreas[55]. Porém, quando a metaplasia mucosa persiste, esta hipersecreção de muco contribui para o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes asmáticos[56]. Dessa forma, o efeito inibitório da brailina sobre a produção de muco pelas células de Goblet, reforça o potencial terapêutico dessa cumarina para a asma.

Os mecanismos responsáveis pelos efeitos farmacológicos da brailina não são ainda bem compreendidos. Embora essa questão não tenha sido objeto do presente estudo, é possível que os efeitos

terapêuticos aqui descritos na asma experimental dependam da ativação de receptores de glicocorticoides[32] e da inibição de PDE4[31], os quais são mecanismos de ação já propostos para a brailina. Utilizando abordagens *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, Espírito-Santo, et al. [32] demonstraram que a brailina induz efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores mediados, pelo menos em parte, por receptores de glicocorticoide. Adicionalmente, Lin et al. [31], demonstraram que a brailina foi capaz de inibir a atividade da PDE4 em ensaio enzimático, com valor de IC₅₀ menor que 10 µM. Trabalhos como o de Junchao et al.[57] e Belvisi et al.[58], demonstraram que moléculas farmacologicamente ativas em modelo de asma via receptor glicocorticoide exibem efeitos com perfil similar ao demonstrado para a brailina, ou seja, redução da produção de muco, diminuição do infiltrado inflamatório tecidual e da celularidade do LBA, e modulação de citocinas Th2. Seguindo a mesma linha de raciocínio, o inibidor de PDE4 piclamilast também apresenta padrão de efeitos farmacológicos similar à brailina em modelo experimental de asma induzida por OVA [59]. Portanto, é possível especular que os efeitos da brailina na asma experimental sejam mediados por sua ação dual em receptores de glicocorticoides e PDE4, embora essa hipótese não tenha sido investigada no presente trabalho.

Segundo Kumar e colaboradores, apesar dos inibidores de PDE4 e agonistas glicocorticoides serem potentes inibidores da inflamação das vias aéreas e do remodelamento, eles possivelmente agem de forma diferente, podendo ser complementares no efeito terapêutico na asma [60]. Dessa forma, os dados aqui apresentados indicam que a brailina pode representar um protótipo inovador para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da asma. Embora essa hipótese seja também corroborada pelo fato de fármacos clinicamente importantes no tratamento da asma incluírem os agonistas de receptores de glicocorticoides e os inibidores de PDE4[61, 62], ela ainda requer estudos de confirmação.

4 Material e Métodos

4.1 Extração, isolamento e identificação da brailina

Espécimes de *Z. tingoassuiba* St. Hil foram coletadas em 12 de agosto de 2009 no distrito de Jaíba município de Feira de Santana – Bahia (12° 12' 52.560" S; 38° 52' 46.205" W). A identificação do espécime foi realizada pela Professora Maria Lenise da Silva Guedes. Com exsicata depositada no Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) sob o número 88005. Os procedimentos de extração purificação e identificação da brailina a partir raízes de *Z. tingoassuiba* St. Hil foram descritos por Costa e colaboradores[63]. A fórmula foi estabelecida por análise em espectroscopia de massa e ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmação da sua estrutura química com grau de pureza superior a 99%[64].

4.2 Animais

Camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 20 e 25g, provenientes do biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos e manipulações foram aprovados pela Comissão de ética para experimentação animal da FIOCRUZ (CEUA/FIOCRUZ/ L-IGM-015/2013).

4.3 Modelo de asma e tratamentos

Os camundongos foram divididos em grupos de seis animais e imunizados com uma injeção subcutânea de 10 μg de ovalbumina (Sigma, St. Louis, MO) diluída em 2 mg/ml alum (AlumImject; Pierce, Rockford, IL), seguida de uma injeção de reforço 14 dias depois. A partir do dia 28, os camundongos foram acondicionados em caixa de acrílico e submetidos à exposição inalatória de ovalbumina (1%) durante 15 minutos por dia, durante cinco dias consecutivos. A solução de ovalbumina foi nebulizada pelo inalador ultrassônico (RespiraMax, Brasil). O protocolo utilizado para indução da asma experimental foi realizado como previamente descrito [48]. O grupo naive foi desafiado apenas com solução salina. Para a realização dos tratamentos, duas horas antes de cada desafio por via inalatória, os camundongos foram tratados com brailina (100, 50, 25,5 e 12,5 mg/kg, via inalatória), dexametasona (30 mg/kg via intraperitoneal) ou veículo (10% propilenoglicol em salina, via inalatória).

4.4 Coleta do lavado broncoalveolar

Os animais foram eutanasiados com dose letal de cetamina e xilazina (300mg/Kg e 30mg/Kg, respectivamente via i.p.) 24 horas após o último desafio para a coleta do lavado broncoalveolar (LBA). Foi realizada a instilação intratraqueal de 1 ml de PBS gelado, seguida de coleta do LBA, e esse procedimento foi repetido. A primeira lavagem foi centrifugada e o sobrenadante armazenado a -70°C para posterior quantificação de citocinas por ELISA. A segunda lavagem foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e os pellets ressuspensos em 1 ml de salina para a contagem de leucócitos totais com auxílio da câmara de Neubauer. Para a realização da contagem diferencial das células, foram coletadas 10.000 células da ressuspensão anterior, centrifugadas no Cytospin® e coradas com hematoxilina e eosina [33].

4.5 Análise histopatológica e morfométrica

Após a coleta do lavado broncoalveolar, foi realizada a perfusão pulmonar via intratraqueal com 1 ml formalina (4%) e, posteriormente, o lobo direito dos pulmões de cada animal foi removido e

fixado na mesma solução para análise histológica e morfométrica. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina para quantificação das células inflamatórias por microscopia ótica de acordo com a quantidade de núcleos presentes nos campos com maior população de células. Para a quantificação da produção de muco, a coloração foi feita com ácidoperiódico de Schiff (PAS) e as áreas marcadas foram quantificadas. A área de tecido pulmonar marcada com PAS foi considerada positiva para o muco produzido pelas células de Goblet [65]. Foram analisados 10 campos (400x) por animal em um total de 5 animais, e os dados foram utilizados para calcular a média de células por mm², ou a área corada com PAS. O programa utilizado para auxiliar na contagem de células e determinação da área foi o Image-Pro PLUS, versão 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA).

4.6 Quantificação de citocinas no lavado broncoalveolar

O sobrenadante do lavado broncoalveolar armazenado a -70°C foi descongelado e utilizado para a quantificação das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 pelo método de ELISA, usando kits específicos (R&D System, Minnesota, MN, USA) para camundongos, seguindo as instruções do fabricante[33].

4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, com nível de significância previamente estabelecido em $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.0 (Califórnia, LA, USA).

5 Conclusão

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a brailina administrada por via inalatória tem propriedades farmacológicas consistentes na asma experimental. Essa cumarina reduziu importantes eventos fisiopatológicos associados a asma, com eficácia similar à dexametasona sistêmica, considerada o fármaco padrão ouro. Estes resultados sugerem que a brailina pode ser um promissor candidato no tratamento da asma por regular a resposta Th2 e apresentar eficácia relevante por via inalatória. Com base no perfil farmacológico aqui descrito e nos dados da literatura sobre seu mecanismo de ação, é possível que os efeitos da brailina na asma experimental decorram de sua ação dual em receptores de glicocorticoide e inibição de fosfodiesterase-4. No entanto, estudos mais aprofundados, sobretudo no que diz respeito ao mecanismo de ação da brailina, são ainda necessários.

Contribuições dos autores: Conceito, Espírito-Santo, R.F., Villarreal, C.F.; metodologia, Espírito-Santo, R.F., Costa, R.S., Velozo, E.S, Soares, M.B.P.; Obtenção dos dados, Espírito-Santo, R.F., Meira, C.S., Costa, R.S.; Escrita original, Espírito-Santo, R.F; escrita, revisão e edição, Villarreal, C.F.; supervisão, Villarreal, C.F. e Formiga, F.R.;

administração do projeto, Espírito-Santo, R.F., Villarreal, C.F.; aquisição de recursos, Soares, M.B.P., Villarreal, C.F., Velozo, E.S. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Este trabalho teve suporte financeiro da FIOCRUZ, CNPq e CAPES.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

1. Asthma, G.I.f., *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. 2020.
2. Barnthouse, M. and B.L. Jones, *The Impact of Environmental Chronic and Toxic Stress on Asthma*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2019. **57**(3): p. 427-438.
3. Beasley, R., A. Semprini, and E.A. Mitchell, *Risk factors for asthma: is prevention possible?*
4. *The Lancet*, 2015. **386**(9998): p. 1075-1085.
5. Stern, J., J. Pier, and A.A. Litonjua, *Asthma epidemiology and risk factors*. *Semin Immunopathol*, 2020. **42**(1): p. 5-15.
6. Mattiuzzi, C. and G. Lippi, *Worldwide asthma epidemiology: insights from the Global Health Data Exchange database*. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2020. **10**(1): p. 75-80.
7. Taylor, Y.J., et al., *Impact of shared decision making on asthma quality of life and asthma control among children*. *J Asthma*, 2018. **55**(6): p. 675-683.
8. Suissa, S., et al., *Low-dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(5): p. 332-6.
9. Busse, W.W., et al., *The Inhaled Steroid Treatment As Regular Therapy in Early Asthma (START) study 5-year follow-up: effectiveness of early intervention with budesonide in mild persistent asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(5): p. 1167-74.
10. Tee, A.K., et al., *Long-acting beta2-agonists versus theophylline for maintenance treatment of asthma*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(3): p. CD001281.
11. Montuschi, P. and M.L. Peters-Golden, *Leukotriene modifiers for asthma treatment*. *Clin Exp Allergy*, 2010. **40**(12): p. 1732-41.
12. Campos, H., et al., *Inibidores de fosfodiesterases: novas perspectivas de uma antiga terapia na asma?* *Jornal de Pneumologia*, 2003. **29**(6): p. 405-412.
13. Heffler, E., et al., *Inhaled Corticosteroids Safety and Adverse Effects in Patients with Asthma*. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2018. **6**(3): p. 776-781.
14. Newnham, D.M., *Asthma medications and their potential adverse effects in the elderly: recommendations for prescribing*. *Drug Saf*, 2001. **24**(14): p. 1065-80.
15. Horne, R., *Compliance, adherence, and concordance: implications for asthma treatment*. *Chest*, 2006. **130**(1 Suppl): p. 65S-72S.
16. O'Byrne, P.M., et al., *Increasing doses of inhaled corticosteroids compared to adding long-acting*

- inhaled beta2-agonists in achieving asthma control.* Chest, 2008. **134**(6): p. 1192-1199.
17. Lazarinis, N., et al., *Combination of budesonide/formoterol on demand improves asthma control by reducing exercise-induced bronchoconstriction.* Thorax, 2014. **69**(2): p. 130-6.
 18. Giembycz, M.A. and R. Newton, *Potential mechanisms to explain how LABAs and PDE4 inhibitors enhance the clinical efficacy of glucocorticoids in inflammatory lung diseases.* F1000Prime Rep, 2015. **7**: p. 16.
 19. Grundy, S., et al., *Additive anti-inflammatory effects of corticosteroids and phosphodiesterase-4 inhibitors in COPD CD8 cells.* Respir Res, 2016. **17**: p. 9.
 20. Jain, R., *Single-action versus dual-action antidepressants.* Prim Care Companion J Clin Psychiatry, 2004. **6**(Suppl 1): p. 7-11.
 21. Woolston, C., *Dual-action drug shows promise against diabetes.* Nature, 2013.
 22. Bertolini, A., A. Ottani, and M. Sandrini, *Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal.* Pharmacol Res, 2001. **44**(6): p. 437-50.
 23. Annunziata, F., et al., *An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(13).
 24. Wardrop, D. and D. Keeling, *The story of the discovery of heparin and warfarin.* Br J Haematol, 2008. **141**(6): p. 757-63.
 25. Kupeli Akkol, E., et al., *Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer.* Cancers (Basel), 2020. **12**(7).
 26. Malikov, V.M. and A.I. Saidkhodzhaev, *Coumarins. Plants, structure, properties.*
 27. Chemistry of Natural Compounds, 1998. **34**(3): p. 345-409.
 28. Aneja, R., S.K. Mukerjee, and T.R. Seshadri, *Synthesis of benzo-furan derivatives-I.*
 29. Tetrahedron, 1958. **2**(3-4): p. 203-210.
 30. Tsai, I.-L., et al., *Anti-platelet aggregation constituents from formosan Toddalia asiatica.*
 31. Phytochemistry, 1998. **48**(8): p. 1377-1382.
 32. Rakotoarison, O., et al., *Vasorelaxing properties and bio-guided fractionation of Cedrelopsis grevei.* Planta Med, 2003. **69**(2): p. 179-81.
 33. Santos, W.A., et al., *Braylin induces a potent vasorelaxation, involving distinct mechanisms in superior mesenteric and iliac arteries of rats.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2020.
 34. Chen, L., et al., *(P)/(M)-corinepalensin A, a pair of axially chiral prenylated bicoumarin enantiomers with a rare C-5C-5' linkage from the twigs of Coriaria nepalensis.* Phytochemistry, 2018. **149**: p. 140-145.
 35. Lin, T.T., et al., *Prenylated coumarins: natural phosphodiesterase-4 inhibitors from Toddalia asiatica.* J Nat Prod, 2014. **77**(4): p. 955-62.

36. Espirito-Santo, R.F., et al., *The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179174.
37. Vasconcelos, J.F., et al., *Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation*. Eur J Pharmacol, 2009. **609**(1-3): p. 126-31.
38. Shen, J.Z. and M.J. Young, *Corticosteroids, heart failure, and hypertension: a role for immune cells?* Endocrinology, 2012. **153**(12): p. 5692-700.
39. Poetker, D.M. and D.D. Reh, *A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids*. Otolaryngol Clin North Am, 2010. **43**(4): p. 753-68.
40. Lipworth, B.J., *Pharmacokinetics of inhaled drugs*. Br J Clin Pharmacol, 1996. **42**(6): p. 697-705.
41. Crompton, G., *A brief history of inhaled asthma therapy over the last fifty years*. Prim Care Respir J, 2006. **15**(6): p. 326-31.
42. Macdowell, A.L. and S.P. Peters, *Neutrophils in asthma*. Curr Allergy Asthma Rep, 2007.
43. **7**(6): p. 464-8.
44. Monteseirín, J., *Neutrophils and asthma*. J Invest Allergol Clin Immunol, 2009. **19**.
45. Cundall, M., et al., *Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p.1064-71.
46. Amitani, R., et al., *Effects of human neutrophil elastase and Pseudomonas aeruginosa proteinases on human respiratory epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **4**(1): p. 26-32.
47. Hood, P.P., et al., *Effect of intravenous corticosteroid on ex vivo leukotriene generation by blood leucocytes of normal and asthmatic patients*. Thorax, 1999. **54**(12): p. 1075-82.
48. Chabannes, B., et al., *Leukotriene B4 level in neutrophils from allergic and healthy subjects stimulated by low concentration of calcium ionophore A23187*. Biochim Biophys Acta, 1991.**1093**(1): p. 47-54.
49. Gosset, P., et al., *Interleukin-8 secretion in patients with allergic rhinitis and allergen challenge: interleukin-8 is not the main chemotactic factor present in nasal lavages*. Clinical & Experimental Allergy, 1997. **27**(4): p. 379-388.
50. Wenzel, S.E., et al., *Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(3 Pt 1): p.737-43.
51. Tanizaki, Y., et al., *Changes in the proportions of bronchoalveolar lymphocytes, neutrophils and basophilic cells and the release of histamine and leukotrienes from bronchoalveolar cells in patients with steroid-dependent intractable asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **101**(2):p. 196-202.
52. Barrios, R.J., et al., *Asthma: Pathology and Pathophysiology*. Arch Pathol Lab Med, 2006.
53. **130**(4): p. 447-51.
54. Possa, S.S., et al., *Eosinophilic inflammation in allergic asthma*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p.46.

55. Boyton, R.J. and D.M. Altmann, *Asthma: new developments in cytokine regulation*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(1): p. 13-4.
56. Corry, D.B., et al., *Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice*. Mol Med, 1998. **4**(5): p. 344-55.
57. Li, D. and L. Wu, *Coumarins from the roots of Angelica dahurica cause anti-allergic inflammation*. Exp Ther Med, 2017. **14**(1): p. 874-880.
58. Chiang, C.Y., et al., *Osthole treatment ameliorates Th2-mediated allergic asthma and exerts immunomodulatory effects on dendritic cell maturation and function*. Cell Mol Immunol, 2017.
59. Wang, J., et al., *Anti-asthmatic activity of osthole in an ovalbumin-induced asthma murine model*. Respir Physiol Neurobiol, 2017. **239**: p. 64-69.
60. Xiong, Y., et al., *The effects of nodakenin on airway inflammation, hyper-responsiveness and remodeling in a murine model of allergic asthma*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014. **36**(5): p. 341-8.
61. Curran, D.R. and L. Cohn, *Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(3): p. 268-75.
62. R. Hays, S. and J.V. Fahy, *The role of mucus in fatal asthma*. The American Journal of Medicine, 2003. **115**(1): p. 68-69.
63. Junchao, Y., et al., *Anti- trachea inflammatory effects of diosgenin from Dioscorea nipponica through interactions with glucocorticoid receptor alpha*. J Int Med Res, 2017. **45**(1): p. 101- 113.
64. Belvisi, M.G., et al., *Preclinical profile of ciclesonide, a novel corticosteroid for the treatment of asthma*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(2): p. 568-74.
65. Sun, J.G., et al., *Inhibition of phosphodiesterase activity, airway inflammation and hyperresponsiveness by PDE4 inhibitor and glucocorticoid in a murine model of allergic asthma*. Life Sci, 2006. **79**(22): p. 2077-85.
66. Kumar, R.K., et al., *Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(1): p. 349-55.
67. Lipworth, B.J., *Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. The Lancet, 2005. **365**(9454): p. 167-175.
68. Barnes, P.J., *Inhaled glucocorticoids for asthma*. N Engl J Med, 1995. **332**(13): p. 868-75.
69. Costa, R.S., et al., *In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity of compounds isolated from the roots of Zanthoxylum tingoassuiba*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2018. **28**(5): p. 551-558.
70. Yoo, S.W., et al., *Constituents of the fruits and leaves of Euodia daniellii*. Arch Pharm Res, 2002. **25**(6): p. 824-30.

71. Southam, D.S., et al., *Goblet cell rebound and airway dysfunction with corticosteroid withdrawal in a mouse model of asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(11): p. 1115-22.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, as propriedades anti- inflamatórias e imunomoduladoras da brailina, uma molécula natural da classe das cumarinas. Utilizando ensaios *in silico*, *in vitro* e modelos de inflamação, dor e asma em camundongos, os efeitos terapêuticos da brailina foram caracterizados, e corroboram seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle da inflamação e asma.

O potencial anti-inflamatório da brailina foi inicialmente investigado *in vitro*. Utilizando ensaios em macrófagos, foi possível estabelecer que essa cumarina inibe a resposta dessas células à estímulos inflamatórios, reduzindo a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL1- β e IL-6, em macrófagos estimulados com LPS+INF- γ . Com base nos resultados dos ensaios *in vitro*, e considerando o potencial intrínseco das cumarinas como moléculas farmacologicamente ativas, e seu núcleo químico com grande potencial de atividade anti-inflamatória (BANSAL; SETHI; BANSAL, 2012), foi a seguir avaliado se a brailina tem propriedades farmacológicas em modelos experimentais de inflamação e dor em camundongos. Baseado em ensaios comportamentais, testes de nocicepção e modelo de inflamação induzida por CFA, foi possível estabelecer que a brailina possui propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas consistentes. Esse estudo representa a primeira demonstração das propriedades farmacológicas da brailina *in vivo*.

Com o objetivo de investigar o mecanismo de ação da brailina, sua possível interação com receptores de glicocorticoide, foi inicialmente investigada *in silico* utilizando docking molecular. Os testes de docking molecular são ferramentas *in silico* que possibilitam prever ou confirmar as interações entre um ligante e um receptor alvo (KITCHEN et al., 2004). Tendo como principal objetivo, simular computacionalmente se o ligante possui afinidade e capacidade química de interagir com o alvo, sendo este processo realizado em centenas ou milhares de conformações diferentes (FISCHER, 2008). Desta forma, o docking desempenha um papel importante nos processos de síntese e descoberta de novos fármacos (MENG et al., 2011). O ensaio de docking molecular indicou a interação entre a molécula de brailina e o receptor glicocorticoide. Neste ensaio, a brailina foi capaz de interagir com o receptor glicocorticoide no mesmo sítio de interação do antagonista de receptor glicocorticoide RU486 e do ligante padrão ouro dexametasona, sendo possível prever a conformação do ligante, bem como sua posição e orientação, além da avaliação da afinidade da ligação com o receptor glicocorticoide. A contribuição dos receptores de glicocorticoides para os efeitos farmacológicos da brailina foi então confirmada utilizando um ensaio de reversão funcional

por antagonista. A brailina, de fato, teve sua atividade imunomoduladora em macrófagos reduzida quando incubada concomitantemente com o antagonista glicocorticoide RU-486, sugerindo fortemente que esta poderia ser uma das vias farmacológicas pela qual ela exerce sua atividade.

Considerando que a ativação dos receptores de glicocorticoides induz efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores mediados pela inibição da atividade de fatores de transcrição nuclear como NF κ B (COUTINHO; CHAPMAN, 2011; DE BOSSCHER, 2000), o efeito da brailina sobre essa via foi também avaliado. Utilizando o ensaio da luciferase em macrófagos, foi possível demonstrar que a brailina é capaz de reduzir a atividade de NF κ B, um fator de transcrição chave na resposta inflamatória e imune, apontando um possível mecanismo de ação e corroborando a participação e receptores de glicocorticoide.

Nessa primeira série de experimentos, os consistentes efeitos anti-inflamatórios da brailina foram demonstrados, e sua mediação por receptores glicocorticoides foi evidenciada. Esses achados, aliados aos dados da literatura indicando que essa cumarina é um inibidor de fosfodiesterase 4 (LIN et al., 2014), levaram à proposição de outra série de experimentos, voltados a investigar o potencial da brailina como candidato à fármaco para o controle da asma. O potencial terapêutico no controle da asma é fundamentado no mecanismo de ação proposto, que engloba receptores de glicocorticoides e a inibição de PDE4. As fosfodiesterases são enzimas que regulam os níveis intracelulares dos segundos mensageiros AMP cíclico e GMP cíclico, controlando suas taxas de degradação (BENDER; BEAVO, 2006). Os inibidores de PDE4 são moléculas que reduzem a degradação de AMPc pela enzima, elevando o AMPc intracelular, regulando negativamente a resposta inflamatória, pois a PDE4 está amplamente presente em células inflamatórias (SALARI; ABDOLLAHI, 2012; SEREZANI et al., 2008). Assim sendo, a

PDE4 vem sendo identificada como alvo terapêutico de alto interesse para doenças inflamatórias mediadas pelo sistema imune, como os glicocorticoides, classes utilizadas na clínica em doenças inflamatórias respiratórias como asma e DPOC (BAUMER et al., 2007; HOUSLAY; SCHAFFER; ZHANG, 2005; LIPWORTH, 2005; STRAND et al., 2013).

Utilizando o modelo de asma induzida por ovalbumina em camundongos, foi possível demonstrar que a brailina é ativa por via inalatória, e inibe relevantes eventos fisiopatológicos associados à asma experimental, como a celularidade total do lavado broncoalveolar, a produção de citocinas da resposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), o infiltrado inflamatório pulmonar e a produção de muco. Considerando que esses eventos também estão associados a morbidade e mortalidade em pacientes asmáticos (IZUHARA et al., 2009), é possível propor que a

brailina seja uma molécula com um potencial a ser desenvolvido para o tratamento da asma. Embora o estudo do mecanismo de ação da brailina na asma experimental não tenha sido objeto do presente estudo, seu mecanismo de ação aqui demonstrado em modelos de inflamação, em associação ao proposto na literatura, indicam que essa molécula pode possuir atividade dual, modulando duas vias diferentes clinicamente úteis no tratamento da asma (CAZZOLA; MATERA, 2020; SANTOS et al., 2020). Os fármacos duais vêm sendo utilizados há alguns anos, como rivastigmina, amitriptilina e tramadol, e são alternativas a polifarmácia, reduzindo reações adversas e interações medicamentosas. Outras estratégias, como associação medicamentosa e sistemas de liberação prolongada, também são consideradas como alternativas (PATYAR; PRAKASH; MEDHI, 2011). Porém, a longo prazo um único ativo que possui capacidade de contribuir para a melhora clínica por duas ou mais vias diferentes, parece ser uma alternativa mais segura, esbarrando, no entanto, na dificuldade de se chegar ao fármaco com tal característica (AROOJ et al., 2013; JANKOWSKA et al., 2017). A busca por tais compostos representa, sem dúvida, uma estratégia de inovação perseguida pela indústria farmacêutica em todo o mundo. Embora o presente trabalho mostre dados promissores que apontam a brailina como um candidato nessa busca, sua validação como um composto com ação terapêutica na asma e mecanismo de ação dual demandará ainda novos estudos.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, evidenciamos uma molécula de origem natural, ativa por via inalatória em modelos de inflamação e asma, com potencial mecanismo de ação dual em receptores de glicocorticoide e inibição de PDE4, que pode representar um protótipo no processo de desenvolvimento de fármacos inovadores para o controle da asma. Vale ressaltar que mais estudos pré-clínicos são ainda necessários para fornecer um perfil de segurança e mecanismo de ação da brailina na asma.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, M. J.; WALTERS, J.; WALTERS, E. H. Adverse effects of beta- agonists: are they clinically relevant? **Am J Respir Med**, 2, n. 4, p. 287-297, 2003.
- ANEJA, R.; MUKERJEE, S. K.; SESHADRI, T. R. Synthesis of benzo-furan derivatives-I. **Tetrahedron**, 2, n. 3-4, p. 203-210, 1958.
- AROOJ, M et al. An innovative strategy for dual inhibitor design and its application in dual inhibition of human thymidylate synthase and dihydrofolate reductase enzymes. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e60470, 2013.
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules**, 21, n. 10, Oct 1, 2016.
- BABU, S.; NUTMAN, T. B. Proinflammatory cytokines dominate the early immuneresponse to filarial parasites. **J Immunol**, 171, n. 12, p. 6723-6732, Dec 15, 2003.
- BANSAL, Y.; SETHI, P.; BANSAL, G. Coumarin: a potential nucleus for anti- inflammatory molecules. **Medicinal Chemistry Research**, 22, n. 7, p. 3049-3060, 2012.
- BARNES, P. J. Th2 cytokines and asthma: an introduction. **Respir Res**, 2, n. 2, p. 64- 65, 2001.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. d. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARROS, T. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain. **J Pharm Pharmacol**, 62, n. 2, p. 205-213, Feb 2010.
- BATEMAN, E. D. et al. Once daily fluticasone furoate (FF)/vilanterol reduces risk of severe exacerbations in asthma versus FF alone. **Thorax**, 69, n. 4, p. 312-319, Apr 2014.
- BAUMER, W. et al. Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. **Inflamm Allergy Drug Targets**, 6, n. 1, p. 17-26, Mar 2007.
- BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev**, 58, n. 3, p. 488-520, Sep 2006.
- BOUSQUET, J.; BOUSQUET, P. J.; GODARD, P.; DAURES, J.-P. The public health implications of asthma. **Bulletin of the World Health Organization**, 83, 2005.
- BOUSQUET, J. et al. Eosinophilic inflammation in asthma. **N Engl J Med**, 323, n. 15, p. 1033-1039, Oct 11, 1990.
- BOYTON, R. J.; ALTMANN, D. M. Asthma: new developments in cytokine regulation. **Clin Exp Immunol**, 136, n. 1, p. 13-14, Apr 2004.

CALHOUN, K. H. Asthma treatments: new and emerging therapies. **Int Forum Allergy Rhinol**, 5 Suppl 1, p. S76-81, Sep 2015.

CARDOSO, T. A. et al. The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national databasesystem. **J Bras Pneumol**, 43, n. 3, p. 163-168, May-Jun 2017.

CAZZOLA, M.; MATERA, M. G. The effect of doxofylline in asthma and COPD. **Respir Med**, 164, p. 105904, Apr 2020.

CAZZOLA, M. et al. beta2-agonist therapy in lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, 187, n. 7, p. 690-696, Apr 1, 2013.

CHARRIOT, J. et al. Future treatment for asthma. **Eur Respir Rev**, 25, n. 139, p. 77-92, Mar 2016.

CHEENPRACHA, S. et al. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorg Med Chem**, 18, n. 17, p. 6598-6602, Sep 1, 2010.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Mol Cell Endocrinol**, 335, n. 1, p. 2-13, Mar 15, 2011.

DAHL, R. Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. **Respir Med**, 100, n. 8, p. 1307-1317, Aug 2006.

DAUGHERTY, J. et al. The impact of long-term systemic glucocorticoid use in severe asthma: A UK retrospective cohort analysis. **J Asthma**, 55, n. 6, p. 651-658, Jun 2018.

DE BOSSCHER, K. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. **Journal of Neuroimmunology**, 109, n. 1, p. 16-22, 2000.

DE LIMA, F. O. et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin. **J Nat Prod**, 74, n. 4, p. 596-602, Apr 25, 2011.

DESAI, J. T.; DESAI, C. K.; DESAI, K. R. A convenient, rapid and eco-friendly synthesis of isoxazoline heterocyclic moiety containing bridge at 2°-amine as potential pharmacological agent. **Journal of the Iranian Chemical Society**, 5, n. 1, p. 67-73, 2008.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev**, 281, n. 1, p. 8-27, Jan 2018.

DONAHUE, J. G. et al. Inhaled steroids and the risk of hospitalization for asthma. **JAMA**, 277, n. 11, p. 887-891, Mar 19, 1997.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, 15, n. 6, p. 190-197, 1994.

DUMONDE, D. C. et al. "Lymphokines": non-antibody mediators of cellular immunity

- generated by lymphocyte activation. **Nature**, 224, n. 5214, p. 38-42, Oct 4, 1969.
- FIREMAN, P. B2 Agonists and Their Safety in the Treatment of Asthma. **Allergy Proceedings**, 16, n. 5, 1995.
- FISCHER, P. M. Computational chemistry approaches to drug discovery in signal transduction. **Biotechnol J**, 3, n. 4, p. 452-470, Apr 2008.
- FRANCO, R. et al. The economic impact of severe asthma to low-income families. **Allergy**, 64, n. 3, p. 478-483, Mar 2009.
- FYLAKTAKIDOU, K. C. et al. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. **Curr Pharm Des**, 10, n. 30, p. 3813-3833, 2004.
- GIBSON, P. G.; POWELL, H.; WILSON, A.; ABRAMSON, M. J. et al. Self-management education and regular practitioner review for adults with asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2002.
- GOMEZ-OUTES, A. et al. Discovery of anticoagulant drugs: a historical perspective. **Curr Drug Discov Technol**, 9, n. 2, p. 83-104, Jun 1, 2012.
- GUILBERT, T. W.; MORGAN, W. J.; ZEIGER, R. S.; MAUGER, D. T. et al. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. **N Engl J Med**, 354, n. 19, p. 1985-1997, May 11, 2006.
- HADDAD, J. J. On the enigma of pain and hyperalgesia: A molecular perspective. **Biochem Biophys Res Commun**, 353, n. 2, p. 217-224, Feb 9, 2007.
- HALDAR, P. et al. Outcomes after cessation of mepolizumab therapy in severe eosinophilic asthma: a 12-month follow-up analysis. **J Allergy Clin Immunol**, 133, n. 3, p. 921-923, Mar 2014.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 2, p. 111-129, Feb 2015.
- HOUSLAY, M. D.; SCHAFER, P.; ZHANG, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. **Drug Discovery Today**, 10, n. 22, p. 1503-1519, 2005.
- HUSCHER, D.; THIELE, K.; GROMNICA-IHLE, E.; HEIN, G. et al. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects. **Ann Rheum Dis**, 68, n. 7, p. 1119-1124, Jul 2009.
- IZUHARA, K.; OHTA, S.; SHIRAIISHI, H.; SUZUKI, S. et al. The mechanism of mucus production in bronchial asthma. **Curr Med Chem**, 16, n. 22, p. 2867-2875, 2009.
- JANKOWSKA, A. et al. PDE7-Selective and Dual Inhibitors: Advances in Chemical and Biological Research. **Curr Med Chem**, 24, n. 7, p. 673-700, 2017.
- JI, H. F.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? **EMBO Rep**, 10, n. 3, p. 194-200, Mar 2009.

KELLER, A. C.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Nitric oxide paradox in asthma. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 100 Suppl 1, p. 19-23, Mar 2005.

KELLY, H.; NELSON, H. Potential adverse effects of the inhaled corticosteroids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 112, n. 3, p. 469-478, 2003.

KELSO, A. Cytokines: principles and prospects. **Immunol Cell Biol**, 76, n. 4, p. 300-317, Aug 1998.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci**, 96, n. 3, p. 229-245, Nov 2004.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, 3, n. 11, p. 935-949, Nov 2004.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. **J Med Chem**, 48, n. 20, p. 6400-6408, Oct 6, 2005.

KUPELI AKKOL, E. et al. Coumarins and Coumarin-Related Compounds in Pharmacotherapy of Cancer. **Cancers(Basel)**, 12, n. 7, Jul 19, 2020.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, 127, n. 2, p. 117-126, Feb 2000.

LIN, T. T.; HUANG, Y. Y.; TANG, G. H.; CHENG, Z. B. et al. Prenylated coumarins: natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Toddalia asiatica*. **J Nat Prod**, 77, n. 4, p. 955-962, Apr 25, 2014.

LIPWORTH, B. J. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Lancet**, 365, n. 9454, p. 167-175, 2005.

MADORE, A. M.; LAPRISE, C. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. **J Asthma Allergy**, 3, p. 107-121, Aug 20, 2010.

MALIKOV, V. M.; SAIDKHODZHAEV, A. I.; ARIPOV, K. N. Coumarins: Plants, structure, properties. **Chemistry of Natural Compounds**, 34, n. 2, p. 202-264, 1998.

MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. **Front Med (Lausanne)**, 4, p. 93, 2017.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, 140, n. 6, p. 771-776, Mar 19, 2010.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**, 7, n. 2, p. 146-157, Jun 2011.

MENZIES-GOW, A.; FLOOD-PAGE, P.; SEHMI, R.; BURMAN, J. et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy induces bone marrow eosinophil maturational arrest and decreases eosinophil progenitors in the bronchial mucosa of atopic asthmatics. **J Allergy Clin Immunol**,

111, n. 4, p. 714-719, Apr 2003.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a shortreview. **Molecules**, 15, n. 12, p. 9252-9287, Dec 15, 2010.

MORE, D. H.; MAHULIKAR, P. P. Microwave assisted one-pot synthesis of nitrogen and oxygen containing heterocycles from acyl meldrum's acid. **Indian Journal of Chemistry**, 50, 2011.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **J Nat Prod**, 83, n. 3, p. 770-803, Mar 27, 2020.

OGUNGBE, I. V.; ERWIN, W. R.; SETZER, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: molecular docking to potential protein targets. **J Mol Graph Model**, 48, p. 105-117, Mar 2014.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Curr Biol**, 22, n. 17, p. R733-740, Sep 11 2012.

ORTEGA, H. G. et al. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. **N Engl J Med**, 371, n. 13, p. 1198-1207, Sep 25, 2014.

PAGE, C. P. An explanation of the asthma paradox. **Am Rev Respir Dis**, 147, n. 6 Pt 2, p. S29-32, Jun 1993.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discov Today**, 21, n. 2, p. 204-207, Feb 2016.

PATYAR, S.; PRAKASH, A.; MEDHI, B. Dual inhibition: a novel promising pharmacological approach for different disease conditions. **J Pharm Pharmacol**, 63, n. 4, p. 459-471, Apr 2011.

PAWANKAR, R. Mast cell function modulating IgE-mediated allergy. **Allergology International**, 48, n. 3, p. 171-182, 1999.

PUNCHARD, N. A.; WHELAN, C. J.; ADCOCK, I. The Journal of Inflammation. **J Inflamm (Lond)**, 1, n. 1, p. 1, Sep 27 2004.

RAKOTOARISON, O.; RABENAU, I.; LOBSTEIN, A.; UM, B. H. et al. Vasorelaxing properties and bio-guided fractionation of *Cedrelopsis grevei*. **Planta Med**, 69, n. 2, p. 179-181, Feb 2003.

RATHER, L. J. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. **Bull N Y Acad Med**, 47, n. 3, p. 303-322, Mar 1971.

ROIFMAN, I. et al. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. **Can J Cardiol**, 27, n. 2, p. 174-182, Mar-Apr 2011.

SALARI, P.; ABDOLLAHI, M. Phosphodiesterase inhibitors in inflammatory bowel disease. **Expert Opin Investig Drugs**, 21, n. 3, p. 261-264, Mar 2012.

SANTOS, W. A. et al. Braylin induces a potent vasorelaxation, involving distinct mechanisms in superior mesenteric and iliac arteries of rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Oct 92000

SCHOFIELD, M. L. Asthma pharmacotherapy. **Otolaryngol Clin North Am**, 47, n. 1, p. 55-64, Feb 2014.

SCIO, E. et al. New bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **J Nat Prod**, 66, n. 5, p. 634-637, May 2003.

SEREZANI, C. H.; BALLINGER, M. N.; ARONOFF, D. M.; PETERS-GOLDEN, M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 39, n. 2, p. 127-132, Aug 2008.

SHUBAYEV, V. I.; KATO, K.; MYERS, R. R. **Translational Pain Research: From Mouse to Man**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2010.

SILVEIRA, M. R.; NUNES, K. P.; CARA, D. C.; SOUZA, D. G. et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infect Immun**, 70, n. 11, p. 6263-6272, Nov 2002.

STRAND, V. et al. Improvements in patient-reported outcomes with apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, in the treatment of moderate to severe psoriasis: results from a phase IIb randomized, controlled study. **Health Qual Life Outcomes**, 11, p. 82, May 10, 2013.

SUISSA, S. et al. Low dose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. **N Engl J Med**, 343, n. 5, p.332-336, Aug 3, 2000.

SUN, C. et al. A pharmacological review of dicoumarol: An old natural anticoagulant agent. **Pharmacol Res**, 160, p. 105193, Oct2020.

TRACY, R. P. The five cardinal signs of inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, 61, n. 10, p. 1051-1052, Oct 2006.

TSAI, I.-L.; WUN, M.-F.; TENG, C.-M.; ISHIKAWA, T. et al. Anti-platelet aggregation constituents from formosan *Toddalia asiatica*. **Phytochemistry**, 48, n. 8, p.1377-1382, 1998.

VERRI, W. A., Jr. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drugdevelopment? **Pharmacol Ther**, 112, n. 1, p. 116-138, Oct 2006.

WATZL, B. Anti-inflammatory effects of plant-based foods and of their constituents. **Int J Vitam Nutr Res**, 78, n. 6, p. 293-298, Dec 2008.

WITAICENIS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarinderivatives. **Phytomedicine**, 21, n. 3, p. 240-246, Feb 15, 2014.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, 45, n.2, p. 27-37, Spring 2007.

Anexoss – Artigos publicados durante o doutorado

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Mesenchymal stem cells reduce the oxaliplatin-induced sensory neuropathy through the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord

Gisele Graça Leite dos Santos^a, Anna Lethícia Lima Oliveira^a, Dourivaldo Silva Santos^b, Renan Fernandes do Espírito Santo^a, Daniela Nascimento Silva^c, Paulo José Lima Juiz^d, Milena Botelho Pereira Soares^{a,c}, Cristiane Flora Villarreal^{a,b,*}

^a *Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, 40296-710 Salvador, BA, Brazil*

^b *College of Pharmacy, Federal University of Bahia, 40170-115 Salvador, BA, Brazil*

^c *SENAI Institute of Innovation in Advanced Health Systems (ISI SAS), University Center SENAI/CIMATEC, 41650-010 Salvador, Bahia, Brazil*

^d *Federal University of Reconcavo of Bahia, 44042-200 Feira de Santana, BA, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuropathic pain
Chemotherapy
Mesenchymal cells
Oxidative stress
Cytokines

ABSTRACT

Aims: The present study was designed to investigate whether the antinociceptive effect of bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells (MSC) during oxaliplatin (OXL)-induced sensory neuropathy is related to antioxidant properties.

Main methods: Male mice C57BL/6 were submitted to repeated intravenous administration of OXL (1 mg/kg, 9 administrations). After the establishment of sensory neuropathy, mice were treated with a single intravenous administration of MSC (1×10^6), vehicle or gabapentin. Paw mechanical and thermal nociceptive thresholds were evaluated through von Frey filaments and cold plate test, respectively. Motor performance was evaluated in the rota-rod test. Gene expression profile, cytokine levels, and oxidative stress markers in the spinal cord were evaluated by real-time PCR, ELISA and biochemical assays, respectively.

Key findings: OXL-treated mice presented behavioral signs of sensory neuropathy, such as mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, which were completely reverted by a single administration of MSC. Repeated oral treatment with gabapentin (70 mg/kg) induced only transient antinociception. The IL-1 β and TNF- α spinal levels did not differ between mice with or without sensory neuropathy. MSC increased the levels of anti-inflammatory cytokines, IL-10 and TGF- β , in the spinal cord of neuropathic mice, in addition to increasing the gene expression of antioxidant factors SOD and Nrf-2. Additionally, nitrite and MDA spinal levels were reduced by the MSC treatment.

Significance: MSC induce reversion of sensory neuropathy induced by OXL possibly by activation of anti-inflammatory and antioxidant pathways, leading to reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord.

Research Article

Reestablishment of Redox Homeostasis in the Nociceptive Primary Afferent as a Mechanism of Antinociception Promoted by Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Oxaliplatin-Induced Chronic Peripheral Neuropathy

Anna Lethicia L. Oliveira,¹ Gisele G. L. Santos,¹ Renan F. Espirito-Santo,¹ Gessica Sabrina A. Silva,² Afrânio F. Evangelista,¹ Daniela N. Silva,³ Milena B. P. Soares,^{1,3,4} and Cristiane Flora Villarreal^{1,2}

¹Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, 40296-710, Brazil

²College of Pharmacy, Federal University of Bahia, 40170-290, Brazil

³SENAI Institute of Innovation in Advanced Health Systems (ISI SAS), University Center SENAI/CIMATEC, 41650-010, Brazil

⁴National Institute of Science and Technology for Regenerative Medicine (INCT-REGENERA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Cristiane Flora Villarreal; cfv@ufba.br

Received 12 August 2020; Revised 23 November 2020; Accepted 19 December 2020; Published 7 January 2021

Academic Editor: Hirotaka Suga

Copyright © 2021 Anna Lethicia L. Oliveira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Painful neuropathy is a common adverse effect of oxaliplatin (OXL), a platinum-derivative chemotherapeutic agent. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are key factors contributing to the development of OXL-induced peripheral neuropathy (OIPN). Based on the antioxidant and antinociceptive properties of mesenchymal stem/stromal cells (MSC), the present study tested the hypothesis that MSC induce antinociceptive effects during OIPN by promoting regulation of redox environment and mitochondrial homeostasis in the nociceptive primary afferents. C57Bl/6 mice submitted to the OXL-chronic neuropathy induction protocol by repeated intravenous administration of OXL (1 mg/kg) were evaluated to determine the paw mechanical and thermal nociceptive thresholds using the von Frey filaments and cold plate tests, respectively. Two weeks after the neuropathy induction, mice were treated with bone marrow-derived MSC (1×10^6), vehicle, or gabapentin (GBP, 70 mg/kg). Four weeks later, mitochondrial morphology, gene expression profile, and oxidative stress markers in the sciatic nerve and dorsal root ganglia (DRG) were evaluated by transmission electron microscopy, RT-qPCR, and biochemical assays, respectively. OXL-treated mice presented behavioral signs of sensory neuropathy, such as mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. The behavioral painful neuropathy was completely reverted by a single administration of MSC, while the daily treatment with GBP induced only a short-lived antinociceptive effect. The ultrastructural analysis of the sciatic nerve and DRG of OIPN mice revealed a high proportion of atypical mitochondria in both myelinated and unmyelinated fibers. Importantly, this mitochondrial atypia was strongly reduced in MSC-treated neuropathic mice. Moreover, MSC-treated neuropathic mice showed upregulation of *Sod* and *Nrf2* mRNA in the sciatic nerve and DRG. In line with this result, MSC reduced markers of nitrosative stress and lipid peroxidation in the sciatic nerve and DRG from OIPN mice. Our data suggest that the reestablishment of redox homeostasis in the nociceptive primary afferents is a mechanism by which MSC transplantation reverts the OXL-induced chronic painful neuropathy.



Article

(E)-2-Cyano-3-(1*H*-Indol-3-yl)-*N*-Phenylacrylamide, a Hybrid Compound Derived from Indomethacin and Paracetamol: Design, Synthesis and Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential

Pablo Silva ^{1,2,3} , Maria de Almeida ², Jamire Silva ^{3,4} , Sonaly Albino ^{1,3} , Renan Espírito-Santo ^{5,6}, Maria Lima ⁴, Cristiane Villarreal ^{5,6} , Ricardo Moura ^{1,3} and Vanda Santos ^{1,2,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; pablo-rayff@hotmail.com (P.S.); sonaly.albino@hotmail.com (S.A.); ricardo.olimpiodemoura@gmail.com (R.M.)
- ² Laboratório de Ensaio Farmacológicos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; cris.freire21@hotmail.com
- ³ Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; jamiremuriel@hotmail.com
- ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 58429-500, PE, Brazil; nenalimamariadocarmo@gmail.com
- ⁵ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador 40296-710, BA, Brazil; r.fernandes88@hotmail.com (R.E.-S.); cfv@ufba.br (C.V.)
- ⁶ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-290, BA, Brazil
- * Correspondence: vandaluciasantos16@gmail.com; Tel.: +55-(83)-98846-6949

Received: 10 March 2020; Accepted: 3 April 2020; Published: 8 April 2020



Abstract: The compound (E)-2-cyano-3-(1*H*-indol-3-yl)-*N*-phenylacrylamide (ICMD-01) was designed and developed based on the structures of clinically relevant drugs indomethacin and paracetamol through the molecular hybridization strategy. This derivative was obtained by an amidation reaction between substituted anilines and ethyl 2-cyanoacetate followed by a *Knoevenagel*-type condensation reaction with indole aldehyde that resulted in both a viable synthesis and satisfactory yield. In order to assess the immunomodulatory and anti-inflammatory activity, *in vitro* assays were performed in J774 macrophages, and significant inhibitions ($p < 0.05$) of the production of nitrite and the production of cytokines (IL-1 β and TNF α) in noncytotoxic concentrations were observed. The anti-inflammatory effect was also studied via CFA-induced paw edema *in vivo* tests and zymosan-induced peritonitis. In the paw edema assay, ICMD01 (50 mg kg⁻¹) showed satisfactory activity, as did the group treated with dexamethasone, reducing edema in 2–6 h. In addition, there was no significant inhibition of PGE₂, IL-1 β or TNF α *in vivo*. Moreover, in the peritonitis assay that assesses leukocyte migration, ICMD-01 exhibited promising results. Therefore, these preliminary studies demonstrate this compound to be a strong candidate for an anti-inflammatory drug together with an improved gastrointestinal safety profile when compared to the conventional anti-inflammatory drugs.

Keywords: cytokines; paw edema; PGE₂; phenylacrylamide

Bioactive Compounds from the Aerial Parts of *Evolvulus linarioides*

Laiane C. O. Pereira, Lucas S. Abreu, Joanda P. R. e Silva, Francisca S. V. L. Machado, Cinthia S. Queiroga, Renan F. do Espírito-Santo, Diego F. de Agnelo-Silva, Cristiane F. Villarreal, Maria de F. Agra, Marcus T. Scotti, Vicente C. de O. Costa, Josean F. Tavares,* and Marcelo S. da Silva



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01189>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

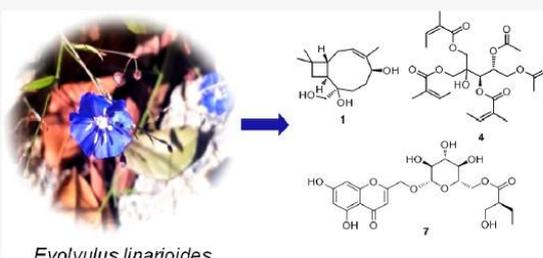


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Three new caryophyllane-type sesquiterpenoids, linariophyllenes A–C (1–3), two new hamamelitol derivatives, linaritols A (4) and B (5), two new chromones, linariosides A (6) and B (7), and three known chromones, cnidimol C (8), monnieriside A (9), and undulatoside A (10), were identified from the aerial parts of *Evolvulus linarioides*. The structures of these compounds were elucidated by NMR, MS, and IR data. The absolute configurations of compounds 1–5 and 7 were established via electronic circular dichroism data. The anti-inflammatory potential of compounds 1–5 and 7–10 was evaluated by determining their ability to inhibit the production of nitric oxide (NO) and proinflammatory cytokine IL-1 β by stimulated J774 macrophages. Compounds tested at noncytotoxic concentrations inhibited NO production by macrophages, exhibiting IC₅₀ values between 17.8 and 66.2 μ M, and inhibited IL-1 β production by stimulated macrophages by 72.7–96.2%.



Evolvulus linarioides



Article

Bergenin Reduces Experimental Painful Diabetic Neuropathy by Restoring Redox and Immune Homeostasis in the Nervous System

Cristiane F. Villarreal ^{1,2,*} , Dourivaldo S. Santos ¹, Pedro S. S. Lauria ¹, Kelly B. Gama ², Renan F. Espírito-Santo ^{1,2}, Paulo J. L. Juiz ³, Clayton Q. Alves ⁴ , Jorge M. David ⁵ and Milena B. P. Soares ²

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, CEP 40.170-115 Salvador, Brazil; dourivaldo2010@hotmail.com (D.S.S.); pedrosslauria@gmail.com (P.S.S.L.); r.fernandes88@hotmail.com (R.F.E.-S.)

² Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 40.296-710 Salvador, Brazil; kellybgama@yahoo.com.br (K.B.G.); milena@cpqgm.fiocruz.br (M.B.P.S.)

³ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44.042-280 Feira de Santana, Brazil; paulojuiz@gmail.com

⁴ Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, CEP 44.036-336 Feira de Santana, Brazil; cleiroz@gmail.com

⁵ Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, CEP 40.170-280 Salvador, Brazil; jmdavid@ufba.br

* Correspondence: cfv@ufba.br; Tel.: +55-(71)3283-6933

Received: 25 April 2020; Accepted: 6 May 2020; Published: 9 July 2020



Abstract: Diabetic neuropathy is a frequent complication of diabetes. Symptoms include neuropathic pain and sensory alterations—no effective treatments are currently available. This work characterized the therapeutic effect of bergenin in a mouse (C57/BL6) model of streptozotocin-induced painful diabetic neuropathy. Nociceptive thresholds were assessed by the von Frey test. Cytokines, antioxidant genes, and oxidative stress markers were measured in nervous tissues by ELISA, RT-qPCR, and biochemical analyses. Single (3.125–25 mg/kg) or multiple (25 mg/kg; twice a day for 14 days) treatments with bergenin reduced the behavioral signs of diabetic neuropathy in mice. Bergenin reduced both nitric oxide (NO) production in vitro and malondialdehyde (MDA)/nitrite amounts in vivo. These antioxidant properties can be attributed to the modulation of gene expression by the downregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and upregulation of glutathione peroxidase and Nrf2 in the nervous system. Bergenin also modulated the pro- and anti-inflammatory cytokines production in neuropathic mice. The long-lasting antinociceptive effect induced by bergenin in neuropathic mice, was associated with a shift of the cytokine balance toward anti-inflammatory predominance and upregulation of antioxidant pathways, favoring the reestablishment of redox and immune homeostasis in the nervous system. These results point to the therapeutic potential of bergenin in the treatment of painful diabetic neuropathy.

Keywords: neuropathic pain; diabetic neuropathy; natural product; analgesic; antioxidant; immunomodulation; cytokine; spinal cord; sciatic nerve



Phenylpropanoids from *Croton velutinus* with cytotoxic, trypanocidal and anti-inflammatory activities

Lucas Silva Abreu^a, Yuri Manguiera do Nascimento^a, Renan Fernandes do Espirito-Santo^b, Cássio Santana Meira^b, Ivanilson Pimenta Santos^b, Railda Batista Brandão^c, Augusto Lopes Souto^a, Maria Lenise Silva Guedes^d, Milena Botelho Pereira Soares^b, Cristiane Flora Villarreal^c, Marcelo Sobral da Silva^a, Eudes da Silva Velozo^c, Josean Fechine Tavares^{a,*}

^a Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil

^b Instituto Gonçalo Montiz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador 40296-710, BA, Brazil

^c Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-290, BA, Brazil

^d Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-290, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Croton velutinus
Phenylpropanoids
Cytotoxic
Trypanocidal
Anti-inflammatory

ABSTRACT

This current study presents the phytochemical analysis of *Croton velutinus*, describing phenylpropanoids obtained from this species. The fractionation of the roots hexane extract led to the isolation of four new phenylpropanoids derivatives, velutines A–D (1–4) and three known (5–7). Their structures were established based on spectroscopic (1D-2D NMR; HRMS and IR) analysis. Cytotoxic, trypanocidal and anti-inflammatory activities of compounds 1–7 were evaluated. Only compounds 2 and 5 showed cytotoxic activity against cancer cell lines (B16F10, HL-60, HCT116, MCF-7 and HepG2), with IC₅₀ values ranging from 6.8 to 18.3 μM and 11.1 to 18.3 μM, respectively. Compounds 2 and 5 also showed trypanocidal activity against bloodstream trypomastigotes with EC₅₀ values of 9.0 and 9.58 μM, respectively. Finally, the anti-inflammatory potential of these compounds was evaluated on cultures of activated macrophages. All compounds exhibited concentration-dependent suppressive activity on the production of nitrite and IL-1β by macrophages stimulated with LPS and IFN-γ. These results indicate phenylpropanoids esters (2 and 5) from *C. velutinus* as promising cytotoxic, trypanocidal and anti-inflammatory candidates that warrants further studies.

1. Introduction

Croton, the second largest genus of the Euphorbiaceae family, is represented by approximately 1300 species, among which 68 species were reported in the Caatinga biome, where 21 are considered endemic [1–3]. Previous phytochemical studies described diterpenes and alkaloids as the main secondary metabolites found in this genus. Sesquiterpenes and monoterpenes were also reported, mostly as essential oil constituents [4].

Anti-inflammatory activity of compounds obtained from plants of the genus *Croton* have been previously described using bioguided assays [5], as well as inhibition of macrophage activation and cyclooxygenase activity assays [6,7]. The use of *Croton* species in folk medicine due to an anticancer activity have been validated by the demonstration of cytotoxicity potential of compounds obtained from this genus in several

cancer cell lines [8–10]. In addition, *Croton* species also exhibit trypanocidal activity against all the evolutive forms of *Trypanosoma cruzi*, possibly by targeting the trypanothione reductase pathway [11]. Interestingly, all the biological activities cited above have been described to compounds from the phenylpropanoid class [12–14].

Croton velutinus Baill. can be found in several areas of the Brazilian northeast region, mainly in rupestrian fields and places considered Cerrado of altitude. Cezar (2016) reported the identification of flavonoids, sesquiterpenes and one diterpene, as well as inhibition of angiotensin-I-converting enzyme (ACE), anticholinesterase, antioxidant and larvicidal activities of methanolic and hexane extracts from this species [15].

In search for bioactive compounds found in species from semi-arid Brazil region, this current work describes the occurrence of new phenylpropanoid derivatives in *C. velutinus*, unusual in the *Croton* genus, with cytotoxic, trypanocidal and anti-inflammatory activity.

* Corresponding author.

E-mail address: josean@lbf.ufpb.br (J.F. Tavares).

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104632>

Received 9 April 2020; Received in revised form 14 May 2020; Accepted 17 May 2020

Available online 22 May 2020

0367-326X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Fluorescent Canthin-6-one Alkaloids from *Simaba bahiensis*: Isolation, Identification, and Cell-Labeling Properties

Rafael dos Santos Costa,^[a, b] Renan Fernandes do Espírito-Santo,^[b, c] Lucas Silva Abreu,^[d] Leonardo de Oliveira Aguiar,^[a] Dara Leite Fontes,^[b] Josean Fachine Tavares,^[d] Marcelo Sobral da Silva,^[d] Milena Botelho Pereira Soares,^[c] Eudes da Silva Vellozo,^[a, b] and Cristiane Flora Villarreal^{*, [b, c]}

Canthin-6-one alkaloids, which are present in plants of the genus *Simaba*, are natural compounds that are capable of acting as fluorescent probes. However, the chemical composition and fluorescent properties of most species of this genus have not been analyzed. The objective of this study was to characterize the fluorescent properties of an extract of *S. bahiensis* and identify the chemical entities responsible for these properties. In addition, the cell-labeling properties of the fluorescent dye from **A** and of the isolated compounds were characterized by confocal fluorescence microscopy and flow cytometry. One quassinoid and three fluorescent alkaloids were

isolated from *S. bahiensis*, all compounds were identified by using NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. Staining experiments and HPLC-FL analysis shown that canthin-6-one alkaloids are the main green fluorescent compounds in the analyzed dyes. All compounds evaluated showed a cytoplasmic marker with a residence time of 24 h. The present study is the first to describe the presence of canthin-6-one alkaloids in *S. bahiensis*, in addition to demonstrating promising cell-labeling properties of fluorescent compounds from *S. bahiensis* with broad emission wavelengths.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp

Natural chromones as potential anti-inflammatory agents: Pharmacological properties and related mechanisms



Luíza Carolina França Opretzka^a, Renan Fernandes do Espírito-Santo^b,
 Olívia Azevedo Nascimento^a, Lucas Silva Abreu^a, Iura Muniz Alves^a, Eva Döring^c,
 Milena Botelho Pereira Soares^b, Eudes da Silva Velozo^a, Stefan A. Laufer^c,
 Cristiane Flora Villarreal^{a,b,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^b Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

^c Department of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Pharmaceutical Sciences, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Chromones
 Anti-inflammatory
 Antinociception
 NF-κB
 Cytokines
 Glucocorticoid receptor

ABSTRACT

Chromones are a group of natural substances with a diversity of biological activities. Herein we assessed the pharmacological potential of three chromones (1, 2 and 3) isolated from *Dictyoloma vandellianum* as anti-inflammatory agents using *in vitro* and *in vivo* approaches. During *in vitro* screening, the production of NO and cytokines by macrophages stimulated with LPS and IFN- γ was inhibited by all chromones at concentrations (5–20 μ M) that did not induce cytotoxicity. Analysis of pharmacokinetic parameters (*in vitro* half-life and intrinsic clearance) using human liver microsomes revealed that 3 has a superior pharmacokinetic profile, compared to 1 and 2. Treatment with 3 (100 mg/kg, ip) did not affect the mice motor performance, while 1 and 2 induced motor deficit. Taking into account the pharmacokinetic profile and absence of motor impairment, 3 was selected for further pharmacological characterization. Corroborating the data from *in vitro* screening, treatment of cell cultures with 3 (5–20 μ M) reduced TNF- α , IL-6 and IL-1 β production by stimulated macrophages. In the complete Freund's adjuvant-induced paw inflammation model in mice, 3 (25 and 50 mg/kg, ip) inhibited mechanical hyperalgesia, edema and cytokine production/release (IL-1 β , IL-6 and TNF- α). 3 (5–20 μ M) also reduced the transcriptional activity of NF- κ B in stimulated macrophages. Furthermore, treatment with RU486, a glucocorticoid receptor (GR) antagonist, partially prevented the inhibitory effect of 3 on macrophages, indicating that this chromone exerts its anti-inflammatory effects in part through the activation of GR. The results presented herein demonstrate the pharmacological potential of natural chromones, highlighting 3 as a possible candidate for the drug discovery process targeting new anti-inflammatory drugs.

RESEARCH

Open Access



IGF-1 overexpression improves mesenchymal stem cell survival and promotes neurological recovery after spinal cord injury

Kyan James Allahdadi^{1,5}, Thaís Alves de Santana^{1,3}, Girlaine Café Santos^{1,3}, Carine Machado Azevedo^{1,2}, Roberta Alves Mota^{2,3}, Carolina Kymie Nonaka^{1,2,5}, Daniela Nascimento Silva^{1,2,5}, Clarissa Xavier Resende Valim¹, Cláudio Pereira Figueira², Washington Luis Conrado dos Santos^{2,3}, Renan Fernandes do Espírito Santo^{2,3}, Afrânio Ferreira Evangelista², Cristiane Flora Villarreal^{2,3}, Ricardo Ribeiro dos Santos^{1,4}, Bruno Solano Freitas de Souza^{1,2,4,5} and Milena Botelho Pereira Soares^{1,2,4*}

Abstract

Background: Survival and therapeutic actions of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) can be limited by the hostile microenvironment present during acute spinal cord injury (SCI). Here, we investigated whether BMMSCs overexpressing insulin-like growth factor 1 (IGF-1), a cytokine involved in neural development and injury repair, improved the therapeutic effects of BMMSCs in SCI.

Methods: Using a SCI contusion model in C57Bl/6 mice, we transplanted IGF-1 overexpressing or wild-type BMMSCs into the lesion site following SCI and evaluated cell survival, proliferation, immunomodulation, oxidative stress, myelination, and functional outcomes.

Results: BMMSC-IGF1 transplantation was associated with increased cell survival and recruitment of endogenous neural progenitor cells compared to BMMSC- or saline-treated controls. Modulation of gene expression of pro- and anti-inflammatory mediators was observed after BMMSC-IGF1 and compared to saline- and BMMSC-treated mice. Treatment with BMMSC-IGF1 restored spinal cord redox homeostasis by upregulating antioxidant defense genes. BMMSC-IGF1 protected against SCI-induced myelin loss, showing more compact myelin 28 days after SCI. Functional analyses demonstrated significant gains in BMS score and gait analysis in BMMSC-IGF1, compared to BMMSC or saline treatment.

Conclusions: Overexpression of IGF-1 in BMMSC resulted in increased cell survival, immunomodulation, myelination, and functional improvements, suggesting that IGF-1 facilitates the regenerative actions of BMMSC in acute SCI.

Keywords: Spinal cord injury, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, IGF-1, Gene and cell therapy

RESEARCH ARTICLE

Antinociceptive compounds and LC-DAD-ESIMSⁿ profile from *Dictyoloma vandellianum* leaves

Lucas Silva Abreu^{1,2}, Iura Muniz Alves³, Renan Fernandes do Espírito Santo^{2,4}, Yuri Mangueira do Nascimento¹, César Augusto Gonçalves Dantas¹, Gisele Graça Leite dos Santos⁴, Mireille Le Hyaric⁵, Maria Lenise Silva Guedes⁶, Marcelo Sobral da Silva¹, Cristiane Flora Villarreal^{2,4}, Eudes da Silva Velozo^{2,3}, Josean Fechine Tavares^{1*}

1 Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, **2** Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, **3** Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, **4** Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, **5** Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, **6** Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

* josean@lf.ufpb.br



OPEN ACCESS

Citation: Abreu LS, Alves IM, Espírito Santo RFd, Nascimento YMd, Dantas CAG, dos Santos GGL, et al. (2019) Antinociceptive compounds and LC-DAD-ESIMSⁿ profile from *Dictyoloma vandellianum* leaves. PLoS ONE 14(10): e0224575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224575>

Editor: Branislav T. Šiler, Institute for Biological Research, SERBIA

Received: July 15, 2019

Accepted: October 16, 2019

Published: October 29, 2019

Copyright: © 2019 Abreu et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico process number CFV, MSS, JFT: INCT/Rennofito 465536/2014-0. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Limonoids, quinolone alkaloids and chromones have been reported as constituents of *Dictyoloma vandellianum* Adr. Juss. (Rutaceae). Although those compounds are known for their biological activities, only the anti-inflammatory activity of chromones isolated from the underground parts has been evaluated. There are no studies of the pharmacological properties of the aerial parts of *D. vandellianum*. The present study was carried out to determine the phytochemical profile and antinociceptive activity of the methanol extract, fractions and isolated compounds of leaves of *D. vandellianum*. The phytochemical profile was performed by HPLC-DAD-ESIMSⁿ and pure substances obtained were characterized by MS and NMR spectroscopy. The antinociceptive activity was assessed using the formalin assay in mice, and the motor function in the rotarod test. ME and all the fractions obtained from ME produced antinociceptive effects. Among them, the ethyl ether fraction was the most active. Data from HPLC-DAD-ESIMSⁿ showed that the ethyl ether fraction presented 42 compounds. The major compounds isolated from this fraction—gallic acid, methyl gallate and 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucopyranose—were tested and produced antinociceptive effects. Gallic acid, methyl gallate and 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucopyranose at antinociceptive doses did not affect the motor performance in mice in the rotarod test. This work is the first report of the occurrence of gallotanins in *D. vandellianum*. In addition, the pharmacological study showed that *D. vandellianum* leaves present antinociceptive activity, probably induced by gallic acid, methyl gallate and 1,2,6-tri-O-galloyl-β-D-glucopyranose.

Introduction

Pain is an unpleasant sensation that affects 20% of adults worldwide and it is associated with a wide range of diseases and tissue damage [1]. Currently, pharmacological management of pain

SHORT COMMUNICATION



Physalis angulata concentrated ethanolic extract suppresses nociception and inflammation by modulating cytokines and prostanoids pathways

Renan Fernandes do Espírito Santo^{a,b}, Milena da Silva Lima^a, Paulo José Lima Juiz^c, Luíza Carolina França Opretzka^a, Renata Campos Nogueira^b, Ivone Maria Ribeiro^d, Therezinha Coelho Barbosa Tomassini^d, Milena Botelho Pereira Soares^b and Cristiane Flora Villarreal^{a,b}

^aFaculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; ^bInstituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Brazil; ^cCentro de Ciência e Tecnologia em Energia e Sustentabilidade, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Feira de Santana, Brazil; ^dFarmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Physalins are *seco*-steroids with a variety of pharmacological activities already described. In this study the pharmacological properties of a standardized concentrated ethanolic extract from *Physalis angulata* (CEEPA), rich in physalins B, D, F and G, were studied in models of pain and inflammation in mice. Inflammatory mediators were measured by radioimmunoassay and Real-Time PCR in mice paws after the CFA stimuli. Systemic administration of CEEPA produced antinociceptive effect on the writhing test and formalin test. In the writhing test, physalins B, D, F and G showed that the antinociceptive effect of CEEPA is more potent than that of these purified compounds. In addition, CEEPA reduced the levels of TNF- α , IL-1 β , COX-2 and iNOS mRNA in the CFA-induced paw inflammation. Likewise, CEEPA decreased the TNF- α , IL-1 β and PGE₂ paw levels. In conclusion, CEEPA induces antinociceptive and anti-inflammatory effects, with improved pharmacological potency relative to pure physalins, associated to modulation of cytokine and cyclooxygenase pathways.

ARTICLE HISTORY

Received 31 May 2019
Accepted 1 December 2019

KEYWORDS

Anti-inflammatory;
antinociception;
immunomodulation;
physalins; herbal
drug extracts

NON-STANDARD

ABBREVIATION

CEEPA - concentrated
ethanolic extract from
Physalis angulata



Physalis angulata

PHYSALIN B

Antinociceptive
activity

PHYSALIN D

Anti-inflammatory
activity

PHYSALIN F

Cytokine reduction

PHYSALIN G

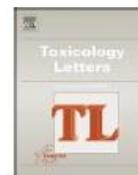
COX-2 reduction



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet



Pain-like behaviors and local mechanisms involved in the nociception experimentally induced by *Latrodectus curacaviensis* spider venom



Pedro Santana Sales Lauria^a, Luciana Lyra Casais-e-Silva^b, Renan Fernandes do Espírito-Santo^c, Claudio Maurício Vieira de Souza^d, Russolina Benedeta Zingali^e, Marjolly Brígido Caruso^e, Milena Botelho Pereira Soares^{c,f}, Cristiane Flora Villarreal^{a,c,*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^b Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^c Instituto Gonçalo Moniz FIOCRUZ, Salvador, BA, Brazil

^d Instituto Vital Brasil, Niterói, RJ, Brazil

^e Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^f Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Widow spider
Pain
Nociception
TRPV1
Histamine
Inflammation

ABSTRACT

The present study was undertaken to characterize the behavioral manifestations of nociception and the local mechanisms involved with the nociceptive response elicited by *Latrodectus curacaviensis* venom (LCV) in mice. After the intraplantar LCV inoculation, spontaneous nociception, mechanical and thermal nociceptive thresholds, motor performance, edema and cytokine levels were evaluated using von Frey filaments, hot/cold plate, rota-rod, plethysmometer and ELISA, respectively. Analysis of LCV was performed by SDS-PAGE and chromatography. Intraplantar injection of LCV (1–100 ng/paw) induced intense and heat-sensitive spontaneous nociception, mediated by serotonin and bradykinin receptors, TRPV1 channels, as well as by transient local inflammation. LCV (0.1–10 ng/paw) induced mechanical allodynia, which was reduced by the local pretreatment with H1 receptor or TRPV1 antagonists. Corroborating the TRPV1 involvement, in thermal nociception assays, LCV induced a similar response to that of capsaicin, a TRPV1 agonist, facilitating the response to noxious hot stimuli and inhibiting the response to cold noxious stimulation. LCV promoted mast cell degranulation, increased IL-1 β paw levels, but did not produce a relevant edematogenic effect. Analysis of LCV components showed a predominance of high molecular weight proteins. This work provides the first mechanistic hypothesis to explain the local pain induced by LCV, the most frequent clinical symptom of human envenomation.

1. Introduction

Latrodectus (Araneae, Theridiidae) is a widespread genus of medically important spiders that causes thousands of venomous bites in humans around the world annually (Bücherl, 1972; Chippaux and Alagón, 2008). *L. curacaviensis*, one of the species found in Brazil (Levi, 1959), is the main responsible for human latrodectism in this country (Lucas, 2003; Souza, 2012). Latrodectism syndrome is characterized by neuromuscular manifestations, such as muscle cramps, involuntary contractions and hypertonicity, leading to rigidity of the abdomen and lower limbs. This syndrome is also associated with *facies latrodectismica*, characterized by the facial muscles twisted in a grimace, besides blepharitis, rhinitis, cheilitis and trismus of masseters (Araújo and Souza,

1988; Lira-da-Silva et al., 1995; Maretic, 1983).

The most frequent symptom of *L. curacaviensis* bite is intense burning local pain. Bitten patients also report generalized muscle pain, which intensifies over time, leading the victim to a state of physical and mental exhaustion (Araújo and Souza, 1988; Lira-da-Silva et al., 1995; Maretic, 1983).

In fact, widow spider bites are described as the most painful spider envenomation (Sylvie, 2015). Nevertheless, the mechanisms by which *Latrodectus* spp. venoms elicit pain are so far unknown. Reflecting this knowledge gap, the therapeutic approaches used in bitten patients aiming the pain control are often inadequate, considering that in most of them analgesia does not reach satisfactory levels (Antoniou et al., 2014; Offerman et al., 2011).

Abbreviations: LCV, *Latrodectus curacaviensis* venom

* Corresponding author at: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo s/n, Ondina, Salvador, BA, CEP 40.170-115, Brazil.
E-mail address: cfv@ufba.br (C.F. Villarreal).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.008>

Received 6 August 2018; Received in revised form 1 September 2018; Accepted 18 September 2018

Available online 24 September 2018

0378-4274/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Structural improvement of new thiazolidinones compounds with antinociceptive activity in experimental chemotherapy-induced painful neuropathy

Diogo Rodrigo Magalhaes Moreira¹ | Dourivaldo Silva Santos² |
 Renan Fernandes do Espírito Santo^{1,2} | Flávia Evangelista dos Santos² |
 Gevanio Bezerra de Oliveira Filho³ | Ana Cristina Lima Leite³ |
 Milena Botelho Pereira Soares^{1,4} | Cristiane Flora Villarreal^{1,2} 

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁴Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, Brazil

Correspondence

Cristiane Flora Villarreal, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil.
 Email: cfv@ufba.br

Funding information

FAPESB, Grant/Award Number: PNX 0009/2009 and RED0010/2012.

Chemotherapy-induced neuropathy is a disabling pain condition resulting from chemotherapy for cancers. Up to now, no drug is available to cure chemotherapy-induced neuropathy. In the present study, we describe the structural design, synthesis, chemical and pharmacological characterization of 15 thiazolidinones, a class of potential analgesic compounds. The synthesis of new thiazolidinones was achieved by using the thiazolidinone heterocyclic as main structural pharmacophoric group and varying the substituents attached to the phenyl near to the iminic bond. The analgesic potential of the compounds was investigated in a mice model of oxaliplatin-induced neuropathic pain, using von Frey, rota-rod and open-field tests. Except for compound **14**, these thiazolidinones exhibited antinociceptive property without causing motor impairment. Thiazolidinones **12**, **15** and **16** displayed a dose-dependent antinociceptive effect, with similar efficacy and enhanced potency than gabapentin, the gold standard drug used for neuropathic pain. In addition, the antinociceptive activity of **16** lasted longer than gabapentin. The antinociceptive effect of thiazolidinones was prevented by GW9662, a PPAR γ antagonist. The main antinociceptive compounds exhibited positive Lipinski's index, predicting their oral bioavailability. In conclusion, the structural design performed here led to the identification of new compounds endowed with potent antinociceptive activity, potentially useful to treat chemotherapy-induced neuropathic pain.

KEY WORDS

analgesic, glitazones, neuropathic pain, oxaliplatin, PPAR

1 | INTRODUCTION

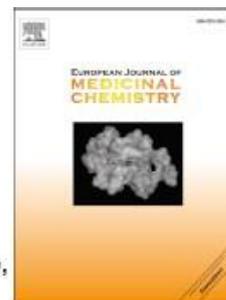
The neuropathic pain is mainly initiated by a primary lesion in the nervous system, commonly caused by a trauma, infection or ischemia. Alternatively, a dysfunction can be induced by cancer and the use of chemotherapy.^[1] This chronic syndrome is characterized by spontaneous pain and an increased

response to painful and innocuous stimuli.^[2] Despite the great morbidity, social cost and negative impact on quality of life, the neuropathic pain has limited therapeutic options, due to the reduced number of pharmaceutical with efficacy in this syndrome.^[3] Painful peripheral neuropathy is a common and dose-limiting side effect of anticancer drugs, such as vinca alkaloids, taxanes, epothilones and platinum-based

Accepted Manuscript

Nanomolar anti-sickling compounds identified by ligand-based pharmacophore approach

Odailson Santos Paz, Milena de Jesus Pinheiro, Renan Fernandes do Espirito Santo, Cristiane Flora Villarreal, Marcelo Santos Castilho



PII: S0223-5234(17)30396-3

DOI: [10.1016/j.ejmech.2017.05.035](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.035)

Reference: EJMECH 9465

To appear in: *European Journal of Medicinal Chemistry*

Received Date: 22 March 2017

Revised Date: 10 May 2017

Accepted Date: 11 May 2017

Please cite this article as: O.S. Paz, M. de Jesus Pinheiro, R. Fernandes do Espirito Santo, C.F. Villarreal, M.S. Castilho, Nanomolar anti-sickling compounds identified by ligand-based pharmacophore approach, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2017), doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.035.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Article

Pharmacological Properties of Riparin IV in Models of Pain and Inflammation

Olivia Azevêdo Nascimento ¹, Renan Fernandes do Espírito-Santo ²,
Luíza Carolina França Opretzka ¹, José Maria Barbosa-Filho ³, Stanley Juan Chavez Gutierrez ⁴,
Cristiane Flora Villarreal ^{1,2,*} and Milena Botelho Pereira Soares ^{2,5}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290 Salvador, BA, Brazil; olivia_azevedo@hotmail.com (O.A.N.); luizacfo@ufba.br (L.C.F.O.)

² Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, 40296-710 Salvador, BA, Brazil; r.fernandes88@hotmail.com (R.F.d.E.-S.); milena@bahia.fiocruz.br (M.B.P.S.)

³ Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil; barbosa.ufpb@gmail.com

⁴ Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina, PI, Brazil; stanleychavez@ufpi.edu.br

⁵ Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, 41253-190 Salvador, BA, Brazil

* Correspondence: cfv@ufba.br; Tel.: +55-71-3176-2260; Fax: +55-71-3176-2272

Academic Editor: David J. Newman

Received: 11 November 2016; Accepted: 17 December 2016; Published: 21 December 2016

Abstract: Riparins, natural alkaloids of the alkamide group, can be synthesized by simple methods, enhancing their potential application in pharmaceutical development. Here, the pharmacological properties of riparins were investigated in *in vitro* and *in vivo* assays of pain and inflammation in Swiss mice. Inflammatory mediators were measured by radioimmunoassay and Real-Time PCR. Riparins I, II, III and IV (1.56–100 mg/kg; ip) produced dose-related antinociceptive effects in the formalin test, exhibiting ED₅₀ values of 22.93, 114.2, 31.05 and 6.63 mg/kg, respectively. Taking the greater potency as steering parameter, riparin IV was further investigated. Riparin IV did not produce antinociceptive effect on the tail flick, suggesting that its antinociception is not a centrally-mediated action. In fact, riparin IV (1.56–25 mg/kg) produced dose-related antinociceptive and antiedematogenic effects on the complete Freund's adjuvant (CFA)-induced paw inflammation in mice. During CFA-induced inflammation, riparin IV did not modulate either the production of cytokines, TNF- α and IL-10, or COX-2 mRNA expression. On the other hand, riparin IV decreased the PGE₂ levels in the inflamed paw. In *in vitro* assays, riparin IV did not exhibit suppressive activities in activated macrophages. These results indicate, for the first time, that riparin IV induces antinociceptive and anti-inflammatory effects, possibly through the inhibition of prostanoid production.

Keywords: anti-inflammatory; antinociception; PGE₂; cytokines; riparins

Bomfim LM, Espírito Santo RF, Quadros HC, Orge CTDM, Carneiro RTO, Magalhães CP, Lima FR

ENSINO POR INVESTIGAÇÃO EM IMUNOLOGIA: AS CÉLULAS DE DEFESA E SEUS MECANISMOS EFETORES FRENTE A DOENÇAS ESPECÍFICAS

RESEARCH-LED TEACHING IN IMMUNOLOGY: DEFENSE CELLS AND THEIR EFFECTOR MECHANISMS AGAINST SPECIFIC DISEASES

**Larissa Mendes Bomfim
Renan Fernandes do Espírito Santo
Helenita Costa Quadros
Cibele Tereza Deolinda Machado Orge
Rita Terezinha de Oliveira Carneiro
Carla Pires Magalhães
Filipe Rocha Lima**

Programa de Pós-Graduação em Patologia. Faculdade de
Medicina da Bahia. Universidade Federal da Bahia.
Instituto Gonçalo Moniz - Fricruz Bahia.
E-mail: rfilipelima@gmail.com

RESUMO

Introdução: O tipo de metodologia de ensino amplia as possibilidades dos alunos em reter o conteúdo. As metodologias ativas surgem como alternativa para os alunos participarem ativamente da construção do seu conhecimento, assim como, estimular as funções mentais de pensar, raciocinar, combinar, refletir, entender e observar. **Objetivo:** O trabalho objetiva propor uma atividade de investigação para a disciplina de imunologia, para estudantes de graduação, com a finalidade de discutir as funções das células imunológicas em doenças. **Metodologia:** O trabalho foi consolidado com a proposta de uma atividade fundamentada no ensino por investigação com o tópico resposta imunológica aos patógenos e os mecanismos efetores das células imunes nas doenças. **Resultados:** A aplicação do conteúdo sobre funções das células do sistema imune e seus mecanismos de mediação e resposta foi melhor assimilado quando utilizamos ferramentas de metodologia ativa, que nesse contexto está configurada na elaboração e excursão do jogo "Perfil Imunológico".

Palavras-chave: Imunologia; Ensino; Doenças; Investigação; Perfil Imunológico.



Betulinic Acid Derivative BA5, Attenuates Inflammation and Fibrosis in Experimental Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy by Inducing IL-10 and M2 Polarization

Cássio Santana Meira¹, Emanuelle De Souza Santos¹, Renan Fernandes do Espírito Santo^{1,2}, Juliana Fraga Vasconcelos^{1,3}, Iasmim Diniz Orge^{1,3}, Carolina Kymie Vasques Nonaka^{1,3}, Breno Cardim Barreto^{1,3}, Alex Cleber Improta Caria³, Daniela Nascimento Silva^{1,3}, José Maria Barbosa-Filho⁴, Simone Garcia Macambira^{2,3}, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira¹ and Milena Botelho Pereira Soares^{1*}

¹ FIOCRUZ, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, ² Science and Health Institute, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Brazil, ³ Center for Biotechnology and Cell Therapy, Hospital São Rafael, Salvador, Brazil, ⁴ Laboratory of Pharmaceutical Technology, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Christoph Hölscher,
Forschungszentrum Borstel
(L.G.), Germany

Reviewed by:

Celio Geraldo Freire-de-Lima,
Federal University of Rio de
Janeiro, Brazil
Thomas Jacobs,
Bernhard-Nocht-Institut für
Tropenmedizin (BNITM), Germany

*Correspondence:

Milena Botelho Pereira Soares
milena@bahia.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 March 2019

Accepted: 17 May 2019

Published: 11 June 2019

Citation:

Meira CS, Santos EDS, Santo RFdE, Vasconcelos JF, Orge ID, Nonaka CKV, Barreto BC, Caria ACI, Silva DN, Barbosa-Filho JM, Macambira SG, Moreira DRM and Soares MBP (2019) Betulinic Acid Derivative BA5, Attenuates Inflammation and Fibrosis in Experimental Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy by Inducing IL-10 and M2 Polarization. *Front. Immunol.* 10:1257. doi: 10.3389/fimmu.2019.01257

Chronic Chagas disease cardiomyopathy (CCC) is a major cause of heart disease in Latin America and treatment for this condition is unsatisfactory. Here we investigated the effects of BA5, an amide semi-synthetic derivative betulinic acid, in a model of CCC. Mice chronically infected with *T. cruzi* were treated orally with BA5 (10 or 1 mg/Kg), three times per week, for 2 months. BA5 treatment decreased inflammation and fibrosis in heart sections but did not improve exercise capacity or ameliorate cardiac electric disturbances in infected mice. Serum concentrations of TNF- α , IFN- γ , and IL-1 β , as well as cardiac gene expression of pro-inflammatory mediators, were reduced after BA5 treatment. In contrast, a significant increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 concentration was observed in BA5-treated mice in both tested doses compared to vehicle-treated mice. Moreover, polarization to anti-inflammatory/M2 macrophage phenotype was evidenced by a decrease in the expression of NOS2 and proinflammatory cytokines and the increase in M2 markers, such as Arg1 and CHI3 in mice treated with BA5. In conclusion, BA5 had a potent anti-inflammatory activity on a model of parasite-driven heart disease related to IL-10 production and a switch from M1 to M2 subset of macrophages.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, betulinic acid derivative, immunomodulation, chagas disease, cardiomyopathy

INTRODUCTION

Chagas disease, caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects 7 million people worldwide (1). Endemic in Latin American countries, it is increasingly found in non-endemic countries due to intense flow of migration, representing a major public health problem (2). The acute phase of Chagas disease is characterized by the presence of *T. cruzi* parasites in the bloodstream, which trigger an intense inflammatory response in several tissues, especially in the cardiac tissue (3, 4). The majority of *T. cruzi*-infected patients survive in the acute phase and develop a chronic asymptomatic infection (5). Nonetheless, after a variable period of time (10–30 years after the onset infection), about 30% of chronically-infected patients become symptomatic (6).



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar



Full length article

Betulinic acid derivative BA5, a dual NF- κ B/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity

Cássio Santana Meira^a, Renan Fernandes do Espírito Santo^{a,b}, Tatiana Barbosa dos Santos^{a,c}, Iasmim Diniz Orge^{a,d}, Dahara Keyse Carvalho Silva^{a,c}, Elisalva Teixeira Guimarães^{a,c}, Luciana Souza de Aragão França^d, José Maria Barbosa-Filho^e, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira^a, Milena Botelho Pereira Soares^{a,d,*}

^a Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brazil

^b Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^c Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^d Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil

^e Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Betulinic acid derivative
T lymphocyte activation
Delayed type hypersensitivity, LPS-induced
endotoxin shock

ABSTRACT

Betulinic acid (BA) is a naturally occurring triterpenoid with several biological properties already described, including immunomodulatory activity. Here we investigated the immunomodulatory activity of eight semi-synthetic amide derivatives of betulinic acid. Screening of derivatives BA1-BA8 led to the identification of compounds with superior immunomodulatory activity than BA on activated macrophages and lymphocytes. BA5, the most potent derivative, inhibited nitric oxide and TNF α production in a concentration-dependent manner, and decreased NF- κ B activation in Raw 264.7 cells. Additionally, BA5 inhibited the proliferation of activated lymphocytes and the secretion of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A and IFN γ , in a concentration-dependent manner. Flow cytometry analysis in lymphocyte cultures showed that treatment with BA5 induces cell cycle arrest in pre-G1 phase followed by cell death by apoptosis. Moreover, BA5 also inhibited the activity of calcineurin, an enzyme that plays a critical role in the progression of cell cycle and T lymphocyte activation. BA5 has a synergistic inhibitory effect with dexamethasone on lymphoproliferation, showing a promising profile for drug combination. Finally, we observed immunosuppressive effects of BA5 *in vivo* in mouse models of lethal endotoxemia and delayed type hypersensitivity. Our results reinforce the potential use of betulinic acid and its derivatives in the search for potent immunomodulatory drugs.

1. Introduction

Betulinic acid (BA) is a naturally occurring pentacyclic triterpenoid found in several plant species, which can be alternatively prepared from its metabolic precursor, betulin (Yogeeswari and Sriram, 2005). This natural product holds several biological activities, including anti-cancer, anti-HIV, antiparasitic and anti-angiogenic activities (Takada and Aggarwal, 2003; Dehelean et al., 2011; Ali-Seyed et al., 2016; Li et al., 2016; Meira et al., 2016). In particular, BA has been reported to possess cytotoxic effects on several tumor cell lines of different origins, as well as in animal models of cancer (Gheorghiosu et al., 2016).

BA has also been investigated as an immunomodulatory agent (Sultana and Saify, 2012). More specifically, BA inhibits the production of several inflammatory mediators, including nitric oxide (NO),

prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor alpha (TNF α), interleukin (IL)-6 and IL-1 β (Jingbo et al., 2015; Kim et al., 2016). Most of these effects are related to the inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B), a transcription factor involved in the regulation of several pro-inflammatory genes, in particular TNF α (Viji et al., 2010; Kim et al., 2016). BA is also known to suppress STAT3 signaling, which is essential transcription factor for differentiation of the CD4⁺ Th17 cells in a variety of autoimmune diseases (Blaževski et al., 2013).

In addition, in a cecal ligation and puncture mouse model, it has been demonstrated that BA treatment reduces mortality and ameliorates lung and kidney function by down-regulating NF- κ B (Lingaraju et al., 2015a, b). Furthermore, in lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock, pre-treatment with BA significantly improves mice survival by modulating TNF α production by macrophages *in vivo*

* Correspondence to: Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia 40296-710, Brazil.
E-mail address: milena@bahia.fiocruz.br (M.B.P. Soares).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.008>

Received 10 June 2017; Received in revised form 31 August 2017; Accepted 8 September 2017
0014-2999/ © 2017 Published by Elsevier B.V.