



FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Curso de Pós-Graduação em Patologia



UFBA

## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação da atividade imunomoduladora de  
fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. em  
macrófagos ativados e no choque endotóxico**

**Moema Cortizo Bellintani**

Salvador – Bahia  
2002

98-085



001636

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Curso de Pós-Graduação em Patologia**



FIOCRUZ



UFBA

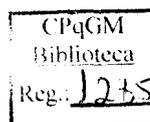
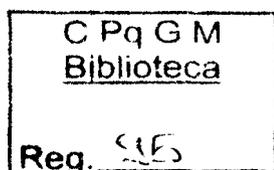
**Avaliação da atividade imunomoduladora de  
fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. em  
macrófagos ativados e no choque endotóxico**

Moema Cortizo Beilintani

Orientadora: Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Patologia, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia  
2002



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – BA

Bellintani, Moema Cortizo

B444a Avaliação da atividade imunomoduladora de fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. em macrófagos ativadas e no choque endotóxico / Moema Cortizo Bellintani. \_ Salvador: Universidade Federal da Bahia / CPqGM / FIOCRUZ, 2002.

64p.: il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)-  
Universidade Federal da Bahia, 2002.

1. *Physalis angulata*. 2. Fisalinas. 3. Macrófagos. 4. Choque endotóxico. 5. Plantas medicinais. 6. esteróides. I. Título.

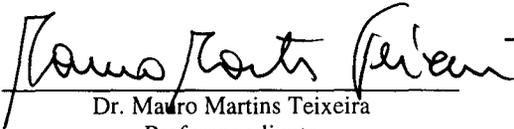
CDU 633-885:06.98-085

Avaliação da atividade imunomoduladora de fisalinas isoladas de *Physalis angulata* L. em macrófagos ativados e no choque endotóxico

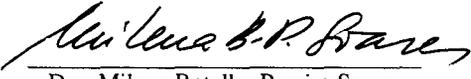
MOEMA CORTIZO BELLINTANI

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dr. Mauro Martins Teixeira  
Professor adjunto  
ICB-UFMG

  
Dr. Johan van Weyenbergh  
Pesquisador Visitante  
CPqGM - FIOCRUZ

  
Dra. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora Assistente  
CPqGM - FIOCRUZ

Aos meus pais, que fazem a vida ainda mais feliz e encantadora; aos meus irmãos, que são principalmente amigos; e a Antonio, que mesmo quando longe, esteve presente nos principais momentos desta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Dra Milena B. P. Soares, pela convivência e incentivo, mas principalmente pela orientação e amizade durante os dois últimos anos.

Ao Dr Ricardo Ribeiro dos Santos, chefe do Laboratório de Imunofarmacologia, por ter participado, apoiado e possibilitado a idealização e realização deste trabalho.

A Dra Therezinha Tomassini e equipe do Laboratório de Produtos Naturais – FarManguinhos, FIOCRUZ/RJ, pela colaboração, através do fornecimento das fisalinas aqui testadas, elemento essencial para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia, pela alegria e descontração que marcaram o nosso convívio diário.

Ao amigo Ricardo Santana de Lima, pela disponibilidade e ajuda em algumas etapas deste trabalho.

A Rosália Meire Oliveira da Silva, pela dedicação maternal aos alunos do curso de pós-graduação.

A Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio e Ana Christina Campos, pela contribuição na normatização da dissertação e das referências bibliográficas.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, pela disponibilidade de excelente estrutura física, pessoal e equipamentos, e aos diretores, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Dr. Lain C. Pontes de Carvalho pelo amor que têm à ciência e a este centro de pesquisas.

A Ana Lúcia Pires Cotias de Oliveira pela orientação, respeito e confiança durante a iniciação científica, etapa fundamental na minha formação.

A Leila, Tiana e Uirá, pelo convívio carinhoso e amigo e pela troca de idéias e valores no campo profissional e pessoal.

A CAPES pela bolsa concedida.

## RESUMO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE FISALINAS ISOLADAS DE *Physalis angulata* L. EM MACRÓFAGOS ATIVADOS E NO CHOQUE ENDOTÓXICO. MOEMA CORTIZO BELLINTANI.** [INTRODUÇÃO] *Physalis angulata* é uma erva de ciclo anual, amplamente difundida pelo mundo, utilizada pela medicina popular para o tratamento de uma variedade de patologias. Neste trabalho foram testadas as atividades imunomoduladoras de fisalinas, esteróides purificados do extrato de *P. angulata*. [METODOS] Os experimentos foram realizados *in vitro* em cultura de macrófagos inflamatórios ou *in vivo* através de ensaio de letalidade induzida por LPS. [RESULTADOS] A adição das fisalinas B, F ou G, mas não da fisalina D, causa uma redução dose-dependente na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ . A produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 por culturas de macrófagos estimulados com LPS ou LPS e IFN- $\gamma$  também foi inibida pela fisalina B de forma dose-dependente. A adição de RU 486, um antagonista do receptor de glicocorticóides, bloqueia a atividade inibitória da dexametasona na produção de IL-12 por macrófagos ativados, mas não reverte os efeitos inibitórios *in vitro* da fisalina B na produção de citocinas ou NO. O tratamento de camundongos com as fisalinas B, F ou G previne a morte induzida por uma dose letal de LPS. Camundongos tratados com fisalina B apresentaram níveis séricos de TNF- $\alpha$  mais baixos que os camundongos controle que foram apenas estimulados com LPS. [CONCLUSÃO] Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que as fisalinas B, F e G de *P. angulata* são substâncias imunomoduladoras potentes, que agem através de um mecanismo diferente da dexametasona. [PALAVRAS-CHAVE] *Physalis angulata*; fisalinas; macrófagos; choque endotóxico; plantas medicinais; esteróides.

## ABSTRACT

IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES OF PHYSALINS PURIFIED FROM *Physalis angulata* L. IN ACTIVATED MACROPHAGES AND IN ENDOTOXIC SHOCK. **MOEMA CORTIZO BELLINTANI**. [INTRODUCTION] *Physalis angulata* is an annual herb widely used in popular medicine for treatment of a variety of pathologies. Here, we tested immunomodulatory activities of physalins, steroids purified from *P. angulata* extracts. [METHODS] The effects of different physalins were evaluated in macrophage cultures and in LPS-induced shock.. [RESULTS] Addition of physalin B, F or G, but not D, caused a dose-dependent reduction in nitric oxide (NO) production by macrophages stimulated with LPS and IFN- $\gamma$ . Cytokine production by activated macrophages was also modulated by physalin B. Macrophage cultures stimulated with LPS or LPS and IFN- $\gamma$  produced lower levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12. Addition of RU486, a glucocorticoid receptor antagonist, blocked the inhibitory activity of dexamethasone in macrophage cultures, but did not abrogate the in vitro suppressive activities of physalin B. Treatment of mice with physalins B, F or G prevented death induced by a lethal dose of LPS. Physalin B-treated mice presented lower levels of serum TNF- $\alpha$  than control mice after LPS challenge. [CONCLUSION] These results demonstrate that steroids from *P. angulata* are potent immunomodulatory substances and act through a mechanism distinct from dexamethasone. [KEYWORDS] *Physalis angulata*; physalins; macrophages; endotoxic shock; medicinal plants; steroids.

# SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 FITOTERÁPICOS .....	13
1.2 <i>Physalis angulata</i> L. ....	14
1.3 OS ESTERÓIDES PURIFICADOS DE <i>PHYSALIS ANGULATA</i> L .....	16
1.4 O PAPEL DOS ESTERÓIDES NA IMUNOMODULAÇÃO .....	19
1.5 O CHOQUE SÉPTICO OU ENDOTÓXICO .....	22
2 OBJETIVOS .....	27
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
3 JUSTIFICATIVA .....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1 ANIMAIS .....	29
4.2 OBTENÇÃO DAS FISALINAS .....	29
4.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS .....	30
4.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS .....	30
4.5 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO .....	31
4.6 DOSAGEM DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IL-6 E IL-12) .....	32
4.7 TESTE DE TOXICIDADE .....	33
4.8 CHOQUE ENDOTÓXICO .....	34
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34

<b>5 RESULTADOS</b> .....	35
<b>5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FISALINAS</b> .....	35
<b>5.2 EFEITO DAS FISALINAS NA PRODUÇÃO DE NO POR</b> .....	37
<b>MACRÓFAGOS ATIVADOS</b>	
<b>5.3 EFEITO DA FISALINA B NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS</b> .....	40
<b>POR MACRÓFAGOS ATIVADOS</b>	
<b>5.4 COMPARAÇÃO DO EFEITO DA FISALINA B COM A AÇÃO DA</b> .....	42
<b>DEXAMETASONA NA PRODUÇÃO DE NO</b>	
<b>5.5 INVESTIGAÇÃO DA VIA DE AÇÃO DA FISALINA B</b> .....	44
<b>5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM FISALINAS NO CHOQUE</b> .....	47
<b>ENDOTÓXICO</b>	
<b>5.6.1 Efeito da fisalina B na produção de TNF-<math>\alpha</math></b> .....	47
<b>em camundongos desafiados com LPS</b>	
<b>5.6.2 Determinação da dose letal de LPS em camundongos</b> .....	49
<b>5.6.3 Efeito das fisalinas B, G e F no choque endotóxico</b> .....	51
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	- <i>Physalis angulata</i> L.....	15
Figura 2	- Estrutura química das fisalinas.....	18
Figura 3	- Desenho esquemático da superfamília de receptores intracelulares .....	21
Figura 4	- Viabilidade de macrófagos tratados com diferentes concentrações de fisalinas .....	36
Figura 5	- Produção de NO in vitro por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ e tratados com diferentes fisalinas .....	38
Figura 6	- Produção in vitro de NO por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ e tratados com fisalina B .....	39
Figura 7	- Produção in vitro de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 por macrófagos ativados por LPS ou LPS e IFN- $\gamma$ e tratados com fisalina B .....	41
Figura 8	- Produção de NO in vitro por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ e tratados com fisalina B ou dexametasona .....	43
Figura 9	- Efeito da fisalina B e/ou RU486 na produção in vitro de IL-12 por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ .....	45
Figura 10	- Efeito da fisalina B e/ou RU486 na produção in vitro de NO por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ .....	46
Figura 11	- Produção de TNF- $\alpha$ em camundongos BALB/c estimulados por LPS e tratados com fisalina B .....	48
Figura 12	- Curva de letalidade de camundongos BALB/c induzida por LPS .....	50
Figura 13	- Efeito das fisalinas em camundongos BALB/c desafiados com uma dose letal de LPS .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>Células NK</b>	- células matadoras naturais
<b>DL</b>	- dose letal
<b>DMEM</b>	- meio Eagle modificado por Dubelco
<b>DMSO</b>	- dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	- ácido desoxiribonucleico
<b>ELISA</b>	- ensaio imunoenzimático
<b>GABA<sub>A</sub></b>	- ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>HBSS</b>	- solução salina balanceada de Hank
<b>HIV</b>	- vírus da imunodeficiência humana
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	- interferon gama
<b>IL</b>	- interleucina
<b>i.p.</b>	- intra-peritoneal
<b>IRF</b>	- fator regulador do interferon
<b>LPS</b>	- lipopolissacarídeo
<b>MHC</b>	- complexo de histocompatibilidade principal
<b>MPLC</b>	- cromatografia líquida por pressão média
<b>MTT</b>	- 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NADPH</b>	- nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato
<b>NF<math>\kappa</math>-B</b>	- fator nuclear $\kappa$ -B
<b>NO</b>	- óxido nítrico
<b>NOS</b>	- sintase de óxido nítrico
<b>PAF</b>	- fator de ativação plaquetária

<b>PBS</b>	- solução tampão fosfato
<b>ppm</b>	- partes por milhão
<b>RU486</b>	- mifepristona
<b>SBF</b>	- soro bovino fetal
<b>TLC</b>	- cromatografia de camada fina
<b>TMB</b>	- trimethylene-bis (4-formylpyridinium Bromide) Dioxime
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	- fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>ZK299</b>	- onapristona

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 FITOTERÁPICOS

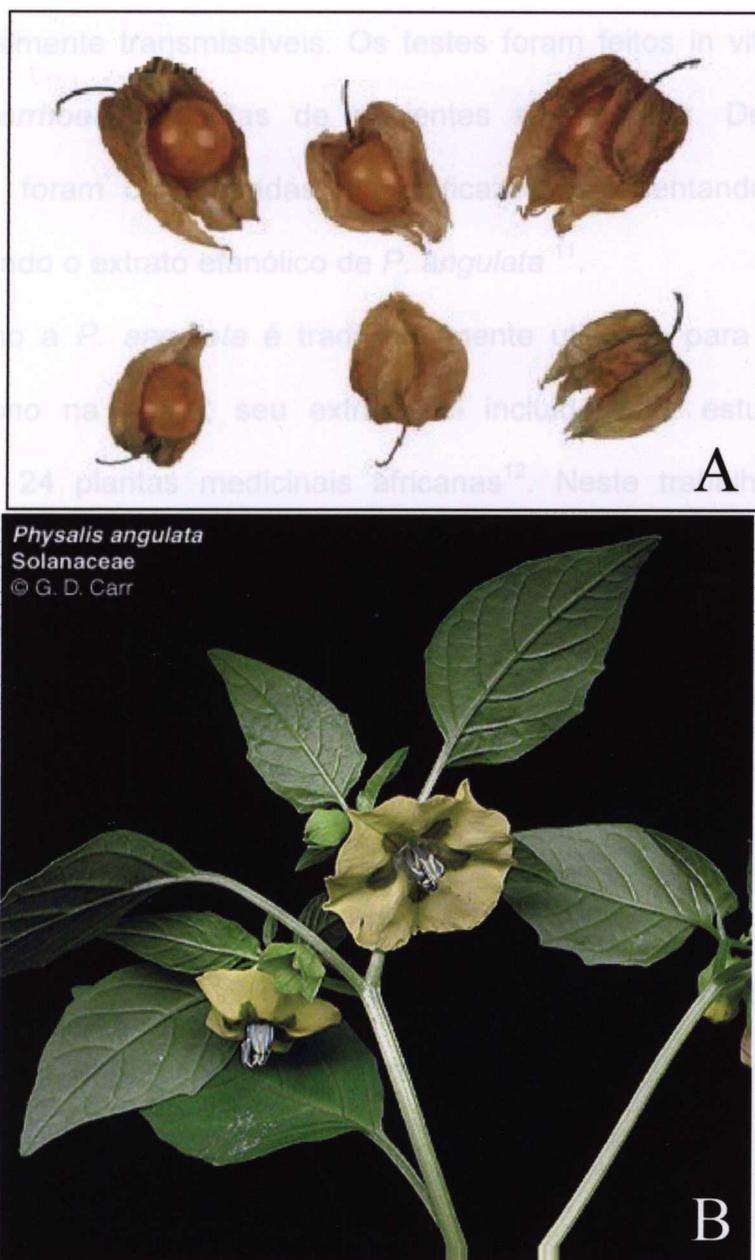
A biodiversidade encontrada no Reino Vegetal resulta em um número crescente de espécies utilizadas no tratamento de diferentes doenças que atingem a humanidade. As observações empíricas das propriedades terapêuticas de produtos naturais têm fornecido subsídios para a pesquisa da atividade biológica de extratos ou frações de produtos de origem vegetal utilizados como medicamentos populares<sup>1</sup>. As plantas não apenas fornecem o princípio ativo de muitas drogas, como também fornecem substâncias que podem servir de base para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos ou semi-sintéticos. A ocupação de diferentes condições ambientais pelos vegetais é possível devido à grande variedade de adaptações apresentadas pelas espécies, sendo a variabilidade química um dos fatores que possibilita esta adaptação<sup>2</sup>.

Produtos derivados de fitoterápicos têm sido utilizados no tratamento de infecções por fungos, bactérias, vírus e parasitas e também como imunossuppressores, agindo na prevenção da rejeição de transplantes, em doenças alérgicas e autoimune. O tratamento de doenças infecciosas ou parasitárias com substâncias imunomoduladoras combinadas ou não com agentes antivirais, antifúngicos e bactericidas previne o surgimento de inflamações crônicas, alergias e outras patologias resultantes de desregulações do sistema imune<sup>1</sup>.

## 1.2 *Physalis angulata* L

*Physalis angulata* (Fig. 1) é uma planta herbácea de ciclo anual amplamente difundida nas regiões tropicais e subtropicais dos continentes asiático, africano e sul-americano. Popularmente conhecida como mullaca, camapú, bucho de rã ou juá de capote, esta solanácea tem sido utilizada pela medicina popular como anticoagulante, antileucêmico, antimutagênico, antiinflamatório, antiespasmódico, antiséptico, analgésico, diurético e no tratamento de diabetes, doença do sono, malária, hepatite, reumatismo, dermatites, asma e gonorréia<sup>3, 4</sup>. No Brasil, pode ser encontrada em quase todo o território, podendo ser considerada em alguns casos como infestante de outras culturas. A medicina popular brasileira utiliza o chá das raízes desta planta como diurético, sudorífico, antireumático e antiinflamatório. A infusão das folhas é recomendada como antiinflamatório da bexiga e fígado e os frutos são ricos em vitamina C<sup>5</sup>. Análises fitoquímicas de *P. angulata* demonstram a presença de flavonóides, alcalóides e esteróides<sup>3</sup>.

Nos poucos estudos que comprovaram a atividade farmacológica de substâncias isoladas de *P. angulata*, foram descritas propriedades antivirais, através de ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa dos vírus da Poliomielite I e HIV I<sup>6</sup>, e bactericidas<sup>7</sup>. Um componente com estrutura química conhecida, isolado de *P. angulata*, a witangulatina A, tem atividade antitumoral, induzindo clivagem do DNA através de ação na topoisomerase II<sup>8</sup>. A witangulatina A demonstra, ainda, atividade citotóxica, sendo capaz de inibir, a nível transcricional, a síntese de proteínas<sup>9</sup>.



**Figura 1 – *Physalis angulata*. (A) Frutos. (B) Aspecto da planta florida.**

FONTE: disponível em <<http://www.rain-tree.com/mullaca.htm>><sup>10</sup>

A atividade antigonorréia de *P. angulata* foi testada juntamente com a de outras 46 plantas utilizadas popularmente na Guatemala para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. Os testes foram feitos in vitro, em cepas de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas de pacientes sintomáticos. Dentre as plantas testadas, 28% foram consideradas mais eficazes, apresentando efeito inibitório evidente, incluindo o extrato etanólico de *P. angulata*<sup>11</sup>.

Como a *P. angulata* é tradicionalmente utilizada para o tratamento da doença do sono na África, seu extrato foi incluído num estudo da atividade tripanocida de 24 plantas medicinais africanas<sup>12</sup>. Neste trabalho foi avaliada a atividade contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*, bem como a citotoxicidade na linhagem WI-38 de fibroblastos humanos. *P. angulata* foi uma das três plantas cujo extrato apresentou maior atividade em concentrações não tóxicas. Dentre os extratos de *P. angulata*, o de caule foi o mais ativo, seguido do de folha. Apesar dos efeitos citotóxicos observados in vitro em células de mamíferos, in vivo os frutos de *P. angulata* não demonstram efeito citotóxico agudo, visto que o consumo destes frutos em muitos locais da África resulta em uma concentração corpórea maior que a considerada tóxica, porém sem causar danos ao organismo<sup>12</sup>.

### **1.3 - OS ESTERÓIDES PURIFICADOS DE *Physalis angulata* L**

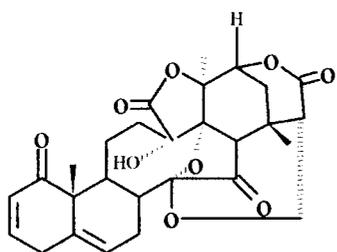
Estudos farmacológicos de esteróides derivados de *P. angulata* têm demonstrado a inibição de mitoses através da clivagem de DNA, resultando em efeitos citotóxicos contra diversos tipos de células tumorais in vitro e in vivo<sup>8, 9</sup>.

Observou-se também a atividade imunomoduladora in vitro, tais como o estímulo à proliferação de linfócitos B e T e a indução à produção de anticorpos<sup>3</sup>.

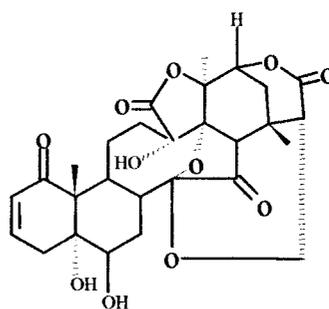
As fisalinas são esteróides constituintes das plantas pertencentes ao gênero *Physalis*, presentes normalmente a níveis de 30 a 500 partes por milhão (ppm) em raízes, caule e folhas (Fig. 2).

A atividade antitumoral das fisalinas B, D e F, isoladas do extrato etanólico total (raízes, caule, folhas) de *P. angulata*, foi testada em linhagens de células tumorais. Verificou-se que as fisalinas B e F agem inibindo o crescimento destas células, contrastando com a fisalina D que não apresentou nenhuma ação in vitro ou in vivo. Foi verificada a ação, tanto da fisalina B quanto da F, contra células leucêmicas humanas das linhagens K562 (eritroleucemia), APM 1840 (leucemia linfóide aguda tipo T), HL-60 (leucemia aguda promielocítica), KG-1 (leucemia mielóide aguda), CTV 1 (leucemia monocítica aguda) e em uma linhagem de células isoladas de pacientes com leucemia linfóide aguda tipo B. O efeito da fisalina F foi maior que o da B, principalmente contra a leucemia mielóide aguda e a leucemia linfóide B aguda<sup>13</sup>.

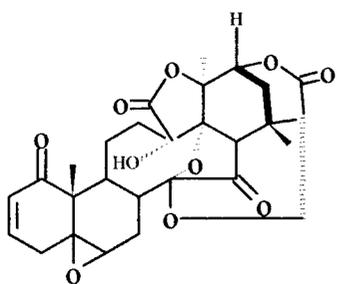
A fisalina F foi testada ainda contra outras 8 linhagens tumorais, 5 humanas - hepatoma (HA22T), cérvix uterino (HeLa), nasofaringe (KB), cólon (colo-205), pulmão (calu-1) - e 3 animais - melanoma (H1477), laringe (Hep-2) e glioma (8401). Observou-se uma ação mais forte contra a linhagem de hepatoma seguido pelo câncer do cérvix uterino. Foi observada, ainda, a ação da fisalina F in vivo contra leucemia linfóide aguda (P 388) em camundongos<sup>4</sup>.



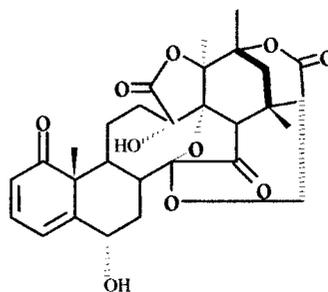
Fisolina B



Fisolina D



Fisolina F



Fisolina G

**Figura 2 – Estrutura química das fisolinas. Desenho esquemático da estrutura química das fisolinas B, D, F e G.**

## 1.4 - O PAPEL DOS ESTERÓIDES NA IMUNOMODULAÇÃO

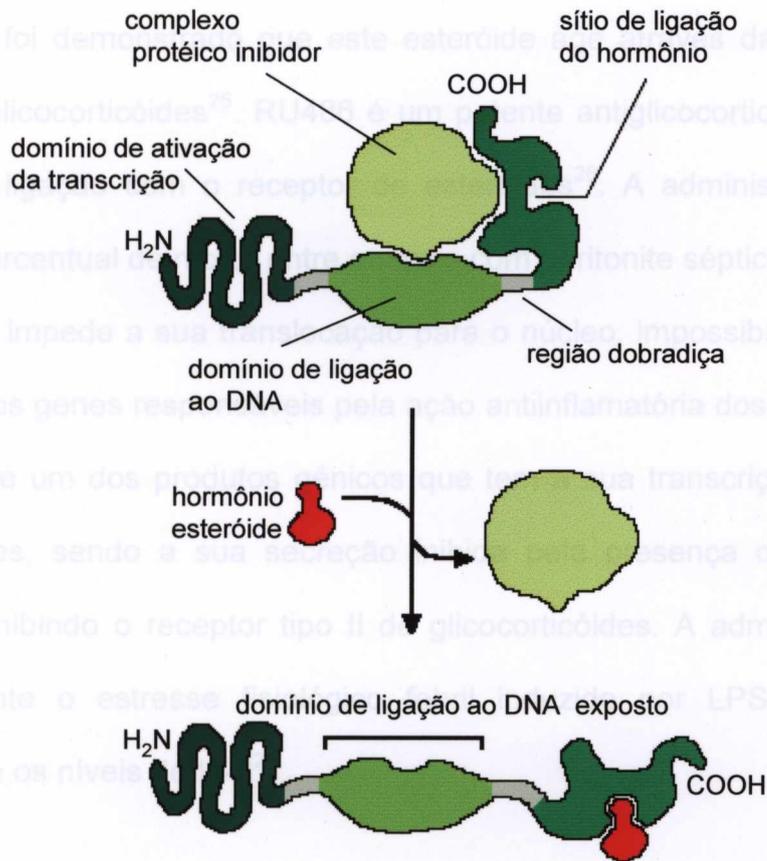
Os esteróides endógenos são hormônios derivados do colesterol que atuam em vários processos no organismo, incluindo a regulação neuro-imuno-endócrina. Entre as principais classes de hormônios esteróides estão os androgênios, os estrogênios, os progestagênios, os glicocorticóides e os mineralcorticóides. Os glicocorticóides e mineralcorticóides são secretados pelo córtex supra-renal, enquanto os progestagênios, são secretados pelos ovários e placenta. Os receptores para estes esteróides possuem uma estrutura similar, com a região amino-terminal específica, uma região de ligação ao DNA conservada e uma região carboxi-terminal de ligação ao hormônio<sup>14</sup>.

Os glicocorticóides afetam o metabolismo dos carboidratos e proteínas, sendo a hidrocortisona e a corticosterona seus principais representantes. Além das atividades metabólicas, estes esteróides exercem também ação antiinflamatória e imunossupressora, sendo frequentemente utilizados no tratamento de doenças autoimune, alergias, na prevenção de rejeição de transplantes, doenças reumáticas, neoplasias e doenças degenerativas do sistema nervoso central. Como as funções metabólicas e terapêuticas são inerentes ao glicocorticóide, não é possível “explorar” uma das atividades sem que a outra se manifeste. Assim, quando esteróides são utilizados como antiinflamatórios e/ou imunossupressores, as atividades metabólicas tornam-se efeitos colaterais indesejáveis. A deficiência na produção dos esteróides endógenos ocasiona a doença de Addison, que tem como sintomas a fraqueza muscular, pressão arterial baixa, depressão, anorexia, perda de peso e hipoglicemia. Entre os fatores que ocasionam a redução da produção destes corticosteróides está a administração terapêutica prolongada de glicocorticóides. O corpo adapta-se ao

tratamento reduzindo a secreção endógena de hormônios esteróides, e, quando a administração é interrompida, os níveis hormonais internos não conseguem se estabilizar, originando a deficiência<sup>15</sup>.

A ação antiinflamatória dos glicocorticóides inclui a redução da atividade de macrófagos e neutrófilos, a diminuição da migração leucocitária e da ação e proliferação de células T e a modulação da secreção de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios<sup>16</sup>. Os glicocorticóides inibem a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, sendo capazes de suprimir a secreção desta citocina in vivo e in vitro, a nível transcricional e pós-transcricional<sup>16, 17, 18</sup>. O TNF- $\alpha$  é expresso inicialmente como uma proteína de membrana que, após ser clivada proteoliticamente, é liberada pela célula<sup>19</sup>. Os glicocorticóides influenciam a atividade de proteases em macrófagos, sendo esta uma hipótese da via de regulação pós-transcricional da secreção de TNF- $\alpha$  por estas substâncias<sup>18, 19</sup>. Os glicocorticóides agem também na inibição da secreção de óxido nítrico (NO) por macrófagos estimulados<sup>20</sup>. Estes esteróides são, portanto, de grande valia no tratamento de inflamações indesejáveis, mas, em paralelo, podem suprimir as respostas protetoras necessárias ao controle de infecções e ao processo de reparo<sup>15, 21</sup>.

A ação dos glicocorticóides é iniciada com a penetração destes esteróides na célula, seguida da interação com os seus receptores no citoplasma celular (Fig. 3). A interação hormônio-receptor causa uma mudança conformacional que expõe o domínio de ligação ao DNA, tornando o receptor ativado. Os dímeros formados pelo complexo hormônio-receptor migram para o núcleo e ligam-se aos elementos de resposta a glicocorticóides, regulando a ativação e transcrição gênica<sup>14, 22, 23</sup>.



**Figura 3 – Desenho esquemático da superfamília de receptores**

**intracelulares.** No estado inativo o receptor está ligado a um complexo inibidor. A ligação do esteróide ao receptor provoca a dissociação do complexo inibitório, ativando o receptor e expondo o sítio de ligação ao DNA. Modelo baseado no receptor de cortisol, que tem estrutura similar a todos os outros receptores desta superfamília.

FONTE: figura 15-12, página 729, Alberts et al. 1994<sup>22</sup>.

A dexametasona, um esteróide sintético amplamente utilizado como antiinflamatório, diminui a morte por choque séptico em camundongos com peritonite séptica<sup>24</sup>. Já foi demonstrado que este esteróide age através da interação com o receptor de glicocorticóides<sup>25</sup>. RU486 é um potente antiglicocorticóide que tem alta afinidade de ligação com o receptor de esteróides<sup>26</sup>. A administração de RU486 aumenta o percentual de morte entre animais com peritonite séptica<sup>24</sup>. A ligação com este receptor impede a sua translocação para o núcleo, impossibilitando o início da transcrição dos genes responsáveis pela ação antiinflamatória dos glicocorticóides<sup>26</sup>. A lipocortina é um dos produtos gênicos que tem a sua transcrição induzida pelos glicocorticóides, sendo a sua secreção inibida pela presença do RU486<sup>27, 28</sup>. O RU486 age inibindo o receptor tipo II de glicocorticóides. A administração oral de RU486 durante o estresse fisiológico febril induzido por LPS faz aumentar a temperatura e os níveis de IL-6<sup>29</sup>.

## 1.5 - O CHOQUE ENDOTÓXICO

O choque séptico é causado por infecção por bactérias. A liberação do LPS (endotoxina constituinte da parede celular bacteriana) no sangue resulta em forte resposta do organismo à disseminação destes microorganismos pelo corpo, desencadeando o colapso circulatório que caracteriza o estado de choque<sup>30</sup>. A endotoxina age através de ligação a “toll-like receptors” presentes, principalmente, em leucócitos e células endoteliais, desencadeando a síntese e liberação de uma série de mediadores, muitos deles secretados por macrófagos<sup>31</sup>. A ativação de macrófagos por LPS acarreta a secreção de IL-1 e TNF- $\alpha$ , que por sua vez

promovem ativação endotelial, adesão e agregação leucocitária, coagulação intravascular disseminada e trombose capilar, além de estimular a secreção de outros mediadores como IL-6, NO e prostaglandinas, que geram outros efeitos pró-inflamatórios, como o edema pulmonar agudo<sup>32, 33, 34</sup>. Quando um inibidor de NOS II (NO sintetase induzida) é administrado num animal com septicemia, consegue-se observar a reversão da injúria pulmonar aguda<sup>34</sup>.

O choque séptico é resultado da redução do volume sanguíneo, ocasionada por alteração do débito cardíaco e vasodilatação. O déficit perfusional facilita o acúmulo de metabólitos e diminui a oxigenação e nutrição celular e tecidual. A persistência do estado de choque resulta em lesões celulares irreversíveis, fato que altera as funções teciduais, podendo ocasionar a morte<sup>32, 35, 36</sup>.

A administração experimental de LPS simula os efeitos da infecção por bactérias, levando à ativação dos macrófagos e a liberação excessiva de NO, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12. A produção excessiva destes mediadores é a causa de muitos sinais da inflamação, podendo ocasionar febre, falência múltipla de órgãos, coagulação intravascular disseminada e até a morte por choque endotóxico<sup>30</sup>.

TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 estão entre as principais citocinas mediadoras da inflamação secretadas por macrófagos ativados. Podem atuar sobre a própria célula secretora ou sobre células próximas, ou atingir a circulação, agindo de forma sistêmica. As citocinas pró-inflamatórias (nas quais estão incluídas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12) levam ao surgimento de uma série de sintomas que caracterizam as respostas sistêmicas de fase aguda, como febre, sono, perda de apetite, migração de neutrófilos, e liberação de hormônio adrenocorticotrófico e corticosteróides, ocasionando os efeitos hemodinâmicos do choque séptico (hipóxia, redução da resistência vascular e taquicardia)<sup>15, 36</sup>.

O TNF- $\alpha$ , produzido principalmente por macrófagos ativados, é o principal mediador da resposta do hospedeiro a bactérias gram-negativas e ao LPS, contribuindo para a patogênese característica do processo inflamatório. Em baixas concentrações, atua como regulador parácrino e autócrino de leucócitos e células endoteliais, estimula as funções secretoras de fagócitos mononucleares, induz a atividade microbicida dos leucócitos inflamatórios, aumenta a expressão de MHC classe I, exercendo efeito protetor contra vírus (aumenta a lise de células infectadas), recruta e agrega neutrófilos, contribuindo para o acúmulo de leucócitos nos sítios inflamatórios e atua como ativador policlonal de linfócitos B. No entanto, quando as concentrações desta citocina são aumentadas, o TNF- $\alpha$  amplifica a resposta dos neutrófilos a si próprio e a outros mediadores inflamatórios e ocasiona a liberação de enzimas proteolíticas por células mesenquimatosas, o que resulta em lesão tecidual. Concentrações alteradas de TNF- $\alpha$  podem levar ainda a linfopenia e imunodeficiência (através da supressão da divisão de células indiferenciadas da medula óssea), colapso circulatório (relaxa o tônus da musculatura lisa vascular e promove a liberação de vasodilatadores), queda da glicemia e coagulação intravascular disseminada, induzindo o choque<sup>18, 36</sup>.

A interleucina 6 não é secretada diretamente em resposta ao LPS, mas sim através da estimulação da secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1, duas citocinas capazes de estimular a secreção de IL-6. Esta citocina, que tem atividade pirogênica, atua como fator de crescimento na diferenciação dos linfócitos B, pode servir como coestimulador de linfócitos T e timócitos e, induz a síntese de diversas proteínas plasmáticas pelos hepatócitos (como o fibrinogênio), contribuindo para a resposta de fase aguda<sup>33, 36, 37</sup>.

A interleucina 12 é uma citocina heterodimérica formada por duas cadeias polipeptídicas, a p35 e p40, ligadas covalentemente<sup>38</sup>. Age na diferenciação e ativação de linfócitos T, é potente ativadora de células NK, estimula a produção de IFN- $\gamma$ , aumenta a atividade citolítica e atua como fator de crescimento para estas células<sup>38, 39, 40</sup>. A regulação sinérgica da produção de IL-12 por LPS e IFN- $\gamma$  é importante durante as infecções bacterianas, pois o LPS inicialmente induz uma secreção restrita desta citocina. No entanto, a própria IL-12 estimula os linfócitos T e as células NK a produzir IFN- $\gamma$  que, juntamente com o LPS estimula então a secreção de IL-12 de forma exacerbada, caracterizando o processo inflamatório<sup>39, 41, 42</sup>.

O óxido nítrico é um radical livre gasoso altamente reativo, produzido principalmente por células endoteliais e macrófagos em resposta à estimulação por citocinas<sup>43</sup>. O NO é formado a partir de L-arginina, oxigênio molecular e NADPH, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A enzima NOS pode ser expressa no organismo sob a forma constitutiva ou induzida (NOS II). As NOS constitutivas estão normalmente expressas no sistema nervoso (NOS I) e no tecido endotelial (NOS III), estando envolvidas em vários processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão e vasodilatação<sup>43</sup>. A expressão da NOS II é ativada por estímulos como LPS ou agentes proinflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , PAF), principalmente pela ativação simultânea por LPS e IFN- $\gamma$ , através da ativação da transcrição gênica regulada pelos fatores nucleares, como o NF- $\kappa$ B<sup>44, 45</sup> e IRF-1<sup>46</sup>.

O NO é uma molécula de sinalização fundamental para manter a homeostase, mas também um potente agente citotóxico envolvido em muitas patologias. Em condições normais, a concentração de NO é baixa e o gás age como fator antioxidante através de interações com metais e outros radicais livres<sup>43, 47</sup>,

participa da atividade neuronal como segundo mensageiro, atua na regulação da pressão sanguínea e na inibição da coagulação intravascular (prevenindo a agregação plaquetária) e é essencial na eliminação de micróbios e células tumorais<sup>48</sup>. Em circunstâncias adversas, a elevação dos níveis de NO causa toxicidade e contribui para a patofisiologia da inflamação, colapso circulatório e isquemia tecidual<sup>47</sup>. A adição de NO in vitro ocasiona efeitos tóxicos, tais como danos nucleares, inibição da respiração mitocondrial e alterações nas proteínas e fosfolipídios da membrana celular. Na septicemia, níveis sanguíneos elevados de nitrito e nitrato, os produtos estáveis do NO, sugerem que o NO está envolvido nas alterações cardiovasculares (vasodilatação periférica maciça e hiporeatividade a vasoconstritores) que caracterizam o choque séptico<sup>32, 35, 45, 49</sup>.

Durante o choque endotóxico, ocorre à expressão maciça de NOS II em muitos órgãos e tecidos, o que resulta na formação descontrolada de NO que por sua vez contribui para a hipotensão, hiporeatividade vascular a vasoconstritores, injúria, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla de órgãos. A inibição da expressão de NOS II através da ação de dexametasona ou de inibidores de NOS II causa efeitos benéficos nos modelos animais de choque, sendo possível observar a reversão de alguns dos sintomas observados<sup>32, 35</sup>.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a atividade imunomoduladora das fisalinas B, D, G e F, extraídas de *Physalis angulata*, em macrófagos ativados e no choque endotóxico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1 – Avaliar a atividade das fisalinas na modulação da produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12) por macrófagos ativados com LPS ou LPS e IFN- $\gamma$ .
- 2 – Avaliar a atividade das fisalinas na produção de óxido nítrico por macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$ .
- 3 – Avaliar a atividade das fisalinas in vivo através de ensaio de letalidade induzida pela administração de LPS.
- 4 – Comparar o mecanismo de ação das fisalinas com o do esteróide sintético dexametasona.

### 3 JUSTIFICATIVA

---

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 80% da população mundial utiliza, de algum modo, plantas medicinais como medicamentos. A grande maioria destas plantas ainda não teve a atividade biológica comprovada, fato que limita o número de princípios ativos devidamente caracterizados e, conseqüentemente, o uso de fitoterápicos no tratamento de doenças<sup>2</sup>.

Análises farmacológicas têm demonstrado que plantas medicinais contêm substâncias imunomoduladoras capazes de atuar na regulação do sistema imunológico ou agir na regressão de tumores<sup>1, 3</sup>. *Physalis angulata* tem sido amplamente utilizada na medicina popular, sendo a esta erva atribuída ações antiinflamatória, antiséptica, analgésica, entre outras. No entanto, poucos estudos comprovaram as suas ações farmacológicas.

Esteróides são substâncias usualmente utilizadas pela medicina por apresentar ação antiinflamatória e imunossupressora, tendo a capacidade de inibir manifestações características da inflamação, bem como controlar o quadro de doenças autoimune. As fisalinas são esteróides constituintes das plantas pertencentes ao gênero *Physalis*. A investigação da atividade das fisalinas B, D, F e G através de ensaios in vitro e in vivo permitiu caracterizar o seu potencial de ação sobre macrófagos e no choque endotóxico, resultando em novas substâncias moduladoras do sistema imune com atividade biológica comprovada.

## 4 MATERIAL e MÉTODOS

---

### 4.1 ANIMAIS

Para os estudos *in vitro* (obtenção de macrófagos peritoneais) e *in vivo* (choque endotóxico), foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c com idade entre 5-8 semanas (aproximadamente 18 g). Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA e mantidos no mesmo até o sacrifício.

### 4.2 OBTENÇÃO DAS FISALINAS

O processo de purificação das fisalinas (esteróides constituintes de *Physalis angulata*) foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais – FarManguinhos, FIOCRUZ/RJ, sob a coordenação da Dra Therezinha Tomassini. Cerca de 15 g do extrato etanólico do caule *P. angulata* L., oriundos de Belém do Pará, foram dissolvidos em 300 ml de metanol. Adicionou-se, em seguida, solução de acetato de chumbo (200 ml de água destilada, quente, com 25 g de acetato de chumbo). Agitou-se esta mistura por duas horas, e, em seguida, foram adicionados 20 g de carvão ativo, sob agitação constante. A mistura obtida foi filtrada, colocada em funil de separação e extraída com 200 ml de clorofórmio, por três vezes, resultando em 770 mg na fase clorofórmica (IMR III-44-1). Esta fração foi submetida à cromatografia por MPLC (cromatografia líquida por pressão média) utilizando, para

eluição, o sistema gradiente hexano/acetato de etila (70:30), até a 100% deste último solvente. As frações foram coletadas através de tubos, após a evaporação do solvente, foram secas e submetidas a TLC (cromatografia de camada fina), bem como aos métodos espectroscópicos. Como resultado final, obtém-se 15 mg de fisalina B com grau de pureza de 96%, 75 mg de fisalina D com grau de pureza de 95,6%, 56 mg de fisalina F com grau de pureza de 97,8% e 51 mg de fisalina G com grau de pureza de 95%. As fisalinas foram diluídas em DMSO, sendo estocadas na concentração de 10 mg/ml.

#### **4.3 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Para obtenção de macrófagos do exudato peritoneal, camundongos foram inoculados por via intraperitoneal com 2 ml de tioglicolato a 3% em água. Após quatro dias, foi feita a lavagem da cavidade peritoneal com 10 ml de HBSS gelado<sup>50</sup>. O lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, em centrifuga refrigerada. O pellet contendo os macrófagos foi resuspenso em 1 ml de DMEM a 10% SBF para determinação da concentração de células através de contagem em câmara de Neubauer.

#### **4.4 CULTURA DE MACRÓFAGOS**

As células obtidas do exudato peritoneal foram cultivadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, em placas de fundo chato de 24 poços (5x10<sup>6</sup>

cel/poço) e 96 poços ( $2 \times 10^5$  cel/poço), em volumes finais de 2 e 0,2 ml de DMEM suplementado com 10% SBF, respectivamente. Após duas horas de cultura, as células não aderentes foram removidas por lavagem com DMEM 10% SBF. As células aderentes foram então estimuladas com 500 ng/ml de LPS (*E. coli* sorotipo 0111:B4, Sigma) e/ou 5 ng/ml de IFN- $\gamma$  (recombinante murino, Genzyme, atividade específica  $5 \times 10^6$  U/mg) e tratadas com diferentes concentrações das fisalinas (2, 0,2 e 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ). A concentração de 2  $\mu\text{g/ml}$  corresponde a uma solução de 3,9  $\mu\text{M}$  da fisalina B, 3,7  $\mu\text{M}$  da fisalina D e 3,8  $\mu\text{M}$  das fisalina F e G. Para fins comparativos, foi feito paralelamente o tratamento com 1  $\mu\text{M}$  de dexametasona (0,4  $\mu\text{g/ml}$ ). Para investigar o mecanismo de ação, utilizou-se o antagonista do receptor da dexametasona – RU486 ( $10^{-5}$  M)<sup>51</sup>. As células foram mantidas em cultura por 4, 24 ou 48 horas, quando então os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de citocinas e óxido nítrico.

#### 4.5 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico foi determinada pelo método de Griess<sup>52</sup> (sulfanilamida a 1% / dihidroclorato de naftileno diamina a 0,1% /  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2,5%) através da medida do conteúdo de nitrito no sobrenadante das culturas de macrófagos das placas de 96 poços coletadas após 24 e 48 horas de estimulação e tratamento.

A absorbância foi determinada em um leitor de ELISA (Emax precision microplate reader – MOLECULAR DEVICES), com filtro de 570 nm. As análises foram feitas no Software Softmax for Windows 3.0, descontando a densidade óptica

do branco (meio de cultura + reagente de Griess 1:1). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{NO}_2^-$ , tendo por base uma curva padrão de nitrito de sódio –  $\text{NaNO}_2$  diluído em meio de cultura com concentração inicial de  $400 \mu\text{M}$ .

#### 4.6 DOSAGEM DE CITOCINAS (TNF- $\alpha$ , IL-6 E IL-12).

As dosagens de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (p40) foram feitas através da técnica de ELISA sanduíche, descrita abaixo, no sobrenadante das culturas de macrófagos das placas de 24 poços (TNF- $\alpha$  e IL-6) e 96 poços (IL-12), coletadas após 4 e 24 horas de cultura, respectivamente<sup>53, 54</sup>. Os anticorpos de captura e detecção e as citocinas recombinantes foram adquiridas da PharMingen.

Placas de ELISA (NUNC – IMMUNO PLATE MaxiSorp Surface) foram sensibilizadas por 16 horas a  $4^\circ\text{C}$  com  $50 \text{ ml/poço}$  de anticorpo de captura na concentração de  $1 \mu\text{g/ml}$ . As placas foram lavadas três vezes com PBS/0,5% Tween e bloqueadas com PBS/5% SBF ( $100 \mu\text{l/poço}$ ) durante 1-2 horas. Após o bloqueio, as amostras, o branco e a curva padrão, foram plaqueadas em triplicata ( $50 \mu\text{l/poço}$ ). Após incubação por 16 horas a  $4^\circ\text{C}$ , foram feitas três lavagens com PBS/0,5% Tween e então foi adicionado ( $50 \mu\text{l/poço}$ ) o anticorpo de detecção (biotinilado) na concentração de  $1 \mu\text{g/ml}$  por 45 minutos. A placa foi lavada cinco vezes com PBS/0,5% Tween e, incubada durante 30 minutos com avidina peroxidase ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). A revelação foi feita utilizando o substrato TMB +  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e interrompida com ácido ortofosfórico diluído (4,4 %).

A absorbância foi determinada em um leitor de ELISA (Emax precision microplate reader – MOLECULAR DEVICES), com filtro de  $450 \text{ nm}$ . As análises

foram feitas no Software Softmax 3.0. Para as curvas padrão foram utilizadas citocinas recombinantes, tendo sido iniciadas com as concentrações de 100 ng/ml (TNF- $\alpha$ ) e 10 ng/ml (IL-6 e IL-12), seguindo-se 9 diluições 1:2 em triplicata. A densidade óptica do branco foi subtraída de todas as amostras e da curva padrão. Os resultados foram expressos em ng/ml de cada uma das citocinas.

Para a dosagem de TNF- $\alpha$  in vivo, camundongos BALB/c foram estimulados com 400  $\mu$ g de LPS/animal, e tratados ou não com uma dose de 500  $\mu$ g/animal de fisalina B. Noventa minutos após o estímulo e/ou tratamento, os animais foram sangrados (veia axilar), o soro isolado e plaqueado imediatamente, sem diluir, numa placa de ELISA previamente sensibilizada. A dosagem de TNF- $\alpha$  in vivo foi realizada conforme descrito anteriormente.

#### **4.7 TESTE DE TOXICIDADE**

A avaliação de eventuais efeitos citóxicos das drogas foi feita pelo método do MTT. O MTT é um sal tetrazóico metabolizado por enzimas mitocondriais de células viáveis, gerando um produto de coloração azul escuro. Após a remoção do sobrenadante para determinar as concentrações de NO e IL-12 (48 horas de estímulo e/ou tratamento com diferentes concentrações das fisalinas) adicionou-se às culturas 100  $\mu$ l de DMEM e 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) por poço. A placa foi então incubada a 37°C, e, após uma hora, foi determinada a densidade óptica a 570 nm, em leitor de ELISA. Para a avaliação da viabilidade celular, foram comparadas as densidades ópticas dos poços tratados com diferentes concentrações das drogas

com as densidades ópticas dos poços controle (sem estímulo e tratamento ou apenas estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ )<sup>55</sup>.

#### **4.8 CHOQUE ENDOTÓXICO**

Para analisar a ação das fisalinas no choque endotóxico, grupos de camundongos foram inoculados com diferentes doses de LPS (400, 600 e 800  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) por via intraperitoneal, a fim de obter a dose que causaria a morte de 100% dos animais (DL 100). Tendo padronizado a concentração de 600  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$  como DL 100, novos experimentos foram feitos, onde grupos de animais estimulados pela dose de 600  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$  foram tratados ou não por via intraperitoneal, com doses de 0,5 e 1 mg/animal das fisalinas, em diferentes tempos. A mortalidade dos animais foi acompanhada durante cinco dias<sup>56</sup>.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

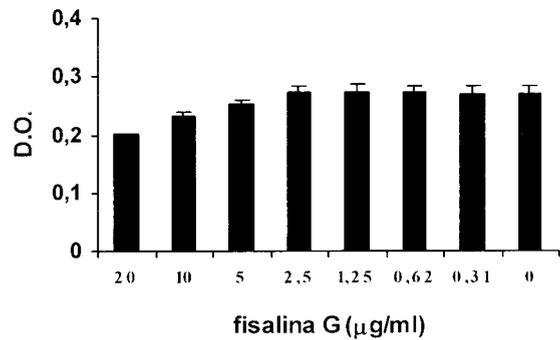
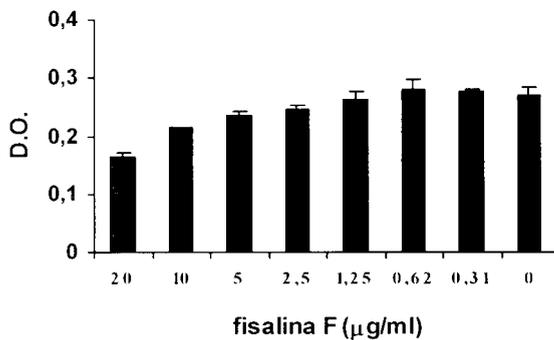
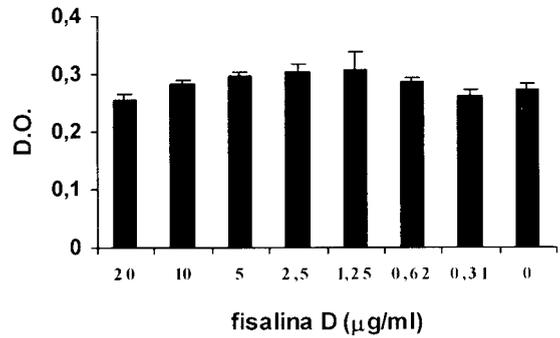
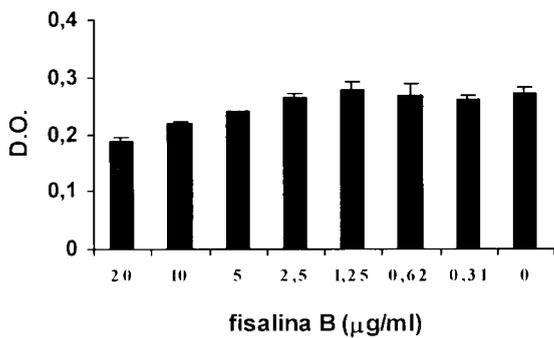
As análises estatísticas foram feitas por teste *t* de Student, para a análise do experimento de dosagem de TNF- $\alpha$  sérico; ou teste de rank de Wilcoxon, para os ensaios in vitro, utilizando o programa Statview 4.0. As diferenças só foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DAS FISALINAS

Para avaliar quais concentrações das fisalinas poderiam ser utilizadas nos testes *in vitro*, com a garantia de que os efeitos observados seriam ocasionados pela atividade imunomoduladora das drogas e não pela morte das células cultivadas (efeito citotóxico), foram feitos ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT. A Figura 4 mostra que as fisalinas B, D, G e F não são citotóxicas em concentrações abaixo de 2,5 µg/ml, ou seja, todos os efeitos observados *in vitro* na produção de NO e citocinas, quando utilizadas concentrações iguais ou menores que 2,5 µg/ml, podem ser atribuídos ao potencial inibidor das drogas, e não a uma eventual morte celular por toxicidade.



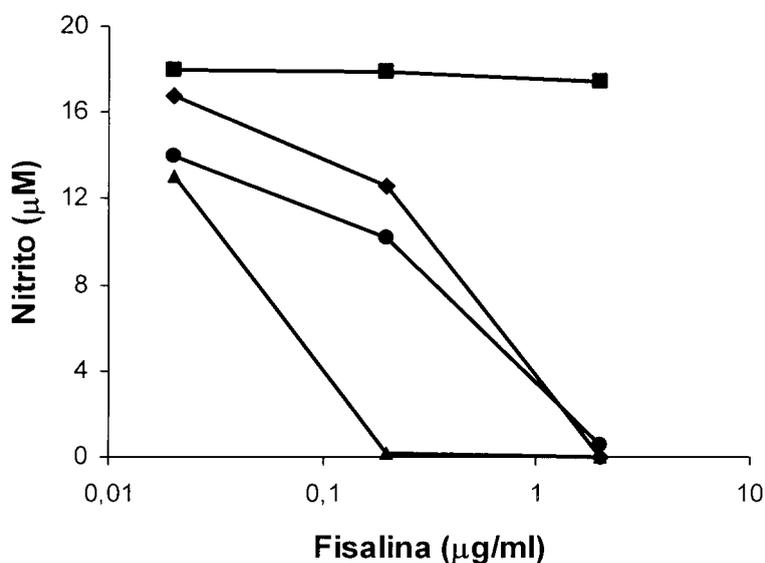
**Figura 4 - Viabilidade de macrófagos tratados com diferentes concentrações de fisalinas.** Macrófagos do exudato peritoneal foram cultivados na presença de várias concentrações das fisalinas B, D, F e G. Após 48 horas de cultura, as placas foram pulsadas com MTT. A viabilidade celular foi avaliada duas horas depois por medida da densidade óptica a 570 nm.

## 5.2 EFEITO DAS FISALINAS NA PRODUÇÃO DE NO POR MACRÓFAGOS ATIVADOS.

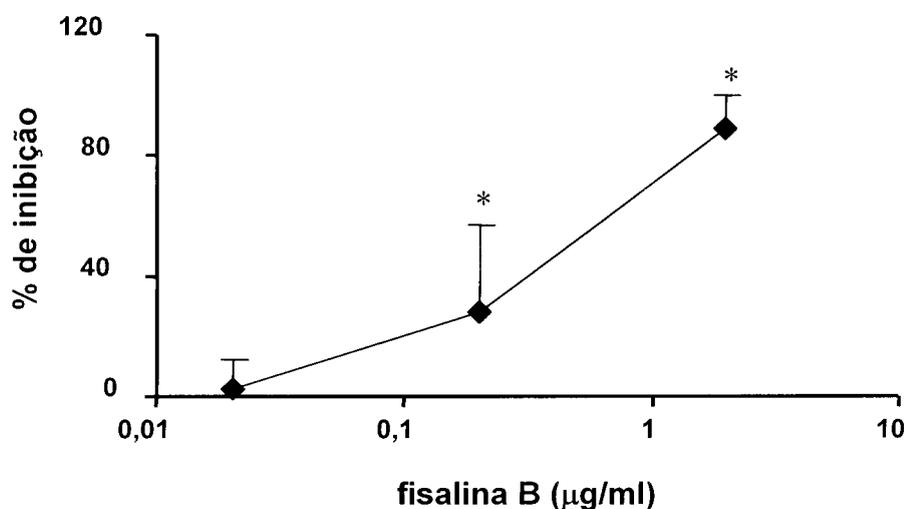
Os efeitos das fisalinas na produção de NO foram avaliados em macrófagos estimulados por LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com diferentes concentrações das fisalinas. A Figura 5 mostra que as fisalinas B, F e G demonstraram uma ação inibitória, dose-dependente, sob a produção de NO. Já a fisalina D não apresentou nenhum efeito inibitório, mesmo na dose mais alta utilizada (2  $\mu$ g/ml).

Os experimentos subsequentes foram realizados para a melhor caracterização das atividades das fisalinas B, F e G, sendo a fisalina B estudada com maior ênfase devido a maior disponibilidade desta substância.

O efeito da fisalina B na produção de NO foi avaliado em macrófagos estimulados por LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com diferentes concentrações da droga. A Figura 6 mostra que a fisalina B age, de forma dose-dependente, inibindo a produção de NO. Na concentração de 2  $\mu$ g/ml, a fisalina B inibiu entre 90-100% a produção de NO ( $p = 0,0077$ ). A inibição na produção de NO também foi estatisticamente significativa na concentração de 0,2  $\mu$ g/ml ( $p = 0,0077$ ), embora nesta concentração a redução na produção de NO tenha sido em torno de 30 %. Os controles negativos (não estimulados), assim como culturas não estimuladas por LPS e tratadas com a droga, não produziram NO.



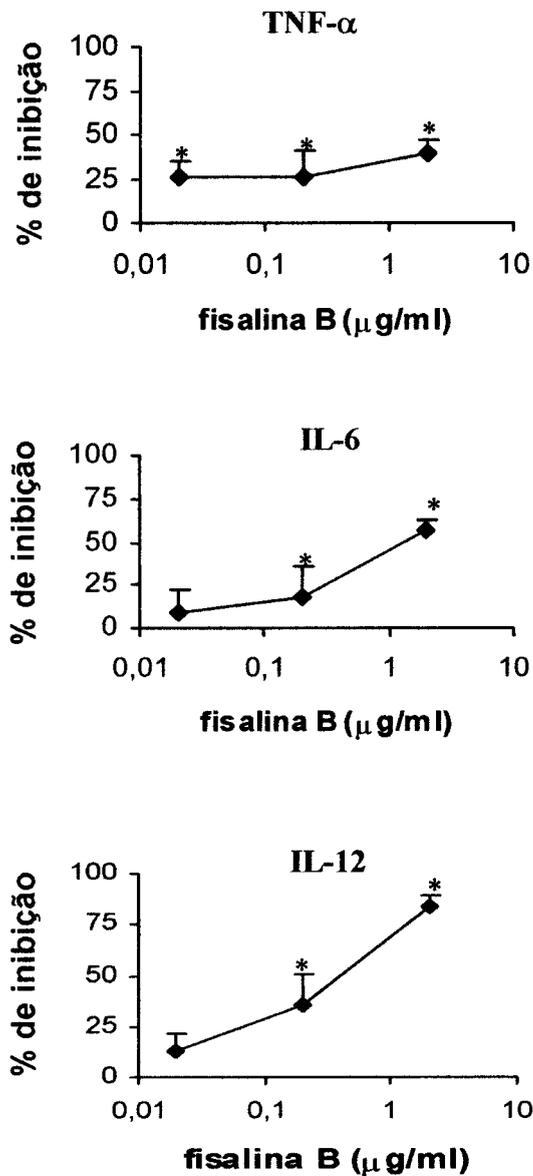
**Figura 5 - Produção de NO in vitro por macrófagos ativado por LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com diferentes fisalinas.** Macrófagos do exudato peritoneal foram estimulados com LPS (500 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (5 ng/ml) na presença de várias concentrações das fisalinas B (◆), D (■), F (▲) ou G (●). Sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas após a estimulação para a avaliação da produção de nitrito pelo método de Griess. Os dados correspondem a um experimento representativo de quatro realizados.



**Figura 6 - Produção in vitro de NO por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com fisalina B.** Macrófagos do exudato peritoneal foram estimulados com LPS (500 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (5 ng/ml) na presença de várias concentrações de fisalina B (2, 0,2 e 0,02 µg/ml). Sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas após a estimulação para a avaliação da produção de nitrito pelo método de Griess. Os valores correspondem à média e desvio padrão de nove experimentos. \* $p < 0,05$ .

### 5.3 EFEITO DA FISALINA B NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS ATIVADOS.

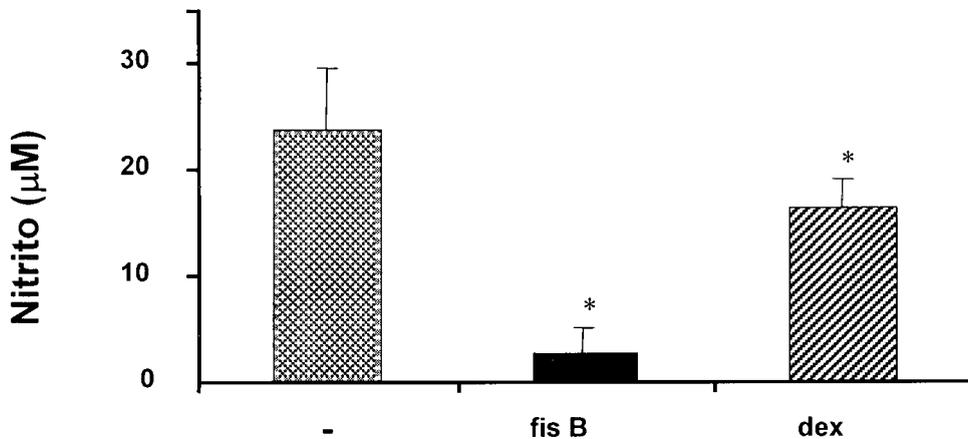
O efeito da fisalina B na produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (p40) foi avaliado em macrófagos estimulados por LPS (TNF- $\alpha$  e IL-6) ou LPS e IFN- $\gamma$  (IL-12) e tratados com diferentes concentrações da fisalina B. A Figura 7 mostra que a fisalina B age, inibindo a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, de forma dose-dependente. A inibição da secreção de TNF- $\alpha$  foi em média de 30% na concentração de 2  $\mu$ g/ml ( $p = 0,0022$ ). A inibição na secreção de IL-6 e IL-12 foi maior, chegando à cerca de 60% para IL-6 ( $p = 0,0077$ ) e cerca de 85% ( $p = 0,00029$ ) para IL-12 na concentração de 2  $\mu$ g/ml. Os controles negativos (não estimulados), assim como culturas não estimuladas e tratadas com a droga, não produziram níveis detectáveis das citocinas mencionadas.



**Figura 7 - Produção In vitro de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 por macrófagos ativados por LPS ou LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com fisalina B.** Macrófagos do exudato peritoneal foram estimulados com LPS (TNF- $\alpha$  e IL-6) ou LPS e IFN- $\gamma$  (IL-12) na presença de várias concentrações de fisalina B (2, 0,2 e 0,02  $\mu\text{g/ml}$ ). Sobrenadantes das culturas foram coletados 4 (TNF- $\alpha$  e IL-6) ou 24 (IL-12) horas após a estimulação para avaliação da produção de citocinas por ELISA. Os dados correspondem à média e desvio padrão de 3 a 5 experimentos. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.4 COMPARAÇÃO DO EFEITO DA FISALINA B COM A AÇÃO DA DEXAMETASONA NA PRODUÇÃO DE NO

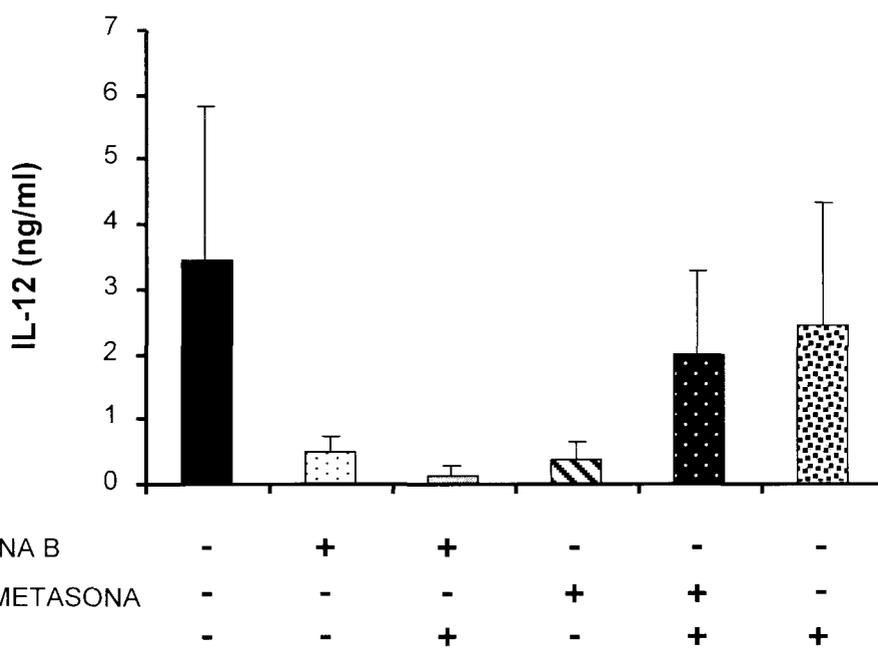
A dexametasona é um esteróide sintético amplamente utilizado por seus efeitos antiinflamatórios. O efeito inibitório da fisalina B na produção de NO foi comparado ao da dexametasona. Macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  foram tratados com fisalina B ou dexametasona (Fig. 8). Embora a produção de NO seja inibida pela adição de dexametasona de forma estatisticamente significativa ( $p = 0,0431$ ), o efeito deste esteróide é discreto quando comparado ao efeito da fisalina B ( $2 \mu\text{g/ml}$ ), que inibe 90-100% da produção de NO ( $p = 0,0431$ ). A dexametasona não foi capaz de levar a uma inibição maior que 10-15%, mesmo quando utilizadas concentrações até 25 vezes mais alta que a demonstrada na Figura 8 (dados não mostrados).



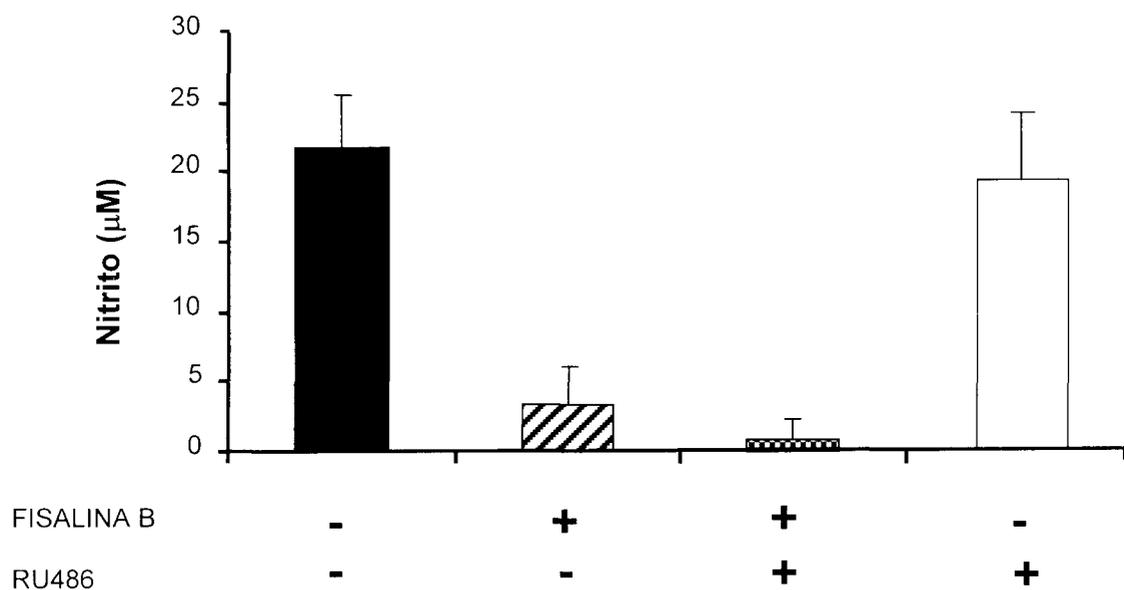
**Figura 8 - Produção de NO in vitro por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com fisalina B ou dexametasona.** Macrófagos do exudato peritoneal foram estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  na presença de 2  $\mu$ g/ml de fisalina B (fis B) ou 1  $\mu$ M de dexametasona (dex). Sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas após a estimulação para avaliação da produção de nitrito pelo método de Griess. Os dados correspondem à média e desvio padrão de cinco experimentos. \*  $p < 0,05$ .

## 5.5 INVESTIGAÇÃO DA VIA DE AÇÃO DA FISALINA B

Para investigar se a fisalina B age através da ativação do receptor de glicocorticóides, o inibidor RU486 foi adicionado às culturas de macrófagos. A Figura 9 mostra a produção de IL-12 in vitro por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com fisalina B ou dexametasona, na presença ou ausência de RU486. Pode-se verificar que, na presença de RU486, o efeito inibidor da dexametasona na produção de IL-12 é revertido ( $p = 0,0022$ ). Já o efeito da fisalina B na produção de IL-12 não é inibido por RU486. A produção de IL-12 na presença de fisalina B e RU486 foi até significativamente menor do que a produção de IL-12 na presença isolada da fisalina B ( $p = 0,0499$ ). De fato o tratamento das culturas apenas com RU486 promoveu um decréscimo na produção de IL-12 em relação ao grupo sem tratamento ( $p = 0,0076$ ). Do mesmo modo, a inibição da produção de NO pela fisalina B não é bloqueada pela adição de RU486 (Fig. 10).



**Figura 9 - Efeito da fisalina B e/ou RU486 na produção in vitro de IL-12 por macrófagos ativado por LPS e IFN- $\gamma$ .** Macrófagos do exudato peritoneal foram estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  na presença de RU486 ( $10^{-5}$  M) e/ou fisalina B ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) ou dexametasona ( $1 \mu\text{M}$ ). Sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas após a estimulação, para a avaliação da produção de IL-12. Os dados correspondem à média e desvio padrão de quatro experimentos realizados.

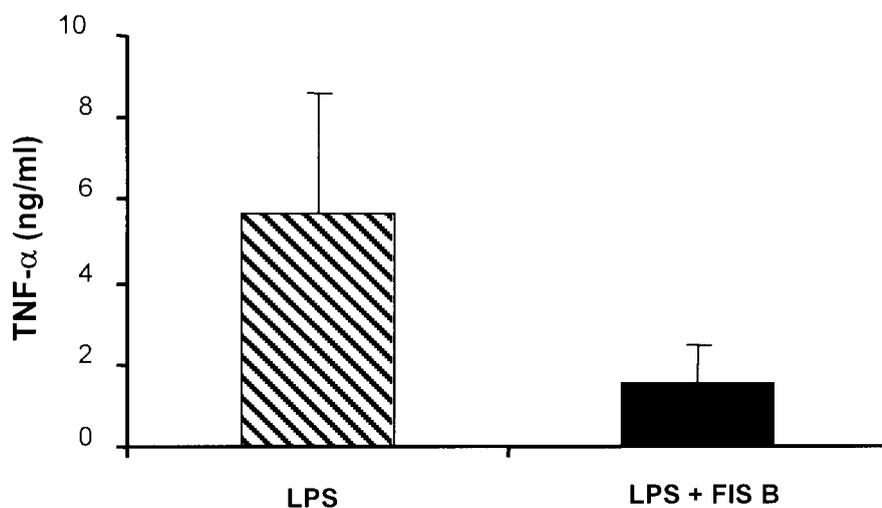


**Figura 10 - Efeito da fisalina B e/ou RU486 na produção in vitro de NO por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ .** Macrófagos do exudato peritoneal foram estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  na presença de RU486 ( $10^{-5}$  M) e tratados ou não com fisalina B (2  $\mu$ g/ml). Sobrenadantes das culturas foram coletados 24 horas após a estimulação, para a avaliação da produção de NO. Os dados correspondem à média e desvio padrão de cinco experimentos realizados.

## 5.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM FISALINAS NO CHOQUE ENDOTÓXICO

### 5.6.1 Efeito da fisalina B na produção de TNF- $\alpha$ em camundongos desafiados com LPS.

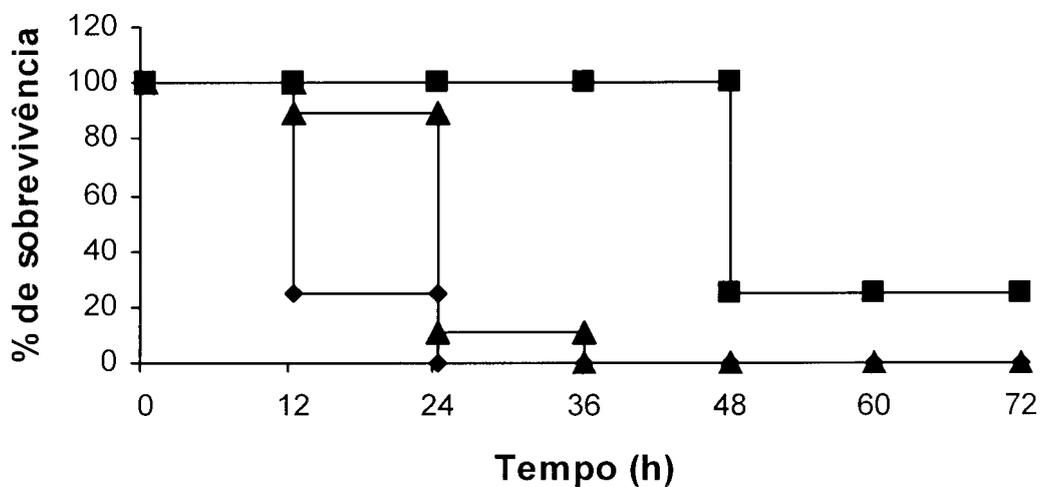
O TNF- $\alpha$  produzido por macrófagos estimulados por LPS é um importante mediador no choque séptico ou endotóxico. Para avaliar o efeito da fisalina B na produção de TNF- $\alpha$  in vivo, camundongos BALB/c foram inoculados com LPS por via intraperitoneal e tratados ou não com a droga. A Figura 11 representa os níveis de TNF- $\alpha$  sérico 90 minutos após a inoculação do LPS. Pode-se observar que a fisalina B, na dose de 500  $\mu$ g/camundongo, tem a capacidade de inibir em torno de 70% a produção de TNF- $\alpha$  in vivo. A diferença entre os animais tratados com a fisalina B e os não tratados é estatisticamente significativa ( $p=0,023$ ).



**Figura 11 - Produção de TNF- $\alpha$  em camundongos BALB/c estimulados por LPS e tratados com fisalina B.** Camundongos BALB/c foram injetados por via i.p. com 400  $\mu$ g de LPS e simultaneamente tratados com 0,5 mg/animal de fisalina B ou com o mesmo volume de salina (controles). O soro foi coletado 90 minutos após a inoculação com LPS para avaliação da produção de TNF- $\alpha$ . Os dados representam a média da dosagem do soro de 5 camundongos/grupo.

### 5.6.2 Determinação da dose letal de LPS em camundongos

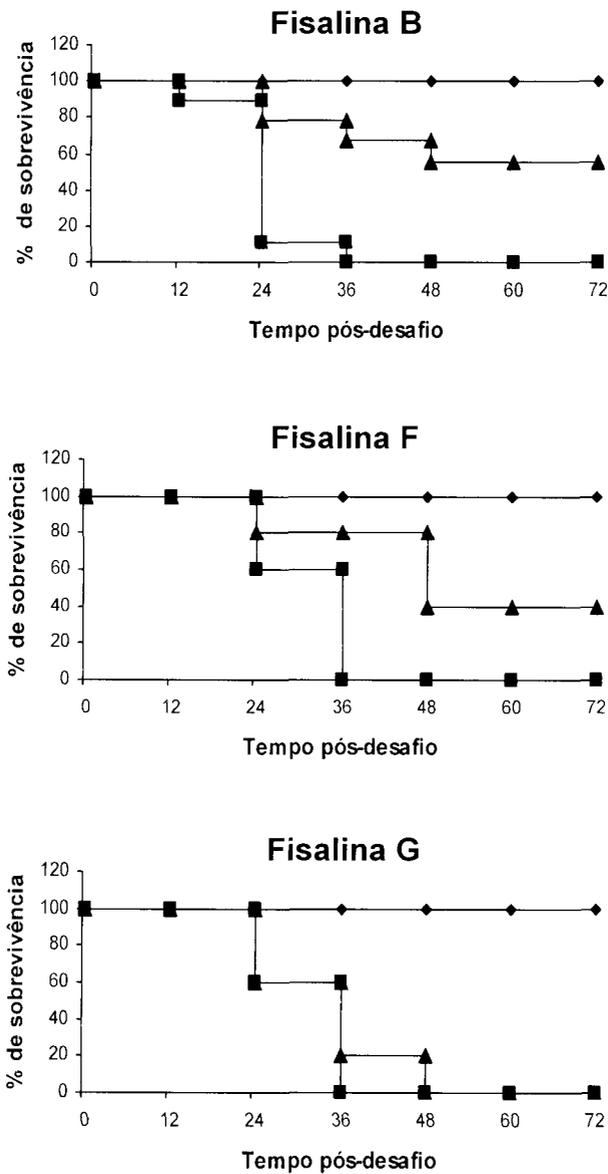
Para analisar a ação das fisalinas no choque endotóxico, primeiramente determinou-se a dose de LPS que leva à morte de 100% dos animais (DL 100). Para isto, três grupos de animais foram injetados por via intra peritoneal com diferentes doses de LPS. A Figura 12 mostra o percentual de sobrevivência dos grupos de animais, permitindo concluir que a injeção de 600  $\mu$ g de LPS por animal causa a morte de 100% dos animais.



**Figura 12 - Curva de letalidade de camundongos BALB/c induzida por LPS.** Camundongos BALB/c foram injetados por via i.p. com 400 (■), 600 (▲) ou 800 (◆) µg de LPS. A letalidade foi acompanhada durante 5 dias. Foram testados de 8 a 23 animais por grupo.

### **5.6.3 Efeito das fisalinas B, G e F no choque endotóxico.**

Para avaliar a ação das drogas, grupos de animais foram simultaneamente injetados com dose letal de LPS (600 µg/animal) e uma das fisalinas, em diferentes doses. A Figura 13 mostra o percentual de sobrevivência dos animais. Pode-se observar que, na dose de 0,5 mg/animal, as fisalinas B e F já demonstram um efeito protetor, diminuindo o número de óbitos. Já na dose de 1 mg/animal, o tratamento com as fisalinas B, F ou G protegeu 100% dos animais tratados. Tanto os animais tratados com fisalina quanto os do grupo controle apresentaram sinais de choque, tais como pelo eriçado e diarreia. No entanto, estes sinais foram mais intensos e duradouros no grupo controle do que nos grupos tratados com as fisalinas.



**Figura 13 - Efeito das fisalinas em camundongos BALB/c desafiados com uma dose letal de LPS.** Grupos de 10 a 23 camundongos BALB/c foram injetados por via i.p. com 600  $\mu$ g de LPS e simultaneamente tratados com 0,5 (▲) ou 1 mg/ml (◆) das fisalinas B, F ou G ou com o mesmo volume de salina (■). A letalidade foi acompanhada durante cinco dias.

## 6 DISCUSSÃO

---

*Physalis angulata* é um vegetal amplamente utilizado na medicina popular. No entanto, até os dias atuais, poucos trabalhos com valor científico descreveram as atividades biológicas de substâncias purificadas ou do extrato bruto de *P. angulata*. Dentre os esteróides testados neste trabalho, as fisalinas B, D e F já tiveram, de alguma forma, sua atividade avaliada anteriormente. As fisalinas B e F demonstraram atividade inibitória do crescimento de algumas linhagens de células tumorais, enquanto a fisalina D, submetida aos mesmos testes, não demonstrou nenhuma ação<sup>4, 13</sup>.

Neste trabalho, avaliamos as atividades das fisalinas B, D, F e G na modulação do sistema imunológico, enfocando a ação em macrófagos e no choque endotóxico. Observamos que as fisalinas B, F e G tiveram ação ampla na inibição da ativação macrofágica em concentrações não tóxicas. Já a fisalina D não apresentou nenhum efeito modulador nos testes aos quais foi submetida.

As fisalinas ativas (B, F e G) demonstraram alto potencial inibidor da síntese de óxido nítrico por macrófagos ativados, mesmo quando o tratamento com a droga ocorreu até 6 horas após o estímulo dos macrófagos com LPS e IFN- $\gamma$  (dados não mostrados). Já foi demonstrado que a dexametasona inibe completamente a secreção de NO em culturas de macrófagos estimulados com LPS, mas que só inibe parcialmente esta secreção quando os macrófagos são estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  simultaneamente<sup>52</sup>. Neste estudo demonstramos que as fisalinas B, F e G têm um poder inibitório mais elevado que a dexametasona na síntese de óxido nítrico por

macrófagos ativados com LPS e IFN- $\gamma$ , causando uma inibição entre 90-100 %, enquanto que a dexametasona inibiu apenas entre 10-15%.

A ação das fisalinas na produção de citocinas também foi inibitória, sendo a fisalina B capaz de inibir a secreção de TNF- $\alpha$  em 40 %, de IL-6 em 56 % e de IL-12 em 84 %. A ação da dexametasona (1  $\mu$ M) na inibição da produção destas citocinas foi significativa, apresentando em média os mesmos percentuais de inibição observados para as fisalinas na concentração de 2  $\mu$ g/ml (dados não mostrados).

Os resultados positivos encontrados nos ensaios in vitro indicaram um potencial efeito in vivo. Avaliou-se, então, a ação das fisalinas B, F e G no choque endotóxico. A dosagem do TNF- $\alpha$  sérico demonstrou que a fisalina B tem forte ação inibitória na secreção desta citocina em animais inoculados com uma dose alta de LPS e simultaneamente tratados com a droga. A forte ação imunossupressora das fisalinas foi demonstrada ainda no choque endotóxico, visto que as três fisalinas, na dose de 1 mg/animal, foram capazes de inibir completamente a mortalidade dos animais desafiados com uma dose letal de LPS (DL100).

A inibição da secreção de TNF- $\alpha$ <sup>18</sup>, bem como do NO<sup>45</sup>, causam a reversão do estado de choque endotóxico. A IL-12 tem grande participação na ativação de linfócitos, que por sua vez secretam grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , levando à reativação dos macrófagos. Portanto, o controle da secreção da IL-12 também ajuda a controlar a inflamação e o choque endotóxico<sup>40, 42, 58</sup>. Pelos resultados observados neste trabalho, é provável que as fisalinas atuem in vivo bloqueando a secreção de outros mediadores além do TNF- $\alpha$  (demonstrado neste trabalho) durante o desafio letal com LPS, levando a uma melhora no quadro geral e à prevenção da morte dos animais.

Após a comprovação do efeito modulador das fisalinas em macrófagos, tentou-se então esclarecer a via através da qual as drogas estariam agindo. Por serem esteróides, classe química a qual pertencem os glicocorticóides, foi cogitada a possibilidade de ação via ligação ao receptor de hormônios glicocorticóides, o mesmo receptor que possibilita a ação da dexametasona<sup>23</sup>. Para tanto, utilizou-se um inibidor deste receptor (RU486) que, ao se ligar ao receptor, impede a ação dos glicocorticóides<sup>26</sup> e leva ao bloqueio da inibição da secreção de citocinas e NO. Na presença do RU486 foi observada a reversão do efeito da dexametasona na produção de IL-12. No entanto, a fisalina B continuou inibindo a secreção das citocinas e NO mesmo na presença do RU486. Para excluir a possibilidade da reversão não estar sendo observada devido a um estímulo extremamente alto de LPS, foram feitos ensaios utilizando as concentrações de 5 e 50 ng/ml de LPS como estímulo e ainda assim não foi possível observar a reversão da ação das fisalinas na presença de diferentes concentrações do RU486 (dados não mostrados).

Neste trabalho demonstramos que, embora os esteróides ativos (B, F e G) tenham atividades semelhantes a dexametasona, as diferenças observadas na inibição da secreção de NO por macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e na reversão do efeito inibitório na produção de IL-12 e NO na presença do RU486 sugerem a ação por vias distintas. Em relação à ação de esteróides, os receptores de glicocorticóides e mineralcorticóides são membros de uma mesma superfamília de receptores nucleares. No entanto, a especificidade observada para o receptor de glicocorticóide difere da demonstrada pelo receptor de mineralcorticóides, que tem a capacidade de interagir tanto com os mineralcorticóides quanto com glicocorticóides<sup>59</sup>.

O receptor da progesterona também pertence à mesma família que o receptor de glicocorticóides. Os dois receptores têm a estrutura do domínio de ligação a esteróides similares e a habilidade de induzir a transcrição de genes semelhantes, sendo que os receptores livres da progesterona distribuem-se predominantemente no núcleo, enquanto que os de glicocorticóides são geralmente encontrados no citoplasma<sup>60</sup>. Já foi demonstrado que a progesterona inibe atividade do gene da NOS II e a produção de NO por macrófagos estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ <sup>51, 61</sup>. Essa inibição é suprimida por ZK299 (onapristona), um inibidor sintético da progesterona<sup>51</sup>. No entanto, apesar do RU486 inibir a maioria das atividades endócrinas da progesterona<sup>62</sup>, o tratamento de culturas de macrófagos com RU486 não tem a capacidade de reverter o efeito da progesterona na produção de NO, assim como ZK299 não reverte a ação da dexametasona<sup>51</sup>. Estes dados sugerem que estes dois esteróides induzem a supressão da produção de NO por vias distintas<sup>51, 61</sup>. Existe, portanto, a possibilidade das fisalinas estarem agindo pela mesma via que a progesterona.

Macrófagos murinos, no entanto, não expressam RNAm para o receptor clássico da progesterona, e já foi demonstrado que a região promotora do gene da NOS II não contém o elemento clássico de resposta ao qual o receptor da progesterona se liga<sup>63</sup>. Contudo, a ausência deste sítio de ligação não exclui a possibilidade de que ocorra uma modulação hormonal do gene da NOS II. É possível que a progesterona aja através de ligação aos elementos de resposta a glicocorticóides na região promotora do gene da NOS II<sup>63</sup>. São postuladas três hipóteses para o mecanismo de ação deste hormônio em macrófagos. A primeira sugere que um receptor não conhecido da progesterona esteja presente em macrófagos. Já a segunda hipótese sugere que a ação da progesterona em

macrófagos ocorre através de um sítio independente no próprio receptor de glicocorticóides. A terceira sugere uma ação independente de ligação a um receptor de glicocorticóides<sup>51</sup>. O fato de que o aumento da concentração de progesterona leva à competição com a dexametasona por saturação dos sítios de ligação<sup>64</sup> sugere que a progesterona possa compartilhar o receptor de glicocorticóides, ligando-se a um sítio que não é bloqueado por RU486.

Como citado anteriormente, a medicina popular utiliza insumos da planta para o tratamento de uma grande variedade de patologias. Dentre os efeitos popularmente atribuídos à *P. angulata* estão as atividades antiinflamatória e antiséptica<sup>3</sup>. Os resultados obtidos neste trabalho subsidiam estas atividades atribuídas popularmente à planta, visto que foi verificada a ação na inibição da produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias, bem como reversão do quadro de choque endotóxico.

A modulação observada na atividade dos macrófagos sugere ainda que as fisalinas possam ter efeito em outros sistemas que envolvam atividade imunológica, como a linfoproliferação e a secreção de citocinas por linfócitos ativados. Trabalhos investigando a atividade farmacológica destas substâncias devem continuar sendo realizados, não só no sentido de descobrir novos potenciais de ação como também a fim de viabilizar o uso clínico destes esteróides. Para tanto, será necessário estudar a toxicopatologia de longa duração das fisalinas, o que possibilitará a avaliação de seus eventuais efeitos colaterais. Para que a utilização destas substâncias como medicamento seja viabilizada, será necessário também buscar moléculas sintéticas que compartilhem da sua estrutura química, visto que estes esteróides estão presentes em quantidades limitadas nas plantas (30-500 ppm).

## 7 CONCLUSÕES

---

- 1 – As fisalinas B, F e G inibem a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados por LPS e IFN- $\gamma$ .
- 2 – A fisalina B inibe a produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12) por macrófagos ativados por LPS ou LPS e IFN- $\gamma$ .
- 3 – Os efeitos da fisalina B, ao contrário da dexametasona, não são revertidos por RU486.
- 4 – A fisalina B inibe a produção de TNF- $\alpha$  *in vivo* em camundongos BALB/c estimulados com LPS.
- 5 – As fisalinas B, F e G previnem a morte induzida por uma dose letal de LPS.

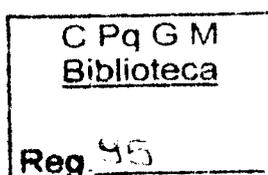
## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. ROSSI-BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S.; DE MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Ciênc. Cult.** **49**:395-401, 1997.
2. LAPA, A.J. Importância da Farmacologia Tradicional e Novas Descobertas no Estudo das Plantas Medicinais. **ARS CVRANDI**:46-52, nov/dez, 1995.
3. LIN, Y.S.; CHIANG, H.C.; KAN, W.S.; HONE, E.; SHIH, S.J.; WON, M.H. Immunomodulatory Activity of Various Fractions Derived from *Physalis angulata* L Extract. **Am. J. Chinese Med.** **20**:233-243, 1992.
4. CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, C.F.; KAN, W.S. Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. **Anticancer Res.** **12**:837-843, 1992.
5. *Physalis angulata* In: CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional: v.1, p.408-409. 1984.
6. OTAKE, T. Screening of Indonesian Plant Extracts for Anti-Human Immunodeficiency Virus-Type 1 (HIV-1) Activity. **Phytother Res.** **91**:6-10, 1995.
7. OGUNLANA, E.O.; RAMSTAD, E. Investigations into the Antibacterial Activities of Local Plants. **Planta Med.** **27**:354-62, 1975.
8. JUANG, J.K.; HUANG, H.W.; CHEN, C.M.; LIU, H.J. A new compound, withangulatin A, Promotes Type II DNA Topoisomerase-Mediated DNA Damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **159**:1128-1134, 1989.
9. LEE, W.; LIN, K.Y.; CHEN, C.M.; CHEN, Z.T.; LIU, H.J.; LAI, Y.K. Induction of Heat-Shock Response and Alterations of Protein Phosphorylation by a Novel Topoisomerase II Inhibitor, Withangulatin A, in 9L Rat Brain Tumor Cells. **J. Cel. Physiol.** **149**:66-76, 1991.
10. Figura 2 disponível em: <<http://www.rain-tree.com/mullaca.htm>>
11. CACERES, A.; MENENDEZ, H.; MENDEZ, E.; COHOBON, E.; SAMAYOA, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E.; CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **J. Ethnopharmacol.** **48**:85-88, 1995.
12. FREIBURGHHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M.H.; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. **J. Ethnopharmacol.** **55**:1-11, 1996.

13. CHIANG, H.C.; JAW, S.M.; CHEN, P.M. Inhibitory Effects of Physalin B and Physalin F on Various Human Leukemia Cells in Vitro. **Anticancer Res.** **12**:155-1162, 1992.
14. LEWIN, B. Regulação da transcrição. In:\_\_\_\_\_ Genes VII. Porto Alegre: Artmed, p.626-629, 2001.
15. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia 4<sup>a</sup> edição: Guanabara Koogan, p.345-353, 2001
16. SCHLEIMER, R.P. An overview of glucocorticoid anti-inflammatory actions. **Eur. J. Clin Pharmacol.** **45**:S3-7; discussion S43-4, 1993.
17. JOYCE, D.A.; GIMBLETT, G.; STEER, J.H. Targets of glucocorticoid action on TNF-alpha release by macrophages. **Inflamm. Res.** **50**:337-340, 2001.
18. JOYCE, D.A.; STEER, J.H.; ABRAHAM, L.J. Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF- $\alpha$  secretion. **Inflamm. Res.** **46**:447-451, 1997.
19. MOSS, M.L.; JIN, S.L.C.; BECHERER, J.D.; BICKETT, D.M.; BURKHART, W.; CHEN, W.J. *et al.* Structural features and biochemical properties of TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE). **J. Neuroimmunol.** **72**:127-129, 1997.
20. REES, D.D.; CELLEK,S.; PALMER, R.M. and MONCADA, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **173**:541-547, 1990.
21. HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. The pharmacological basis of therapeutics. 9 edition. CD-ROM: The Mc Graw-Hill, 1996.
22. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell signaling. In; Molecular biology of the cell 3<sup>th</sup> ed. New York: Garland Publishing, p.729,1994.
23. BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. **Cell.** **83**:851-857, 1995.
24. LAZAR, G.Jr.; LAZAR, G.; AGARWAL, M.K. Modification of septic shock in mice by the antiglucocorticoid RU38486. **Circ. Shock.** **36**:180-184, 1992.
25. TSURUFUJI, S.; SUGIO, K.; TAKEMASA, F. The role of glucocorticoid receptor and gene expression in the anti-inflammatory action of dexamethasone. **Nature.** **280**:408-410, 1979.

26. LINDEMEYER, R.G.; ROBERTSON, N.M.; LITWACK, G. Glucocorticoid receptor monoclonal antibodies define the biological action of RU38486 in intact B16 melanoma cells. **Cancer Res.** **50**:7985-7991, 1990.
27. YANG, Y.H.; HUTCHINSON, P.; SANTOS, L.L.; MORAND, E.F. Glucocorticoid inhibition of adjuvant arthritis synovial macrophage nitric oxide production: role of lipocortin 1. **Clin. Exp. Immunol.** **111**:117-122, 1998.
28. KAMAL, A.M.; TETLEY, T.D.; WITHERDEN, I.R.; SMITH, S.F. Reduction of nitric oxide release from alveolar macrophages by a lipocortin peptide. **Mediators Inflamm.** **7**:93-98, 1998.
29. MORROW, L.E.; MCCLELLAN, J.L.; CONN, C.A.; KLUGER, M.J. Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. **Am. J. Physiol.** **264**:1010-1016, 1993.
30. SPITZER, J.J.; ULEVITCH, R.J.; VOGEL, S.N.; MCSWEEGAN, E. Bacterial endotoxins and pathogenesis of gram-negative infections: current status and future direction. **J. Endotoxin Res.** **1**:71-83, 1994.
31. MEANS, T.K.; GOLENBOCK, D.T.; FENTON, M.J. The biology of toll-like receptors. **Cytokine growth factor Rev.** **11**: 219-232, 2000.
32. THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock, **Gen. Pharmacol.** **29**:159-166, 1997.
33. KLUGER, M.J. Fever: the role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Rev.** **71**:93-127, 1991.
34. WANG, D.; WEI, J.; HSU, K.; JAU, J.; LIEU, M.W.; CHAO, T.J.; CHAN, H.I. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. **J. Biomed. Sci.** **6**:28-35, 1999.
35. WANECEK, M.; WEITZBERG, E.; RUDEHILL, A.; OLDNER, A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. **Eur. J. Pharmacol.** **407**:1-15, 2000.
36. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Hemodynamic disorders, thrombosis, and shock. In: \_\_\_\_\_ Pathologic basis of disease, 6 edition, Philadelphia: W.B.Saunders Company, p.117-120, 2001.
37. LEMAY, L.G.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Role of interleukin-6 in fever in the rat. **Am. J. Physiol.** **258**:R798-R803, 1990.
38. TRINCHIERI, G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. **Int. Rev. Immunol.** **16**:365-396, 1998.



39. HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; LING, P.; HAKIMI, J.; SCHOENHAUT, D.S. Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. **Infect. Immun.** **62**:4244-4249, 1994.
40. TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. immunoregulation by interleukin-12. **J. Leukoc. Biol.** **59**:505-511, 1996.
41. FOSS, D.L.; ZILLIOX, M.J.; MURTAUGH, M.P. Differential regulation of macrophage interleukin-1 (IL-1), IL-12, and CD80-CD86 by two bacterial toxins. **Infect. Immun.** **67**:5275-5281, 1999.
42. HEINZEL, F.P.; RERKO, R.M.; LING, P.; HAKIMI, J.; SCHOENHAUT, D.S. Interleukin-12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. **Infect. Immun.** **62**:4244-4249, 1994.
43. STUER, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochim. Biophys. Acta.** **1411**: 217-230, 1999.
44. WU, C.C.; CROXTALL, J.D.; PERRETTI, M.; BRYANT, C.E.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Lipocortin 1 mediates the inhibition by dexamethasone of the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **92**:3473-3477, 1995.
45. VINCENT, J.L.; ZHANG, H.; SZABO, C.; PREISER, J.C. Effects of nitric oxide in septic shock. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **161**:1781-1785, 2000.
46. KAMIJO, R.; HARADA, H.; MATSUYAMA, T.; BOSLAND, M.; GERECITANO, J.; SHAPIRO, D.; LE, J.; KOH, S.I.; KIMURA, T. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science.** **263**:1612-1615, 1994.
47. LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; SZABO, C. Biology of nitric oxide signaling. **Crit. Care. Med.** **28**:37-52, 2000.
48. SNYDER, S.H.; BREDET, D.S. Biological roles of nitric oxide. **Sci. Am.** 68-76, 1992.
49. NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.** **6**:3051-3064, 1992.
50. KAUFMANN, S.H.E.; KABELITZ, D. **Immunology of infection** - Methods in microbiology. Academic Press, San Diego. Vol. 25, 1998
51. KOHMURA, Y.; KIRIKAE, T.; KIRIKAE, F. NAKANO, M.; SATO, I. Onapristone (ZK299) blocks the suppressive effect of progesterone, but not that dexamethasone, on inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.** **22**:765-774, 2000.

52. DING, A.H., NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.** **141**:2407-2412, 1998.
53. SOARES, M.B.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R.; BOZZA, M. The Vasoactive Peptide Maxadilan from Sand Fly Saliva Inhibits TNF $\alpha$  and Induces IL-6 by Mouse Macrophages Through Interaction with the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Receptor. **J. Immunol.** **160**:1811-1816, 1998.
54. TANAKA, M.; ISHIBASHI, H.; HIRATA, Y.; MIKI, K.; KUDO, J.; NIHO, Y. Tumor Necrosis Factor Production by Rat Kupffer Cells – Regulation by Lipopolysaccharide, Macrophage Activating Factor and Prostaglandin E<sub>2</sub>. **J. Clin. Lab. Immunol.** **48**:17-31, 1996.
55. FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells - **A manual of basic technique**, second edition, Wiley-Liss, New York, 1987.
56. BOZZA, M.; SOARES, M.B.; BOZZA, P.T.; SATOSKAR, A.R.; DIACOVO, T.G.; BROMBACHER, F.; TITUS, R.G.; SHOEMAKER, C.B.; DAVID, J.R. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. **Eur. J. Immunol.** **28**:3120-3127, 1998.
57. BAYDOUN, A.R.; BOGLE, R.G.; PEARSON, J.D.; MANN, G.E. Selective inhibition by dexamethasone of induction of NO synthase, but not of induction of L arginine transport, in activated murine macrophage J774 cells. **Br. J. Pharmacol.** **110**:1401-1406, 1993.
58. TRINCHIERI, G. Immunobiology of interleukin-12. **Immunol. Res.** **17**:269-278, 1998.
59. DEY, R.; ROYCHOWDHURY, P.; MUKHERJEE, C. Homology modelling of the ligand-binding domain of glucocorticoid receptor: binding site interactions with cortisol and corticosterone. **Protein Eng.** **14**:565-571, 2001.
60. WAN, Y.; COXE, K.K.; THACKRAY, V.G.; HOUSLEY, P.R.; NORDEEN, S.K. Separable features of the ligand-binding domain determine the differential subcellular localization and ligand-binding specificity of glucocorticoid receptor and progesterone receptor. **Mol. Endocrinol.** **15**:17-31, 2001.
61. SONG, L.N.; HUSE, B.; RUSCONI, S.; SIMONS, S.S.Jr. Transactivation specificity of glucocorticoid versus progesterone receptors. Role of functionally different interactions of transcription factors with amino- and carboxyl-terminal receptor domains. **J. Biol. Chem.** **276**:24806-24816, 2001.

62. ELGER, W.; BARTLEY, J.; SCHNEIDER, B.; KAUFMANN, G.; SCHBERT, G.; CHWALISZ, K. Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity. **Steroids**. **65**:713-723, 2000.
63. MILLER, L.; ALLEY, E.W.; MURPHY, W.J.; RUSSELL, S.W.; HUNT, J.S. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. **J. Leukoc. Biol.** **59**:442-450, 1996.
64. WERB, Z.; FOLEY, R.; MUNCK, A. Interaction of glucocorticoids with macrophages. Identification of glucocorticoid receptors in monocytes and macrophages. **J. Exp. Med.** **147**:1684-1694, 1978.