

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ISADORA DE FÁTIMA BRAGA MAGALHÃES

AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO DA NANOEMULSÃO E DO ÓLEO DE *Carapa guianensis* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7

SÃO LUÍS - MA
2016

ISADORA DE FÁTIMA BRAGA MAGALHÃES

AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO DA NANOEMULSÃO E DO ÓLEO DE *Carapa guianensis* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7

Exame de qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva
Orientadora: Profa. Dra Ana Lucia Abreu Silva
Coorientadora: Dra. Flávia de Oliveira Cardoso

SÃO LUÍS - MA

2016

ISADORA DE FÁTIMA BRAGA MAGALHÃES

AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO DA NANOEMULSÃO E DO ÓLEO DE *Carapa guianensis* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7

Exame de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Magalhães, Isadora de Fátima Braga.

Avaliação in vitro da ação da nanoemulsão e do óleo de *Carapa guianensis* em macrófagos RAW 264.7

81 f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientadora: Ana Lucia Abreu Silva.

1. *Carapa guianensis*. 2. inflamação. 3. macrófagos.

I. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva

Universidade Estadual do Maranhão - Orientadora

Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva

Universidade Federal do Tocantins - 1º membro

Profa. Dra. Joicy Cortez de Sá

Universidade CEUMA - 2º membro

A Deus, por nunca me deixar desistir.

“Eu queria que você visse o que é realmente coragem, em vez de pensar que coragem é um homem com uma arma na mão. Coragem é quando você sabe que está derrotado antes mesmo de começar, mas começa assim mesmo, e vai até o fim, apesar de tudo. Raramente a gente vence, mas isso pode até acontecer.” Harper Lee

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me amparar em todos os infortúnios inerentes a vida humana, por partilhar comigo minhas alegrias, por traçar caminhos para mim que nunca pensei que conseguiria seguir e no fim, me fazer encontrar um arco-íris e um estranho prazer em todas as dúvidas e confusões que me cercam.

À minha mãe, Georgina Garcês Braga por todo apoio.

À irmã Esperanza Braga Magalhães pelos desabafos e reclamações sobre tudo, incentivo para estudos e concursos dessa vida, inspiração e cafés de madrugada.

À Profa. Ana Lucia Abreu Silva, por ser uma inspiração e mais que uma orientadora uma amiga sempre disposta a fazer o possível e o impossível para ajudar a sua grande família de orientados.

A minha co-orientadora, Dra. Flávia de Oliveira Cardoso, pela ajuda fundamental para realização deste trabalho e pelo conhecimento partilhado.

À doutoranda Iara Oliveira, pela imensa ajuda para terminar o trabalho, pela paciência, disponibilidade e apoio. Obrigada garota!

A Fernando Almeida Souza pela ajuda durante o experimento, qualificação e orientação na estatística do trabalho.

A todos do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia (LIP) da Fundação Oswaldo Cruz – RJ, pelo apoio nos experimentos e companhia. Agradeço à Daiana, Carol, Sandy, Celeste e Calabrese por toda ajuda!

A todos do Laboratório de Anatomopatologia: Anderson, Higor, Allana, Aarão, Breno, Carol, Raquel, Douglas, Sarah, Joanna, Eslen, Alcindo, Isabel, Gustavo, Vanessa, Iara, Tatiane, Nathália, Alessandra, Natanael, Prof. Fábio e Mylena Torres. Agradeço pelas incontáveis risadas, carinho e ajuda.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) por possibilitar a realização do estágio na FIOCRUZ-RJ e consequente execução do experimento que deu origem a este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal e ao seu corpo docente, pelas aulas, apoio e por contribuírem para minha formação profissional.

À “Sala da Justiça”, turma 2014-2016, à Almerinda Medeiros, Delano Alencar, Karoline Gonçalves, Thayane Fernandes, Italla Mayara, Luciana Rosa, Carla Janaína, Paulo Bryguel, Emerson Araújo, Danilo Brenno e Douglas Dadalto, por tornarem as dificuldades motivos de piadas durante as disciplinas, pelos cafés durante as aulas e as cervejas durante as sociais, vocês são a melhor turma de mestrado que alguém poderia ter!

À grande amiga e companheira de sala de aula, Renata Mondêgo, que além de grande amiga foi uma grande profissional e parceira. Um exemplo de perseverança, inteligência e esforço. Alguém que quero levar junto comigo por resto da vida!

A Graco Macedocouto por compartilhar comigo a maior parte da minha vida acadêmica e ser acima de tudo meu melhor amigo e confidente.

A Danilo Saribeiro pelos áudios, risadas, loucuras, conselhos, histórias, prints intermináveis, viagens pro Rio e por me fazer rir sempre!

Aos integrantes do “quarteto”: Danilo, Marina e Emerson. Amigos de infância sempre presentes.

Aos amigos de graduação Venir Lia, Izaías Polary, Deborah Cristina, Jessica Stefane, Isabelle Lima e Fabiana Lima por estarem presentes até hoje em minha vida.

RESUMO

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos invasores. Os macrófagos iniciam a resposta imune inata por meio do reconhecimento e fagocitose de patógenos e produção de mediadores inflamatórios, servindo como ligação entre a imunidade inata e adquirida. As citocinas são mediadores importantes de resposta imunológica que permitem a comunicação entre células e a ativação de mecanismos inflamatórios. A inflamação deve equilibrar mecanismos pró-inflamatórios, para eliminar o agente causador da agressão, e mecanismos anti-inflamatórios para não causar danos maiores aos tecidos. Diante disso e considerando a importância do reconhecimento de novos agentes imunomoduladores, nosso objetivo foi pesquisar a ação do óleo e da nanoemulsão de *Carapa guianensis* em macrófagos RAW 264.7 e sua possível influência na liberação de citocinas relacionadas a ação pró- inflamatória (IL-1 β ,IFN- γ , IL-12 e TNF α) e a ação anti-inflamatória (IL-4, , IL-10) e na produção de óxido nítrico. Macrófagos RAW 264.7 foram incubados com diferentes concentrações de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*. Um dos grupos foi estimulado uma hora antes com LPS, outro foi estimulado uma hora depois do contato com a planta e outro grupo não foi estimulado. O experimento foi feito em triplicata e com duas repetições independentes. Os sobrenadantes foram coletados após 24, 48 e 72 horas de incubação e por meio de ELISA foram mensuradas as liberações de citocinas entre os diferentes grupos e pelo método de Griess foi mensurado o nitrito produzido. Para citotoxicidade as concentrações de nanoemulsão e de óleo de *C. guianensis* produziram efeito dose-dependente e também tempo-dependente. Quando sem estímulo, a nanoemulsão de *C. guianensis* reduziu a liberação de TNF- α e o óleo reduziu a liberação de IL-1 β e de IL-4. E ambos aumentaram a liberação de IL-12 nestas células. Nanoemulsão e óleo de *C. guianensis* inibiram a produção de nitrito, IFN- γ , IL-1 β , IL-4 e IL-10 em macrófagos RAW-264.7 estimulados anteriormente com LPS indicando efeito inibidor sobre a via Th1 e Th2. Quando no estímulo posterior com LPS, o tratamento com *C. guianensis* reduziu a liberação de IFN- γ e IL-1 β e IL-4 em macrófagos. Estes dados sugerem que os componentes do óleo e da nanoemulsão de *C. guianensis* possuem efeito predominantemente inibidor sobre a liberação de citocinas e produção de nitrito em macrófagos.

PALAVRAS-CHAVE: *Carapa guianensis*, inflamação, macrófagos

ABSTRACT

The innate immune system is the first line of defense against invading pathogens. Macrophages initiate the innate immune response by recognizing pathogens, phagocytosing them, and secreting inflammatory mediators, serving as a link between the innate and acquired immunity. Cytokines are important mediators of immune responses that allow cells to communicate and activate inflammatory mechanisms to solve the challenge. Inflammation must balance proinflammatory mechanisms, to eliminate the causative agent of the aggression, and anti-inflammatory mechanisms to avoid causing further damage to tissues. In view of this and considering the importance of the recognition of novel immunomodulatory agents, our aim was to investigate the action of oil and nanoemulsion of *Carapa guianensis* in RAW 264.7 macrophages and its effect on release of the proinflammatory cytokines related action (IL-1 β , IFN- γ , IL-12 and TNF) and anti-inflammatory action (IL-4, IL-10) and in nitric oxide production. Macrophages RAW 264.7 were incubated with different concentrations of *C.guianensis* oil and nanoemulsion. One group was stimulated with LPS one hour before contact with oil or nanoemulsion, other group was LPS stimulated one hour after contact with the plant and another group was not stimulated. The experiment was done in triplicate and with two independent repetitions. Supernatants were collected after 24, 48 and 72 hours incubation and cytokine levels were measured using the traditional ELISA method. The nitrite production was determined through Griess Reaction. For cytotoxicity concentrations of *C.guianensis*, oil and nanoemulsion produced dose-dependent effect and also time-dependent. Without LPS stimulation, *C.guianensis* nanoemulsion reduced the release of TNF- α and oil reduced the release of IL-1 β and IL-4. And both increased the release of IL-12 in these cells. Oil and nanoemulsion of *C.guianensis* inhibited nitrite production, IFN- γ , IL-1 β , IL-4 and IL-10 in macrophages RAW-264.7 previously stimulated with LPS indicating inhibitory effect on Th1 and Th2 pathway. When stimulated with LPS after contact with the plant, treatment with *C.guianensis* reduced the release of IFN- γ , IL-1 β and IL-4 in macrophages. These data suggest that the components of oil and nanoemulsion of *C.guianensis* have predominantly inhibitory effect on the release of cytokines and nitrite production in macrophages.

KEYWORDS: *Carapa guianensis*, inflammation, macrophages

LISTA DE FIGURAS

Página

- 18
- Figura 1 - Reação química para síntese de óxido nítrico.**
- 33
- Figura 2 - Efeito da nanoemulsão e do óleo de *Carapa guinensis* na viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas. Os valores representam média ± desvio padrão das triplicatas do experimento. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.**
- 35
- Figura 3. Concentrações de nitrito (pg/mL) em sobrenadante de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. ++ Representa $p < 0,01$. ++++ Representa $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo. *** Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo. **** Representa $p < 0,0001$.**
- 37
- Figura 4 - Concentrações de IFN-γ (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle positivo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo. ND= níveis não detectáveis.**

Figura 5- Concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 μ g/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle positivo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo.+ Representa $p < 0,05$. +++ Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle negativo.

39

Figura 06- Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 μ g/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. + Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ++ representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo. * representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo. ND= níveis não detectáveis.

41

Figura 7. Concentrações de de IL-1 β (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 μ g/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. + Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo LPS. *** Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo. **** Representa $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle positivo. ND= níveis não detectáveis.

43

Figura 8. Concentrações de de IL-4 (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 μ g/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos

45

tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. + Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo LPS. *** Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo. **** Representa $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle positivo.

Figura 9. Concentrações de de IL-10 (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de óleo e nanoemulsão de *C. guinensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

%: porcentagem.

°C : grau Celsius

μl: microlitro

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

APCs: células apresentadoras de antígeno

cm²: centímetros quadrados

CO₂ : dióxido de carbono

DMSO : dimetilsulfóxido

ELISA: teste imunoenzimático

EROs: espécies reativas de oxigênio

FTCβ: fator transformador de crescimento β.

g: grama

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₃PO₄: ácido fosfórico

IFN-γ: interferon gamma

IL-1: interleucina 1

IL-1β: interleucina 1β

IL-10: interleucina 10

IL-12: interleucina 12

IL-13: interleucina 13

IL-18: interleucina 18

IL-4: interleucina 4

IL-5: interleucina 5

IL-6: interleucina 6

iNOS óxido nítrico-sintase induzível

kDa: kilodaltons

LB: linfócito B

LPS: lipopolissacarídeo

LT: linfócito T

M1: macrófagos de fenótipo M1

M2: macrófagos de fenótipo M2

Mg: miligramas

MHC :complexo principal de histocompatibilidade

Min: minutos

ml: mililitros

mM: Milimolar

NK: natural killer

Nm: nanômetros

NO: óxido nítrico

PAF: fator de Agregação Plaquetária

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PBS: tampão fosfato-salino

PGE2: prostaglandina E2

pH: potencial de hidrogénio,

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões

Rpm: rotações por minuto

RPMI : meios Roswell Park Memorial Institute

T-CD4: linfócito T CD4

Th1: linfócito T helper tipo 1

Th2: linfócito T helper tipo 2

Th: linfócitos T CD4+ auxiliares

TLRs: receptores do tipo Toll

TNFR1: receptor 1 para fator de necrose tumoral alfa

TNFR2: receptor 2 para fator de necrose tumoral alfa

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 O Sistema Imunológico	03
2.2 Macrófagos	05
2.3 Inflamação	09
2.4 Citocinas	11
2.4.1 Interleucina 12	12
2.4.2 Interferon Gama	13
2.4.3 Fator de necrose tumoral alfa	14
2.4.4 Interleucina 1β	15
2.4.5 Interleucina 4	16
2.4.6 Interleucina 10	17
2.5 Óxido Nítrico	18
2.6 Fitoterapia	19
2.7 <i>Carapa guianensis</i>	20
2.8. Nanoemulsões	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26

4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Obtenção do óleo da semente de <i>Carapa guianensis</i> (andiroba)	27
4.2 Padronização da emulsão do óleo de andiroba	27
4.3 Padronização da nanoemulsão da andiroba	27
4.4 Linhagens Celulares	27
4.5 Condições de cultura celular macrófagos RAW 264.7	28
4.6 Citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7	28
4.7 Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo e nanoemulsão de <i>C. guianensis</i> sem estímulo com LPS	28
4.8 Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo ou nanoemulsão de <i>C. guianensis</i> com prévio estímulo com LPS	29
4.9 Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo ou nanoemulsão de <i>C. guianensis</i> com posterior estímulo com LPS	30
4.10 Determinação da produção de citocinas	30
4.11 Dosagem de nitrito	31
4.12 Análise estatística	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A imunidade inata é uma resposta precoce do organismo que atua no controle de infecções e para reduzir danos aos tecidos (DE RIVERO VACCARI et al., 2015). Os macrófagos estão diretamente relacionados à resposta imunológica inata por meio da homeostase e reparação tecidual e desempenham papel importante na patogênese de várias doenças, incluindo infecções e tumores. Por isso são vistos como importante alvo em abordagens terapêuticas (SCHULTZE, 2015).

Macrófagos teciduais são anatomicamente distintos um do outro, e têm diferentes capacidades funcionais e perfis transcricionais (WYNN et al., 2013). Eles diferem quanto ao estado de polarização e funções imunológicas dependendo, primordialmente, do microambiente e dos micro-organismos que interagem com essas células no tecido (SALINA et al, 2014).

A inflamação é um processo necessário para promover a proteger contra a infecção e reparação de tecidos, na qual os macrófagos participam ativamente. A inflamação crônica contribui diretamente para a patogênese e progressão da vários distúrbios infecciosos, inflamatórios e metabólicos, sendo a linha comum que liga a autoimunidade, a infecção e o câncer (TENG et al., 2015).

Ao longo dos anos, a busca por novos agentes que atuem sobre a inflamação marcou a história da Imunologia. Nesta busca, destaca-se o papel de agentes isolados de plantas que podem possuir ação farmacológica frente à inflamação (MACHADO E OLIVEIRA, 2014). É crescente o número de espécies vegetais utilizadas para o tratamento de doenças (BEZERRA-SANTOS et al., 2005) pois a descoberta de novas substâncias com atividade imunomodulatória permite intervir em distúrbios como neoplasias, imunodeficiências como AIDS, doenças inflamatórias e doenças auto-imunes (SMIT et al., 2009).

A andiroba (*Carapa guianensis*) é uma árvore nativa da floresta tropical da América do Sul (INOUE et al., 2013) que possui comprovada ação para tratamento de inflamações e infecções, como agentes antialérgicos (HENRIQUES E PENIDO, 2014) e cicatrizante de feridas (NAYAK et al., 2011). Estudo in vitro com compostos limonóides isolados da planta

demonstrou ação inibidora de óxido nítrico em macrófagos peritoneais indicando possível ação anti-inflamatória (SAKAMOTO et al., 2015).

O uso de plantas pela população permite explorar a biodiversidade da flora brasileira, no entanto é necessária a investigação científica para que sejam utilizadas de forma segura e forma correta. O uso pela medicina popular e as crescentes pesquisas com essa planta, tornam-na uma planta alvo para ensaios na área de imunologia. Mais experimentos são necessários para melhor compreender a possível ação imunomoduladora de andiroba , possibilitando assim seu uso em sinergia com outros compostos ou como possível facilitador para uma melhor resposta imune, o que justifica a realização deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Sistema Imunológico

O sistema imunológico é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas, e tem por finalidade manter a homeostase do organismo, combatendo as agressões em geral. A resposta imune é dividida em dois tipos: imunidade inata ou natural e imunidade adaptativa ou adquirida. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo e fazem parte desta as barreiras anatômicas e fisiológicas, as células e os componentes humorais. As barreiras anatômicas e fisiológicas são constituídas pela pele intacta, o pH ácido do estômago, lisozimas bacteriolíticas nas lágrimas e salivas, mecanismos mucociliares de limpeza das vias aéreas superiores e que são cruciais na defesa contra patógenos (TURVEY et al. 2009).

O sistema imunológico mantém o equilíbrio frente a desafios externos e erros genéticos que podem levar ao câncer. O rompimento desse equilíbrio pode levar à autoimunidade e imunopatologia após a infecção, já a imunidade inadequada permite a evasão do patógeno e falha na vigilância de tumores (TENG et al., 2015).

A imunidade inata atua em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio. Seus mecanismos compreendem barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. A primeira defesa do organismo frente a um dano tecidual envolve diversas etapas intimamente integradas e constituídas pelos diferentes componentes desse sistema (TURVEY et al. 2009).

O dogma atual vê a resposta imune inata como algo não-variável, estável, e com mesmo padrão de resposta frente a todos os desafios ao qual é exposta. Já a resposta imune adquirida é conhecida como a resposta que possui memória, e desenvolve respostas mais rápidas a partir desta memória imunológica. Essa memória ocorre através dos linfócitos e consiste em reconhecer o mesmo estímulo antigênico caso ele entre novamente em contato com o organismo, evitando assim o restabelecimento da doença e se aperfeiçoando a cada encontro com um antígeno.

Um rompimento com este dogma é a teoria da presença de memória também na resposta imune inata em mamíferos. Os monócitos, que possuem uma meia-vida relativamente curta em circulação, podem ser responsáveis por esta memória a longo prazo por possivelmente manter-se um reservatório de monócitos epigeneticamente modificado de memória que persistem no corpo, possivelmente localizados no baço. Os macrófagos são também uma das principais células de memória relativas ao sistema inato (TÖPFER et al., 2015).

Em contraste com a imunidade adaptativa, o reconhecimento inespecífico de endógeno e estruturas exógenas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) representa um elemento-chave da imunidade inata (ZEWINGER et al., 2015).

A fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata. Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência em microrganismos, mas que não ocorrem na espécie humana (HÖLZL et al., 2008).

A imunidade inata é formada por componentes humorais e celulares. Os componentes humorais são as proteínas do complemento, proteína C reativa, pentraxinas, colectinas e os peptídeos antimicrobianos que são responsáveis por destruir agentes patogênicos no momento em que estes entram em contato com o organismo. As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer (NK) (HÖLZL et al., 2008).

Células apresentadoras de antígeno (APCs) especializadas, como macrófagos, circulam pelo corpo ingerindo e digerindo os patógenos encontrados, fragmentando-os em peptídeos antigênicos. Partes destes peptídeos se ligam a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC – major histocompatibility complex) e são apresentados na superfície celular sob a forma de um complexo MHC/peptídeo. As células T possuem receptores de superfície que têm a função de reconhecer diferentes complexos MHC/peptídeo. Uma vez ativados pelo reconhecimento MHC/peptídeo, as células T se dividem e secretam linfocinas (sinais químicos) que mobilizam outros componentes do sistema imunológico.

A imunidade inata possui baixa especificidade reconhecendo os patógenos por um número limitado de receptores, chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês Pattern recognition receptor) (HÖLZL et al., 2008). No entanto este número limitado de receptores é compensado pelo reconhecimento de componentes microbianos chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês pathogen associated molecular patterns), que são compartilhados pela maioria dos grupos de agentes patogênicos (TURVEY et al., 2009).

2.2 Macrófagos

Os macrófagos fazem parte do sistema mononuclear fagocitário (MPS) e podem ser definidos como células da linhagem fagocítica mononuclear obtidas a partir de monócitos que se originam na medula óssea e na circulação. Macrófagos de fenótipos podem ser recrutados a partir de monócitos reservatórios de sangue, baço e medula óssea (GEISSMANN et al., 2010).

Apesar dos monócitos darem origem aos macrófagos, a aplicabilidade deste dogma é questionada, pois essas células têm várias origens durante a ontogenia e cada um destas diferentes linhagens persiste nos adultos (GAUTIER et al., 2012). Os monócitos podem não contribuir substancialmente para a maioria dos macrófagos dos tecidos no estado estacionário ou durante certos tipos de inflamação, além disso, os macrófagos de tecidos adultos são derivados de precursores embrionários que permanecem nos tecidos antes do nascimento. E ainda, macrófagos dos tecidos podem manter-se em adultos através da auto-renovação (GINHOUX E STEFFEN, 2014).

Os macrófagos são as principais células apresentadoras de antígenos (APC's) ficando na interface entre o sistema imune inato e adaptativo (JANEWAY, 2001). Eles proveem uma linha de defesa contra invasão microbiana e crescimento tumoral. Podem efetuar isto de maneira direta, envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e fatores de necrose tumoral, que são lesivos a microorganismos e células cancerígenas, ou indiretamente, pela secreção de citocinas, e processamento e apresentação de antígenos, regulando o sistema imune (KLIMP et al., 2002). Participam também da remoção de células lesadas, senescentes ou apoptóticas, do reconhecimento de células neoplásicas e do remodelamento de tecidos durante a embriogênese (MURPHY et al., 1996).

Uma característica importante dos macrófagos é a sua plasticidade e a capacidade de integrar sinais do microambiente para executar diferentes funções biológicas (SCHULTZE, 2015). Os macrófagos mudam a expressão de seus genes em resposta a muitos estímulos diferentes (HUME, 2015).

Como os macrófagos residentes do tecido exercem funções homeostáticas e diferem de tecido para tecido, eles são capazes de integrar sinais do microambiente para induzir sinais do tecido relacionados a programas de transcrição que estão associados com a expressão de fatores de transcrição específicos (SCHULTZE, 2015). Eles mudam seu estado funcional para novos estados metaestáveis em resposta a alterações na fisiologia do tecido ou desafios ambientais. Devido a sua incrível capacidade de adaptação ao tipo de tecido eles poderiam nem mesmo ser considerados como somente um tipo de célula, mas sim serem subdivididos em diferentes subconjuntos funcionais de acordo com suas diferentes origens (WYNN et al., 2013).

Os macrófagos têm papéis em quase todos os aspectos da biologia de um organismo, desde o desenvolvimento, a homeostase e reparação como também para as respostas imunes aos agentes patogênicos. Macrófagos residentes atuam como sentinelas e respondem a alterações na fisiologia, bem como à ação de microorganismos invasores (GEISSMANN et al., 2010).

Apesar de suas funções protetoras, macrófagos podem estar associados a patologias como fibrose, obesidade e cancro, resultando numa relação causal de macrófagos com estados de doença (WYNN et al., 2013).

Os monócitos e macrófagos fornecem a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos. Eles também dão início a imunidade adquirida pelo processamento de antígenos apresentando e auxiliando em funções efetoras (HUME, 2015). Os principais mecanismos de ação dessas células envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, processamento e apresentação de antígenos, além do recrutamento de outras células do sistema imunológico (KLIMP et al., 2002; SIVEEN E KUTTAN, 2009).

Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos são encontrados na superfície de microorganismos

como vírus, bactérias, fungos e parasitas. São expressos normalmente por microrganismos e não por células do hospedeiro, mostram pouca variação entre os microrganismos e a sua expressão é essencial para a sobrevivência destes patógenos (TEIXEIRA et al., 2002).

Os PAMPs interagem com diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (RRP), dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs), a ligação dos PAMPs com os RRP ativará a resposta imune inata. Não há diversidade nem capacidade adaptativa para a geração de novos receptores ou reconhecimento de novos padrões moleculares que não aqueles já programados no código genético (CRUVINEL et al., 2010).

Uma efetiva resposta imune depende do reconhecimento dos PAMPs pelos macrófagos que distinguem o agente infeccioso do que é “próprio” do organismo. Após esse reconhecimento, os TLRs ativados sinalizam componentes que ativam respostas imunes apropriadas necessárias para defesa do hospedeiro (CARLOS et al., 2009). Por exemplo, patógeno-molecular associado padrões, tais como LPS representam ligantes para reconhecimento de padrões receptores e sinalização através destes receptores conduz mudanças de transcrição durante a ativação de macrófagos (OSTUNI et al., 2013).

O termo "ativação" foi aplicado originalmente para macrófagos recrutados que adquiriram atividade tumoricida e microbicida (HUME, 2015). Os macrófagos podem ser ativados por duas vias distintas, a ativação clássica (M1) ou a via alternativa (M2). A primeira caracteriza-se por ser desencadeada em resposta a produtos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) que está presente na membrana de bactérias gram-negativas e é um dos mais potentes ativadores dos macrófagos. Os macrófagos ativados por essa via são responsáveis pela morte de microrganismos e de células tumorais e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MOSSER E EDWARDS, 2008).

Por outro lado, a ativação alternativa (M2) é promovida por moléculas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4, 10 ou 13, que levam à proliferação celular, angiogênese e remodelação e reparo tecidual (SIVEEN E KUTTAN, 2009). Há ainda a classificação que propõe a existência de três subpopulações de macrófagos: macrófagos ativados, de reparo tecidual e reguladores. Os primeiros são os macrófagos clássicos, o segundo tipo, ativados por IL-4, que estão basicamente envolvidos no reparo tecidual, estimulando fibroblastos e promovendo deposição de matriz extracelular. E o terceiro tipo

exerce atividade reguladora mediante liberação de IL-10 (MOSSER E EDWARDS, 2008). Fenótipos M1 e M2 podem ser convertidos uns nos outros dependendo do microambiente específico no qual estão inseridos (WYNN et al., 2013).

Os macrófagos atuam como mediadores imprescindíveis entre a imunidade inata e a adaptativa através do processamento e apresentação de antígeno às células T e liberação de moléculas moduladoras, direcionando desta maneira a imunidade adaptativa para uma resposta celular (Th1) ou humoral (Th2) (IONTCHEVA et al., 2004). Antígenos microbianos, produtos tumorais, células T efectoras Th1 e Th2 e seus produtos secretados, influenciam a heterogeneidade e o estado de ativação das populações de macrófagos (MUNDER et al., 1998). Os tipos M1 e M2 estão associados com linfócitos Th1 e Th2, e por sua vez com o interferon-gama (IFN- γ) (SCHRODER et al., 2004) e interleucina 4 (IL4) respectivamente (MARTINEZ et al., 2013).

Sinais de ativação incluem a presença de citocinas (interferon- gama, fator de estimulação de colônias de granulócitos-monócitos e fator de necrose tumoral alfa), lipopolissacarídeos bacterianos, proteínas da matriz extracelular, e outros mediadores químicos (FUJIWARA E KOBAYASHI, 2005). A ativação “clássica” pode ocorrer em presença dos mediadores IFN- γ e TNF- α , após o reconhecimento de PAMPs (LPS, lipoproteínas, etc.), ou por meio de sinais endógenos (proteínas de choque térmico, etc.). Esses macrófagos ativados em geral produzem níveis elevados de interleucina 12 (IL-12) e baixos níveis de IL-10, participando como indutores e efetores de resposta imune Th1 (HAO et al., 2012). Essa resposta medeia a defesa contra patógenos bacterianos, através da expressão nestas células de MHC classe II, e da apresentação antígenos aos linfócitos T. A via alternativa é ativada em infecções por parasitas e tumores (MARTINEZ et al., 2013).

A ativação de macrófagos é induzida pelo IFN-gama, o que desencadeia uma resposta pró-inflamatória que é necessária para matar agentes patogênicos intracelulares. Os macrófagos também sofrem ativação alternativa por IL-4 e IL-13, que desencadeiam um fenótipo diferente que é importante para a resposta imune a parasitas (MARTINEZ et al., 2009).

De uma maneira geral, a indução de uma resposta imune que favoreça o perfil Th1 irá controlar os patógenos intracelulares por meio da ativação de macrófagos e a não geração desta resposta imune promove a replicação do patógeno (ROCHA et al., 2007). A maioria dos

tumores desencadeará uma reprogramação dos macrófagos de um fenótipo M1 anti-tumoral para um fenótipo M2 pró-tumoral, o qual promoverá um crescimento do tumor (KALISH et al., 2015).

2.3 Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico que ocorre em decorrência da ativação de alguns mecanismos que provocam alterações nos componentes humorais e celulares após injúria tecidual. A exposição a um patógeno gera uma migração de células circulantes, que são direcionadas pela presença de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório (CRUVINEL et al., 2010). A regulação desse processo envolve ambos os sinais que iniciam e mantêm a inflamação e sinais que finalizam o processo. Um desequilíbrio entre os dois sinais de inflamação resulta em dano celular e tecidual (FUJIWARA E KOBAYASHI, 2005).

Na inflamação, os macrófagos desempenham três principais funções: a apresentação de antígenos, fagocitose e a produção de imunomodulação por meio de citocinas e fatores de crescimento (FUJIWARA E KOBAYASHI, 2005). A flexibilidade dos macrófagos permite-lhes desempenhar múltiplos, às vezes opostos, papéis em inflamação e reparação tecidual. O seu papel central no processo inflamatório torna-se evidente quando na sua disfunção, a qual implica em inflamação crônica e feridas mal curadas (DUNSTER, 2015).

Uma vez iniciada a agressão tecidual, vários componentes do sistema imunológico passam a envolver-se no processo inflamatório. Como consequência da ação vasodilatadora de mediadores, como prostaglandinas, citocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) ocorre aumento do fluxo sanguíneo no local atingido e aumento da permeabilidade capilar. Em decorrência desta última alteração surge retração de células endoteliais e expressão de moléculas de adesão nestas mesmas células e em leucócitos. Tais alterações ocasionam passagem de mediadores solúveis para os vasos e saída de células da circulação. Dentre os mediadores, encontram-se leucotrienos, fator ativador de plaquetas, bradicininas, componentes do sistema complemento e citocinas (incluindo as quimiotáticas), caracterizando-se, assim, a fase aguda da inflamação (KUMAR et al., 2005).

Os macrófagos desempenham um papel crítico na iniciação, manutenção e resolução de inflamação. Eles são ativados e desativados no processo inflamatório. Remover ou

desativar mediadores inflamatórios e células efetoras permite inibir a inflamação e prevenir maiores danos teciduais. Os macrófagos ativados são desativados por citocinas anti-inflamatórias IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (FUJIWARA E KOBAYASHI, 2005).

Os neutrófilos são os principais elementos celulares no início da resposta inflamatória seguidos pelo afluxo de monócitos e macrófagos e, por fim, o de linfócitos (KUMAR et al., 2005). Durante a resposta primária, parte dos linfócitos se diferencia em células de memória de longa sobrevivência resultando em respostas sustentadas à exposição dos antígenos (SCHNURR et al., 2004). A diferenciação dos linfócitos Th em Th1 e Th2 ocorre a partir de uma célula T naive precursora ou T auxiliar periférica (Thp), em resposta aos estímulos fornecidos pela célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês Presenting Cell Antigen) no momento da apresentação do mesmo (ANSEM et al., 2009). A diferenciação dos linfócitos Th é definida predominantemente pelas citocinas do microambiente e pela interação do receptor de célula T com o antígeno (BOYTON et al., 2002).

Na inflamação, os macrófagos atuam como APCs, potencializando a ativação de LT e LB pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas. Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO) (ABBAS E LICHTMAN, 2003).

Os mediadores da inflamação induzida por macrófagos são críticos para uma variedade de doenças inflamatórias, tais como a disfunção relacionadas com sepse, infecção microbiana, lesões hepáticas e renais, distúrbios neurodegenerativos, tumorigênese, osteoporose osteonecrose, doenças cardiovasculares e metabólicas e doenças autoimunes (JOU et al., 2013).

Porque os macrófagos produzem uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas que participaram em ambos os resultados benéficos e nocivos na inflamação, várias terapêuticas os têm como alvo para descobrir novas vias para o controle de doenças inflamatórias (FUJIWARA E KOBAYASHI, 2005).

2.4 Citocinas

A atividade das citocinas foi primeiramente reconhecida em meados dos anos 60, quando se constatou que sobrenadantes derivados de cultura de linfócitos continham fatores que poderiam regular a proliferação, diferenciação e maturação de células do sistema imune (KUBY, 1995).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (SOMMER E WHITE, 2010).

A ação das citocinas poderá ser pró-inflamatórias (Th1) como IL 1, 2, 6, 7 e FNT (fator de necrose tumoral) ou anti-inflamatórias (Th2), IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (fator transformador de crescimento β). A pleiotropia permeia as ações das citocinas de forma que única citocina pode agir em diversos tipos de células e diferentes tipos de células secretam a mesma citocina. Podem ser formadas em cascata em que uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas e serem redundantes, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas (SOMMER E WHITE, 2010).

As citocinas desempenham um papel crucial na coordenação das atividades dos sistemas imune inata e adaptativa. Em resposta ao reconhecimento do patógeno, células imunes inatas segregam citocinas que informam o sistema imunitário adaptativo sobre a natureza do agente e instruem as células T naive para se diferenciarem em subtipos de células T apropriadas necessárias para eliminar a infecção. Estes incluem interleucinas, interferons e outras citocinas imuno-reguladoras que exibem notável redundância funcional e efeitos pleiotrópicos (SUN et al., 2015).

Nomalmente possuem ação parácrina (atuação local, próxima às células que as produzem), ou autócrina (diretamente sobre as células que as produzem), e apenas ocasionalmente entram no sistema circulatório para agirem como mediadores endócrinos (KISHIMOTO et al., 1994).

Assim as citocinas podem ter efeitos estimulantes (pró-inflamatório) ou inibidores (antiinflamatório) dependendo do subtipo de clone de linfócitos Th ativados. As citocinas e seus receptores são classificados em famílias distintas de proteínas estruturalmente relacionadas e iniciam sua ação por ligação a receptores específicos na membrana da célula-alvo, desencadeando uma via de transdução de sinais, que levam a alterações da expressão gênica na célula alvo (ABBAS et al., 2000).

2.4.1 Interleucina 12

Interleucina-12 é uma citocina heterodimérica pró-inflamatória que induz a produção de interferon-gama (IFN- γ), o qual induzirá a produção de fator de necrose tumoral (TNF), favorecendo a diferenciação dos linfócitos para o perfil T auxiliar do tipo 1 (Th1), formando um elo entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (TENG et al., 2015). É produzida por células mielomonocíticas, principalmente células dendríticas e macrófagos em resposta a patógenos durante a infecção (TRINCHIERI, 2003).

Funciona como a mais forte indutora de respostas imunes Th1 especialmente devido à sua capacidade para induzir a secreção de IFN - γ por células T e NK. Na ausência de IL-12, uma resposta Th2 pode emergir e conduzir à secreção de citocinas, tais como IL-4, IL-10, e IL-13. Estas citocinas Th2, em particular IL-10, regulam a produção das citocinas Th1 como IFN- γ e por IL-12 (ASTE-AMEZAGA et al., 1998).

Está envolvida em doenças inflamatórias ou autoimunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatóide, e doença inflamatória do intestino (ADORINI et al., 1995). Assim, a modulação da produção de IL-12 durante a estimulação antigênica parece crucial para o resultado de uma resposta imunitária (SÄEMANN et al., 2000). Ela também desempenha papéis essenciais nas funções de uma variedade de células efetoras, tornando-se um alvo terapêutico importante para doenças inflamatórias, tais como as doenças autoimunes do sistema nervoso central, uveíte e esclerose múltipla (SUN et al., 2015). Camundongos deficientes em IL-12p40 são resistentes quando induzidos experimentalmente a condições autoimunes (LUGER et al., 2008).

2.4.2 Interferon Gama

A produção de interferon-gama (IFN γ) em resposta à infecção é uma característica da imunidade inata e adaptativa. Além do papel central de IFN-gama na defesa do hospedeiro, a sua liberação excessiva tem sido associada com a patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (MÜHL E PFEILSCHIFTER et al., 2003). A produção de IFN- γ é controlada por citocinas secretadas por APCs, principalmente interleucina IL-12 e IL-18. Estas citocinas servir como uma ponte para ligar a infecção com a produção de IFN- γ na resposta imune inata (GOLAB et al.,2000).

É produzida por células NK frente a estímulo com IL-12 (SALAZAR-MATHER et al., 2000). Em macrófagos, a combinação de IL-12 e IL-18 aumenta ainda mais a estimulação da produção de IFN- γ . Para sua regulação outras citocinas como IL-4, IL-10, fator de crescimento transformante- β , e glucocorticóides atuam como reguladores negativos (FUKAO et al., 2001).

Em macrófagos, IFN- γ promove a ativação de funções microbicidas, aumentando a pinocitose e fagocitose e promove maior capacidade de matar microorganismos através da indução da “explosão respiratória” com alta produção de NO, que acontece sob a regulação de enzimas lisossomais que promovem a destruição do patógeno (DECKER et al., 2002). É um das mais fortes indutores de mecanismos efetores antimicrobianos e atua contra patógenos intracelulares virais, bacterianos e parasitários (MEUNIER E BROZ, 2015).

Como citocina de efeitos pleiotrópicos, IFN- γ age em sinergia ou antagoniza os efeitos das citocinas, fatores de crescimento, e as vias padrão molecular (PAMP) associados a sinalização de patógenos , se torna importante na biologia de macrófagos, já que essas são células que recebem constantemente múltiplos sinais e têm a necessidade de integrá-los a dar uma resposta adequada para o meio extracelular (SCHRODER et al., 2004).

2.4.3 Fator de necrose tumoral alfa

O fator de necrose tumoral α é uma proteína de membrana de 26 kDa, um importante regulador da imunidade e inflamação, bem como de diferenciação e de morte celular (CLARK, 2007). O TNF é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos, que possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose. O TNF é induzido por vários estímulos, incluindo microorganismos, mediadores lipídicos, complexos imunes, células

tumorais e citocinas. PAMPs microbianos, atuando em TLR, induzem a produção de TNF, o qual induz uma cascata de mediadores inflamatórios (TRACEY et al., 2008).

Sua produção ocorre principalmente por macrófagos. Entretanto, após a estimulação com LPS, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células NK também a sintetizam (CLARK, 2007). Também está presente nos neurônios e células da glia (Lin et al 2000). O estímulo para sua produção são os mediadores lipídicos, complexos imunes, células tumorais e citocinas. PAMPs microbianos, atuando em TLR, induzem a produção de TNF (TRACEY et al., 2008).

Além disso, a produção do TNF- α também pode ser estimulada por IFN, IL-1, IL-2, GM-CSF, substância P, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e fator ativador plaquetário (PAF). Por outro lado, a produção pode ser inibida por ciclosporina, dexametasona, prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 e antagonistas do PAF (CLARK, 2007).

O TNF é um importante mantenedor da homeostasia do sistema imune, através do controle da hematopoese, da proliferação de células T e B, desenvolvimento dos órgãos linfóides e maturação dos centros germinativos. Estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção e ativa essas células para erradicar microorganismos (TRACEY et al., 2008), além de induzir a liberação de quimiocinas que auxiliam neste recrutamento de leucócitos participa também da indução da expressão de proteínas pro-coagulantes, levando à formação de trombo. Age como pirógeno endógeno através de sua ação no hipotálamo, aumentando a síntese de proteínas séricas nos hepatócitos (BRADLEY, 2008).

O TNF faz com que células do endotélio vascular expressem moléculas de adesão, que tornam a superfície endotelial adesiva para leucócitos, inicialmente para neutrófilos e subsequentemente para monócitos e linfócitos. Ele estimula células endoteliais e macrófagos a secretar quimiocinas. Atua também nos fagócitos para estimular a secreção de IL-1 (FORTE, 2004).

As funções do TNF- α mais bem caracterizadas estão relacionadas a apoptose e à inflamação. Assim, da mesma forma que a IL-1 β , o TNF- α pode regular tanto respostas tróficas, quanto de diferenciação. TNF- α possui dois receptores expressos constitutivamente, TNFR1 e TNFR2. O do tipo 1 se faz predominante na maioria das células, possuindo um

domínio de morte intracelular, contribuindo principalmente para a morte neuronal, ao passo que o TNFR2 contribui para a neuroproteção (BERNARDINO et al., 2008).

O TNF- α e a IL-1 são as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório. São produzidos, principalmente, por macrófagos ativados e induzem espectro variado de alterações. Os principais estimulantes da produção do TNF- α são os lipolissacarídeos (LPS) constituintes da membrana de bactérias, em especial das Gram-negativas (KUMAR et al., 2005).

Em contraste a sua função protecionista para o organismo, TNF está associado à patogênese de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais, alergias, rejeição de enxertos (BRADLEY, 2008), distúrbios metabólicos graves e choque séptico devido à produção de TNF induzida por lipopolissacárides e outras citocinas (FORTE, 2004). Em neoplasias malignas, é o principal mediador da caquexia (VARELLA E FORTE, 2001) através da perda de células musculares e adiposas frente a sua produção prolongada (FORTE, 2004).

2.4.4 Interleucina 1 β

IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células, incluindo monócitos, macrófagos, queratinócitos e outras células epiteliais. IL-1 β é uma citocina inflamatória chave liberada mediante a infecção, lesão celular, ou desafio antigênico. Atua diretamente sobre vários tipos de células, quer isoladamente ou em combinação com outras citocinas inflamatórias, para induzir um estado inflamatório ou a "resposta de febre." É liberada após a ativação de um complexo multiproteico intracelular chamado inflamassoma (LAMKANFI E DIXIT, 2014).

Esta citocina age na coordenação de aspectos da inflamação local (VARELLA E FORTE, 2001). IL-1 β influencia na taxa de reabsorção do tecido ósseo juntamente com IL-6 e TNF- α , através do controle do grau de diferenciação e do número dos osteoclastos (FUNK, 2001). No sistema nervoso, uma das primeiras funções atribuídas a IL-1 β foi de pirógeno endógeno como agente estimulante da febre pela ativação das células do hipotálamo (GOSHEN E YIRMIYA, 2009). IL-1 β é conhecido como um potente promotor de carcinogênese (DINARELLO, 1996).

2.4.5 Interleucina 4

IL-4 é uma glicoproteína de 15 kDa, com propriedades antiinflamatórias e produzida por linfócitos-T-CD4, mastócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos (SOMMER E WHITE, 2010).

A interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 são produzidos durante respostas imunes do tipo 2 e são essenciais para a imunidade protetora contra infecções de parasitas extracelulares e são responsáveis pela asma e outras doenças inflamatórias alérgicas (ZHU, 2015).

Tem ação sobre os linfócitos-T e B, células NK, mastócitos, sinoviócitos e células endoteliais. Atua sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, FNT α , IL-6 e IL-8, e inibindo a produção de radicais livres de oxigênio. Além disso, aumenta a suscetibilidade dos macrófagos aos efeitos de glicocorticoides (SOMMER E WHITE, 2010).

Além da regulação dicotômica da diferenciação de células Th por IL-4, esta citocina está envolvida em várias outras vias alternativas (LUZINA et al., 2012). Funcionalmente, a IL-4 é melhor conhecida por definir o chamado fenótipo Th2 dos linfócitos e para a regulação da proliferação celular, apoptose, e a expressão de numerosos genes em vários tipos de células, incluindo linfócitos, macrófagos e fibroblastos, bem como células epiteliais e endoteliais (LAPORTE et al., 2008).

Age em macrófagos inibindo a capacidade de produzir mediadores tóxicos (espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio) e citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e IL-8. Além disso, a IL-4 aumenta a expressão de moléculas MHC classe II nestas células. Macrófagos ativados por IL-4 foram chamados de macrófagos alternativamente ativados os quais expressam receptor fagocítico e exercem atividades diferentes quando comparados com os macrófagos classicamente ativados (MARTINEZ et al., 2009).

2.4.6 Interleucina 10

Foi descrita pela primeira vez uma substância presente no sobrenadante de células Th2, em 1988 por Fiorentino et al. (1989) que tinha a capacidade de inibir a produção de citocinas por células Th1 em cultura. Tal substância foi denominada fator inibidor da síntese

de citocinas. A denominação "interleucina-10" apareceu depois que se concluiu por análises imunológicas e bioquímicas que se tratava de uma nova citocina (MOORE et al., 1990).

IL-10, uma citocina anti-inflamatória, é segregada sobre diferentes condições de ativação imunitária por uma variedade de células, incluindo células T, células B, monócitos e macrófagos (SABAT, 2010). A produção de IL-10 por monócitos ativados por LPS, indica que a expressão de IL-10 pode ser regulada por "feedback" negativo nestas células. Dessa forma a secreção de IL-10 parece ser autolimitada (DE WAAL et al., 1991).

Durante a infecção, IL-10 inibe a atividade das células Th1, células NK, e macrófagos, ou seja, células necessárias para eliminar patógenos mas que também contribuem para a lesão do tecido. Em consequência, IL-10 pode tanto impedir a eliminação do patógeno como também melhorar a imunopatologia (COUPER et al., 2008). Embora a IL-10 seja classificada como uma citocina de tipo Th2, ela suprime uma ampla gama de respostas a doenças inflamatórias, sendo um fator importante na manutenção da homeostase (VILLALTA et al., 2007).

Os macrófagos são uma importante fonte de IL-10 durante a infecção (COUPER et al., 2008). A fonte, tempo e magnitude da produção de IL-10 determina o resultado de infecções por protozoários. IL-10 inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN γ pelas células NK (SOMMER E WHITE , 2010).

Novas terapias que utilizam a IL-10 são desenvolvidas para reações alérgicas e doenças autoimunes (SHARMA et al., 2010).

2.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula difusível, a qual está envolvida em condições fisiológicas e patológicas (PREDONZANI et al., 2015).

NO é produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado e macrófagos (ABBAS et al., 2008). O aumento na produção de NO está relacionado com a indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (CARLOS et al., 2005).

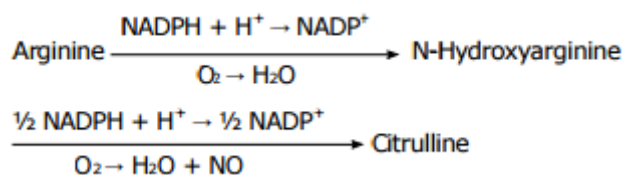
É sintetizado pela NO sintase (NOS), enzima presente em três isoformas, sendo a forma indutível (iNOS) a envolvida nas reações inflamatórias. Essa é induzida em macrófagos e em outras células (ABBAS et al., 2008).

A relação entre L- arginina e macrófagos é essencial para o desenvolvimento da inflamação nessas células e para a produção de NO, através da iniciação de uma sinalização intracelular. Frente a presença de uma endotoxina bacteriana, esse aminoácido aumenta a sensibilidade dos macrófagos a esse agente estranho (PEKAROVA E LOJEK, 2015).

L-arginina funciona é um substrato importante e imunomodulador de respostas inatas, e pode ser potencialmente utilizada como um imunonutriente (PEKAROVA E LOJEK, 2015). Vários estudos comprovam que a síntese de NO é dependente do transporte de L-arginina em células do endotélio, em leucócitos e em plaquetas (BRUNINI et al., 2003).

A síntese de NO, em várias condições fisiológicas e patológicas, depende de L-arginina extracelular. Esta dependência, que ocorre mesmo quando o nível intracelular de L-arginina disponível está em excesso, é denominado “O paradoxo da L-arginina” (BRUNINI et al., 2005).

Em sistemas biológicos, o NO é sintetizado enzimaticamente a partir de L-arginina de acordo com a seguinte reação química (PREDONZANI et al., 2015):



Durante as últimas décadas, o óxido nítrico (NO) tem sido reconhecido como um dos principais agentes envolvidos na imunidade e inflamação. A relevância de efeitos mediados por NO na regulação de qualquer imunidade seja ela inata ou adaptativa é inegável (PREDONZANI et al., 2015). NO possui potente ação vasodilatadora o que leva a um aumento da permeabilidade vascular. Além disso, atua como regulador do recrutamento de leucócitos e exerce ação citotóxica contra micro-organismos (ABBAS et al., 2008).

Devido às suas características químicas, NO pode reagir rapidamente com outros radicais livres para gerar diferentes espécies reativas de nitrogênio (RNS), que têm sido intrigantemente associados com diversas condições patológicas. As RNS estão envolvidas em

várias condições patológicas, tais como inflamação crônica, doenças autoimunes e cancro. Essas RNS aumentam a inflamação, afetam a estrutura de proteínas e suas funções, a expressão de genes, a sinalização celular e a morte celular revelando uma duplicidade das respostas mediadas por NO (PREDONZANI et al., 2015).

2.6 Fitoterapia

A fitoterapia é o estudo das plantas medicinais e fitoterápicos e outros produtos. Vem do grego “therapeia” tratamento e interações medicamentosas existentes entre os “phyton”: vegetal (SILVEIRA et al., 2008). Os chamados medicamentos “fitoterápicos” são preparações vegetais padronizadas que consistem de uma mistura complexa de uma ou mais substâncias presentes na planta que são preparados adequadamente e posteriormente prescritos em obediência à legislação vigente (DI STASI, 2007).

Os remédios populares têm importante papel em países em desenvolvimento, em especial em locais onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é limitada (AGRA et al., 2007). Grande parte dos produtos farmacêuticos que são elaborados usando plantas, somente foram possíveis a partir de informações obtidas junto a população que despertaram o interesse da indústria farmacêutica (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010). É a chamada “corrida pelo conhecimento tradicional”, marcada pela valorização deste conhecimento para futuras pesquisas (REZENDE, 2005).

Cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para fins medicinais porém a maioria das plantas não foi investigada tanto química quanto biologicamente. Desta forma, a descoberta pela comunidade científica de compostos e plantas com função terapêutica vai de encontro aos conhecimentos populares que já utilizam as plantas baseados em experiências passadas de geração a geração por meio de indicações empíricas. Muitas plantas medicinais nativas possuem potencial para novos estudos voltados para interesse social e ecológico, como doenças endêmicas negligenciadas ainda persistentes no país (BESSA, 2013).

Nas pesquisas com fitoterápicos o uso popular pode sugerir espécies potencialmente importantes, porém, faz-se necessário uma série de estudos, entre eles, a identificação de espécies com comprovada ação farmacológica e/ou substâncias biologicamente ativas (MACHADO E OLIVEIRA, 2014).

Atualmente a demanda por medicamentos à base de plantas medicinais é crescente. O uso de fitoterápicos aumentou em países em desenvolvimento, bem como em países desenvolvidos, como uma forma adicional para tratar e prevenir doenças. A grande extensão, aproximadamente um terço da flora mundial, e diversidade da flora brasileira é uma vantagem na busca de plantas com potencial terapêutico (SILVA et al., 2013) já que plantas da floresta tropical representam uma rica fonte de substâncias potencialmente imunomodulatórias (WILLIAMS, 2001).

2.7 *Carapa guianensis*

O gênero *Carapa* pertence a família botânica Meliaceae e contém duas espécies, *Carapa guianensis* e *Carapa procera*, que são conhecidas na Amazônia sob o mesmo nome de andiroba, sendo dificilmente diferenciadas (FERRAZ et al., 2002). É amplamente distribuído em toda Amazônia e ocorre em alta frequência em floresta de terra firme e na várzea (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2004). Foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês Jean-Baptiste Christopher Fuscé Aublet (1720-1778), em 1775, na Guiana Francesa, como pertencente a esta família (CARIOCA, 2002).

Carapa guianensis Aublet (Meliaceae), ou andiroba, é uma árvore nativa da floresta tropical da América do Sul que pode medir até 50 m de altura é facilmente reconhecível pelo seu porte grande, flores perfumadas e esbranquiçadas (INOUE et al., 2013).

C. guianensis pode ser encontrada em toda a região Amazônica, em várzeas secas e alagadiças, beiras de rios e igarapés do Pará até a Bahia. Floresce duas vezes ao ano, agosto-setembro e janeiro-fevereiro, já os frutos amadurecem em junho-julho e fevereiro-março (LORENZI, 1992; AMBROZIN et al., 2006).

A casca cinzenta e grossa; folhas impinadas ou abrupto-impinada composta por inúmeros folíolos subopostos, elíptico-oblongo; flores pequenas, amarelas ou vermelhas, axilares; fruto capsular ovóide semi-globoso, lenhoso; número variado de sementes vermelhas, coriáceas e quase lenhosas, convexas, angulosas ou irregularmente tetraédricas, achatadas lateralmente (CORRÊA, 1926).

Carapa spp, é uma espécie de uso múltiplo, sua madeira e o óleo extraído das suas sementes são os produtos mais importantes. A madeira obtida desta planta é de excelente qualidade e resistente contra insetos. O óleo extraído de suas sementes é muito procurado para uso medicinal e cosmético, aumentando sua exploração extrativista (FERRAZ et al., 2002) . O chá da casca é utilizado para febre, como repelente de insetos e na fabricação de vela, sabão e xampu, pode ser também usado para tratar feridas e vermes (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2004).

O nome andiroba é amplamente usado no Brasil com variações como andiroba-branca, andiroba-de-igapó, andiroba-lisa, andiroba-vermelha (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 2004). O óleo das sementes é um dos produtos medicinais da floresta amazônica mais vendido e vem sendo utilizado por comunidades indígenas da Floresta Amazônica como antipirético, anti-malária, inseticida (MIRANDA JÚNIOR et al., 2012), para o tratamento de tosse , convulsões, doenças de pele, artrite , reumatismo, infecções de ouvido e para curar as feridas e contusões (COSTA-SILVA et al., 2008).

O óleo de andiroba é quase exclusivamente composto por material saponificável com alta porcentagem de ácidos graxos insaturados, ácido palmítico, oléico (cerca de 50%) e linoléico, de grande interesse para a indústria de cosméticos (CASTRO et al., 2006). A fração não saponificável, cerca de 2 a 5% (TAYLOR, 1984), é rica em substâncias amargas, chamadas meliacinas ou limonóides, os quais são os compostos responsáveis pelos efeitos medicinais da planta (AMBROZIM et al., 2006). Dentre os limonoides encontrados no óleo da semente de *C. guianensis* estão: 6 α -acetoxygedunin, 7-desacetoxi-7-oxogedunin, andirobina, gedunin e metil-angolensate (HENRIQUES E PENIDO, 2014). Diversas atividades biológicas são atribuídas aos compostos limonóides como sua ação inseticida, antibacteriana, antifúngica, antimalárica, anticancerígena e antiviral (DA SILVA et al., 2009).

Os limonóides, uma série de estruturalmente diversa de tetranortripenoides ou tetra-nor-triterpenos, são encontrados principalmente na Família Meliaceae e têm atraído a atenção dos pesquisadores, sendo considerados metabólitos típicos das meliáceas. Diversos limonóides já forma isolados de *C. guianensis*. A partir do óleo da flor foram obtidos 7-desacetoxi-7-oxogedunin, 6 α -acetoxygedunin , methylangolensate , 6 α -hydroxygedunin , 6 α -acetoxy-7 α deacetoxy- 7 α -hydroxygedunin , gedunin e 7-desacetoxi-7-hydroxygedunin (SAKAMOTO et al., 2015).

Dois novos gedunins, um andirobin, dois mexicanolides, e um limonóides-tipo phragmalin, chamado Andiolides Q, R, S, T, L e V, foram isolados a partir de um óleo da flor de Aublet *Carapa guianensis* (Meliaceae) (SAKAMOTO et al., 2013). Novos limonóides, conhecidos como carapanolides foram isolados por Matsui et al. (2014) e nomeados J-L. Três novos andiolides, W-Y, foram isolados a partir do óleo de flor de *C. guianensis* (Sakamoto et al., 2015). Além dos limonóides: 17 β -hidroxiazadiradiona, 6 α -acetoxigedunina, 7-deacetoxi-7-oxogedunia, deacetilgedunina, andirobina, gedunina, metil-angolesato (AMBROZIN et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Três novas geduninas, H, I e J, uma andirobina, K, três mexicanolides, L, M e N, e dois limonoides do tipo andiolides, O e P, foram isoladas a partir de um óleo da flor de *Carapa guianensis* Aublet (TANAKA et al., 2012).

Dois novos limonoids guianolides, denominadas A e B, foram isolados a partir das sementes de *C. guianensis* (INOUE et al., 2013).Três novos andiolides, W-Y, foram isolados a partir do óleo de flor de *C. guianensis*, são eles : 7-desacetoxi-7-oxogedunin, 6 α -acetoxypedunin, methylangolensate, 6 α -hydroxygedunin, 6 α -acetoxi-7 α deacetoxi- 7 α -hydroxygedunin, gedunin e 7-desacetoxi-7-hydroxygedunin a partir do óleo da flor (SAKAMOTO et al., 2015).

Limonóides tetranortripenoides são de interesse considerável devido às suas variedades estruturais e atividades biológicas, tais como inseticidas, agentes antibacterianos, antifúngicos, antimaláricos, anti-cancro e anti-viral. Eles contêm átomos de oxigênio que conferem uma polaridade moderada e são responsáveis pelas dificuldades na sua separação por meio de métodos cromatográficos tradicionais (DA SILVA et al., 2009).

Limonoides tetranortripenoides isolado de *C. guianensis* apresentam efeitos inibitórios sobre eosinófilos e linfócitos T, através do qual eles prejudicam a diferentes mecanismos que mediam a resposta alérgica (FERRARIS et al., 2011).

O óleo das sementes da planta é eficaz para o tratamento de inflamações e infecções, e como agentes anti-alérgicos através da inibição da formação de edema por insuficiência de vias de sinalização desencadeada por histamina, bradicinina e fator de ativação de plaquetas (HENRIQUES E PENIDO, 2014).

Tem ação para tratamento de cicatrização de feridas, aumentando a taxa de contração da ferida e da resistência da pele (NAYAK et al., 2011), e cicatrização do estômago (SANTOS et al., 2013).

Sobre a toxicidade, quando administrado via oral em ratos Wistar, o óleo de semente de *C. guianensis* não induziu alterações significativas em parâmetros bioquímicos, hematológicos e morfológicos, mas há indícios de uma possível toxicidade hepática (COSTA-SILVA et al., 2008). A parte não saponificável do óleo de andiroba foi atribuída ação antiplasmódica ao *Plasmodium falciparum*, agente transmissor da malária a humanos (MIRANDA JÚNIOR et al., 2012), o óleo bruto apresenta toxicidade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* isoladas do formigueiro (OLIVEIRA, 2006) e o óleo possui efeito como repelente contra a picada do mosquito do gênero *Aedes* sp. (MIOT et al., 2004).

A mistura de óleos essenciais de *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* e *C. guianensis* e extrato fermentado de *Carica papaya agiram* em sinergia como um larvicida em *Aedes aegypti* (TORRES et al., 2014).

A atividade ovicida contra nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos *in vitro*, demonstrada pelo óleo da semente de *C. guianensis* evidencia a atividade anti-helmíntica deste fitoterápico e a possibilidade como alternativa para o controle de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos (FARIAS et al., 2000).

Em estudo *in vitro* com macrófagos peritoneais estimulados com LPS, limonóides isolados da flor de *C. guianensis* demonstraram ação inibidora de óxido (SAKAMOTO et al., 2015). Matsui et al. (2014) em estudo similar com óleo da semente de *C. guianensis*, também encontrou efeito inibidor sobre NO, tendo o carapanolide J (C26H30O7) efeito inibidor superior ao da droga padrão.

As propriedades, os índices de acidez e peróxidos e o rendimento do óleo de andiroba, confirmam a potencialidade da utilização deste óleo na indústria cosmética e farmacêutica (DAMASCENO et al., 2003).

2.8. Nanoemulsões

As emulsões são dispersões de pelo menos dois líquidos imiscíveis. As nanoemulsões são as emulsões ultrafinas, uniformes, em que os glóbulos estão em escala nanométrica, que varia de 20-500nm (ROCHA-FILHO et al., 2014). O prefixo "nano" está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007). Os nanocompósitos são materiais híbridos, nos quais pelo menos um de seus componentes tem dimensões nanométricas (ASSIS et al., 2012).

Nanoemulsões são emulsões com tamanho de submicron que estão sob investigação extensa como veículos de fármacos para melhorar a entrega de agentes terapêuticos. Estas representam um sistema de nanopartículas avançado para a entrega sistêmica de princípios ativos na indústria farmacêutica para liberação controlada de fármacos (THAKUR et al., 2012).

As vantagens do uso de nanoemulsões são a sua maior interação com biomoléculas; maior penetração, otimização do efeito cosmético (SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004), a sua baixa viscosidade e capacidade de se espalhar melhor pela pele o que seria desejável para elaboração de produtos tópicos (ROCHA-FILHO et al., 2014), estabilidade física e físico-química, sua capacidade de servir como veículos para fármacos hidrofílicos e lipofílicos, fornecer aumento da taxa de absorção e biodisponibilidade, da estabilidade de fármacos e também aumento da permeação cutânea, além de possuir características sensoriais mais agradáveis para aplicação em cosméticos (THAKUR et al., 2012).

O tamanho nano proporciona maior área de superfície e, portanto, aumenta a velocidade de absorção, reduz a variabilidade e, assim, aumenta a biodisponibilidade de drogas (THAKUR et al., 2012). A principal razão para as diferenças no comportamento entre materiais compostos e nanocompósitos está relacionada com a elevada área superficial destes últimos, resultando em intensa interação entre a matriz na qual estão inseridos e as nanopartículas (ASSIS et al., 2012). Nanoemulsão é uma grande promessa para o futuro dos cosméticos, diagnóstico, terapias e biotecnologias de fármacos (THAKUR et al., 2012)

Nanoemulsões são sistemas muito frágeis por natureza. Como eles são transparentes e, geralmente, muito fluidos, ao menor sinal de desestabilização aparece facilmente. Eles se tornam opacos e desnatamento podem ser visíveis. Foram identificadas duas principais fontes de instabilidade em sistemas estes que são descritos no presente documento: um causada pela natureza da fase de óleo e outro proveniente da adição de polímeros para espessar ou gelificar a nanoemulsão, Tem como desvantagens também a grande concentração de agentes tensoativos, co-agentes tensoativos, instabilidade pode ser causada devido ao efeito Oswald de amadurecimento. A sua estabilidade é afetada pela temperatura e pH (THAKUR et al., 2012).

Apesar da instabilidade termodinâmica, as nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos, especialmente para aqueles de reduzida hidrossolubilidade. Estudos recentes descrevem a possibilidade de redução de toxicidade, aumento de atividade, janela terapêutica e biodisponibilidade e, em alguns casos, uma liberação controlada e direcionada de fármacos incorporados nesses sistemas (DATE et al., 2008).

Nanoemulsões são sistemas muito frágeis por natureza. Como eles são transparentes e, geralmente, muito fluidos, ao menor sinal de desestabilização aparece facilmente. Eles se tornam opacos e desnatamento podem ser visíveis. Foram identificadas duas principais fontes de instabilidade em sistemas estes que são descritos no presente documento: um causada pela natureza da fase de óleo e outro proveniente da adição de polímeros para espessar ou gelificar a nanoemulsão (ASSIS et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o efeito imunomodulatório *in vitro* da nanoemulsão e do óleo de *Carapa guianensis* em macrófagos RAW 264.7.

3.2 Específicos

- Quantificar os níveis de nitrito em sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*.
- Quantificar a produção de citocinas IL-12, TNF α , IL-4, IL-1 β , IL-10 e IFN- γ em sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do óleo da semente de *C. guianensis* (andiroba)

As sementes da andiroba foram coletadas a partir de 20 localidades do Estado do Pará. O óleo de andiroba foi processado e caracterizado pelo Laboratório de Química da Universidade Federal do Pará. As amostras foram coletadas e os frutos conservados sob refrigeração (12 °C) e transportados para local apropriado, onde foram processados e foi feito o processo de puba para extração do óleo in natura via solvente orgânico. A extração por solvente foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Sousa Filho (2007).

4.2 Obtenção da nanoemulsão de *C. guianensis* (andiroba)

A nanoemulsão foi obtida a partir do óleo da semente de *C. guianensis*, com concentração de 10% de óleo de andiroba, 10% de água e 20% de surfactante. A densidade do óleo de andiroba usada foi de 0,95939g/mL.

A composição química e a metodologia ainda não podem ser divulgadas por proteção por patente do resultado da pesquisa.

4.2 Padronização da emulsão do óleo de andiroba

Para a realização dos microtestes o primeiro procedimento adotado foi resolver o problema da solubilização do óleo de andiroba, haja vista que o mesmo por ser muito lipofílico é de difícil solubilização em meio aquoso, 0,08 gramas do óleo foi diluído em 1 ml de DMSO e depois foi necessário utilizar um agente solubilizante ou emulsificante para estabilizar a solução de trabalho (RPMI 1640 sem soro fetal bovino). Com isso, inicialmente as soluções foram preparadas a temperatura ambiente em cinco concentrações que variaram de 800µg/ml a 2,5 µg/ml.

4.3 Padronização da nanoemulsão da andiroba

A nanoemulsão utilizada era constituída por 10% óleo de *C. guianensis*, 10% de água e 20% de surfactante. O óleo possui densidade de 0,95939 g/ml. A quantidade de 0,08 gramas da nanoemulsão foi diluída em 1 ml de DMSO e depois com a diluição em meio RPMI 1640

(sem soro fetal bovino) foram preparadas a temperatura ambiente as cinco concentrações que variaram de 800µg/ml a 2,5 µg/ml.

4.4 Linhagens Celulares

A linhagem celular utilizada foi a de macrófago RAW 264.7 (ATCC TIB-71), cedida pelo Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro-RJ). É uma linhagem de macrófagos derivados de tumores induzidos pelo vírus de Abelson Murine Leukemia vírus, em camundongos machos BALB/c. Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de leucemia Abelson, obtidos da ascite de ratos BALB/c (ABELSON, 1970). Estas células possuem receptores para imunoglobulinas e produzem lisozimas (ABCAM, 2009). Também são capazes de responder de forma similar aos macrófagos obtidos diretamente de camundongos, além de serem alvos de ativação por polissacarídeos (RAMAMOORTHY E TIZARD, 1998).

4.6 Condições de cultura celular macrófagos RAW 264.7

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas à temperatura de 37°C e 5% de CO². O meio utilizado foi RPMI 1640 (Gibcon BRL) suplementado com 10 ml L-glutamina (20 mM) e 10 ml de solução antibiótica e antimicótica (Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized- Sigma) contendo 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25µg de anfotericina B por ml. O meio foi suplementado com 10% (V/V) Soro Bovino Fetal (SBF) (Cultilab).

A suspensão celular foi então distribuída em novas garrafas de cultura estéreis novamente mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C (LÉO et al., 2008). A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido (OLYMPUS MOD. CK2).

4.7 Citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

A avaliação da citotoxicidade foi realizada conforme adaptação da técnica Mosmann (1983). Foram adicionados 100 µl de macrófagos RAW 264.7 (2x10⁶ células/mL) na concentração de 5 x 10⁴ em três placas de 96 poços. As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C com 5% CO₂. No dia seguinte retirou-se o meio RPMI e adicionou-se nos poços 100 µl de nanoemulsão, nas concentrações seriadas 800, 400; 200; 100;50 e 25 µg/ mL.

Em outros poços 100 µl do óleo de *C. guianensis* nas mesmas concentrações seriadas. Para cada concentração, foi mantido um controle negativo somente com a nanoemulsão e o meio e outra com o óleo e o meio. O controle positivo foi feito com as células e a droga de referência para avaliação de citotoxicidade, DMSO.

Todos os grupos foram feitos em triplicata. Após a adição da nanomulsão e do óleo, as placas foram divididas em três grupos, um para 24, um para 48 e outro para 72 horas, de acordo com o tempo de permanecimento em estufa a 37°C com 5% CO₂ e tempo de coleta dos sobrenadantes. Em cada um dos grupos, após decorrido o tempo estipulado, adicionou-se 10 µl de MTT na concentração de 5 mg/mL e incubou-se novamente a placa por 2 horas em estufa sob as mesmas condições.

Em seguida, foi feita a centrifugação a 1500 rpm durante 10 minutos e depois retirado 100 µl do sobrenadante de cada poço, depois foram adicionados e homogeneizados 100 µl de DMSO em cada poço. A placa foi colocada em agitador por 30 minutos.

A seguir, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

4.8 Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo e nanoemulsão de *C. guianensis* sem estímulo com LPS

O experimento foi realizado em placa de 96 poços, com cada grupo em triplicata e repetido duas vezes. A concentração de células por poço foi de 2×10^6 . As células foram plaqueadas com 390 µL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, permanecendo overnight. No dia seguinte, foi retirado o meio e lavou-se com 1 ml de PBS (ph 7.4). Então o PBS foi retirado e acrescentou-se 990 µL de meio RPMI 1640 sem soro e foram feitas as diluições para as concentrações de nanoemulsão ou do óleo de *C. guianensis*. As concentrações escolhidas foram baseadas no resultado da citotoxicidade e foram de 10, 5 e 2,5 µg/ mL. O grupo controle negativo foi de células incubadas apenas com meio RPMI 1460 e o controle positivo com células com meio RPMI 1460 e estimuladas com LPS, houve ainda um grupo estimulado com LPS e tratado com a droga antiinflamatória de referência dexametasona (2mg/ml). Após 24, 48 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados para a análise das citocinas IL-12, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10, IFN- γ e da produção de nitrito.

4.9 Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo ou nanoemulsão de *C. guianensis* com prévio estímulo com LPS

O experimento foi realizado em placa de 96 poços, com cada grupo em triplicata e repetido duas vezes. A concentração de células por poço foi de 2×10^6 . AS células foram plaqueadas com 390 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, permanecendo overnight. No dia seguinte tirou-se o meio e lavou-se com 1 ml de PBS (ph 7.4). Então o PBS foi retirado e se acrescentou 990 μ L de meio RPMI 1640 sem soro e foi adicionado 10 μ L de LPS (1 mg/ml) em cada poço correspondente.

Após 1 hora de contato com LPS, foi retirado 1 mL e adicionado 1 mL de PBS para lavagem e depois retirado. Acrescentou-se então 990 μ L de meio RPMI 1640 sem soro e foram acrescentadas as concentrações de nanoemulsão ou do óleo de *C. guianensis* de 10, 5 e 2,5 μ g/ mL.

O grupo controle negativo foi de células incubadas apenas com meio RPMI 1460 e o controle positivo com células com meio RPMI 1460 e estimuladas com LPS, houve ainda um grupo estimulado com LPS e tratado com a droga antiinflamatória de referência dexametasona (2mg/ml).

Após 24, 48 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados para a análise das citocinas IL-12, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10, IFN- γ e da produção de nitrito.

4.10 Macrófagos RAW 264.7 tratados com óleo ou nanoemulsão de *C. guianensis* com posterior estímulo com LPS

O experimento foi realizado em placa de 96 poços, com cada grupo em triplicata e repetido duas vezes. A concentração de células por poço foi de 2×10^6 . As células foram plaqueadas com 390 μ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino, permanecendo overnight. No dia seguinte tirou-se o meio e lavou-se com 1 ml de PBS (ph 7.4). Então o PBS foi retirado e se acrescentou 990 μ L de meio RPMI 1640 sem soro e acrescentou-se e foram acrescentadas as concentrações de 10, 5 e 2,5 μ g/ mL de nanoemulsão ou do óleo de *C. guianensis*. Após 1 hora foi adicionado estímulo com LPS.

O grupo controle negativo foi de células incubadas apenas com meio RPMI 1460 e o controle positivo com células com meio RPMI 1460 e estimuladas com LPS, houve ainda um

grupo estimulado com LPS e tratado com a droga antiinflamatória de referência dexametasona (2mg/ml).

Após 24, 48 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados para a análise das citocinas IL-12, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10, IFN- γ e da produção de nitrito.

4.11 Dosagem de citocinas

A partir do sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 incubados por 24, 48 e 72 horas foram mensuradas as produções de IL-12, TNF- α , IL-4, IL-1 β , IL-10, IFN- γ por Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences, EUA).

4.12 Dosagem de nitrito

A concentração de nitrito das amostras foi mensurada a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 incubados por 24, 48 e 72 horas pelo método colorimétrico de Griess (GREEN et al., 1982). O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida e 0.1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato (Vetec) em ácido ortofosfórico (H₃PO₄) a 5%. As amostras foram transferidas em triplicatas, para uma placa tipo ELISA de 96 poços. O mesmo volume (50 μ l) do reagente de Griess foi adicionado em cada poço. Após 10 minutos, a densidade óptica (absorbância) foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA com comprimento de onda de 570 nm.

4.13 Análise estatística

A concentração de nanoemulsão e do óleo de *C. guianensis* que reduz a viabilidade celular em 50% (CC50) quando comparada com o controle de citotoxicidade foi determinada através das regressões não lineares das médias das triplicatas encontradas para cada concentração através do programa GraphPad Prism 6.

Os valores da citotoxicidade e das liberações de citocinas foram representados como média \pm desvio padrão. Os dados não paramétricos foram analisados pela ANOVA por teste de Kruskal–Wallis com pós Teste de Dunn.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7 foram analisados por meio da viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas (Figura 2).

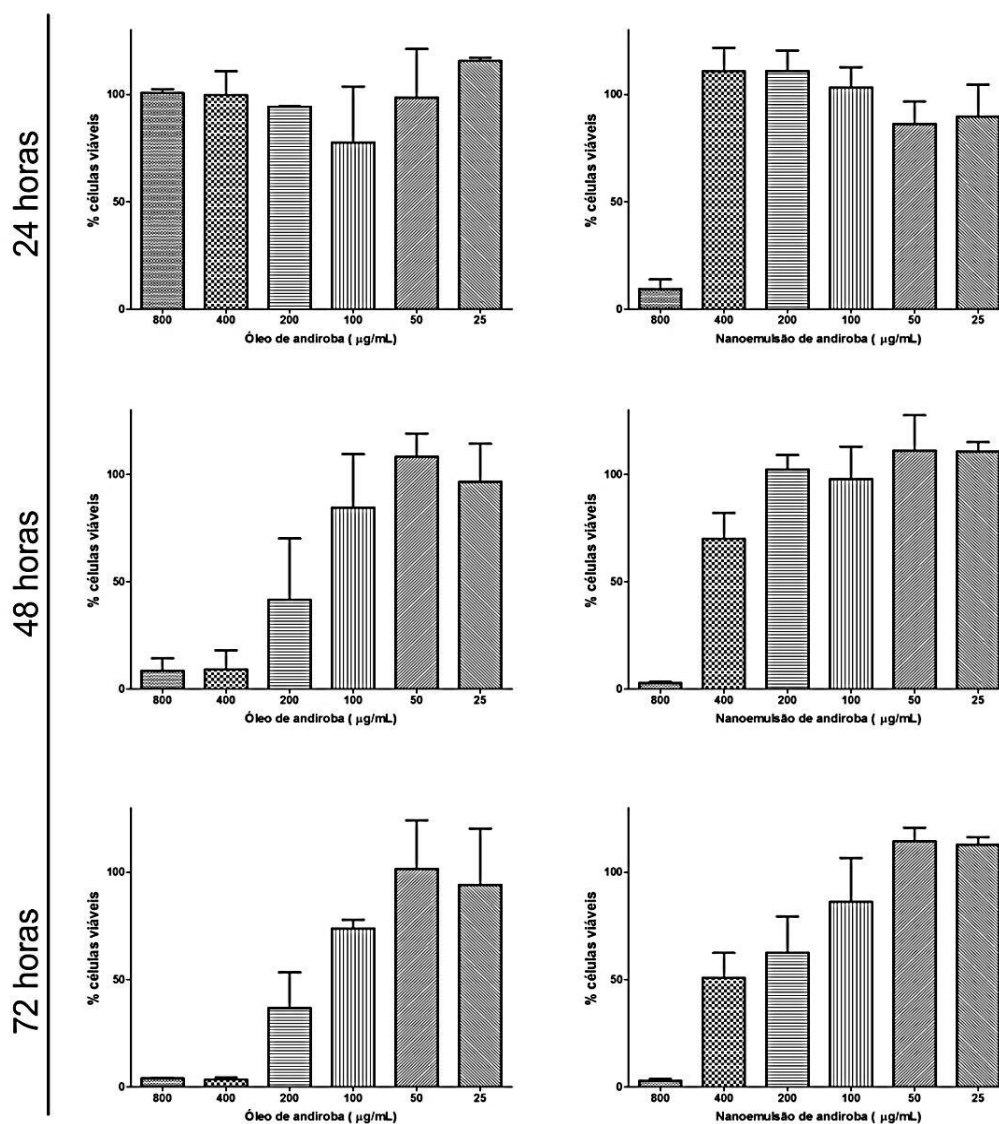


Figura 2. Efeito da nanoemulsão e do óleo de *C. guianensis* na viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas. Os valores representam média \pm desvio padrão das triplicatas do experimento. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Nanoemulsão na concentração de 800 µg/ml foi a mais tóxica e apresentou acentuado decréscimo na viabilidade celular em comparação com as outras concentrações neste tempo.

Talvez a maior concentração associada a maior taxa de absorção celular, característica típica das nanoemulsões (THAKUR et al., 2012) seja a justificativa.

A concentração do óleo de *C. guianensis* que reduziu 50% da viabilidade celular (CC50) após 48 horas de incubação o CC50 do óleo foi de $199,6 \pm 0,1278$ µg/ml e da nanoemulsão foi de $477,8 \pm 0,1622$ µg/ml e em 72 horas foi de $167,3 \pm 0,1302$ µg/ml para o óleo e de $349,5 \pm 0,1775$ µg/ml de nanoemulsão. Após 24 horas de incubação, as CC50 foram as mais elevadas de todos os tempos, como já era esperado já que essa tende a reduzir-se com o decorrer do tempo.

Não há registro na literatura de citotoxicidade de *C. guianensis* em macrófagos RAW 264.7, da fração total óleo ou nanomemulsão e sim de compostos isolados como da planta como os carapanolides. Matsui et al. (2014) encontrou no carapanolide J ($C_{26}H_{30}O_7$) e carapanolide L ($C_{33}H_{38}O_{13}$) não-toxicidade em 3-100 mM, enquanto o Carapanolide K ($C_{39}H_{50}O_{13}$) exibiu citotoxicidade maior para macrófagos peritoneais de ratos após 24 horas de incubação, dados de citotoxicidade foram encontrados nesse mesmo tempo em nosso trabalho mas em concentrações bem mais elevadas da nanoemulsão (800 µg/ml).

Sakamoto et al. (2013) testou a citocidade para linhagem de células P388 do tipo leucêmica de camundongo e encontrou siginificativa citotoxicidade para andirolide S ($C_{29}H_{36}O_9$) e andirolide T ($C_{34}H_{44}O_{12}$) (IC50 of 1.4 µM para andirolide s; 1.8 µM para andirolide t). Em células HL-60 da linhagem leucêmica para humanos houve IC50 de 1.3 µM para andirolide s e andirolide t, atribuidno essa citotoxicidade a fração 2-metilbutiriloxi.

De acordo com os resultados de citotoxicidade foram as escolhidas as concentrações para estudo in vitro na mesma linhagem celular, as concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml foram eleitas por forneceram com segurança ausência de toxicidade para as células.

A produção de óxido nítrico foi mensurada indiretamente através da dosagem de nitrito (Figura 3). A dosagem de NO propriamente dito torna-se difícil devido sua evanescência, e em sua rápida oxidação a nitrito e nitrato, considera-se a concentração de nitrito e nitrato como prova de sua produção (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

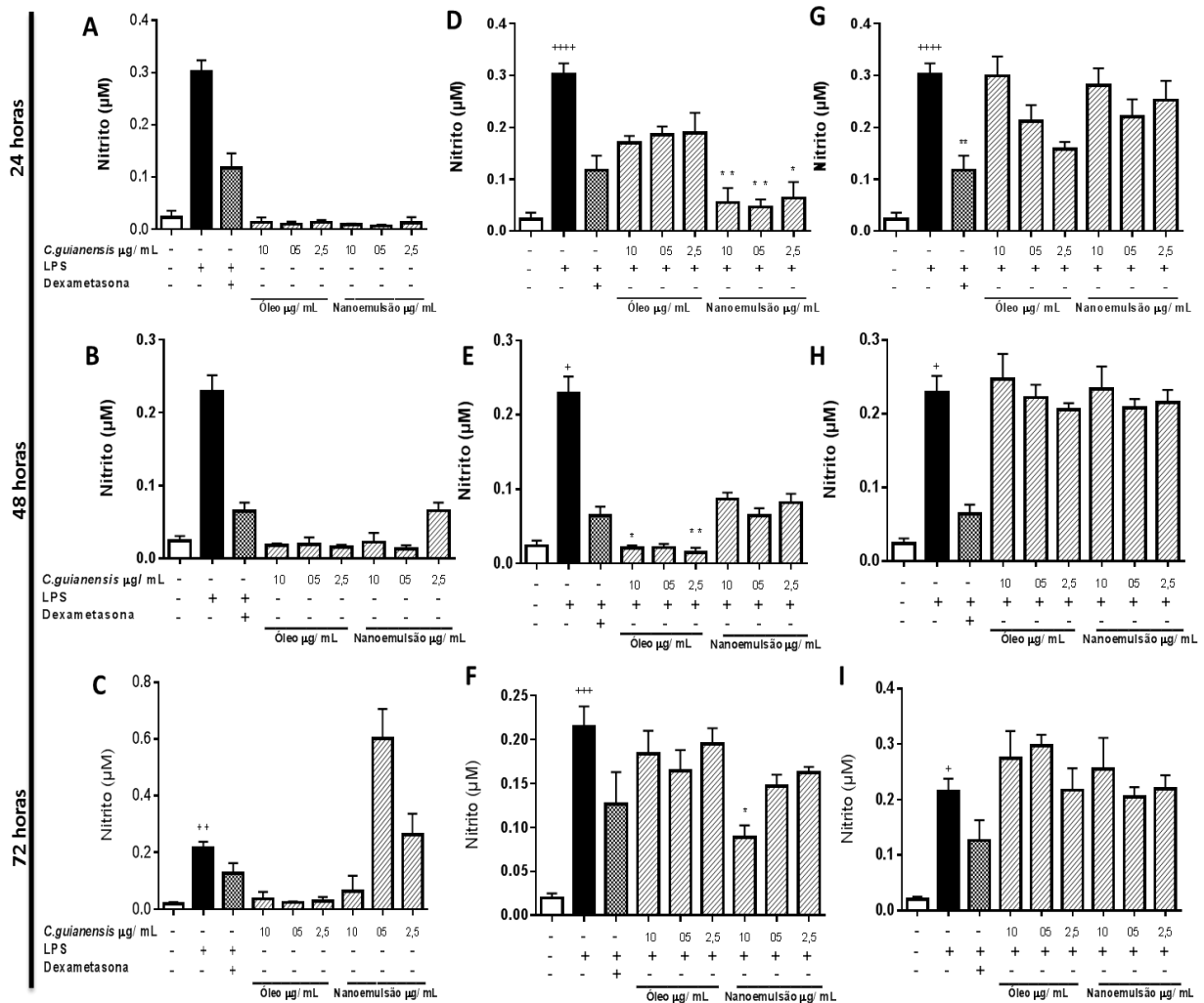


Figura 3. Concentrações de nitrito (pg/mL) em sobrenadante de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. ++ Representa $p < 0,01$. +++ Representa $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo. *** Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo. **** Representa $p < 0,0001$.

Os grupo não estimulado com LPS (Figura 3, A, B e C) e tratados com óleo ou nanoemulsão de *C. guianensis* tiveram liberação de nitrito semelhante ao grupo negativo em 24 e 48 horas. Em 72 horas as concentrações de 05 e 2,5 µg/ml nanoemulsão promoveram maior liberação de nitrito sem diferença estatística com o grupo controle negativo.

Nos grupos com estímulo prévio com LPS (Figura 3, D, E e F), a nanoemulsão reduziu significativamente a liberação de nitrito em 24 horas de incubação. Em 48 horas a concentração de 10 e 2,5 µg/ml do óleo também promoveram redução nessa liberação. Matsui et al. (2014) em estudo com limonóides isolados do óleo da semente de *C. guianensis*, também encontrou efeito inibidor sobre NO, tendo o carapanolide J (C26H30O7) efeito inibidor superior ao da droga padrão L-NMMA após 24 horas de incubação com macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS. Em estudo in vitro com macrófagos peritoneais estimulados com LPS, limonóides isolados da flor de *C. guianensis* também demonstraram ação inibidora sobre óxido nítrico (SAKAMOTO et al., 2015).

Nos grupos com estímulo posterior com LPS a nanoemulsão e o óleo tiveram efeito semelhante ao grupo controle positivo (Figura 3, G, H e I).

Óxido nítrico é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imunológico, que expressam a isoforma induzível (ou tipo II) da NO sintase (NOS). O NO gerado nestas circunstâncias ocasiona “danos oxidativos” letais às células-alvo, tais como células neoplásicas ou bactérias (CORREIA & MUSCARÁ et al., 2005).

Óxido nítrico possui papel importante na sinalização intra e extra-celular e está envolvido em muitos processos fisiológicos dos mamíferos, que incluem a neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, inflamação, reações imunológicas e nos mecanismos de defesa contra microorganismos e neoplasias (COSTA et al., 2003).

A produção de NO podem culminar em efeitos indesejáveis, devido ao tênue limite de concentração tissular entre a não-toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação antimicrobica. Portanto, o NO atua como toxina conforme a concentração e o tecido em questão. A diversidade de efeitos do NO parece estar relacionada às concentrações de ON gerados, à sensibilidade individual das células e à duração do fenômeno (COSTA et al., 2003).

O descontrole na sua síntese está implicado na patogênese de doenças cardiovasculares, autoimunidade, rejeição de transplantes, doenças degenerativas, na sépsis, na genotoxicidade e no surgimento de neoplasias. O NO também foi incriminado como agente

iniciador da carcinogênese, que, associado a outros fatores, poderia levar ao descontrole da citostase e da diferenciação celular (COSTA et al.,2003).

Nos grupos tratados apenas com *C. guianensis*, sem estímulo com LPS, as concentrações de nanomemulsão estimularam uma maior liberação de IFN- γ em 24 horas, maior até que o grupo controle positivo. Em 48 horas, a liberação para nanomemulsão não foi detectável, e em 72 horas a maior concentração (10 $\mu\text{g/ml}$) estimulou maior liberação. Para macrófagos tratados com o óleo, o maior estímulo para liberação de IFN- γ ocorreu em 48 horas (Figura 4).

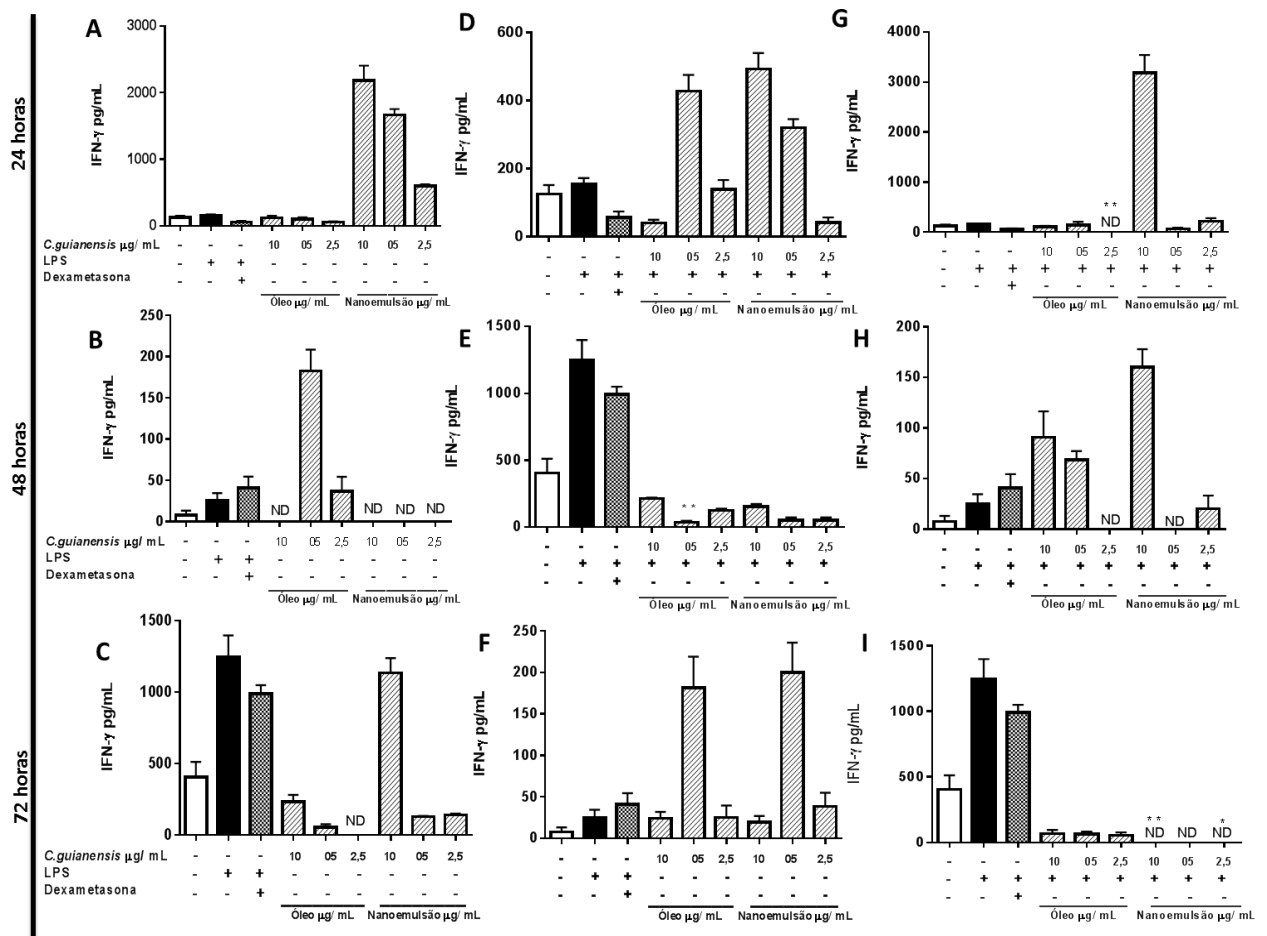


Figura 4. Concentrações de IFN- γ (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As letras A, B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle positivo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo. ND= níveis não detectáveis.

Para grupos estimulados anteriormente com LPS em 48 horas de incubação o óleo em 5 µg/ml promoveu redução na liberação de IFN- γ pelas macrófagos em comparação com o grupo controle positivo.

Para grupos com estímulo posterior com LPS, em 24 horas o óleo em 2,5 µg/ml reduziu significativamente a liberação desta citocina(Figura 4, G) e em 72 horas a nanoemulsão em 10 e em 2,5 µg/ml reduziu significativamente a liberação de IFN- γ (Figura 4 , I).

Ferraris et al. (2011) dosaram os níveis de IFN- γ a partir do sobrenadante de esplenócitos de camundongos C57BL/6 , após tratamento com diferentes tetranortriterpenóides (TNTPs) isolados da semente de *C. guianensis*, e encontrou redução dos níveis desta citocina na concentração de 50 µg/ml.

Tanto a resposta Th1 como a resposta Th2 são fundamentais para a defesa do hospedeiro frente aos desafios imunológicos. Essas respostas são consideradas antagônicas e a citocina IFN- γ modula negativamente a resposta Th2 enquanto IL-4 modula negativamente a resposta Th1 (MILLS & MCGUIRK, 2004).

Essa citocina interfere na modulação da resposta inflamatória através da ativação macrófagos para sua forma clássica de ativação (M1) os quais induzirão a inflamação através de citocinas inflamatórias (MANTOVANI et al., 2004).

É uma das principais citocinas envolvidas na reposta imune mediada por células, portanto essencial para a eliminação de infecções intracelulares como bactérias, pois induz macrófagos a destruir e/ou restringir o crescimento destas (DORMAN & HOLLAND, 2000) através do aumento da produção de reativos de oxigênio e nitrogênio que potencializam a resposta microbicida (JAYACHANDRAN et al., 2007).

Ao IFN- γ também se atribui efeito antitumoral e que este se acumula em macrófagos no local da inflamação (SCHRODER et al., 2004).

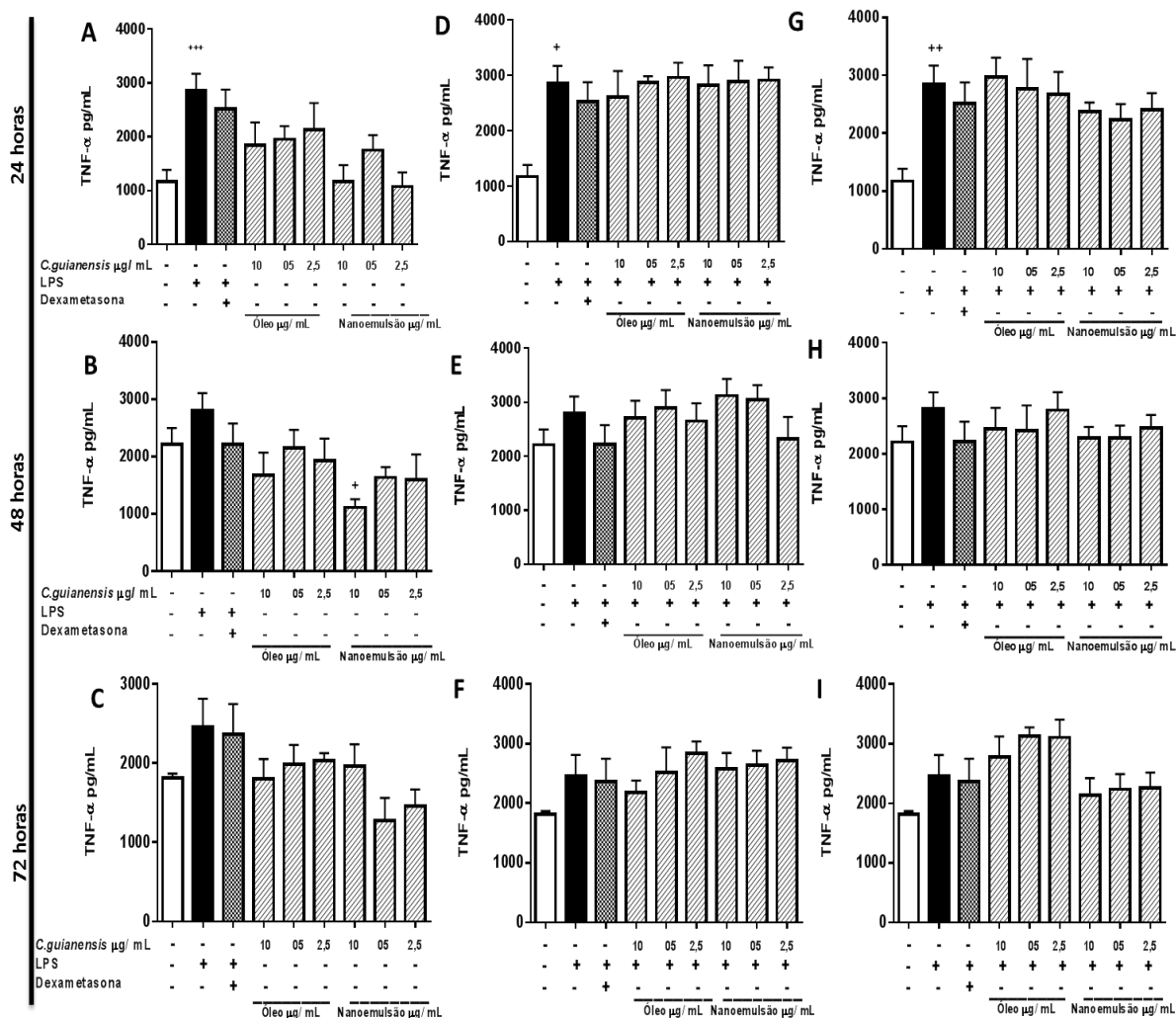


Figura 5. Concentrações de TNF- α (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 μ g/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As letras A, B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle positivo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo. + Representa $p < 0,05$. +++ Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo.

A liberação de TNF- α nos grupos tratados com o óleo e nanoemulsão e não estimulados foi estatisticamente semelhante a de células tratadas apenas com meio (controle negativo). Exceto pela maior concentração de nanoemulsão (10 μ g/ml) que reduziu a liberação em 48 horas (Figura 5, B).

Em grupos tratados com a planta e estimulados com LPS (anteriormente ou posteriormente) todas as concentrações de óleo e nanoemulsão liberaram concentrações estatisticamente semelhantes ao grupo controle positivo tratado apenas com LPS.

Penido et al. (2006), em experimento com camundongos Swiss e C57/B16 induziram a artrite com zimosan e após tratamento com tetranortriterpenóides isolados da semente de *C. guianensis* via oral encontrou redução nos níveis de TNF- α das articulações dos joelhos dos animais.

TNF- α é uma citocina produzida predominantemente por macrófagos ativados e tem múltiplos efeitos biológicos que incluem a diferenciação celular, proliferação, e múltiplos efeitos pró-inflamatórios (LIU et al., 2013).

LPS é um componente da membrana exterior de bactérias Gram-negativas e um dos mais potentes ativadores de monócitos e macrófagos. LPS ativa os macrófagos o que estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α , a qual desempenha um papel crucial na iniciação da resposta inflamatória e choque séptico (WANG et al, 2014)

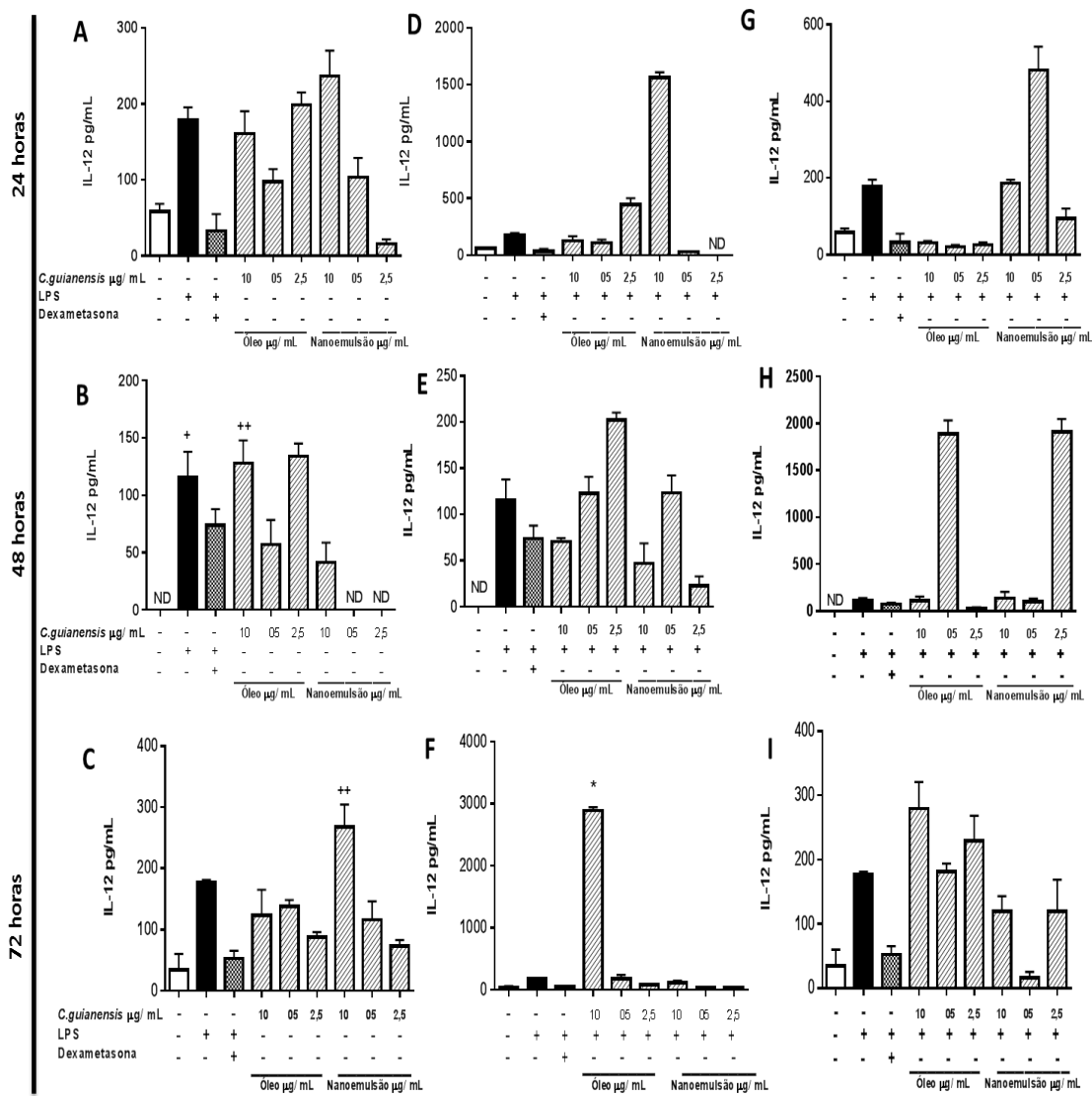


Figura 6. Concentrações de IL-12 (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As letras A, B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. + Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ++ representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle negativo. * representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle positivo. ND = níveis não detectáveis.

Após 48 horas de incubação o grupo tratado com óleo a 10 µg/ml foi o que estimulou a maior liberação de IL-12 em macrófagos não estimulados com LPS (Figura 6, B). E em 72 horas a concentração da nanoemulsão de 10 µg/ml estimulou também maior liberação de IL-12 quando comparada ao grupo controle negativo (Figura 6, C).

Em macrófagos estimulados com LPS o grupo tratado com óleo a 10 µg/ml com 72 horas de incubação , com estímulo prévio com LPS, obteve maior liberação de IL-12(Figura 6, F).

A interleucina-12 desempenha um papel crucial na resposta inflamatória à infecção precoce e na geração de células Th1 (CONSTANTINESCU et al., 2000) e atividade anti-tumoral (MA et al., 2015). A alta produção de IL-12 pode ser perigosa pois está envolvida na patogênese de numerosas doenças inflamatórias autoimunes como artrite e diabetes tipo 1 (ZIPRIS et al., 1996)

Nos grupos não estimulado com LPS não houve concentração detectável de IL-1 β nos grupos tratados após 24 e 48 horas de incubação, com diferença estatística em 24 horas de incubação com os grupos tratados com nanoemulsão na concentração de 10 e 05 µg/ml.do óleo (Figura 7, A).

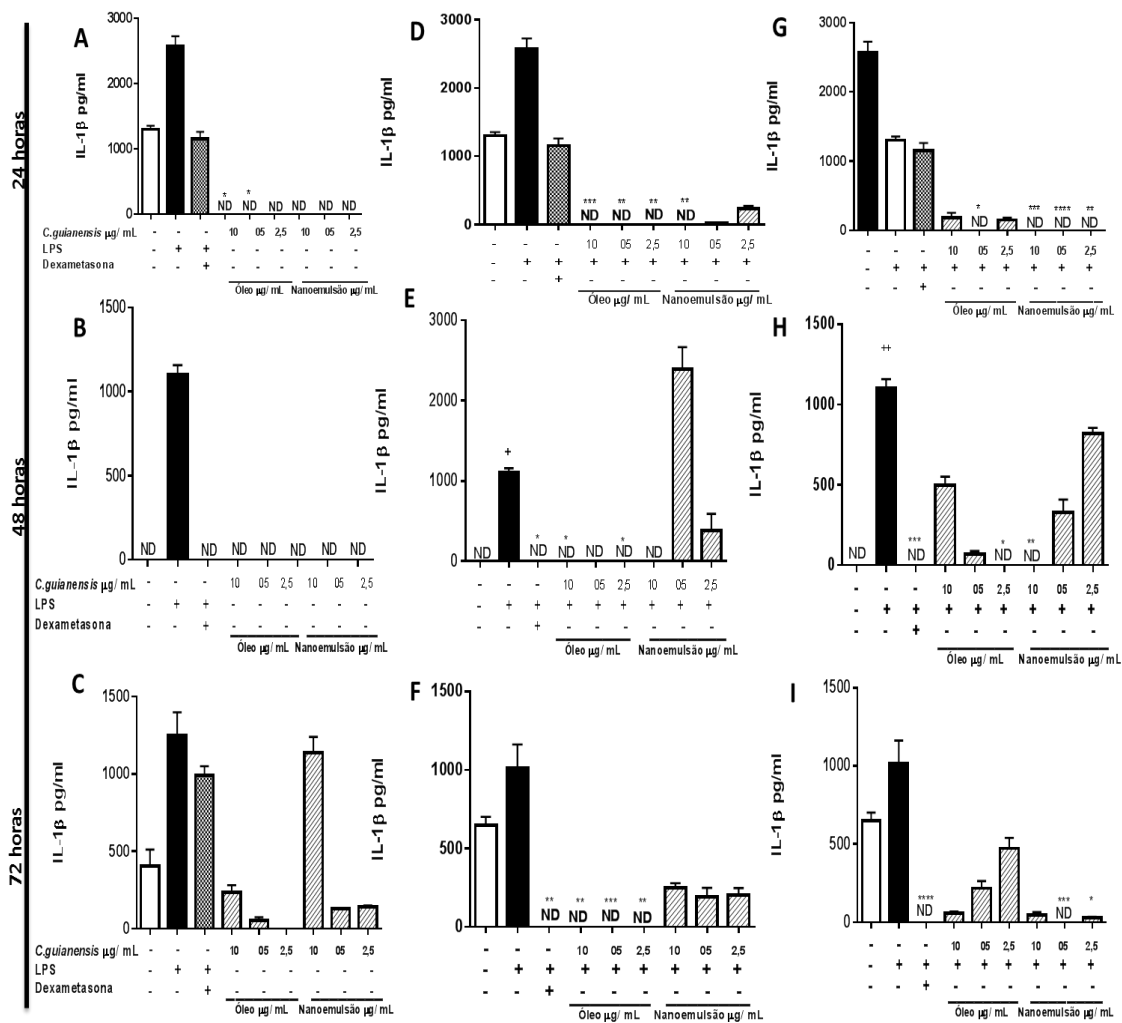


Figura 7. Concentrações de de IL-1β (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 μg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. + Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo LPS. *** Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo. **** Representa $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle positivo. ND= níveis não detectáveis.

Em grupos estimulados anteriormente com LPS , apenas macrófagos tratados com a nanoemulsão liberaram níveis detectáveis desta citocina. O óleo teve efeito inibidor sobre a liberação de IL-1β em todos os tempos (Figura 7, D, E e F).

Em grupos estimulados posteriormente com LPS a liberação de IL-1β foi menor que no grupo controle positivo, com diferença estatística nos grupos tratados com óleo a 05 μg/ml

e com todas de nanoemulsão em 24 horas (Figura 7, G), grupos tratados com 2,5 µg/ml de óleo e 10 µg/ml de nanoemulsão em 48 horas (Figura 7, H) e tratados com 05 e 2,5 µg/ml de nanoemulsão em 72 horas (Figura 7, I).

Resultados de Penido et al. (2006) demonstraram redução dos níveis de IL-1β para animais tratados com TNTPs de *C. guianensis* consolidando o já uso da planta para tratamento de artrite.

Interleucina-1β (IL-1β) é uma das principais citocinas pró-inflamatórias, é secretada por vários tipos celulares, mas suas principais fontes são monócitos e macrófagos (MURAKAMI et al., 2012), sendo capaz de induzir a diferenciação de monócitos em macrófagos (SCHENK et al., 2014) e está relacionada a condições inflamatórias crônicas clinicamente importantes, como a aterosclerose (SERGIN et al., 2014).

Com a dosagem de IL-4 dos sobrenadantes nota-se que a concentração de 05 e 2,5 µg/ml do óleo inibiu a liberação de IL-4 em 48 horas (Figura 8, B). E a concentração de 05 µg/ml de nanoemulsão estimulou a liberação de IL-4 em macrófagos após 72 horas (Figura 8, C).

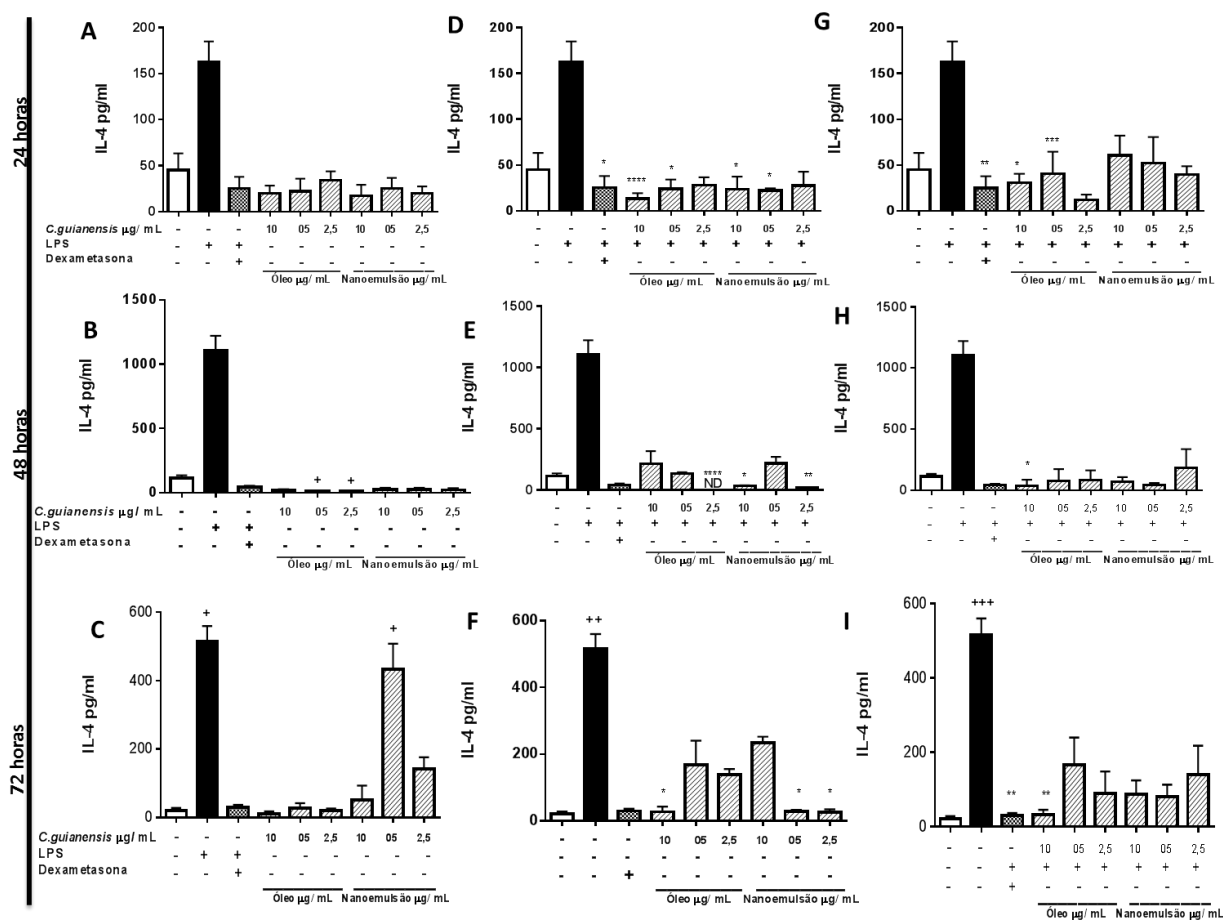


Figura 8. Concentrações de de IL-4 (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. + Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo LPS. *** Representa $p < 0,001$ quando comparado ao controle positivo. **** Representa $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle positivo.

Após 24 horas de incubação, macrófagos estimulados com LPS e depois tratados com óleo e nanoemulsão em 10 e 5 µg/ml reduziram a liberação de IL-4 (Figura 8, D). Em 48 horas, as concentrações de 10 e 2,5 µg/ml de nanemulsão reduziram a liberação dessa citocina e a concentração de 2,5 µg/ml de óleo inibiu a liberação de IL-4 em macrófagos a níveis não detectáveis (Figura 8, E). Após 72 horas de incubação a concentração de 10 µg/ml do óleo e de 05 e 2,5 µg/ml da nanoemulsão inibiram a liberação (Figura 8, F).

Macrófagos ativados do tipo M2 são uma importante fonte de IL-4 que agirá em T CD4, por isso representam um novo caminho pelo qual as células inatas promovem a diferenciação de linfócitos em Th2 e portanto um papel importante na formulação de respostas imunitárias adaptativas. A produção de IL-4 por macrófagos indica, dessa forma, um novo alvo para terapias destinadas a regular as respostas imunes disfuncionais (LA FLAMME et al., 2012).

IL-4 age sobre macrófagos ativados e inibe a produção de radicais livres de oxigênio, e reduz os efeitos das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 (ZHANG & NA, 2007). Devido a esse efeito antiinflamatório, IL-4 é vista como alvo para ser usada no tratamento de doenças como asma, osteoartrite, psoríase e linfoma (O'BYRNE, 2006). Seu efeito em reações alérgicas e anti-helmínticas relaciona-se a indução da diferenciação de linfócitos-B para produzir IgG e IgE (ZHANG & NA, 2007).

As citocinas antiinflamatórias IL-4 e IL - 10 são importantes reguladores negativos da expressão de gene pró-inflamatória em fagócitos mononucleares. Os mecanismos intracelulares que medeiam essas respostas parecem ser multifatoriais. IL- 4 é capaz de suprimir marcadamente a ativação da transcrição de genes que respondem a IFN- γ (HAMILTON et al., 1999).

Células estimuladas com LPS e tratadas com dexametasona apresentaram diferença estatística com o grupo controle positivo. A dexametasona é um corticóide que age na inibição da expressão de muitos genes envolvidos na resposta inflamatória e imune como, por exemplo, aqueles relacionados a citocinas e enzimas como iNOS e COX-2 (BARNES et al., 2006). Possui atividade no combate a microorganismos intracelulares (BOUMPAS et al., 1993), e devido a sua ação é utilizada como droga anti-inflamatória de referência.

Dexametasona é utilizada na terapia de doenças autoimunes e na prevenção e tratamento da rejeição a transplantes, porém apresenta efeitos colaterais sistêmicos e severos principalmente em crianças e em algumas circunstâncias clínicas muitas vezes não suprimem adequadamente a inflamação (BARNES et al., 2006). Sendo necessário portanto a pesquisa de agentes que possam mimetizar seus efeitos ou até mesmo superá-los para uma terapêutica mais eficaz

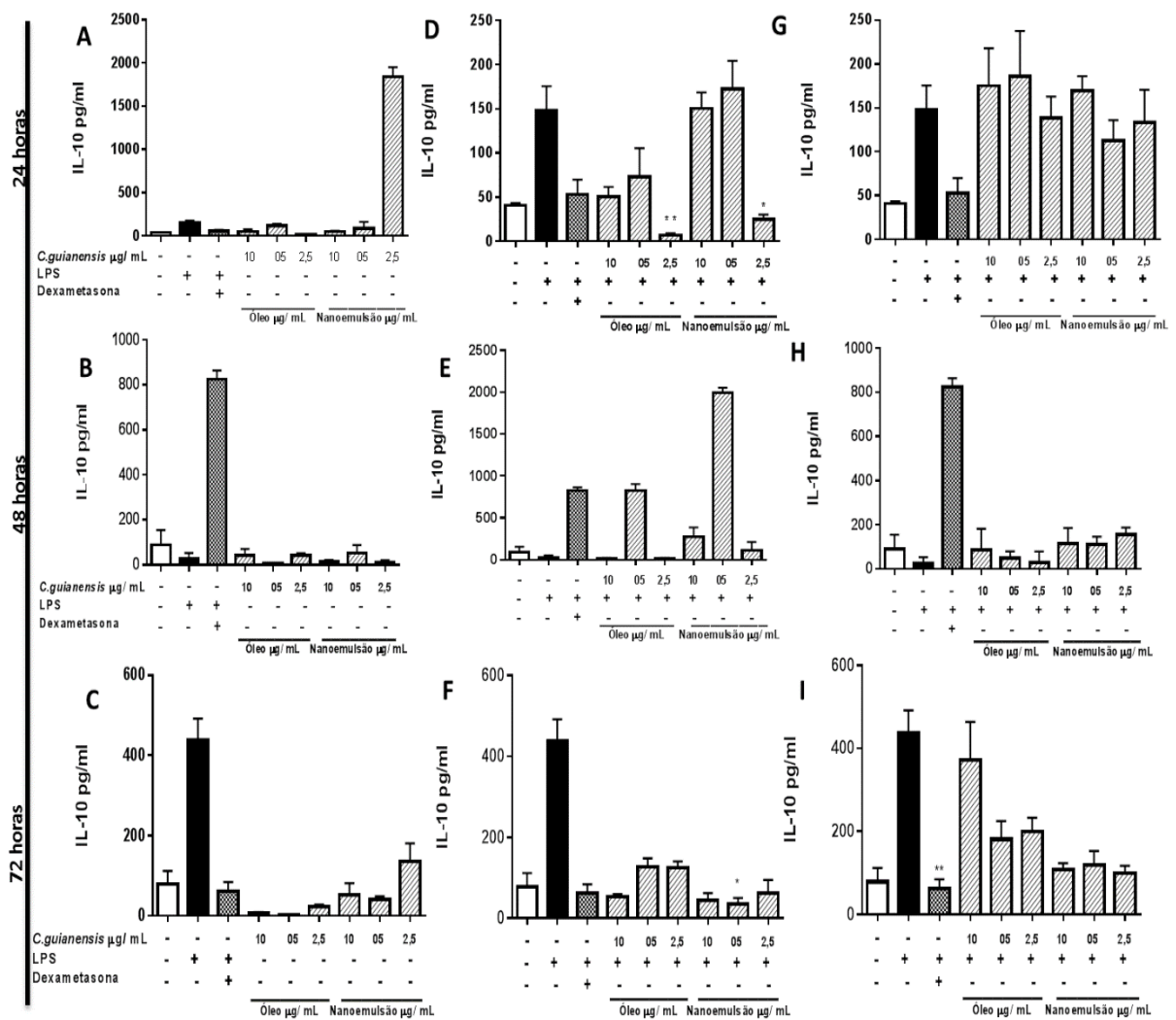


Figura 9. Concentrações de de IL-10 (pg/mL) determinadas por ELISA a partir de sobrenadantes de cultura macrófagos RAW 264.7 tratados com concentrações de 10, 05 e 2,5 µg/ml de óleo e nanoemulsão de *C. guianensis*, após 24 , 48 e 72 horas de incubação. As letras A B e C representam grupos tratados com a planta sem estímulo. D, E e F grupos estimulados 1 hora antes com LPS e depois tratados. G, H e I grupos tratados e 1 hora depois estimulados com LPS. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores representam média ± desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. * Representa $p < 0,05$ quando comparado ao controle negativo. ** Representa $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo.

As concentrações de 2,5 µg/ml do óleo e de nanoemulsão em 24 horas , após estímulo com LPS, inibiram a liberação de IL-10 (Figura 9 , D) assim como a de 05 µg/ml de nanoemulsão após 72 horas de incubação(Figura 9 , E).

IL-10 foi inicialmente descrita como uma citocina do tipo T helper 2 (Th2) mas hoje se enquadra mais com uma resposta de células T reguladoras (Treg) pois a sabe-se que a expressão de IL-10 não é específica para células Th2. Ela está amplamente expressa por células do sistema adaptativo como Th1, Th2 e células do sistema imune inato como os macrófagos (O’GARRA & VIEIRA , 2004).

É altamente pleiotrópica e possui papel crucial como um regulador de respostas e auxilia no feedback imunológico pois apesar de induzido em muitas situações juntamente com citocinas pró-inflamatórias, essas vias na verdade regulam negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias (SARAIVA & GARRA , 2010).

Possui propriedades anti-inflamatórias, tem um papel central na infecção por limitar a resposta imunitária aos agentes patogênicos, e assim evitando danos ao hospedeiro (SARAIVA & GARRA, 2010), está envolvida em de doenças auto-imunes , câncer (MANNINO et al., 2015) e em doenças inflamatórias intestinais (ZIGMOND et al., 2014).

Muitas células da resposta inata e adaptativa produzem IL-10 independentemente do estímulo. Diferentes estímulos, ou a força de um estímulo, pode dar origem a diferentes níveis de IL-10 no mesmo tipo de célula (SARAIVA & GARRA , 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As concentrações de nanoemulsão e de óleo de *C.guianensis* produziram efeito dose-dependente e também tempo-dependente, com redução de CC50 ao longo dos tempos considerados.

Quando sem estímulo, a nanoemulsão de *C.guianensis* reduziu a liberação de TNF- α em macrófagos RAW-264.7. Em macrófagos tratados com óleo de *C.guianensis* houve redução na liberação de IL-1 β e de IL-4 e óleo e nanoemulsão em 10 $\mu\text{g/ml}$ aumentaram a liberação de IL-12 nestas células.

Nanoemulsão e óleo de *C.guianensis* conduziram a uma ação anti-inflamatória através da inibição da produção de nitrito, IFN- γ e IL-1 β em macrófagos RAW-264.7 estimulados anteriormente com LPS. Inibiram também a liberação de IL-4 e IL-10 indicando efeito inibidor também sobre a via Th2.

Quando no estímulo posterior com LPS, o tratamento com *C.guianensis* reduziu a liberação de IFN- γ e IL-1 β e IL-4 em macrófagos.

CONCLUSÃO

De acordo com o exposto neste trabalho, podemos concluir que os componentes do óleo e da nanoemulsão de *C.guianensis* atuam em vias envolvidas no processo inflamatório referentes a liberação de citocinas e a produção de nitrito com efeito predominantemente inibidor.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Cellular and Molecular Immunology**. 6 ed. Saunders, 2003.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Citocinas**. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p. 266-267.

ABCAM. Disponível em: <<http://www.abcam.com/RAW-264-7-Mouse-leukaemic-monocytemacrophage-cell-line-Whole-Cell-Lysate-ab7187.html>>. Acesso em 09/10/2015.

ABELSON, H.T.; RABSTEIN, L.S. Lymphosarcoma: Virus-induced thymic-independent disease in mice. **Cancer Research**, v. 30, p. 2213-2222, 1970.

ADORINI, L.; MAGRAM, J.; TREMBEAU, S. The role of endogenous IL12 in the induction of Th1-cell-mediated autoimmune diseases. **Research in Immunology**, v. 146, p. 645-651, 1995.

AMBROZIN, A.R.P.; LEITE, A.C.; BUENO, F.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 542-547, 2006.

ANSEM, D.; SPILIANAKIS, C.G.; FLAVEL, R.A. How are Th1 and Th2 effector cells made? **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 153-160, 2009.

ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E.R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L.A. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.

ASTE-AMEZAGA, M.; MA, X.; SARTORI, A.; TRINCHIERI, G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 5936-5944, 1998.

BARNES, P.J. Corticosteroids: The drugs to beat. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 2-14, 2006.

BERNARDINO, L.; AGASSE, F.; SILVA, B.; FERREIRA, R.; GRADE, S.; MALVA, J.O. Tumor necrosis factor- α modulates survival, proliferation, and neural differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. **Stem Cells**, v. 26, p. 2361-2371, 2008.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do

cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 692-707, 2013.

BEZERRA-SANTOS, C.R.; PEÇANHA, L.M.T.; PIUVEZAM, M.R. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) inhibits anaphylactic shock reaction in murine allergic model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 287-291, 2005.

BOUMPAS, D.T.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; CUPPS, T.R.; BALOW, J.E. BOYTON, R.J.; ALTMANN, D.M. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? **Trends in Immunology**, v. 23, p. 526-529, 2002.

BRADLEY, J. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214. p. 149-160, 2008.

BRUNINI, T.M.C.; RESENDE, A.C.; MOSS, M.B.; SOARES DE MOURA, R.; MENDES RIBEIRO, A.C. L-arginine availability in essential hypertension, chronic renal and heart failure. **Vascular Disease Prevention**, v. 2, p. 37-51, 2005.

BRUNINI, T.M.C.; ROBERTS, N.B.; YAQOUB, M.M.; REIS, P.F.; ELLORY, J.C.; MANN, G.E. et al. Activation of L-arginine transport in peripheral blood mononuclear cells in chronic renal failure. **Pflügers Archives**, v. 445, p. 147-151, 2003.

C.B. EVIG, E.E. KELLEY, C.J. WEYDERT, Y. CHU, G.R. BUETTNER, C.P. Burns, Endogenous production and exogenous exposure to nitric oxide augment doxorubicin cytotoxicity for breast cancer cells but not cardiac myoblasts, **Nitric Oxide Biol. Chem.** 10 (2004) 119–129.

CARIOCA, C.R.F.. **Estudo de processos de hidrólise para o óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) em sistemas descontínuos.** 2002. 101f. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal do Pará, Belém.

CARLOS, I.Z.; SASSA, M.F.; SGARBI, D.B.G.; PLACERES, M.C.P.; MAIA, D.C.G. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*, v. 168, p.1-10, 2009.

CASTRO, L.H.; SANTOS, O.P.; BIAGGIO, R.M.; BELTRAME JÚNIOR, M. **Extração e estudo de óleos essenciais da semente da Andiroba.** X Encontro latino americano de Iniciação Científica e VI Encontro latino americano de pós-graduação. pp 201-204. São José dos Campos. 2006.

CHAU, C.F.; WU, S.H.; YEN, G.C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 269-280, 2007.

CLARK, A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 18, p. 335–343, 2007.

CONSTANTINESCU CS, GOODMAN DB, HILLIARD B, WYSOCKA M, COHEN JA. Murine macrophages stimulated with central and peripheral nervous system myelin or purified myelin proteins release inflammatory products. **Neurosci Lett.** 2000;287:171–4.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro. v. 1, 1926.

COSTA, M. T.; FABENI, R.C., APTEKMAN, K.P., MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.967-974,2003

COSTA-SILVA, J.H.; LIMA, C.R.; SILVA, E.J.; ARAÚJO, A.V.; FRAGA, M.C.; RIBEIRO E RIBEIRO, A. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 116, p. 495-500, 2008.

COUPER, K.N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E.M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 5771-5777, 2008.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W. S.; SILVA, N. P. et al. Sistema imunitário - parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-461, 2010.

DA SILVA, V.P.; OLIVEIRA, R.R.; FIGUEIREDO, M.R. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 20, p. 77-81, 2009.

DAMASCENO, F.C.; MORAES, M.S.A.; KRAUSE, L.C.; MARTINELLI, M.; RODRIGUES, M. R. A. **Caracterização físico-química do óleo das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.)**. XI Encontro de Química da Região Sul, Pelotas-RS, 2003.

DATE, A.A.; NAGARSENKER, M.S. Parenteral microemulsions: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 355, p. 19-30, 2008.

DE RIVERO VACCARI, J.P.; DIETRICH, W.D.; KEANE, R.W. Therapeutics targeting the inflammasome after central nervous system injury. **Translational Research**, v. 167, p. 35-45, 2015.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, p. 1209-1220, 1991.

DECKER, T.; STOCKINGER, S.; KARAGHIOSOFF, M.; MULLER, M.; KOVARIK, P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 1271-1277, 2002.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.

DORMAN, S.E.; HOLLAND, S.M. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 11, p. 321-333, 2000.

DUNSTER, J.L. The macrophage and its role in inflammation and tissue repair: mathematical and systems biology approaches. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, 2015.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Espécies arbóreas da Amazônia**, *Carapa guianensis*, Andiroba - Características Gerais da Espécie *Carapa guianensis*, 2004.

FARIAS, M.P.O.; TEIXEIRA, W.C.; WANDERLEY, A.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Avaliação in vitro dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 220-226, 2010.

FERRARIS, F.K.; RODRIGUES, R.; DA SILVA, V.P.; FIGUEIREDO, R.; PENIDO, C.; HENRIQUES, M.D. Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions in vitro by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1-11, 2011.

FERRAZ, I.D.K.; CAMARGO, J.L.C; SAMPAIO, P.T.B. Sementes e plântulas de Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, v. 32, p.647-661, 2002.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of experimental medicine*, v. 170, p. 2081-2095, 1989.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, Sept. 2000.

FORTE, W.N. **Imunologia básica e aplicada**. São Paulo: Artmed, 2004. 359p.

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

FUKAO, T.; FRUCHT, D.M.; YAP, G.; GADINA, M.; O'SHEA, J.J.; KOYASU, S. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses **Journal of Immunology**, v. 166, p. 4446-4455, 2001.

FUNK, J.L. A role for parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1101-1121, 2001.

GAUTIER, E.L.; SHAY, T.; MILLER, J.; GRETER, M.; JAKUBZICK, C.; IVANOV, S. et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nature Immunology**, v. 13, p. 1118–1128, 2012.

GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p 656-661, 2010.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 392-404, 2014.

Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Annals of Internal Medicine**, v. 119, p. 1198-1208, 1993.

GOLAB, J.; ZAGOZDZON STOKLOSAL, T.; KAMINSKI, R.; KOZAR, K.; JAKOBISIAK, M. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18—a bridge too far? **Immunology Letters**, v. 72, p. 153-157, 2000.

GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, p. 30-45, 2009.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; HAMILTON TA, OHMORI Y, TEBO JM, KISHORE R. Regulation of macrophage gene expression by pro- and anti-inflammatory cytokines. **Pathobiology**. 1999;67(5-6):241-4.

HAO, N.; LU, M.; FAN, Y.; CAO, Y.; ZHANG, Z.; YANG, S. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

HENRIQUES, M.D.; PENIDO, C. The therapeutic properties of *Carapa guianensis*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, p. 850-856, 2014.

HÖLZL, M.A.; HOFER, J.; STEINBERGER, P.; PFISTERSHAMMER, K.; ZLABINGER, G.J. Host antimicrobial proteins as endogenous immunomodulators. **Immunology Letters**, v. 119, p. 4-11, 2008.

HUME, D.A. The many alternative faces of macrophage activation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2015.

INOUE, T.; MATSUI, Y.; KIKUCHI, T.; IN, Y.; YAMADA, T.; MURAOKA, O. et al. Guianolides A and B, new carbon skeletal limonoids from the seeds of *Carapa guianensis*. **Organic Letters**, v. 15, p. 3018-3021, 2013.

IONTCHEVA, I.; AMAR, S.; ZAWAWI, K.H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T.E. Role for moesin in lipopolysaccharide-stimulated signal transduction. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2312-2320, 2004.

JANEWAY, C.A Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1167-1171, 2001.

JAYACHANDRAN, R.; SUNDARAMURTHY, V.; COMBALUZIER, B.; MUELLER, P.; KORF, H.; HUYGEN, K. et al. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin dependent activation of calcineurin. **Cell**, v. 130, p. 37-50, 2007.

KALISH, S.V.; LYAMINA, S.V.; USANOVA, E.A.; MANUKHINA, E.B.; LARIONOV, N.P. et al. Reprogrammed *in vitro* towards the m1 phenotype and activated with lps extend lifespan of mice with Ehrlich ascites carcinoma. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 21, p. 226-234, 2015.

KISHIMOTO, T.; TAGA, T.; AKIRA, S. Cytokine signal transduction. **Cell**, v. 76, p. 253-262, 1994.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 143-161, 2002.

KUBY, J. **Immunology**. 3 ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1995. 664p.
KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Inflamação aguda e crônica**. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. Patologia. Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 49-89.

LA FLAMME, A.C.; KHARKRANG, M.; STONE, S.; MIRMONEINI, S.; CHULUUNDORJ, D.; KYLE, R. Type II-Activated Murine Macrophages Produce IL-4. **PLoS One**, v. 7, 2012.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, p. 1013-1022, 2014.

LAPORTE, S.L.; JUO, Z.S.; VACLAVIKOVA, J.; COLF, L.A.; QI, X.; HELLER, N. et al. Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. **Cell**, v. 132, p. 259-272, 2008.

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

LIU L1, ZHAO Y1, XIE K1, SUN X1, GAO Y2, WANG Z2. Estrogen-induced nongenomic calcium signaling inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor α production in macrophages. **PLoS One**. 2013 Dec 23;8(12):e83072. 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 351p.

LUGER, D. SILVER, P.B.; TANG, J.; CUA, D.; CHEN, Z.; IWAKURA, Y. et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, 799-810, 2008.

LUZINA, I.G.; KEEGAN, A.D.; HELLER, N.M.; ROOK, G.A.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S.P. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 753-764, 2012.

MA TT, WU BT, LIN Y, XIONG HY, WANG Q, LI ZW, CHENG F, TU ZG. IL-12 could induce monocytic tumor cells directional differentiation. **Mol Cell Biochem**. 2015 Apr;402(1-2):157-69.

MACHADO, A.C.; OLIVEIRA, R.C. Medicamentos fitoterápicos na Odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodium urundeuva Allemão*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, p.283-289, 2014.

MANDINOVA A, SOLDI R, GRAZIANI I, BAGALA C, BELLUM S, LANDRISCINA M, TARANTINI F, PRUDOVSKY I, MACIAG T .S100A13 mediates the copper-dependent stress-induced release of IL-1 α from both human U937 and murine NIH 3T3 cells. **J Cell Sci** 116:2687–2696. 2003

MANNINO MH, ZHU Z, XIAO H, BAI Q, WAKEFIELD MR, FANG Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Lett.** 2015 Oct 28;367(2):103-7. Epub 2015 Jul 15.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**. v. 25, p. 677-686, 2004.

MARGARIDA SARAIVA & ANNE O'GARRA. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology** 10, 170-181.2010

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451-483, 2009.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; MILDE, R.; VARIN, A.; MELGERT, B.N.; DRAIJER, C. et al. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. **Blood**, v. 121, p. 57-69, 2013.

MATSUI, Y.; KIKUCHI, T.; INOUE, T.; MURAOKA, O.; YAMADA, T.; TANAKA, R. Carapanolides J–L from the Seeds of *Carapa guianensis* (Andiroba) and Their Effects on LPS-Activated NO Production. **Molecules**, v. 19, p. 17130-17140, 2014.

MEUNIER, E.; BROZ, P. Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. **Cellular Microbiology**, 2015.

MILLS, K.H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 107-117, 2004.

MIOT, H.A.; BATISTELLA, R.F.; BATISTA, K.A.; VOLPATO, D.E.C.; AUGUSTO, L.S.T.; MADEIRA, N.G.; HADDAD Jr, V. et al. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 253-256, 2004.

MIRANDA JÚNIOR, R.N.; DOLABELA, M.F.; DA SILVA, M.N.; PÓVOA, M.M.; MAIA, J.G. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 142, p. 679-683, 2012.

MIZUMOTO, N.; GAO, J.; MATSUSHIMA, H.; OGAWA, Y.; TANAKA, H.; TAKASHIMA, A. Discovery of novel immunostimulants by dendritic-cell-based functional screening. **Blood**, v. 106, p. 3082-3089, 2005.

MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, v. 248, p. 1230-1234, 1990.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 56, p. 55-63, 1983.
- MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 958-969, 2008.
- MÜHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1247-1255, 2003.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 5347-5354, 1998.
- MURAKAMI T, OCKINGER J, YU J, BYLES V, MCCOLL A, HOFER AM, et al. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ;109(28):11282–7. 2012
- MURPHY, P.M.; BITTAR, E.E.; NEVILLE, B. **Phagocytes in immunity and inflammation**. Principles of Medical Biology, 6ed, 1996. p. 197-229.
- NAYAK, B. S.; KANHAI, J.; MILNE, D.M.; PEREIRA, L.P.; SWANSTON, W.H. Experimental evaluation of ethanolic extract of *Carapa guianensis* leaf for its wound healing activity using three wound models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- O’GARRA, A. & VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nature Med**. 10, 801–805.2004
- O’BYRNE, P.M. Cytokines or their antagonists for the treatment of asthma. **Chest**, v. 130, p. 244-250, 2006.
- OLIVEIRA, M.F.S.S. Controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais. **Dissertação**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista; 2006.
- OSTUNI, R.; PICCOLO, V.; BAROZZI, I.; POLLETTI, S.; TERMANINI, A.; BONIFACIO, S. et al. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. **Cell**, v. 152, p. 157-171, 2013.
- PEKAROVA, M.; LOJEK, A. The crucial role of l-arginine in macrophage activation: What you need to know about it. **Life Sciences**, v. 137, p. 44-48, 2015
- PREDONZANI, A.; CALI, B.; AGNELLINI, A.H.R.; MOLON, B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 5, p. 64-76, 2015.
- RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I.R. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan. **Molecular Pharmacology**, , v. 53, p. 415-421, 1998.

REZENDE, E.A.; RIBEIRO, M.T.F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção? **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 37-44, 2005.

RICARDO DE L. BARRETO E CARLOS ROQUE D. CORREIA Revisão . ÓXIDO NÍTRICO: PROPRIEDADES E POTENCIAIS USOS TERAPÊUTICOS **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 6, 1046-1054, 2005

ROCHA, F.J.; SCHLEICHER, U.; MATTNER, J.; ALBER, G.; BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3823-3832, 2007.

ROCHA-FILHO, P.A.; MARUNO, M.; OLIVEIRA, B.; BERNARDI, D.S.; GUMIERO, V.C.; PEREIRA, T.A. Nanoemulsions as a vehicle for drugs and cosmetics. **Nanoscience and Technology**, v. 1, p. 5, 2014.

SABAT, R. IL-10 family of cytokines. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, p. 315-324, 2010.

SÄEMANN, M.D.; BÖHMIG, G.A.; OSTERREICHER, C.H.; BURTSCHER, H.; PAROLINI, O.; DIAKOS, C. et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. **FASEB Journal**, v. 14, p. 2380-2382, 2000.

SAKAMOTO, A.; TANAKA, Y.; INOUE, T.; KIKUCHI, T.; KAJIMOTO, T.; MURAOKA, O. et al. Andiolides Q–V from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Fitoterapia**, v. 90, p. 20-29, 2013.

SAKAMOTO, A.; TANAKA, Y.; YAMADA, T.; KIKUCHI, T.; MURAOKA, O.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; TANAKA, R. Andiolides W–Y from the flower oil of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Fitoterapia**, v. 100, p. 81-87, 2015.

SALAZAR-MATHER, T.P.; HAMILTON, T.A.; BIRON, C.A. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 985-993, 2000.

SALINA, A.C.G.; DIAS, F.N.; DEJANI, N.; NIÑO, V.E.; MEDEIROS, A.I. Polarização de macrófagos M1/M2 pela fagocitose de células apoptóticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p., 2014.

SANTOS; O.J.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; CZECZKO, N.G.; SANTOS, R.H.P.; SANTOS, R.A.P. Efeito de *Schinus terebinthifolius raddi* (aroeira) e *Carapa guianensis Aublet* (andiroba) na cicatrização de gastrorrafias. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 26, p. 84-91, 2013.

SCHENK M1, FABRI M, KRUTZIK SR, LEE DJ, VU DM, SIELING PA, MONTOYA D, LIU PT, MODLIN RL. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. **Immunology**. Feb;141(2):174-80.2014

SCHNURR, M.; CHEN, Q.; SHIN, A.; CHEN, W.; TOY, T.; JENDEREK, C. et al. Tumor antigen processing and presentation depends critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. **Blood**, v. 105, p. 2465-2472, 2005.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P.J.; RAVASI, T.; HUME, D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 163-189, 2004.

SCHULTZE, J.L. Reprogramming of macrophages - new opportunities for therapeutic targeting. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 26, p. 10-15, 2015.

SERGIN I1, EVANS TD1, BHATTACHARYA S1, RAZANI B2. Hypoxia in plaque macrophages: a new danger signal for interleukin-1 β activation? **Circ Res**. 2014 Oct 24;115(10):817-20.

SHARMA, S.; YANG, B.; XI, X.; GROTTA, J.C.; ARONOWSKI, J.; SAVITZ, S.I. IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. **Brain Research**, v. 1373, p. 189-194, 2010.

SILVA, R.A.O.; SANTOS, M.R.M.C.; FILHO, F.C.S.; SILVA, M.C.C.; OLIVEIRA, G.A.L.; SILVA, M.G.O.; MARQUES, L.G.A. Prospecção tecnológica de fitoterápico (*Euphorbia Tirucalli* L.) utilizado no tratamento de neoplasias e outras doenças. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, p. 490-499, 2013.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, p. 618-626, 2008.

SIVEEN, K.S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunology Letters**, v. 123, p. 97-102, 2009.

SMIT, E.; OBERHOLZER, H.M.; PRETORIUS, E. A review of immunomodulators with reference to Canova[®]. **Homeopathy**, v. 98, p. 169-176, 2009.

SOMMER, C.; WHITE, F. **Cytokines, Chemokines, and Pain**. In: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F. et al. *Pharmacology of Pain*. 1 ed. Seattle: IASP Press, 2010. p. 279-302.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J.T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 145-149, 2004.

SOUSA FILHO, José Victorio da Costa. **Extração supercrítica do óleo residual da torta de andiroba (*Carapa guianensis Aublet*) resultante da prensagem industrial**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.

SUN, L.; HE, C.; NAIR, L.; YEUNG, J.; EGWUAGU, C.E. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. **Cytokine**, v. 75, p. 249-255, 2015.

TANAKA, Y.; SAKAMOTO, A.; INOUE, T.; YAMADA, T.; KIKUCHI, T.; KAJIMOTO, T. et al. Andriolides H–P from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Tetrahedron**, v. 68, p. 3669-3677, 2012.

TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

TAYLOR, D.A.H. The chemistry of the limonoids from Meliaceae. **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe**, v. 45, p. 1-102, 1984.

TENG, M.W.; BOWMAN, E.P.; MCELWEE, J.J.; SMYTH, M.J.; CASANOVA, J.L.; COOPER, A.M. et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. **Nature Medicine**, v. 21, p. 719-729, 2015.

THAKUR, N.; GARG, G.; SHARMA, P.K.; KUMAR, N. Nanoemulsions: A Review on Various Pharmaceutical Application. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 222-225, 2012.

TÖPFER, E.; BORASCHI, D.; ITALIANI, P. Innate Immune Memory: The latest frontier of adjuvanticity. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

TORRES, S.M.; CRUZ, N.L.; ROLIM, V.P.; CAVALCANTI, M.I.; ALVES, L.C.; SILVA JÚNIOR, V.A. Cumulative mortality of *Aedes aegypti* larvae treated with compounds. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 445-450, 2014.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E.H.; SALFELD, J.G.; TAK, P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, p. 244-279, 2008.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Natur Reviews Immunology**, v. 3, p. 133-146, 2003.

TURVEY, S.E.; DPhil, B.S.; Broide, D.H. Innate Immunity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S34-S32, 2010.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Cytokines: a review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.

VILLALTA S. A., C. RINALDI, B. DENG, G. LIU, B. FEDOR, AND J. G. TIDBALL. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. **Human Molecular Genetics**, v. 20, p. 790-805, 2011.

WANG XQ, LUO NS, SALAH ZQ, LIN YQ, GU MN, CHEN YX. Atorvastatin Attenuates TNF-alpha Production via Heme Oxygenase-1 Pathway in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages. **Biomed Environ Sci**. 2014 Oct;27(10):786-93. 2014

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, Saindpoint, v.6, n.6, p. 567-579, 2001.

WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, v. 496, p. 445-455, 2013.

YUNES, R. A; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova.**, São Paulo, v. 24, n.1, p.147-152, 2001.

ZEWINGER, S.; SCHUMANN, T.; FLISER, D.; SPEER, T. Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 2015, 2015.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHU, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. **Cytokine**, v. 75, p. 14-24, 2015.

ZIGMOND E, BERNSHTEIN B, FRIEDLANDER G, WALKER CR, YONA S, KIM KW, BRENNER O5, KRAUTHGAMER R, VAROL C, MÜLLER W, JUNG S. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. **Immunity**. 2014 May 15;40(5):720-33. 2014

ZIPRIS D, GREINER DL, MALKANI S, WHALEN B, MORDES JP, ROSSINI AA. Cytokine gene expression in islets and thyroids of BB rats. IFN-gamma and IL-12p40 mRNA increase with age in both diabetic and insulin-treated nondiabetic BB rats. **J Immunol**. 1996;156:1315-21

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. **Macrophage-pathogen interactions**. New York: Marcel Dekker, 1994. 634p