

## Experimentação farmacológica *in vitro*: explorando novas fronteiras no desenvolvimento de fármacos

### *In vitro* pharmacological experimentation: exploring new frontiers in drug development

DOI:10.34119/bjhrv6n6-119

Recebimento dos originais: 13/10/2023

Aceitação para publicação: 15/11/2023

#### **Beatriz de Castro Silva**

Graduanda em Engenharia Biotecnológica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis – SP, CEP: 19806-900

E-mail: beatriz.c.silva@unesp.br

#### **Rafael André Lunardi**

Graduado em Engenharia Biotecnológica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis – SP, CEP: 19806-900

E-mail: rafaellunardi0@gmail.com

#### **Amanda Letícia Santos Costa**

Graduanda em Engenharia Biotecnológica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis – SP, CEP: 19806-900

E-mail: als.costa@unesp.br

#### **Luísa Taynara Silvério da Costa**

Doutoranda em Ciências

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Endereço: Rua José Bonifácio, 1193, Vila Mendonça, Assis-SP, CEP: 16015-050

E-mail: luisa.silverio@unesp.br

#### **Pedro Castro Baltazar**

Graduando em Engenharia Biotecnológica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis – SP, CEP: 19806-900

E-mail: pedro.baltazar@unesp.br

#### **Lucinéia dos Santos**

Doutora em Ciências

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis – SP, CEP: 19806-900

E-mail: lucineia.santos@unesp.br

#### **RESUMO**

Os testes *in vitro* atualmente em ascensão se apresentam como uma importante ferramenta para o desenvolvimento de pesquisas farmacológicas que visam o desenvolvimento de novos

medicamentos. Isto porque, a utilização de animais em pesquisas farmacológicas tem sido questionada desde longa data. Inclusive, há um compromisso da comunidade científica mundial em seguir o princípio dos 3Rs. O primeiro “R” refere-se a *Reduction* (redução), o segundo “R” a *Replacement* (substituição) e o terceiro “R” a *Refinement* (refinamento). Assim, de acordo com o princípio dos 3Rs é necessário refletir sobre a necessidade de se reduzir o número de animais nos procedimentos experimentais e sempre que possível substituir o seu uso por métodos *in vitro*. Considerando que os anti-inflamatórios se apresentam como uma das classes mais comercializadas de medicamentos no mundo, e tendo como propósito contribuir para a redução do número de animais nas análises experimentais, este estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica a respeito das metodologias realizadas *in vitro* que foram empregadas em ensaios de avaliação da atividade anti-inflamatória, e que já tiveram seu uso validado por meio da literatura.

**Palavras-chave:** anti-inflamatório, princípio dos 3Rs, metodologias *in vitro*.

## ABSTRACT

The *in vitro* tests, currently on the rise, are presented as an important tool for the development of pharmacological research aimed at the development of new drugs. This is because the use of animals in pharmacological research has long been questioned. In fact, there is a commitment from the global scientific community to follow the principle of the 3Rs. The first "R" refers to Reduction, the second "R" to Replacement, and the third "R" to Refinement. Thus, according to the principle of the 3Rs, it is necessary to reflect on the need to reduce the number of animals in experimental procedures and whenever possible, replace their use with *in vitro* methods. Considering that anti-inflammatory drugs are one of the most marketed classes of medications worldwide, and with the purpose of contributing to the reduction of the number of animals in experimental analyses, this study aimed to conduct a literature review on *in vitro* methodologies employed in anti-inflammatory activity evaluation assays, which have already been validated through the literature.

**Keywords:** anti-inflammatory, 3Rs principle, *in vitro* methodologies.

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação natural de proteção do organismo contra danos endógenos e exógenos, tais como: lesões teciduais, trauma, infecções, reações imunológicas e necrose tecidual (ARULSELVAN et al., 2016). Diversas células do sistema imunológico participam de forma ativa nos processos inflamatórios mediando o reparo tecidual com a proliferação de queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e recrutamento de macrófagos (CAMILA et al., 2022). Estes últimos são conhecidos como fagócitos, intimamente ligados à imunidade inata e responsáveis pela produção, em conjunto com outros leucócitos, de mediadores químicos que promovem a cascata inflamatória e o reparo do dano gerado (CEBENELLI, 2019).

Assim, quando a resposta é adequada, a inflamação torna-se um mecanismo de defesa para reparar o tecido que foi danificado; já quando a resposta é inadequada e persistente, o aumento de células, citosinas e quimiocinas inflamatórias prejudicam a regeneração tecidual e

oferecem uma resposta maléfica ao organismo (CAMILA et al., 2022). Nesta situação faz-se o uso de medicamentos anti-inflamatórios. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), representam no mundo o principal tratamento para diversas dores e sintomas decorrentes do processo inflamatório, como o edema, a hiperemia, e a febre (VITOR BORGES JAPIASSU; DE, 2022). Todavia, os AINEs, em sua maioria, por não apresentarem total especificidade em relação a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), também inibem a enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) e com isso, promovem vários efeitos adversos (SETHI et al., 2019). Ademais, o emprego indiscriminado desta classe farmacológica, que pode ser facilmente adquirida sem apresentação de prescrição médica, gera um importante fator de risco à saúde de indivíduos que se automedicam (RADI; KANWAR, 2019).

Na busca por novos tratamentos medicamentosos que apresentem efetiva atividade anti-inflamatória e menor número de efeitos adversos, pesquisas farmacológicas são conduzidas em todo o mundo. Desta maneira, os testes *in vivo*, isto é, com a utilização de animais, é o método de análise comumente empregado para verificar a atividade de novas drogas anti-inflamatórias. Todavia, por gerar muitas discordâncias sobre questões éticas, o uso de animais na experimentação farmacológica vem sendo discutido desde longa data e em escala mundial (DOBROVOLSKAIA, 2013).

Em 1959, na Europa, o zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch definiram o princípio dos 3Rs. E um compromisso firmado pela comunidade científica mundial visa seguir esse princípio, a sigla relaciona as iniciais, em inglês, com seus principais objetivos: o primeiro “R” (*Reduction* = redução) significa que deve haver a redução do número de animais no experimento. O segundo “R” (*Replacement* = Substituição) sugere a substituição das técnicas *in vivo* pelos métodos alternativos, sempre que possível. E, por fim, o terceiro “R” (*Refinement* = Refinação) determina que haja modificações no protocolo visando diminuir dor e sofrimento dos animais, assegurando o bem-estar (ANDRADE, 2018).

A regulamentação do uso de animais na experimentação alcançou uma maior dimensão em 1986, com a Diretiva EC86/906, que uniformizou as disposições legislativas, regulamentares e administrativas, entre os Estados filiados à União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 1986). A partir dessa Diretiva, as pressões em defesa dos animais aumentaram, e a legislação foi se tornando mais rígida.

Em 2010, a Diretiva 2010/63/UE atualizou, regulamentou e substituiu a Diretiva EC 86/906 e trouxe como citação a seguinte posição do Parlamento Europeu: “O bem-estar dos animais é um valor da União Europeia, consagrado no artigo 13º do Tratado sobre o Funcionamento da União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2010). Essas iniciativas fizeram com

que os testes *in vitro* ganhassem espaço nas pesquisas. Ademais, os testes *in vitro* se tomaram cada vez mais acessíveis por terem um custo reduzido em relação aos testes *in vivo* e se mostrarem capazes de gerar resultados similares aos testes com uso de animais, ou seja, podem prever se as novas drogas em estudo apresentam atividade anti-inflamatória e se realmente devem ser testadas em animais.

Dessa forma, visando contribuir para o uso dos testes *in vitro*, e conseqüentemente a redução do uso de animais nas pesquisas farmacológicas, o presente trabalho realizou uma revisão sobre alguns conceitos do processo inflamatório que permitem a compreensão da teoria subjacente a cada método. Em complemento, apresenta algumas metodologias *in vitro* que estão sendo desenvolvidas em diferentes centros de pesquisas, bem como, alguns resultados que já foram obtidos em estudos prévios com diferentes amostras em análise, além de medicamentos anti-inflamatórios já utilizados na clínica médica, que permitiram comprovar a validação do método.

## 2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação representa uma resposta de defesa clinicamente visível do sistema imunológico, e se estabelece com o reconhecimento de estruturas moleculares conservadas de microrganismos, ou seja, os padrões moleculares associados a patógenos são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão presentes no organismo hospedeiro. Além disso, esses receptores também identificam moléculas provenientes do próprio hospedeiro, que são liberadas em resposta a lesões ou morte celular, bem como padrões moleculares associados a danos, como quimiocinas (como a IL-8), citocinas (como o TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (como IL-1 e IL-6). Essas moléculas são produzidas durante as fases de ativação e efetora da resposta imune, desempenhando um papel essencial na regulação da resposta inflamatória e imunológica (KENNEDY; DELEO, 2008).

De acordo com Read (2019) são quatro os acontecimentos que promovem a inflamação de um local: 1) Infiltração celular, o que resulta na liberação de mediadores moleculares e produtos bioquímicos, como citocinas e mediadores lipídicos; 2) Formação de metabólitos de oxigênio; 3) Ocorrência de produtos granulados e de enzimas catalisadoras e 4) Ativação dos sistemas de enzimas derivadas do plasma como o sistema complemento. Sendo esses eventos responsáveis por gerar a ocorrência de cinco sintomas característicos da inflamação: edema, dor, rubor, calor e perda de função (READ, 2019).

Considerando que a ocorrência desses cinco sintomas é fortemente influenciada pelo recrutamento das células do sistema imune inato e pelo aumento da permeabilidade do vaso

sanguíneo, um importante tipo celular a ser considerado são os neutrófilos. Essas células são as mais comuns na corrente sanguínea e desempenham o papel inicial na detecção e proteção contra invasores infecciosos nos tecidos. Tradicionalmente, elas desencadeiam uma reação inflamatória aguda e desempenham um papel crucial na promoção de uma resposta imune pró-inflamatória eficaz (SILVA, 2015).

Os neutrófilos são terminalmente formados através da proliferação e diferenciação das células precursoras da medula óssea, durante a hematopoese, e após a sua maturação os neutrófilos são liberados da medula. Contudo, no caso de lesões físicas, impacto mecânico ou infecções, essa sequência de eventos é amplificada. Isso ocorre porque os sinais químicos inflamatórios resultantes das células danificadas do hospedeiro e das substâncias liberadas pelo agente infeccioso desencadearão uma série de reações no corpo. Dentro desse contexto, é desencadeada uma resposta que resulta na ativação das células endoteliais próximas à área inflamada. Essas células começam a expressar moléculas de adesão, como as selectinas (E e P-selectinas) e as integrinas (ICAMs). Isso tem o efeito de facilitar a migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos, uma vez que essas moléculas permitem que os leucócitos se prendam ao revestimento endotelial dos vasos. Além disso, há um sinal para aumentar a produção de leucócitos a partir das células progenitoras na medula óssea, graças à ação da interleucina-17 (IL-17) (SILVA, 2015).

Adicionalmente, quando os macrófagos que residem nos tecidos percebem a presença de microrganismos ou uma lesão, eles atraem neutrófilos que estão circulando na corrente sanguínea para o local afetado. Esse fenômeno é conhecido como recrutamento de leucócitos e ocorre em várias etapas, que incluem a captura/ativação, o rolamento, a adesão e a transmigração (KENNEDY; DELEO, 2009; KOBAYASHI; DELEO, 2009). Os monócitos são as células precursoras dos macrófagos. Isso faz com que macrófagos sejam células do tecido hematopoiético, apesar de termos macrófagos específicos que não estão presentes na corrente sanguínea. Sua formação ocorre na medula óssea (APPELBERG, 2005).

Quando o monócito se transforma em macrófago ele sofre uma série de alterações para assumir diferentes funções fisiológicas, como por exemplo, o aumento da capacidade fagocítica e antimicrobiana (YANG et al., 2014). Assim, os macrófagos têm muitas funções que variam de acordo com o seu subtipo. Suas funções são: apresentação de antígenos a linfócitos T, atuação como primeira linha de defesa do sistema imunológico, limpeza de detritos celulares e o recrutamento de células do sistema imune (SOLINAS et al., 2009; PIXLEY e STANLEY, 2004).

Para que os macrófagos possam exercer suas diferentes funções, tais como: a

diferenciação, o crescimento, a adesão, a migração, a fagocitose, a ativação e o desenvolvimento de citotoxicidade, estes possuem importantes receptores de superfície (GORDON, 2003). Existem receptores para as mais variadas funções, como o reconhecimento de microrganismos, fatores de coagulação, componentes de matriz extracelular, proteínas de transporte, fatores de crescimento, hormônios e citocinas.

Esses receptores, presentes em sua membrana, permitem que os macrófagos possam reconhecer e responder aos estímulos que recebem (EZEKOWITZ; GORDON, 2006). Assim, o reconhecimento só ocorre quando o receptor é ativado, levando o macrófago a reagir a essa ativação, seja pela expressão de determinado gene ou alteração na sua superfície celular, para captação de uma substância. Todo esse processo contribui para a defesa do hospedeiro por levar a fagocitose, além da captação de lipoproteínas modificadas (WOODS et al., 2000; TAYLOR et al., 2005; GEISSMAN et al., 2010).

A fagocitose é uma das formas do nosso organismo de se livrar de microrganismos e é usada tanto por neutrófilos como pelos macrófagos (READ, 2019). A fagocitose é mediada por receptores, como por exemplo os receptores complemento que se ligam a membrana do macrófago. Quando essa ligação ocorre a membrana do macrófago se invagina e forma o que chamamos de fagossomo. Então os grânulos citoplasmáticos da célula se unem ao fagossomo. Os fagossomos possuem muitas formas de matar essas células como radicais de oxigênio e radicais reativos de nitrogênio. Apesar destes mecanismos terem como função a destruição de patógenos, a liberação do conteúdo deste fagossomo no meio celular também causa um aumento na inflamação e danos ao tecido (READ, 2019).

Nesta situação, para que não ocorra um dano celular, ocorre a participação dos lisossomos secretores, células da linhagem hematopoiética (BLOTT, 2002). Essas células secretam proteínas e outras moléculas como peptídeos para realizar suas funções efetoras (BLOTT, 2002). Por exemplo, após a sua separação da membrana plasmática o fagossomo é levado através da via endocítica e se funde ao lisossomo, formando o fagolisossomo. Então, o material fagocitado é degradado e eventualmente secretado, um evento similar a secreção lisossomal (DESJARDINS, 1994; MOHN, 1995). Para isso, os lisossomos possuem mais de 60 hidrolases em uma única bicamada lipídica (GE, 2014).

Também na membrana plasmática do fagolisossomo ocorre a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS do inglês - *Reactive Oxygen Species*), através de um processo chamado burst oxidativo, que é dependente da participação de todos os grânulos, principalmente dos específicos, pois eles apresentam o citocromo b558 em sua membrana, que, ao fundir-se com o fagossomo, torna um componente essencial na formação da NADPH



oxidase, possibilitando o transporte de elétrons entre o NADPH no citoplasma para o  $O_2$  presente no lúmen do fagossomo, colaborando para a principal atividade deste complexo, a geração de superóxido de oxigênio ( $O_2^-$ ) através da redução molecular do oxigênio ( $O_2$ ) (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011). O radical superóxido ( $O_2^-$ ) é prontamente transformado pela enzima superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Alternativamente, o superóxido pode reagir com o óxido nítrico (NO) para formar o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Além disso, ele pode reagir com a mieloperoxidase liberada a partir dos grânulos azurófilos, que tem a capacidade de catalisar a transformação de  $H_2O_2$  em ácido hipocloroso (HOCl) ou oxidar ânions (como  $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cl^-$ ,  $SCN^-$ ,  $NO_2^-$ ) presentes nos fluidos biológicos (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011).

Dessa forma, o radical superóxido ( $O_2^-$ ) desempenha um papel fundamental no início da sequência de eventos que leva à produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas substâncias são conhecidas por sua notável capacidade oxidativa, que lhes permite combater ou inibir o crescimento de bactérias. Elas são liberadas tanto dentro das células como no meio ambiente extracelular, muitas vezes devido a processos de fagocitose que não foram bem-sucedidos. Como resultado, o conteúdo dos grânulos primários e secundários, juntamente com os produtos oxidantes gerados durante o "burst oxidativo", é liberado no tecido, causando danos significativos às células do hospedeiro (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011).

Além da regulação de receptores de glicocorticóides, lisossomos secretores podem regular a liberação de citocinas inflamatórias como as interleucinas – IL ( $IL-1\beta$ ,  $IL-18$ ) e do fator de necrose tumoral –  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) na resposta imune (GE, 2014). Mas, para entender a produção dessas citocinas faz-se necessário compreender a participação da cascata do ácido araquidônico, e das vias da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LO), no processo inflamatório. Desta forma, após a ocorrência de uma lesão da membrana celular, que é constituída fundamentalmente por fosfolípidos, a enzima fosfolipase A2, presente nos leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas 1. Esta enzima leva à degradação dos fosfolípidos, resultando na produção de ácido araquidônico, que poderá sofrer ação da enzima LO e da enzima COX (BRATER, 2001).

Em mamíferos existem 2 isoformas da enzima COX, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutiva (BRATER, 2001), está presente em quase todos os tecidos e atua em diversos efeitos fisiológicos, como proteção gástrica, agregação plaquetária, entre outros (ROMERO et al., 2014). Nas plaquetas a COX-1 é responsável principalmente pela produção de Tromboxana A2 ( $TxA_2$ ), e no trato gastrointestinal produz as prostaglandinas (PGs) citoprotetoras

(BRATER, 2001). Enquanto a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios e fatores de crescimento (BRATER, 2001). A COX-2 está presente, principalmente, no cérebro e medula espinhal. Quando células inflamatórias, como fibroblastos, macrófagos, monócitos e células inovais são ativadas, induzem a produção e ação da COX-2. É considerada enzima que produz os mediadores da inflamação da classe dos prostanóides (TANIURA et al., 2002; BOTTING, 2003; RAMSAY et al., 2003; SCHWAB et al., 2003; SIMMONS, 2003; SOMVANSHI et al., 2007).

### **3 TESTES ANTI-INFLAMATÓRIOS *IN VITRO***

#### **3.1 AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO BASEADO NA ESTABILIZAÇÃO DE MEMBRANA DE HEMÁCIAS**

Este teste se baseia na similaridade entre a membrana da hemácia e a dos lisossomos e na capacidade de uma determinada amostra em análise conseguir estabilizá-la (LEELAPRAKASH; DASS, 2011). Assim, ao promover estabilização da membrana dos eritrócitos, por analogia, este teste indica que a amostra em análise é capaz de promover a estabilização da membrana dos lisossomos e impedir que o mesmo libere seus componentes no meio celular, inibindo conseqüentemente a secreção de intraleucina-1 (IL-1), que é uma citocina altamente inflamatória (LEELAPRAKASH; DASS, 2011; SAKAT et al., 2010). Também, como já visto, existem muitas outras formas das quais os lisossomos se utilizam para auxiliar na inflamação. Por essa razão, se a amostra que está sendo avaliada promover a estabilização de membrana da hemácia pode-se inferir que a atividade anti-inflamatória foi positiva (DE et al., 2023).

O princípio deste método se fundamenta no efeito da concentração de uma solução na membrana dos eritrócitos. Isto porque, ao reduzir a concentração de sal no meio celular, as células tendem a aumentar de tamanho, esse aumento pode chegar a um ponto em que ocorre o rompimento da membrana celular (GROULX, 2007). Em termos espectrofotométricos, o que se observa é um aumento de absorbância a 560 nm em razão da hemólise e liberação de hemoglobina, que fica suspensa no sobrenadante (TEIXEIRA, 2023).

Como este teste usa o fato da similaridade entre as membranas das hemácias e dos lisossomos é necessário que o doador de sangue seja saudável e as propriedades do sangue devem se manter estáveis. A partir desta premissa, para testar a resistência das hemácias à hemólise pode-se utilizar o método descrito por Shinde et al. (1999) modificado por Chowdhury et al. (2014).

Para a preparação da suspensão de glóbulos vermelhos esses autores propõem que um



volume de sangue seja misturado com volume igual de solução Alsever (dextrose 2%, citrato de sódio 0,8%, ácido cítrico 0,05%, cloreto de sódio 0,42% e água destilada 100 mL). Em seguida, essa solução deve ser centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. As células precipitadas são lavadas em solução isosalina (0,85%). Após isso, com as células precipitadas, uma solução HRBC (*Human red blood cell* – células vermelhas humanas) \ 10% v/v é preparada usando a solução isosalina. Para avaliar a hemólise induzida por solução hipotônica são adicionados 2 mL de solução hiposalina (0,25%), 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,1M e pH 7,4), 1 mL da amostra a ser analisada em diferentes concentrações e 0,5 mL da solução de glóbulos vermelhos humanos. Como controle negativo deve ser usado 2 mL de solução destilada em 0,5 mL de solução de glóbulos vermelhos humanos para que ocorra 100% de hemólise. Como controle positivo pode ser utilizada a aspirina em concentração de 100 µg/mL. Todas as amostras são incubadas a 37 °C por 30 minutos e centrifugadas. O sobrenadante é analisado em espectrofotômetro a 560 nm. Considerando que a hemólise em água destilada é de 100% a partir da equação abaixo é calculada a porcentagem de hemólise. Como branco é usada água destilada. Quanto menor a absorbância no teste melhor é a estabilização da membrana dos glóbulos vermelhos.

$$\% \text{ Estabilização de membrana} = \left( 100 - \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \right) \cdot 100$$

Na literatura, há relatos de trabalhos que se utilizam deste ensaio. Pode-se citar o teste de Oyeleke et al. (2018). Neste estudo foi testado o extrato etanólico da casca da *Theobroma cacao* e suas frações de diclorometano, acetato de etila e sua fração aquosa. Todas as frações e extratos foram testados em concentração de 0,5, 1 e 2 mg/mL e o melhor resultado obtido foi o do acetato de etila com concentração de 2 mg/mL, que obteve 99,7% de estabilização de membranas. Como controle positivo foi usado a indometacina em concentração de 1 mg/mL, que obteve 77,4% de estabilização das membranas.

Outro estudo realizado utilizando este método foi o de Chowdhury et al. (2014) que testou extratos etanólicos de folhas de *Gardenia coronaria* em concentrações de 100, 200 e 300 µg/mL. A concentração com maior efeito foi a de 300 µg/mL com estabilização de 33% das membranas. Como controle positivo neste teste foi utilizado a aspirina em concentração de 100 µg/mL que obteve uma estabilização de 38,84% das membranas.

### 3.2 AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO BASEADO NA INIBIÇÃO DA DESNATURAÇÃO PROTEICA DE UMA SUBSTÂNCIA

A inibição da desnaturação proteica está associada a atividade anti-inflamatória, tal comportamento já foi observado em certos AINEs (SASO et al., 2001). Algumas doenças inflamatórias crônicas, como artrite possui correlação com essa atividade (CHOPADE et al., 2012; GOVINDAPPA et al., 2011; LEELAPRALKASH; DASS, 2011; SAKAT et al., 2010). Uma possível explicação para tal associação é que, durante um processo inflamatório, os mediadores inflamatórios podem induzir a liberação de proteases, que causam desnaturação de proteínas presentes nas articulações (GONZAL et al., 2020). Por outro lado, foi verificado que o ácido acetilsalicílico e outros fármacos anti-inflamatórios possuem a capacidade de inibir a desnaturação de proteínas (SAKAT et al., 2010).

Este ensaio baseia-se na desnaturação proteica provocada pela temperatura elevada, com consequente alteração estrutural das proteínas e diminuição da sua solubilidade em água (ANGELIS; TIRAPEGUI, 2007). Para sua realização pode-se utilizar o método descrito por Dias (2021).

Neste método são adicionados 50 µL de diluições seriadas do extrato, em concentrações variando de 2 a 0,5 mg/mL, em 450 µL de uma solução aquosa de albumina sérica bovina (BSA) a 5% (m/v). Como controles, são utilizados 50 µL de água destilada como controle negativo, que promoverá 100% de desnaturação e como controle positivo 50 µL de diluições seriadas de indometacina, de 2-0,5 mg/mL, que impedirá a desnaturação. Além disso, são adicionados 50 µL das diluições seriadas do extrato testado e da indometacina a 450 mL de água destilada, para se ter o controle da absorbância inerente a cada um dos tratamentos. Todas as amostras devem ser incubadas a 37 °C em banho-maria por 20 minutos e, em seguida, aquecidas a 57 °C por 3 minutos. Em cada amostra, após o resfriamento, é adicionado 2,5 mL de tampão fosfato salina (PBS) 0,2 M, pH 6,3. Por fim, as absorbâncias devem ser medidas por espectrofotometria a 255 nm. O percentual de inibição da desnaturação da proteína pode ser calculado através da seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left( 100 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \cdot 100$$

Onde:

A amostra: absorbância da amostra; e A controle: absorbância do controle negativo.

Na literatura existem trabalhos que se utilizaram dessa metodologia. Pode-se citar aqui o trabalho de Rego (2012) que testou diferentes extratos e frações da *Ilex perado* e da *Umbilicus rupestres*. Foram testados os extratos de acetona e de etanol e suas frações, de hexano, de diclorometano, de clorofórmio e de acetato de etila. Todas as amostras tinham concentração de 0,5 mg/mL. A fração de hexano foi a que obteve o melhor resultado com inibição de desnaturação de 96,4%. O ácido acetilsalicílico foi usado como controle positivo e obteve uma inibição de desnaturação de 94,7% com concentração de 0,5mg/mL. Outro trabalho que se pode citar é o de Puglia et al. (2006) onde foram testados três extratos oleospor os obtidos extração de acetona. Os extratos eram de *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus* e *Trachurus mediterraneus*. O extrato do *T. mediterraneus* apresentou o melhor resultado com IC50 de 49,79µg/mL. O ácido linoleico, utilizado como controle positivo, apresentou um IC50 de 37,5µg/mL

### 3.3 AVALIAÇÃO DE EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO BASEADO NA LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico é produzido por muitas células, mas existe um aumento expressivo em sua concentração no tecido durante o processo inflamatório em razão da elevada quantidade de macrófagos ativos no tecido (DOBROVOLSKAIA, 2013). O NO contribui com a inflamação porque ele tem um efeito citotóxico apesar de sua meia-vida ser de segundos. (BINGHAM, 2002). Também, pode-se afirmar que o NO é liberado no processo de fagocitose, visto que existe uma liberação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio durante o processo fagocítico. O que em parte formará o óxido nítrico que pode ser testado *in vitro* (KASSIM et al., 2010). Pode-se realizar este teste seguindo o método descrito por Dirsch et al., 1998 e modificado por Kassim et al. 2010.

Neste método são utilizadas células de macrófagos de roedores RAW264.7. Estas células são adicionadas a uma placa de 96 poços em um volume de 50 µL, com uma densidade celular de  $5 \times 10^4$  células/mL, e a mesma é incubada por duas horas a 37 °C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Isso é feito para que ocorra fixação das células. O branco não é incubado. As células que não se fixarem são descartadas. Em seguida é adicionado 200 U/mL de IFN- $\gamma$  e 10 µg/mL de LPS para que os macrófagos sejam ativados. Após essa etapa a amostra é adicionada nas células. O inibidor de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é usado como controle positivo. Como controle negativo o volume da amostra é substituído por água destilada. O volume final deve ser 100 µL. Os poços devem ser incubados de 16 a 20 horas em 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. A próxima etapa é descobrir a concentração de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) no meio utilizando a reação de Griess. Para

isso, 50 µl do volume de cada poço tratado e não tratado são misturados com um volume igual de reagente de Griess. A cor resultante é testada em um espectrofotômetro com leitura em 550 nm com um leitor de microplacas. Quanto menor a concentração de nitrito da amostra menor é a leitura do espectrofotômetro.

Os valores são então comparados com uma curva padrão de nitrito de sódio e convertidos para concentração de nitrito da amostra de acordo com a leitura do espectrofotômetro. A porcentagem de inibição é então calculada pela seguinte forma:

*% de Inibição*

$$= \left( \frac{\text{Concentração nitrito controle} - \text{Concentração nitrito amostra}}{\text{Concentração nitrito controle}} \right) . 100$$

Na literatura está descrito o trabalho de Kassim et al. (2010). os autores testaram os extratos metanólico e de acetato de etila de mel nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100 µg/mL. O extrato de acetato de etila promoveu o melhor resultado com 80% de inibição na produção de NO em concentração de 100 µg/mL. Como controle positivo foi usado aminoguanadina com concentração de 1 mmol/mL e inibiu totalmente a produção de NO.

Outro estudo realizado utilizando esse método foi o de Syahida et al. (2006). Neste trabalho foram testados 32 compostos fitoquímicos em concentrações de 12,5; 25 e 50 µg/mL. Os compostos que tiveram o melhor resultado foram a cardamonina e a zerumbona com mais de 90% de inibição na produção de NO, na concentração de 50 µg/mL.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO PELA FOSFOLIPASE A2

A fosfolipase A2 (PLA2) é uma enzima comumente encontrada em tecidos de mamíferos, assim como em veneno de cobras, aracnídeos e insetos (NICOLAS, 1997). Essa enzima faz parte do ciclo do ácido araquidônico e é responsável por transformar fosfolipídios no ácido araquidônico, tornando a PLA2 precursora de vários mediadores do processo inflamatório como os eicosanoides. Para testar o PLA2 pode-se usar o método descrito por Frason et al. (1974) e Escrig et al. (1997):

Inicialmente, é necessário que as bactérias produzam fosfolipídios, pois a PLA2 transforma fosfolipídios em ácido araquidônico, portanto se a marcação dos fosfolipídios com material radioativo for aferida, é possível fazer a contagem de cintilação líquida. Para isso 2,5 x 10<sup>8</sup> células/mL de *E. coli* devem ser adicionadas a um de meio com 1 mL contendo 1% triptona, 0,5% cloreto de sódio e 0,6% de ortofosfato diidrogenado de sódio em pH 5. Em

seguida, as células irão crescer durante 6 - 8h a 37 °C, com bastante oxigenação na presença de 0,5 µCi/mL de [3H] ácido oleico (atividade específica 10 Ci/mmol). Depois, as células serão centrifugadas a 2550 x g por 10 minutos e lavadas extensivamente em uma solução de 0,7 M Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% soro de albumina bovina em pH 8,0 para remover o oleato não incorporado ou que não se ligou (GARRIDO et al., 2004). As membranas de *E. coli* lavadas então serão suspensas novamente em solução salina de CaCl<sub>2</sub> 10µmol/mL e autoclavadas durante 30 a 45 minutos sob pressão máxima, lavadas e centrifugadas a 2550 x g por 10 minutos novamente e guardadas a -20 °C até que pelo menos 95% da radioatividade tenha sido incorporada pelos fosfolipídios.

Nesta etapa adiciona-se a enzima sinovial recombinante humana, como fonte de PLA2. Para isso, dilui-se 25 µg/mL da enzima em 10 µL de meio para crescimento (100mM Tris-HCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Em seguida, deve ser adicionado ao meio 2,5 µL da amostra em análise, com concentrações variadas, e este deve ser pré-incubado a 37°C por 5 minutos. Deve-se usar uma substância conhecida na literatura como controle positivo e como um controle negativo deve ser usado somente o veículo (solução tampão). Logo após, são adicionados 10 µL de oleato autoclavado às membranas marcadas com e continua-se a incubação por 15 minutos a 37°C. Este processo é feito, pois caso a PLA2 não seja inibida pela amostra ou controle positivo os fosfolipídios serão transformadas em ácido araquidônico o que pararia a radioatividade dos fosfolipídios. Portanto, quanto maior a radioatividade do sobrenadante mais inibido foi o PLA2. Por fim, adiciona-se 100 µL da solução contendo soro bovino de albumina a 0,25%, dissolvido em uma solução salina com concentração de 0,07 % (peso/volume), para prender o ácido oleico solto. O ensaio então é centrifugado a 2500 x g por 10 minutos a 4°C, e a radioatividade do sobrenadante é então determinada por contagem de cintilação líquida.

Diversos trabalhos se utilizaram desse método, sendo possível citar o teste de Escrig et al. (1997) que testou a variabilina, um produto marinho, como inibidor da PLA2. Ele obteve um IC50 de 6,9 µM. Como controle positivo foi usado o escaladrial que obteve um IC50 de 0,5 µM. Além desse trabalho pode-se citar também o trabalho de Garrido et al. (2004) onde foi testado extrato metanólico da casca do caule de *M. indica* com concentrações de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 0,75, 1, 10 e 100 µg/mL. A amostra com melhor resultado foi a de 100 µg/mL com 97,6% de inibição. Como controle positivo foi usado a magniferina em concentração de 10 µg/mL que obteve 92,8% de inibição da PLA2.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO PELO TESTE DE LIBERAÇÃO DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) E LEUCOTRIENO B4 (LTB4) EM MACRÓFAGOS ATIVOS

Este ensaio quantifica a prostaglandina E2 e de LTB4. A PGE2 e o LTB4 fazem parte do ciclo do ácido araquidônico que promove um aumento da inflamação (BINGHAM, 2002). O LTB4 é produto da lipoxigenase e a PGE2 é produto da cicloxigenase, e ambos têm função direta na inflamação. LTB4 é um potente ativador de granulócitos. *In vivo* o LTB4 estimula o rolamento dos leucócitos, sua adesão ao endotélio vascular e migração ao espaço extracelular. Durante uma pequena exposição de LTB4, granulócitos são recrutados, mas longas exposições geram mais respostas da célula, incluindo formação de radical ânion superóxido e degranulação (MARONE, 1997). As múltiplas associações da COX-2 e PGE2, além dos dados levantados mostram que a PGE2 pode ser alvo para produção de anti-inflamatórios (SMITH, 1989; BRATER, 2001).

Este teste se baseia no fato de macrófagos ativos produzirem grandes quantidades de PGs e LT. Inicialmente, suspendem-se células de macrófagos de roedores RAW264.7 em um meio adequado para seu crescimento (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino) em uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL. A placa é incubada por 24 h a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>.

Na segunda parte o objetivo é colocar os macrófagos em contato com um inibidor da via da cicloxigenase ou da lipoxigenase. Para isso, em cada placa será adicionada a amostra a ser analisada ou um controle positivo com ação já conhecida por inibir essas enzimas. O grupo controle negativo irá conter apenas o veículo. Em seguida, para que ocorra a estimulação dos macrófagos, adiciona-se ao meio o ionóforo de cálcio A21387 (com concentração final de  $10^{-6}$ M) para liberar LTB4 e incubação por 4 horas ou com LPS e IFN- $\gamma$  (100 ng/mL e 10 U/mL) para liberação de PGE2 e incubação por 24 horas (HULKOWE et al., 1996). Um grupo controle é feito contendo apenas DMSO (dimetilsulfóxido) para liberação de um nível base de eicosanoides.

Por fim, as concentrações desses eicosanoides são avaliadas por radioimunoensaio. As concentrações são avaliadas através de uma curva padrão e os resultados apresentados por média e erro padrão médio.

Para avaliar a capacidade de uma amostra em inibir a produção dessas substâncias pode-se utilizar o método descrito por Hulkowe et al. (1996) com modificações por Garrido et al. (2004). Inclusive, pode-se citar o trabalho feito por Garrido et al. (2004) utilizando o extrato metanólico de casca do caule de *M. indica* com concentração de 10, 50 e 100  $\mu$ g/mL. Foi obtido com a concentração de 100  $\mu$ g/mL uma redução de 87,9% do LTB4 e 83,2% do PGE2. Como



controle positivo foi utilizado Mangiferina na concentração de 10 µg/mL e obteve uma redução de 68,8% de LTB4 e 84,3% de PGE2.

Outro trabalho que se pode citar é o de Battu et al. (2011) onde foi testado extrato de acetato de etila de *A. tagala* em concentrações de 10, 25, 50 e 100mg/mL. O extrato com concentração de 100 mg/mL obteve uma redução de LTB4 de 91,4% e do PGE2 de 87,7%. Como controle positivo foi utilizado a indometacina com concentração de 100 µM e obteve 93,2% de redução da produção de PGE2. Como controle positivo do LTB4 foi usado NDGC na concentração de 25µM e foi obtido uma redução de 94%.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO POR MEIO DA LIBERAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- ALFA (TNF- $\alpha$ ) *IN VITRO*

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que tem uma importante função em iniciar e perpetuar a inflamação (BINGHAM, 2002). Esta citocina é produzida por várias células, e principalmente por macrófagos ativados em grande quantidade como apresentado anteriormente, e tem função direta na apoptose das células, o que causa um aumento na quantidade de detritos no meio extracelular, o que aumenta a inflamação. Portanto, uma forma de reduzir o processo inflamatório é inibir a produção deste fator tumoral-alfa. Esse ensaio testa se uma droga consegue inibir ou reduzir a produção de TNF- $\alpha$ . Para isso, pode-se utilizar o método descrito por Cho et al. (2000).

Neste método, inicialmente a amostra a ser analisada é solubilizada em uma solução contendo 89.9% de propilenoglicol, 10% de etanol e 0.1% de dimetilsulfóxido a 18 µM. Em seguida, essa solução é inserida no meio de cultura RPMI 1640, sendo que a concentração final do extrato não deve exceder 0.05% no meio de cultura. Para o controle negativo a amostra deverá ser substituída pelo veículo usado para a sua dissolução.

Em uma etapa seguinte, os macrófagos de roedor RAW264.7 devem ser diferenciados e estimulados a produzir o TNF- $\alpha$ . Para isso, inicialmente os macrófagos devem ser inseridos e incubados no meio de cultura, já contendo as amostras, na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL por 18h. Em seguida, deve ser adicionado às placas o LPS (1µg/mL) por 6h para que ocorra a liberação do TNF- $\alpha$ . Por fim, os sobrenadantes são coletados e testados para TNF- $\alpha$ , utilizando kit de ensaio imunossorvente ELISA de enzima similar ao TNF- $\alpha$  de ratos. Para determinar se ocorreu uma diminuição na produção de TNF- $\alpha$  compara-se os resultados dos poços das amostras testadas com os que contém somente o veículo.

Pode-se citar aqui o trabalho de Byeon et al. (2008) que testou o hinoquitilol e foi constatada uma IC50 de 212 µM. Como controle positivo foi usado pentoxifilina, que

apresentou uma IC50 de 228  $\mu\text{M}$ . Além deste trabalho pode-se citar o trabalho feito por Cho et al. (2000) que testou a cinopropiricina que apresentou uma IC50 de 8,24  $\mu\text{M}$ . Como controle positivo foi usado a prednisolona com uma IC50 de 25,4  $\mu\text{M}$ .

### 3.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO POR MEIO DA INIBIÇÃO DE COX-1 E COX-2

A cicloxigenases são parte do ciclo do ácido araquidônico e produzem PGE2. Esse ciclo causa um aumento da inflamação. Este teste se baseia no fato de que um extrato com capacidade de redução da produção de prostaglandinas reduz a inflamação.

A inibição das cicloxigenases pode ser avaliada pela capacidade destas enzimas em converter ácido araquidônico em PGH2 e pela redução desta a PGF2 $\alpha$ . Esta metodologia foi descrita por Pradelles (1985) com modificações de Rego (2012).

Neste teste adicionam-se COX-1 e COX-2 em tubos de ensaio contendo solução tampão (0,1 M de Tris-HCl, pH 8, contendo 5 mM de EDTA e 2 mM de fenol). A mistura é então agitada no vórtex e incubada durante 10 minutos, a 37 °C com o extrato em etanol (0,025 mg/mL) ou somente com o tampão sem o etanol para obter 100% de atividade da enzima. Para o controle negativo inativar as enzimas num banho-maria em ebulição por 3 minutos.

Para fazer a reação da cicloxigenase adiciona-se ácido araquidônico a todos os tubos e estes são incubados por 2 minutos durante 10 minutos, a 37 °C. Depois disso, adiciona-se 1 M de HCl para parar a reação. Para reduzir a PGH2 a PGF2 $\alpha$  adiciona-se cloreto de estanho saturado e os deixa incubar por 5 minutos. As prostaglandinas obtidas são então quantificadas pelo teste ELISA. Para determinação da quantidade utiliza-se o espectrofotômetro num leitor a 415 nm. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de PGs encontradas. Como controle positivo utiliza-se um anti-inflamatório capaz de inibir tanto a COX-1 como a COX-2. A curva padrão para determinar a concentração é encontrada no kit ELISA. Então subtrai-se o valor encontrado pelo branco, que é a solução tampão. Para calcular a inibição da enzima utiliza-se a seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = \left( \frac{(PG_S)A - (PG_S)B}{(PG_S)A} \right) \cdot 100$$

Onde:

(PGs)A corresponde a prostaglandinas no tubo sem o inibidor e (PGs)B corresponde a prostaglandinas nos tubos de ensaio com a amostra.

Rego (2012) testou diferentes extratos e frações da *Ilex perado* e da *Umbilicus rupestres*. Os extratos testados foram os de acetona e etanol e as frações de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. Todas as amostras tinham concentração de 0,025 mg/mL. O extrato que obteve melhor resultado foi o extrato de clorofórmio que promoveu uma inibição de 81,7%. Como controle positivo foi usado a indometacina que promoveu uma inibição de 93,9% na concentração de 0,025 mg/mL.

Outro trabalho publicado que utilizou essa mesma metodologia foi o trabalho de Butovich et al. (2008) que testou o ácido linoleico hidroxâmico. Foi constatado um valor de IC<sub>50</sub> de 60 µM para o ácido linoleico. Como controle positivo foi usado o DuP-697 que apresentou um IC<sub>50</sub> de 0,8 µM.

### 3.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO POR MEIO DA INIBIÇÃO DA AÇÃO DE PROTEASE TRIPSINA

Os neutrófilos transportam em seu lisossomo muitas proteases de serina (SAKAT et al, 2010; LEELAPRAKASH; DASS, 2011). Durante a inflamação essas proteases causam danos ao tecido. Os anti-inflamatórios não esteroidais atuam pela inibição de enzimas lisossomais ou estabilização da membrana do lisossomo. Este teste analisa se um extrato é capaz de inibir a tripsina que serve de modelo para as proteases de serina do lisossomo. Isso reduziria a quantidade de dano causado ao tecido.

Seguindo o teste de Oyedapo et al. (1995) modificado por Rego (2012) monitora-se o grau de hemólise da caseína pela tripsina. A hidrólise da caseína produz aminoácidos livres, no entanto, apenas três tipos de aminoácidos aromáticos têm efeito na absorvância de onda UV, a tirosina, o triptofano e a fenilalanina. Levando isso em consideração, pode-se afirmar que a absorvância desses três aminoácidos representa o conteúdo total de caseína hidrolisada (ZHANG et al, 2010). Por isso quanto maior a absorvância em 280 nm maior a hidrólise.

Para o teste, primeiramente, prepara-se uma solução de tripsina a 2 mg/mL. Mistura-se então 1 mL de tampão 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) e 1 mL da amostra com concentrações variadas ou do controle positivo que pode ser o ácido acetilsalicílico, dissolvidos em DMF com concentração menor do que 2,5% e diluídos em tampão, tendo essas concentrações de 0,06 a 1 mg/mL. Adiciona-se então 60 mL de tripsina de modo que a concentração final da enzima seja 0,06 mg/mL. Então deve-se incubar a solução a 37 °C por 5 minutos. Em seguida adiciona-se 1 mL de caseína (0,08% m/v) e incuba-se novamente por 20 minutos, à mesma temperatura. Depois, adiciona-se ácido perclórico 70% para parar a reação. Centrifuga-se a suspensão durante 10 minutos a 13000 g e realiza a leitura da absorvância do sobrenadante a 280 nm. O

tampão é usado como branco. Para calcular a porcentagem de inibição usa-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição da tripsina} = \left( Absa - \frac{Absa}{Absc} \right) \cdot 100$$

Onde:

Absa é a absorbância da amostra e Absc é a absorbância do controle negativo.

Para essa metodologia pode-se citar o trabalho de Rego (2012), que testou diferentes extratos e frações da *Ilex perado* e da *Umbilicus rupestres*. Foram testados os extratos de acetona e etanol e suas frações de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila. Os melhores resultados foram a fração de clorofórmio com IC50 de 0,29 mg/mL, a fração de hexano do extrato de etanol com IC50 de 0,16 mg/mL e o extrato de acetona com IC50 de 0,16 mg/mL. Como controle positivo foi usado o ácido acetilsalicílico que obteve IC50 de 0,32 mg/mL.

Também pode-se citar o trabalho de Govindappa et al. (2011), que testou o extrato liofilizado de *W. trilobata*. Foram usados extratos secos da folha, do caule e da flor. Como inibidor de protease o melhor resultado foi o extrato fresco da folha com concentração de 0,5 g/mL que obteve inibição de 83,91%. Como controle positivo foi usado aspirina na concentração de 200 mg/mL que obteve inibição de 92,83%.

#### 4 CONCLUSÃO

A experimentação *in vitro* reduz o número de animais nas pesquisas farmacológicas ao promover respostas preliminares sobre os potenciais anti-inflamatórios das amostras estudadas. Sabe-se que todo o processo de desenvolvimento de um medicamento leva em consideração a eficácia e segurança, desde a triagem das moléculas candidatas até a última fase dos ensaios pré-clínicos. Assim, para gerar dados de alta qualidade sobre a segurança e eficácia dos candidatos a medicamentos, as metodologias *in vitro* apresentam-se como uma excelente ferramenta. As inúmeras aplicações de ensaios farmacológicos *in vitro* levam a uma questão ao desenvolvimento de medicamentos: Poderá os ensaios *in vitro* substituir totalmente os ensaios em animais no futuro? Infelizmente, diferente do que acontece na indústria de cosméticos e cuidados pessoais, atualmente, os testes *in vitro* não são suficientes para substituir

completamente os testes de segurança e eficácia *in vivo* na indústria farmacêutica. Todavia, os testes *in vitro*, podem reduzir o número de animais na pesquisa em razão do seu valor preditivo. Também, a busca contínua de um melhor bem-estar animal impulsiona a melhoria e o desenvolvimento de novos métodos *in vitro*, visto que o futuro sem ensaios em animais é uma possibilidade realista. Dessa maneira, este estudo é uma adição bem-vinda à literatura num momento em que cresce o interesse em modelos celulares *in vitro* para estudos farmacológicos e toxicológicos.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org> – Acesso em 16 fevereiro de 2018.
- ANGELIS R.C.; TIRAPEGUI, 2007. **J. Fisiologia da nutrição humana. Aspectos básicos, aplicados e funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2007.
- APPELBERG, R. **As células fagocíticas**. Azevedo C. **Biologia Celular e Molecular**. Lisboa: Lidel, 2005. Terceira edição. p. 491-502.
- ARULSELVAN, P., et al. **“Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation.”** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 10 de outubro de 2016, [www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5276130/](http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5276130/).
- BATTU, G. R.; PARIMI R.; CHANDRA, K. B.; SHEKAR. **In vivo and in vitro pharmacological activity of Aristolochia tagala (syn: Aristolochia acuminata) root extracts**. *Journal of Pharmaceutical Biology*, v.49, n.11, p.1210-1214, ago. 2011.
- BINGHAM, CO 3rd. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation**. *The Journal of Rheumatology*, v.65, p. 3-9, set. 2002.
- BLOTT, E. J.; GRIFFITHS, G. M. **Secretory lysosomes**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v. 3, n. 1, p. 122-131, fev. 2002.
- BORREGAARD, N. **Neutrophils, from marrow to microbes**. *Immunity*, v. 33, n. 5, p. 657-670, nov. 2010.
- BOTTING, R. **COX-1 and COX-3 inhibitors**. *Thrombosis Research*, v. 110, p. 269-272, 2003.
- BRATER, D. C.; HARRIS, C.; REDFERN, J. S.; GERTZ, B. J. **Renal Effects of COX-Selective Inhibitors**. *American Journal of Nephrology*, v. 21, n. 1, p. 1–15, jan. 2001.
- BUTOVICH, I. A.; LUKYANOVA, S. M. **Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenases by linoleyl hydroxamic acid: comparative in vitro studies**. *Journal of Lipid Research*, v. 49, n.1, p. 1284-1294, Junho de 2008.
- BYEON, S.; LEE, Y.; KIM, J.-C.; HAN, J.; LEE, H.; CHO, J. **Hinokitiol, a Natural Tropolone Derivative, Inhibits TNF- $\alpha$  Production in LPS-Activated Macrophages via Suppression of NF- $\kappa$ B**. *Planta Medica*, v.74, n.8, p. 828–833, abr. 2008.
- CAMILA et al. **Própolis verde brasileira: citotoxicidade e potencial anti-inflamatório in vitro**. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 11, p. 76609–76626, 30 nov. 2022.
- CEBENELLI, GCM. **Papel dos monócitos inflamatórios na sepse. Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2019.
- CHO, J.Y.; BAIK, K.U.; PARK, M.H.; JUNG, J.H. **In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpenelactone, from Saussurea lappa**. *European Journal of Pharmacology*, v.398, n.3, p. 399–407, jun. 2000.



CHOPADE A.R.; SOMADE P.M.; SAYYAD F.J. **Membrane Stabilizing Activity and Protein Denaturation: A Possible Mechanism of Action for the AntiInflammatory Activity of *Phyllanthus amarus***. JKIMSU, v.1, n.1, p.67-72, mar. 2012.

CHOWDHURY, A.; AZAM, S.; JAINUL, M.A.; ISLAM, A. **Antibacterial Activities and In Vitro Anti-Inflammatory (Membrane Stability) Properties of Methanolic Extracts of *Gardenia coronaria* Leaves**. International Journal of Microbiology, v.2014, n. único, p.1-5, fev. 2014.

DE, D. J. et al. **Inflammation versus regulation: how interferon-gamma contributes to type 1 diabetes pathogenesis**. Frontiers in Cell and Developmental Biology, v. 11, 24 de maio de 2015.

DESJARDINS, M.; HUBER, L. A.; PARTON, R. G.; & GRIFFITHS, G. **Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus**. J. Cell. Biol. v. 124, p. 677-688, 1994.

DIAS, THANISE ANTUNES. "Estudo in Vitro de Ações Biológicas Da Ficocianina Livre E Microencapsulada." Tede.upf.br, 8 mar. 2021, tede.upf.br/jspui/handle/tede/2061. Acesso em 11 de outubro de 2023.

DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. M. **The Griess Assay: Suitable for a Bio-Guided Fractionation of Anti-Inflammatory Plant Extracts?** Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research, v.64, n.5, p.423-426, jun. 1998.

DOBROVOLSKAIA, M.A.; MCNEIL, S.E. **Understanding the correlation between *in vitro* and *in vivo* immunotoxicity tests for nanomedicines**. Journal of Controlled Release, v.172, n.2, p.456-466, dez. 2013.

ESCRIG, V; UBEDA, A.; FERRANDIZ, M. L.; SANCHEZ, J. M.; ALCARAZ, M. J.; PAYA, M. **Variabilin: A dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A2 with anti-inflammatory activity**. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.282, n.1, p. 123-131, jul. 1997.

EZEKOWITZ, R. A.; GORDON, S. **Interaction and regulation of macrophage receptors**. Ciba Foundation Repository, v.118, n. único, p. 127-136, dez. 1985.

FRASON, R.; PATRIARCA, P.; ELSBACH, P. **Phospholipid metabolism by phagocytic cells. Phospholipases A2 associated with rabbit polymorphonuclear leukocyte granules**. Journal of Lipid Research, v. 15, n.1, p.380-388, jul. 1974.

GARRIDO, G. et. al. **In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®)**. Pharmacological Research, v.50, n.2, p.143-149, ago. 2004.

GEISSMAN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD, M.; LEY, K. **Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells**. Science. v, 327, n. 5966, p.656-661, fev. 2010.

GE, W.; LI, D.; GAO, Y.; & CAO, X. **The Roles of Lysosomes in Inflammation and Autoimmune Diseases**. International Reviews of Immunology, v.34, n.5, p. 415- 431, jul.

2014.

GONZAL, T. E. et al. *In vitro* anti-inflammatory, anti-oxidant and in vivo anti-arthritis properties of stem bark extracts from *Nauclea pobeguinii* (Rubiaceae) in rats. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 10, n. 2, p. 65, 2020.

GORDON, S. **Alternative Activation of macrophages.** Nature Reviews Immunology, v. 3, n. 1, p. 23-25, jan. 2003.

GOVINDAPPA, M.; NAGA, S.S.; POOJASHRI, M.N.; SADANANDA, T.S.; CHANDRAPPA, C.P.; SANTOYO, G.; SHARANAPPA, P.; ANIL, K.N.V. **Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of Wedelia trilobata (L.) Hitchc.** J. Med. Plants Res., v.5, n.24, p.5718-5729, out. 2011.

GROULX, N.; BOUDREAU, F.; ORLOV, S. N.; GRYGORCZYK, R. **Membrane Reserves and Hypotonic Cell Swelling.** The Journal of Membrane Biology, v.214, n.1, p.43-56, jun. 2007.

HAAS, ROBERT. et al. **Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions.** PLOS Biology, v. 13, n. 7, p. e1002202–e1002202, 16 de julho de 2015.

HULKOWE, K.I.; POLLOCK, J.S.; WALSH, R.E.; HUANG, R.; OTIS, E.R.; BROOKS, C.D.; **Leukotrienes do not regulate nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages.** Prostaglandins. Leukot Essent Fatty Acids, v.55, n.3, p.145–149, set. 1996.

KASSIM, M.; ACHOUI, M.; MUSTAFA, R.M.; MOHD, M.A.; YUSOFF, K.M.; **Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity.** Nutrition Research, v.30, n.9, p. 650-659, set. 2010.

KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. **Neutrophil apoptosis and the resolution of infection.** Immunologic Research, v. 43, n. 1-3, p. 25–61, 9 de dezembro de 2008.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. **Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach.** Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med., v. 1, n. 3, p. 309-333, 2009.

LEELAPRAKASH G.; DASS S. **In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Methanol Extract of *Enicostemma Axillare*,** Int. J. Drug Dev. & Res., v.3, n.3, p.189-196, set. 2011.

MARONE, G.; CASOLARO, V.; PATELLA, V.; FLORIO, G.; TRIGGIANI, M. **Molecular and Cellular Biology of Mast Cells and Basophils.** International Archives of Allergy and Immunology, v. 114, n. 3, p. 207–217, mar. 1997.

MOHN, H.; Le CABEC, V.; FISCHER, S.; MARIDONNEAU-PARINI, I. **The src-family protein-tyrosine kinase p59hck is located on the secretory granules in human neutrophils and translocates towards the phagosome during cell activation.** Biochem. J. v. 309, p. 657–665, 1995.

NICOLAS, J.P.; LIN, Y.; LAMBEAU, G.; GHOMASCHCHI, F.; LAZDUNSKI, M.; GELB, M. H. **Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase A2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity.** The Journal of Biological Chemistry, v.272, p. 7173-7181, mar. 1997.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. **Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils.** Journal of Leukocyte Biology, v. 90, n. 2, p. 271-284, Agosto de 2011.

OYEDAPO, O. O.; FAMUREWA, A. J. **Antiprotease and membrane stabilizing activities of extracts of *Fagarhia zanthoxylozdes*, *Olox subscorpzozdes* and *Tetrapleura tetraptera*.** International Journal of Pharmacology, v. 33, n.1, p.65-69, 1995.

OYELEKE, S. A.; AJAYI, A. M.; UMUKORO, S.; ADERIBIGBE, A.O.; ADEMOWO, O.G. **Anti-inflammatory activity of Theobroma cacao L. stem bark ethanol extract and its fractions in experimental models.** Journal of Ethnopharmacology, v. 222, n. 1, p. 239-248, ago. 2018.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF, J. **Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase as label: An alternative to radioimmunoassay.** Anal. Chem., v.57, n. 1, p. 1170-1173, Abril de 1985.

PIXLEY, F.J.; STANLEY, R. **CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action.** Trends in Cell Biology, v. 14, n 11, p. 628-638, nov. 2004.

PUGLIA C.; SANTAGATI N.A.; BONINA F.; TROMBETTA D.; CRISTANI M.; SPECIALE A.; SAIJA A. **Protective effect of Mediterranean fish oil extracts on heat-induced denaturation of albumin.** J Pharm Pharmacol., v.58, n.10, p.1411- 1413, jun. 2006.

RADI, S.; KANWAR. **Cardio-renal safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs.** Journal of Toxicological Sciences, v. 44, n. 6, p. 373–391, 1 de janeiro de 2019.

RAMSAY, R. G., CIZNADIJA, D., VANEVSKI, M., MANTAMADIOTIS, T. **Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase: Three pillars of control.** International Journal of Immunopathology and Pharmacology, Austrália, v. 16, n.2: 59-67 suppl., 2003.

ROMERO, R.B. et al. **"Inibição de Ciclooxygenases 1 (COX-1) E 2 (COX-2) Por Monoterpenos: Um Estudo in Silico Cyclooxygenase 1 (COX-1) and 2 (COX-2) Inhibition by Monoterpenes: An in Silico Study"**. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, vol.16, no.4, 2014, <http://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/download/373/350>. Acesso em outubro de 2023.

READ, R.W. **Basic and Clinical Science Course.** USA: American Academy of Ophthalmology, Janeiro de 2019.

REGO, E.A. **Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores** 2012. P.84. Universidade de Açores, departamento de ciências tecnológicas e desenvolvimento, Ponta Delgada, 2012.

SAKAT, S; JUVEKAR, A.R.; GAMBHIRE, M.N. **In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn.** Int. J. Pharm.

Pharmacol. Sci., v.2, n.1, p. 146-155, jan. 2010.

SASO, L. et al. **Inhibition of heat-induced denaturation of albumin by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Pharmacological implications.** Archives of Pharmacal Research, v. 24, p. 150-158, 2001.

SASO, L.; VALENTINI, G.; CASINI, M.L.; MATTEI, E.; BRAGHIROLI, L.; MOZZANTI, G.; PANZIRONI, C.; GRIPPA, E.; SILVESTRINI, B. **Inhibition of protein denaturation by fatty acids, bile salts and other natural substances: a new hypothesis for the mechanism of action of fish oil in rheumatic diseases.** Jpn. J. Pharmacol., v.79, n.1, p.89-99, Fevereiro de 1999.

SCHWAB, J. M., SCHLUESENER, H. J., MEYERMANN, R., SERMAN, C. N. **Cox-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, Alemanha, v. 69, n. 5, p. 339-343, 2003.**

SETHI, R. et al. **Neurobiology and Therapeutic Potential of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors for Inflammation in Neuropsychiatric Disorders.** Frontiers in Psychiatry, v. 10, 4 de setembro de 2019.

SHINDE, U.A.; PHADKE, A. S.; NAIR, A. M.; MUNGANTIWAR, A. A.; DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N. **Membrane stabilizing activity — a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil.** Fitoterapia, v.70, n.3, p.251-257, jun. 1999.

SILVA, I. C. **Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias.** Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v. 7, n. único, p. 35-46, 2015.

SIMMONS, D. L. **Variants of ciclooxigenase-1 and their roles in medicine.** Thrombosis Research, USA, v. 110, p. 265-268, 2003.

SMITH, WL. **The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action.** Biochemical Journal, v 259, n 2, p 315–324, abr. 1989.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. **Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation.** Journal of Leukocyte Biology, v. 86, n. 5, p. 1065-1073, nov. 2009.

SOMVANSHI, R. K., KUMAR, A., KANT, S., GUPTA, D., SINGH, S. B., DAS, U., SRINIVASAN, A., SINGH, T. P., DEY, S. **Surface Plasmon Resonance Studies and Biochemical Evaluation of a Potent Peptide Inhibitor Against Cyclooxygenase-2 as an Anti-inflammatory Agent.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 361, p. 37-42, 2007.

SYAHIDA, A.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.H.; KHORIZAH, S.; HABSAH, M.; PERMANA J.D.; NORHADIANI, I. **Effect of compounds isolated from natural products on IFN-  $\gamma$ /LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages.** Pharmaceutical biology, v. 44, n. 1, p. 50-59, Outubro de 2006.

TANIURA, S., KAMITANI, H., WATANABE, T., ELING, T. E. **Transcriptional regulation of cyclooxygenase-1 by histone deacetylase inhibitors in normal human astrocyte cells.** *J. Biol. Chem. Japão*, v. 277, n. 19, p. 16823-16830, 2002.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. **Macrophages receptors and immune recognition.** *Annual Review of Immunology*, v. 23, p. 901-944, abr. de 2005.

TEIXEIRA, K. **Determinação Da Concentração de Hemoglobina Livre Em Concentrados de Hemácias Pela Espectrofotometria Direta: Método de Harboe.** 10 Apr. 2018, <https://doi.org/10.11606/d.17.2017.tde-06062017-165908>. Acesso em 28 de agosto de 2023.

UNIÃO EUROPEIA, 1986 - **Diretiva 86/906/EEC of European Parliament and of Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances.** – *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 18 de dezembro de 1986.

UNIÃO EUROPEIA, 2010 - **Diretiva 2010/63/EU DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de setembro de 2010 - relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos** – *Jornal Oficial da União Europeia*, 20 out. 2010. Disponível em: [http://3dmfsx6ameqwfda31pu5rjxq.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2015/10/diretiva\\_201063UE.pdf](http://3dmfsx6ameqwfda31pu5rjxq.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2015/10/diretiva_201063UE.pdf).

VITOR BORGES JAPIASSU; DE, S. **Nefrotoxicidade de anti-inflamatórios não esteroidais e sua relação com a gota: uma breve revisão de literatura / Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatories and its relation with gout: a brief literature review.** *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 1, p. 2549–2562, 11 de janeiro de 2022.

WOODS, J. A.; LU, Q.; LOWDER, T. **Exercise-induced modulation of macrophage function.** *Immunology and Cell Biology*, v. 78, n.5, p. 545-553, out. 2000.

YANG, J.; ZHANG, L.; YU, C.; YANG, X.; WANG, H. **Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.** *Biomarker Research*, v. 2, n.1, n1-9, janeiro de 2014.

ZHANG, L. et al. **Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition.** *Food Chemistry*, v. 119, n. 2, p. 592–599, 15 de março de 2010.