



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Lucas Possebon

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E DO EXTRATO DA
GARCINIA BRASILIENSIS EM MODELO DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA
CRÔNICA INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO**

São José do Rio Preto

2021

Lucas Possebon

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E DO EXTRATO DA
GARCINIA BRASILIENSIS EM MODELO DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA
CRÔNICA INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a Dra. Ana Paula Girol

Coorientadora: Prof^a Dra. Sonia Maria Oliani

São José do Rio Preto

2021

P856c

Possebon, Lucas

Efeitos da administração da proteína anexina a1 e do extrato da garcinia brasiliensis em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida por exposição à fumaça de cigarro / Lucas Possebon. -- São José do Rio Preto, 2021

105 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Ana Paula Giroi

Coorientadora: Sonia Maria Oliani

1. DPOC. 2. Anexina A1. 3. Fitoterápicos. 4. Garcinia brasiliensis. 5. Inflamação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Lucas Possebon

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA PROTEÍNA ANEXINA A1 E DO EXTRATO DA
GARCINIA BRASILIENSIS EM MODELO DE DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA
CRÔNICA INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Girol
UNIFIPA- Catanduva

Profa. Dra Ana Cláudia Polli Lopes
FAMERP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Maria de Lourdes Gomes Pereira
Universidade de Aveiro – Aveiro/Portugal

Profa. Dra Flávia Cristina Rodrigues Lisoni
UNESP – Ilha Solteira

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

5 de março de 2021

Dedico este trabalho aos meus pais, Sr. Luis Carlos Possebon e Sra. Rosemary da Cruz Possebon, irmãos, André Luís Possebon e Letícia Possebon, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Girol, meu reconhecimento pela competência e talento profissional. Agradeço por sua orientação nesse trabalho e por todo aprendizado desde o tempo da graduação, pela atenção e carinho que tem sido extremamente importante para meu desenvolvimento profissional e principalmente por sua amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Primeiramente à Deus por mais esta conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À Prof^a Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos e Prof^a Rejane Maira Goes, coordenadoras do Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE-UNESP), e aos demais professores do programa.

À minha coorientadora, Prof^a Dra. Sonia Maria Oliani, pela participação fundamental neste trabalho e por todo conhecimento adquirido.

A instituição onde desenvolvi meu doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), todos os funcionários que me atenderam nesse período.

Às Faculdades Integradas Padre Albino (FIPA), onde pude desenvolver parte do meu projeto de pesquisa nos Laboratório Multidisciplinar, Laboratório de Histopatologia e À Unidade Didática e de Pesquisas Experimentais (UDPE).

À minha família, meus pais, Luís Carlos Possebon e Rosemary da Cruz Possebon, meus irmãos Letícia Possebon e André Luis Possebon e cunhada Renata Olívio Morasca Possebon pelo apoio. Também à minha sobrinha Luiza Morasca Possebon, que nos alegra com sua vinda em nossa família.

Às Técnicas e amigas Melina Mizusaki Iyomasa-Pilon e Helena Ribeiro Souza, que me auxiliaram com todo carinho e disposição neste trabalho.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação, Ariane Harumi Yoshikawa, Jéssica Messias da Silva e Sara de Souza Costa, pelos auxílios durante o desenvolvimento do meu trabalho. Aos amigos que sempre me apoiaram e incentivaram. Enfim, a tantos outros que de alguma maneira colaboraram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

RESUMO

A proteína anti-inflamatória Anexina A1 (AnxA1) e o extrato da *Garcinia brasiliensis* têm mostrado resultados positivos em diferentes contextos de inflamações. Diante disso e da grande incidência da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), o objetivo desta investigação foi avaliar os efeitos da administração do peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26, e do extrato alcoólico da *G. brasiliensis* em modelo de DPOC. O extrato de *G. brasiliensis* foi submetido a análises fitoquímicas, microbiológicas e de citotoxicidade para escolha da concentração de uso adequada. As análises de padronização do extrato indicaram presença de tanino, glicosídeos flavanoídeos e alcaloides e ausência de glicosídeos saponínicos. O extrato mostrou baixa toxicidade nas concentrações de 4%, 6% e 8% em testes de hemólise e *in ovo*. Ainda, indicou inibição de *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella*. Para o desenvolvimento da DPOC, ratos (machos e fêmeas, Wistar) foram expostos à fumaça da queima de 10 cigarros comerciais, 2x/dia, por 8 semanas, em aparelho próprio para exposição ao fumo. Animais dos grupos tratados foram administrados via intraperitoneal com o Ac2-26 (1mg/Kg) e outros com solução de extrato da *G. brasiliensis* (4%), por gavagem, 3x/semana. Os grupos controles foram mantidos no mesmo regime, mas na ausência da fumaça do cigarro. Peso e pressão sanguínea arterial foram avaliados no início e no término do protocolo de exposição. Ao final do experimento, foram realizadas análises das imagens de raios X e estudos da ventilação pulmonar (pletismografia). Após eutanásia por dose excessiva de anestésico, sangue, lavado broncoalveolar (LBA), pulmões e traqueia foram coletados. As células inflamatórias do LBA foram quantificadas em câmara de Neubauer. As expressões das proteínas AnxA1, e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), receptores de peptídeos formilados (FPR1 e FPR2) e metaloproteinases de matriz (MMP2 e MMP9) foram estudadas por imuno-histoquímica nos tecidos, enquanto os macrófagos foram quantificados por imunofluorescência. As expressões de AnxA1, também foram analisadas no sobrenadante do macerado pulmonar por *Western blotting*. A hemoglobina foi avaliada no sangue total e as citocinas interleucina (IL)-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e proteína quimioattractante para monócitos (MCP)-1 foram quantificadas no plasma sanguíneo e no sobrenadante pulmonar, pelo LUMINEX xMAP MAGPIX. Os ratos machos e fêmeas expostos ao fumo sem

tratamento apresentaram reduções macroscópicas das dimensões pulmonares por imagens de raio-X, aumento de frequência, volume e ventilação pulmonares, bem como da concentração de hemoglobina comparados aos ratos tratados e controles. Nas análises do LBA, foi observada maior quantidade de linfócitos e macrófagos no grupo exposto à fumaça sem tratamento, comparado à redução significativa dessas células nos grupos tratados. Nas avaliações morfológicas, maiores espaços intra-alveolares ocorreram no pulmão dos ratos expostos à fumaça do cigarro comparados aos grupos controle e tratados. Nos pulmões também foi observado aumento de macrófagos nos animais não tratados, comparados aos demais. Os estudos imunohistoquímicos revelaram aumento significativo da expressão das proteínas analisadas nos animais expostos sem tratamento, com redução de AnxA1 e MMP-2 após os tratamentos. Entretanto, nos grupos tratados com o peptídeo Ac2-26 ocorreu aumento de FPR1 e FPR2 comparados ao não tratados. Nas dosagens das citocinas, foram observados aumentos significantes de IL-1 β , TNF- α e MCP-1 nos animais expostos à fumaça do cigarro, com redução após os tratamentos, bem como aumento de IL-10 nos animais que receberam tratamento com o peptídeo e extrato vegetal comparado aos animais não tratados. Nas fêmeas, de modo geral, o processo inflamatório foi mais exacerbado e a reversão dos danos menos pronunciada após os tratamentos. Associados, nossos dados mostram que a administração do peptídeo mimético Ac2-26 da AnxA1 e do extrato vegetal da *G. brasiliensis* promoveu efeitos anti-inflamatórios protetores contra o desenvolvimento da DPOC no modelo proposto.

PALAVRAS-CHAVE: Tabagismo, Anexina, Fitoterápico, Inflamação, DPOC.

ABSTRACT

The anti-inflammatory protein Annexin A1 (AnxA1) and the extract of *Garcinia brasiliensis* have shown positive results in different contexts of inflammation. Given this and the high incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the objective of this investigation was to evaluate the effects of administering the AnxA1 mimetic peptide, Ac2-26, and the alcoholic extract of the leaves of *G. brasiliensis* in a COPD model. The extract of *G. brasiliensis* was submitted to phytochemical, microbiological and cytotoxicity analyses to choose the appropriate concentration for use. The standardization analyses indicated the presence of tannins, flavanoid and alkaloids glycosides and absence of saponin glycosides. The extract showed low toxicity at concentrations of 4%, 6% and 8% in hemolysis and in ovo tests. Besides, it indicated inhibition of *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* and *Shigella*. For the development of COPD, rats (male and female, Wistar) were exposed to smoke of 10 commercial cigarettes, 2x / day, for 8 weeks, in a device for smoke exposure. Animals in the treated groups were administered intraperitoneally with Ac2-26 (1mg / Kg) and others with solution of *G. brasiliensis* extract, by gavage, 3x / week. Control groups were maintained in the same regime, but in the absence of cigarette smoke. Arterial blood pressure and weight were assessed at the beginning and at the end of the exposure protocol. At the end of the experiment, analyses of X-ray images and studies of pulmonary ventilation (plethysmography) were performed. After euthanasia due to an overdose of anesthetic, blood, bronchoalveolar lavage (BAL), lungs and trachea were collected. Inflammatory BAL cells were quantified in a Neubauer chamber. The expressions of AnxA1, and cyclooxygenase-2 (COX-2), formylated peptide receptors-1 and 2 (FPR1 and FPR2) and matrix metalloproteinase (MMP2 and MMP9) were studied by immuno-histochemistry in tissues, while macrophages were quantified by immunofluorescence. AnxA1 expression was also analyzed in the pulmonary macerate supernatant by Western blotting. Hemoglobin was evaluated in whole blood and the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α and Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1 were quantified in blood plasma and pulmonary supernatant, by LUMINEX xMAP MAGPIX. Untreated-exposed-to-smoke rats showed macroscopic reductions in lung dimensions by X-ray images, increased pulmonary frequency, volume and ventilation, as well as hemoglobin concentration compared to

treated and control rats. In the BAL analyses, a greater amount of lymphocytes and macrophages was observed in the untreated-exposed-to-smoke group, compared to the significant reduction of these cells in the treated groups. In morphological evaluations, larger intra-alveolar spaces occurred in the lungs of rats exposed to cigarette smoke compared to the control and treated groups. In lung tissues, an increase in macrophages was also observed in untreated animals, compared to the others. Immunohistochemical studies revealed a significant increase in the expression of the proteins analyzed in animals exposed to smoke without treatment, with a reduction in AnxA1 and MMPs after treatments. However, in the groups treated with the Ac2-26 peptide, there was an increase in FPR1 and FPR2 compared to untreated ones. In cytokine measurements, significant increases in cytokine IL-1 β , TNF- α and MCP-1 were observed in animals exposed to cigarette smoke, with reduction after treatments, as well as an increase in IL-10 in animals that received treatment with peptides and plant extract compared to untreated animals. In females, in general, the inflammatory process was more exacerbated and the reversal of the damage was less pronounced after treatments. Taken together, our data showed that the administration of the AnxA1 mimetic peptide Ac2-26 and of the *G. brasiliensis* leaves extract promoted protective anti-inflammatory effects against the development of COPD in the proposed model.

KEYWORDS: Smoking, Annexin, Phytotherapeutic, inflammation, COPD.

Lista de Ilustrações

Introdução

Figura 1.....	19
Figura 2.....	20
Figura 3.....	22

Manuscrito 1

Figura 1.1 – Análise em Cromatografia em camada delgada por HPTLC –	42
Figura 2. Análises de citotoxicidade. 2.1 – Hemólise (<i>in vitro</i>)	43
Figura 3 – Análises quantitativas. Mastócitos na lâmina própria do intestino delgado.	44
Figura 4 - Expressão da AnxA1 na mucosa intestinal	45

Manuscrito 2

Figura 1- Análises fisiológicas e radiográficas do pulmão –	67
Figura 2 – Análise histopatológica do pulmão–	68
Figura 3 - Expressão das proteínas AnxA1, FPR1 e FPR2 no pulmão de machos e fêmeas:	69
Figura 4 - Expressão das proteínas COX-2, MMP-2 e MMP-9 no pulmão de machos e fêmeas	70
Figura 5 - Dosagem de citocinas no macerado do pulmão e plasma sanguíneo em machos e fêmeas	71

Manuscrito 3

Figura 1	91
Figura 2 – Análise histopatológica do pulmão	92
Figura 3 – Imunofluorescência de macrófagos no pulmão em machos e fêmeas.....	93
Figura 4	94
Figura 5	95
Figura 6 - Dosagem de citocinas no macerado do pulmão e plasma sanguíneo em machos e fêmeas	96

Lista de abreviações

µL	Microlitro
µm	Micrômetro
Ac2-26	Peptídeo mimético Ac2-26 da proteína anexina
ANOVA	Análise de variância
AnxA A1	Proteína Anexina A1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BALT associado ao brônquio)	<i>Bronchus Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido linfático
C	Controle/ <i>Control</i>
CAM	<i>Chorioallantoic membrane assay</i>
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
Cm	Centímetro
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ED-1	Anticorpo marcador de macrófagos
EF	Exposto à fumaça do cigarro
EF+Ac2-26 Ac2-26	Exposto à fumaça do cigarro e tratado com o peptídeo mimético
EF+G. brasiliensis brasiliensis	Exposto à fumaça do cigarro e tratado com o extrato G.
EPO	Eritropoietina sérica
F	Fêmeas
FCεR	Receptors for IgE
FPR	<i>Formyl peptide receptor</i> (Receptores de peptídeos formilados)
FPR1	<i>Formyl peptide receptor</i> (Receptores de peptídeos formilados 1)
FPR2	<i>Formyl peptide receptor</i> (Receptores de peptídeos formilados 2)

g	Grama
GCs	Glicocorticóides
HE	Hematoxilina-Eosina
HPTLC	<i>High-performance thin-layer chromatography</i>
I.P.	Intraperitoneal
IFN- γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-18	Interleucina-18
IL-1 β	Interleucina -1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
kDa	Kilodaltons
L	Litro
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Machos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
Mcs	Mastócitos
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMP-2	Matrix metaloproteínase -2
MMP-9	Matrix metaloproteínase -9
NF- κ beta)	<i>Nuclear transcription – $\kappa$$\beta$</i> (Fator de transcrição nuclear – kappa beta)
nm	nanômetro
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
°C	<i>Graus Celsius</i>

P ou p	Valor de p (significância do teste estatístico)
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i> (solução tampão de fosfato)
Pg	Picograma
PIE	Peritonite induzida por Endotoxina
PIE+G.brasiliensis	Peritonite induzida por Endotoxina tratado com G. brasiliensis
R.P.M	Rotação por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S.E.M	<i>Standard error of mean</i> = Erro padrão da média
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (Fator de necrose tumoral-alpha)
UDPE	Unidade didática e de pesquisa experimental
UNIFIPA	Centro Universitário Padre Albino
Vs	<i>Versus</i>
XBJ	Xuebijing

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. DPOC e tratamentos	18
1.1.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).....	18
1.1.2. Proteína anexina a1	20
1.1.3. <i>Garcinia brasiliensis</i>	22
1.2. Objetivos gerais	25
1.2.1. Objetivos específicos.....	25
1.3. Resultados	26
2. MANUSCRITO 1 - Padronização do extrato bruto das folhas da <i>Garcinia brasiliensis</i> em ensaios fitoquímicos e citotóxicos e efeitos da administração no modelo de peritonite induzida por endotoxina	27
1. Introdução.....	29
2. Materiais e métodos	30
2.1. Padronização do extrato alcoólico	30
2.2. Análise em cromatografia em camada delgada por HPTLC	30
2.3. Análise antimicrobiana	31
2.4. Análises Citotóxicas	31
2.4.1. <i>In Vitro</i>	31
2.4.2. <i>In Vivo</i>	31
2.4.2.1. Ensaio da membrana corioalantoide (<i>Chorioallantoic membrane assay</i> - CAM)	31
2.4.2.2. Modelo de peritonite.....	32
2.5. Indução da peritonite e protocolos de tratamento	32
2.6. Avaliações quantitativas e histopatológicas	33
2.7. Estudo imuno-histoquímico	33
2.8. Análises do plasma sanguíneo	34
2.9. Análises estatísticas	34
3. Resultados	34

3.1. Análises fitoquímicas e microbiológicas	34
3.2. Análises de citotoxicidade	35
3.3. Ação anti-inflamatória do extrato na peritonite experimental	35
4. Discussão	36
5. Conclusões	38
Referências	39
3 MANUSCRITO 2 - Avaliação do efeito do extrato das folhas da <i>Garcinia brasiliensis</i> em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzido pela fumaça do cigarro.....	46
1. Introdução.....	48
2. Materiais e Métodos	48
2.1. Animais	48
2.2. Obtenção do extrato.....	49
2.3. Exposição à fumaça do cigarro e protocolos de tratamentos	49
2.4. Análises fisiológicas de pletismografia	50
2.5. Análises por imagem de Raio X	50
2.6. Análises bioquímicas do sangue e lavado broncoalveolar	50
2.7. Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas	50
2.8. Quantificação de macrófagos por imunofluorescência.....	51
2.9. Dosagem de citocinas.....	52
2.10. Análises Estatísticas.....	52
3. Resultados	53
3.1. Análises fisiológicas e níveis de hemoglobina	53
3.2. Análises histopatológicas e quantificações do influxo inflamatório.....	54
3.3. Estudos das expressões das proteínas	55
3.4. Dosagem de citocinas.....	56
4. Discussão	57
5. Conclusão	61
Referências	61

4. MANUSCRITO 3 - Potencial terapêutico do peptídeo Ac2-26 da Anexina A1 em doenças pulmonares obstrutiva crônica.....	72
1. Introdução.....	74
2. Materiais e Métodos	74
2.1. Animais	74
2.2. Exposição à fumaça do cigarro e protocolos de tratamentos	75
2.3. Análises fisiológicas de pletismografia	75
2.4. Análises por imagem de Raio X	75
2.5. Análises bioquímicas do sangue e lavado broncoalveolar	76
2.6. Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas	76
2.7. Quantificação de macrófagos por imunofluorescência.....	77
2.8. Análises de <i>Western Blotting</i>	77
2.9. Dosagem de citocinas.....	78
2.10. Análises Estatísticas.....	78
3. Resultados	79
3.1. Análises fisiológicas e bioquímicas do sangue total.....	79
3.2. Histopatologia e influxo inflamatório nos tecidos e lavado broncoalveolar	80
3.3. Avaliações de expressão de proteínas.....	81
3.4. Níveis de mediadores químicos no plasma e sobrenadante do macerado pulmonar	82
4. Discussão	83
5. Conclusão	87
Referências	87
5. CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO A – Aprovação da CEUA	103
ANEXO B – Aprovação da CEUA	104
ANEXO C – Submissão do manuscrito 1	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. DPOC e tratamentos

1.1.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

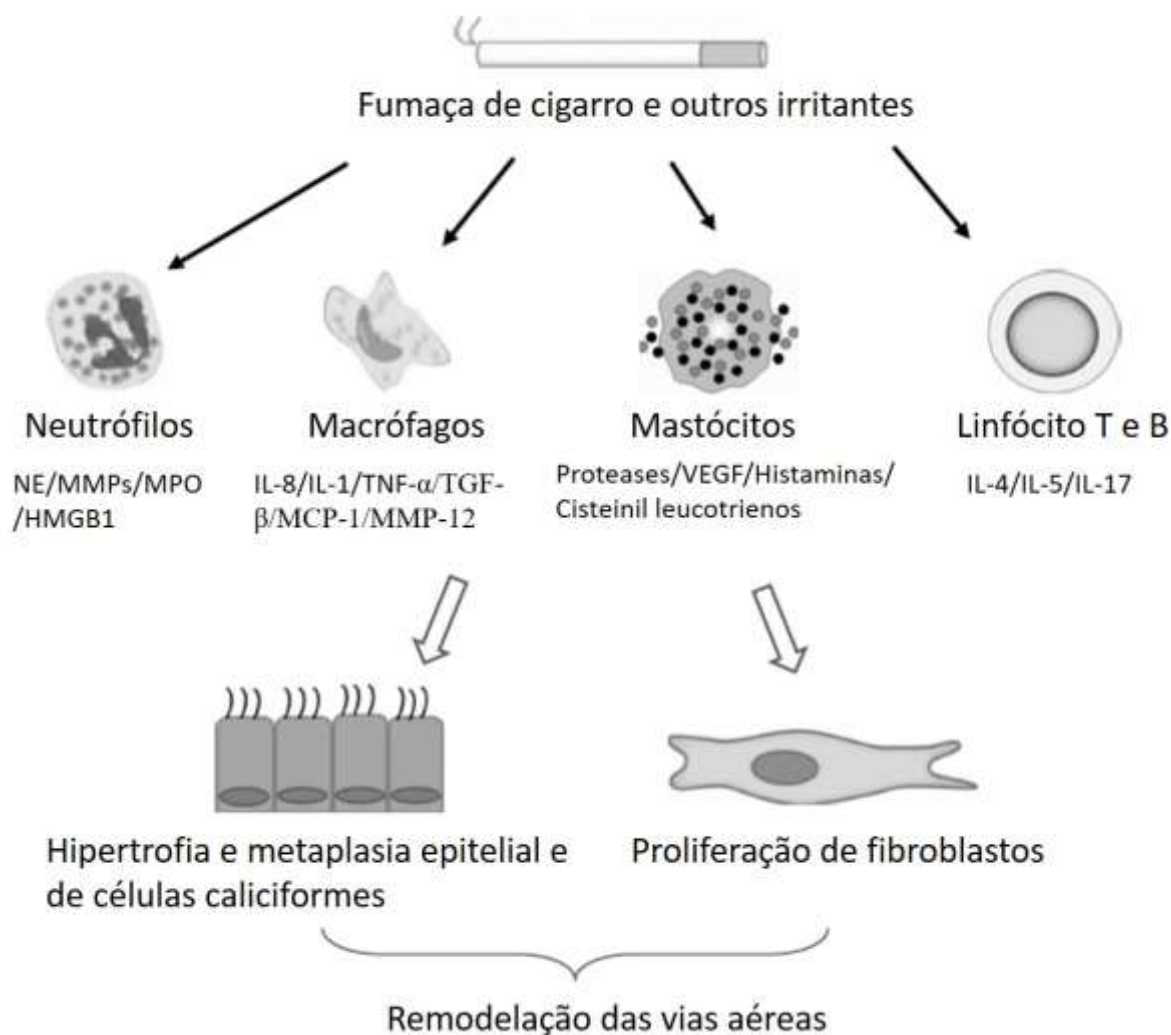
O vício tabagista é um importante problema de saúde mundial e mesmo pessoas não tabagistas, que convivem com a fumaça produzida por fumantes, sofrem os danos causados por esta exposição. A influência da fumaça do cigarro pode levar à alterações pulmonares, bem como pode ser prejudicial para todo o organismo, com efeito citotóxico de irritação local, como no nariz e também na pele, como envelhecimento precoce, dermatite atópica, degeneração do tecido conjuntivo com a participação de metaloproteinasas (MMPs) como MMP-1 e MMP-3 (STRZELAK et al., 2018). Em especial, o tabagismo predispõe, à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma grave condição de saúde caracterizada pela limitação progressiva do fluxo de ar e que apresenta estimativa de ser a terceira causa de morte em 2020 (*Pan American Health Organization and World Health Organization: concerns regarding tobacco use*, 2012; CARAMORI et al., 2014).

A DPOC é causada por processo inflamatório induzido pela inalação de partículas e gases nocivos, o que leva a mudanças estruturais nas vias respiratórias e alvéolos. Diferentes células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e linfócitos participam do processo da doença (Figura 1), sendo responsáveis pela liberação de vários mediadores químicos como o fator de necrose tumoral (TNF) α , o interferon (IFN) γ e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL8 (CCLX8), IL17 e IL18, que a longo prazo e pelo desequilíbrio da resposta imune, causam danos teciduais e levam ao declínio da função pulmonar (RABE et al., 2007; SARIR et al., 2008; CARAMORI et al., 2014, STRZELAK et al., 2018).

A influência da exposição à fumaça do cigarro em ratos é um modelo de DPOC simples e usado na literatura para estudar os efeitos adversos do tabagismo e possibilidades de tratamento das enfermidades causadas por esse hábito (GENG et al., 2013; KOZMA et al., 2014). Embora difiram no tipo e quantidade de cigarros e tempo de exposição, estudos têm sido realizados para induzir a DPOC em ratos expostos ao fumo (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008; ZHENG et al., 2009; GENG et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Desse modo, o modelo de tabagismo é útil na

compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos na DPOC e no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

Figura 1 - Papel das células inflamatórias em um perfil de exposição à fumaça do cigarro ou outros componentes irritantes.



Fonte: (Adaptado de WANG et al., 2018)

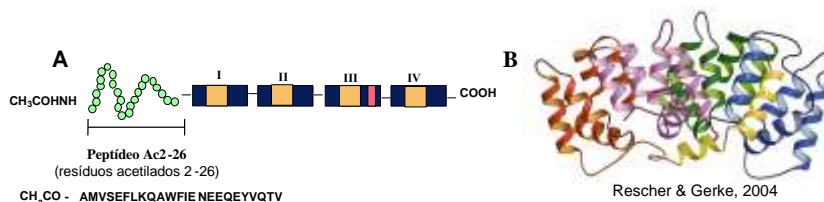
Como os mecanismos inflamatórios induzidos pelo fumo estão relacionados ao desenvolvimento das diferentes condições clínicas da DPOC, uma das possibilidades de tratamento é a terapia anti-inflamatória (ARYAL; DIAZ-GUZMAN; MANNINO, 2014). Entre os mediadores anti-inflamatórios, a proteína endógena Anexina A1 (AnxA1), o primeiro membro caracterizado da superfamília das anexinas (LIM; PERVAIZ, 2007; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009), pode representar uma terapia

alternativa para o tratamento da DPOC. Outras terapias promissoras são as baseadas em plantas medicinais que apresentam componentes fitoativos importantes no combate da inflamação, como a *Garcinia brasiliensis* (SANTA-CECÍLIA et al., 2011; SARONI ARWA et al., 2015, ESPIRITO SANTO et al., 2020).

1.1.2. Proteína anexina a1

Estruturalmente, as anexinas compreendem dois domínios, uma pequena região N-terminal, que varia em comprimento e composição e um domínio central altamente conservado (Figura 2). O domínio N-terminal é único para cada membro da superfamília, confere as atividades e funções específicas das anexinas e contém sítios para processos pós-traducionais, tais como, fosforilação, glicosilação e proteólise (PERRETTI; FLOWER, 2004; SOLITO et al., 2006; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; D'ACUNTO et al., 2014; GOBETTI; COORAY, 2016; GREWAL et al., 2016).

Figura 2- Estrutura da proteína anexina A1 (AnxA1). A: Representação esquemática da estrutura primária da AnxA1, com destaque do sítio ativo anti-inflamatório (peptídeo Ac2-26). B: Ilustração do arranjo tridimensional da proteína.



Fonte: RESCHER; GERKE, 2004.

A AnxA1 exibe sítios de ligação ao cálcio e aos fosfolipídios de membrana e está envolvida na inibição das sínteses de eicosanoides e fosfolipase A₂, induzidas por glicocorticoides (D'ACQUISTO; PERRETTI; FLOWER, 2008). Após a descoberta que atividade da AnxA1 poderia ser reproduzida pelos primeiros aminoácidos da N-terminal da proteína (peptídeo Ac2-26), tornou-se uma prática comum o uso dessas moléculas em modelos experimentais de inflamação (SOLITO et al., 2003; GIROL et al., 2013). Estudos indicam que o receptor de peptídeo formilados 2 (FPR2) está presente nas células epiteliais e inflamatórias do pulmão e é importante na resolução da DPOC, podendo ser modulado pela AnxA1 e outros agonistas como amiloide sérica

A e lipoxina A4 (BOZINOVSKI; ANTHONY; VLAHOS, 2014; CORMINBOEUF; LEROY, 2015, HAN et al., 2020).

Em modelo de fibrose induzida por bleomicina em ratos nocautes para a AnxA1, a ausência da proteína endógena exacerbou o processo inflamatório e o índice de fibrose, atenuado pela administração do peptídeo mimético Ac2-26 (DAMAZO et al., 2011). O tratamento com o Ac2-26 também apresentou efeito protetor na isquemia/reperfusão intestinal por atenuação da migração de leucócitos para o pulmão e indução da liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 para o plasma sanguíneo (GUIDO et al., 2013). Na endotoxemia pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos, a administração do Ac2-26 inibiu a migração de leucócitos e a liberação de citocina pró-inflamatória nos espaços alveolares (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012).

Uma investigação anterior do nosso grupo de pesquisa demonstrou os efeitos protetores da administração do Ac2-26 em modelo de tabagismo em ratas, por 5 semanas, com manutenção das condições fisiológicas e bioquímicas semelhantes aos animais controles, preservação dos aspectos histológicos normais de traqueia e pulmões, atenuação do influxo de células inflamatórias e redução dos níveis de mediadores inflamatórios e das expressões da AnxA1, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e metaloproteinase de matriz (MMP-9) nos animais tratados com o peptídeo (POSSEBON et al., 2018). Contudo, o estudo foi realizado em um período que pode ser considerado agudo para o processo inflamatório pulmonar e com a utilização apenas de fêmeas. Diante disso e dos resultados promissores encontrados, houve interesse de aprofundamento dessa investigação, com aumento do período de exposição e conseqüentemente tratamento com o Ac2-26, em machos e fêmeas.

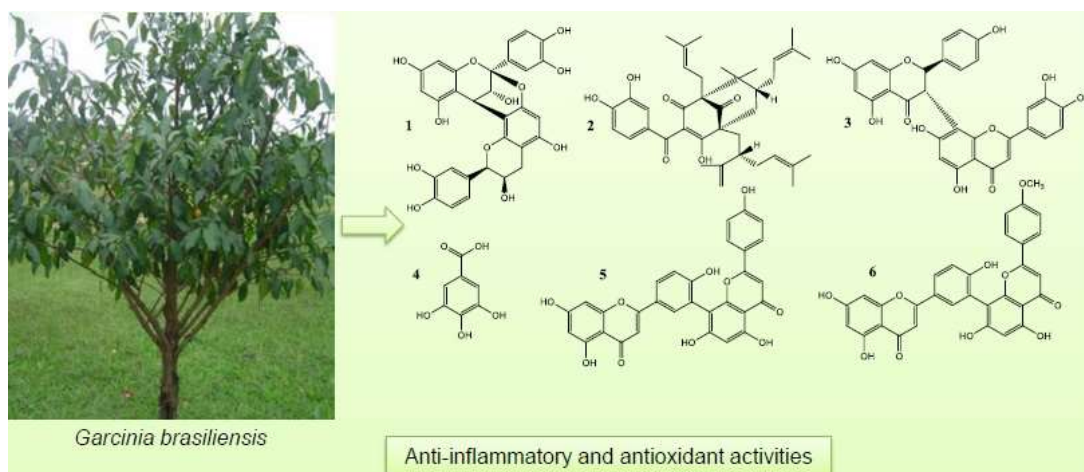
Outro aspecto interessante a ser considerado é que a expressão da AnxA1 pode ser modulada pela administração de fitoterápicos. Na sepse induzida em ratos, o tratamento com Xuebijing (XBJ), medicamento comumente usado na medicina chinesa, composto por extratos de cinco diferentes plantas medicinais (*Carthamus tinctorius*, *Paeoniae radix*, *Salvia divinorum*, *Angelica sinensis* e *Ligusticum wallichii* Franchet) promoveu efeitos anti-inflamatórios pela diminuição da liberação de citocinas e infiltrado inflamatório, correlacionado ao aumento na expressão de AnxA1 nos neutrófilos e pulmões (HE et al., 2013). Além disso, em estudos com cultura de células tumorais de pulmão, outros pesquisadores relataram que a atividade anti-

inflamatória da *Cammelia sinenses* (chá verde) é mediada pela superexpressão da AnxA1 e redução na expressão da COX-2 e prostagladina 2 (LU et al., 2012; SEIDEL et al., 2012).

1.1.3. *Garcinia brasiliensis*

Entre as plantas brasileiras com potencial terapêutico promissor, destacamos o Gênero *Garcinia* da família Guttiferae (*Clusiaceae*), típica da região amazônica, mas também encontrada em diversos estados brasileiros (Figura 3) (AMPOFO; WATERMAN, 1986; SARONI ARWA et al., 2015). As espécies de *Garcinia* vêm sendo estudadas em diferentes condições inflamatórias e diversas infecções em modelos animais e apresentam algumas propriedades biológicas interessantes como atividades antifúngicas, anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e vasodilatadoras (GOPALAKRISHNAN et al., 1997; CRUZ et al., 2006; CASTARDO et al., 2008; OTUKI et al., 2011).

Figura 3 - Compostos identificados em extratos de folhas e ramos de *Garcinia brasiliensis*: procianidina (1), garcinol (2), fukugetina (3), ácido gálico (4), amentoflavona (5) e podocarpusflavona (6).



Fonte: Modificado de SARONI ARWA et al., 2015.

Em especial, vários pesquisadores têm investigado os compostos fitoquímicos presentes em extratos de *G. brasiliensis*, também conhecida por *Rheedia brasiliensis*

(BOTTA et al., 1984) e popularmente chamada de bacupari. Em extratos etanólicos de ramos e folhas desta planta foram encontradas quantidades significativas de compostos fenólicos totais e flavonoides, especialmente nas folhas (SARONI ARWA et al., 2015). Dos extratos etanólicos de folhas também foi isolado o lupeol (CORRÊA et al., 2008). As benzofenonas polipreniladas, 7-epiclusianona e glutiferona A, foram obtidas de extratos etanólicos de frutas e sementes de *G. brasiliensis* (MARTINS et al., 2011). Estudos mostram que as benzofenonas polipreniladas exibem propriedades anti-inflamatórias e antitumorais (YAMAGUCHI et al., 2000; PAN et al., 2001; PRABHAKAR et al., 2006).

Outros fitoquímicos como os biflavonoides, volkensiflavona e fukugetina foram encontrados em extratos de raízes de *G. brasiliensis*, e ainda, foram isolados do extrato dos frutos da planta os biflavonoides morelloflavona e fukugisida (GONTIJO et al., 2012). Esses biflavonoides apresentam propriedades anti-inflamatórias (CASTARDO et al., 2008), anti-bacteriana (ASSIS et al., 2013), antioxidante, leishmanicida, antiproteolítica (GONTIJO et al., 2012) e anticarcinogênica (MERCADER; POMILIO, 2013).

O efeito antiespasmódico da 7-epiclusianona do extrato de frutos de *G. brasiliensis* foi estudado em preparações isoladas de anel de traqueia de cobaias e a ação potencial do tratamento oral da 7-epiclusianona no broncoespasmo desencadeado por metacolina aerosolizada em ratos BALB/c foi investigada por Coelho e colaboradores (2008). Os resultados dessa investigação mostraram mecanismos dependentes de óxidos e GMPc. A 7-epiclusianona, isolada do pericarpo de frutas de *G. brasiliensis*, também é um potente inibidor da liberação de histamina tecidual induzida por alérgenos (NEVES et al., 2007).

Outro estudo investigou as ações anti-inflamatórias e antinociceptivas da 7-epiclusianona isolada de extrato de folhas de *G. brasiliensis* (SANTA-CECÍLIA et al., 2011), em diferentes modelos animais. Esses pesquisadores observaram redução do edema de pata induzido por carragenina e a inibição do recrutamento de leucócitos na peritonite induzida por LPS, bem como o aumento no tempo de latência entre os episódios dolorosos com a administração oral da 7-epiclusianona.

Saroni Arwa e colaboradores (2015) mostraram que os compostos fenólicos tebiflavonoide, procianidina, fukugetina, amentoflavona e podocarpusflavona isolados de ramos e folhas de *G. brasiliensis* apresentaram efeitos inibidores sobre os íons

superóxido e espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por neutrófilos humanos estimulados, o que poderia representar uma estratégia terapêutica no controle de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, manejo da inflamação e redução dos efeitos prejudiciais das ROS. Além disso, os biflavonoides também isolados dos extratos exibiram potente inibição da hemólise oxidativa e da peroxidação lipídica induzidas por Cloridrato de azobis (2-amidinopropano) em eritrócitos humanos (SARONI ARWA et al., 2015).

Diante do potencial efeito anti-inflamatório do extrato da *G. brasiliensis* é possível que sua administração module a expressão da AnxA1, bem como promova efeitos protetores em modelo de inflamação respiratória induzida por exposição à fumaça do cigarro, limitando a progressão da doença.

Por reconhecer que o entendimento dos processos que controlam a inflamação é essencial para o desenvolvimento de drogas farmacológicas eficazes no tratamento das afecções inflamatórias, sem os efeitos adversos observados nos tratamentos convencionais, procedemos ao estudo da administração do peptídeo mimético da AnxA1, bem como do extrato alcoólico da *G. brasiliensis* como tratamento dos processos inflamatórios induzidos pela exposição à fumaça do cigarro em modelo experimental de DPOC, como possíveis alternativas terapêuticas das enfermidades causadas pelo hábito do tabagismo.

1.2. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos das administrações do extrato de *G. brasiliensis* e do peptídeo Ac2-26 em modelo de inflamação respiratória induzida pela exposição prolongada à fumaça do cigarro.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICO

Experimentos in vitro

2. Padronizar a obtenção do extrato alcoólico de *G. brasiliensis*;
3. Realizar análises de citotoxicidade, microbiológicas e fitoquímicas do extrato.

Experimentos in vivo

Nos animais expostos ao fumo por 8 semanas, tratados ou não com o Ac2-26 ou extrato de *G. brasiliensis*:

1. Analisar os dados fisiológicos;
2. Dosar os níveis de hemoglobina no sangue;
3. Quantificar as células inflamatórias no LBA;
4. Avaliar as características histopatológicas e quantificar os macrófagos do pulmão e traqueia;
5. Investigar a expressão das proteínas AnxA1, FPR1, FPR2, COX-2, MMP-2 e MMP-9 no pulmão e traqueia.
6. Avaliar a expressão de AnxA1 e receptores FPR1 e FPR2 no sobrenadante do macerado pulmonar;
7. Dosar no plasma sanguíneo e sobrenadante do macerado pulmonar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α .

1.3. RESULTADOS

Os resultados obtidos das investigações serão apresentados a seguir na forma de manuscritos.

O manuscrito 1 apresenta os resultados da padronização do extrato de *G. brasiliensis*, com acréscimo de procedimentos *in vivo*, para reforçar as análises de citotoxicidade e da potencialidade anti-inflamatória do extrato.

Os resultados obtidos no modelo de DPOC e tratamentos propostos estão apresentados nos manuscritos 2 e 3, que mostram, respectivamente, os efeitos da administração do extrato de *G. brasiliensis* e do peptídeo Ac2-26 da AnxA1.

2. MANUSCRITO 1

Padronização do extrato bruto das folhas da *Garcinia brasiliensis* em ensaios fitoquímicos e citotóxicos e efeitos da administração no modelo de peritonite induzida por endotoxina

Lucas Possebon^{1,2}, Jéssica Messias da Silva¹, Ariane Harume Yoshikawa¹, Sara de Souza Costa^{1,2}, Melina Mizusaki, Iyomasa Pilon¹, Helena Ribeiro Souza^{1,2}, Sonia Maria Oliani², Ana Paula Girol^{1,2}

1 – Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

2- Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.

Palavras-chave: fitoquímico; citotóxico; peritonite; *G. brasiliensis*; inflamação.

Suporte financeiro: CAPES, UNIFIPA

Resumo

A *Garcinia brasiliensis* é utilizada na medicina tradicional brasileira para o tratamento de tumores, inflamações e dores. Neste estudo padronizamos e avaliamos as propriedades anti-inflamatórias, bem como a citotoxicidade do extrato bruto de folhas da *G. brasiliensis* em modelos *in vitro* e *in vivo*. O extrato etanólico bruto a 20% foi obtido das folhas de *Garcinia brasiliensis*. Após rediluído em água em diferentes concentrações realizamos perfil cromatográfico (HPTLC), estudos microbiológicos, análise citotóxica por hemólise e Chorioallantoic membrane assay (CAM). A potencialidade anti-inflamatória foi testada no modelo de peritonite induzida por única injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS, 1mg/kg). O extrato de *G. brasiliensis* a 4% foi administrado por gavagem (1mL) antes e 12h do LPS. Após 24h da indução foram coletados sangue, lavado intraperitoneal e intestino delgado para análises quantitativas de neutrófilos e mastócitos, níveis de histamina e imunohistoquímica da expressão da proteína Anexina A1 (AnxA1). As análises fitoquímicas indicaram presença de taninos, glicosídeos flavanoídeos e alcaloides e negativas para glicosídeos saponínicos. O HPTLC indicou presença de lupeol. O extrato mostrou baixa citotoxicidade nas concentrações de 4%, 6% e 8%, não apresentou toxicidade no CAM e inibiu *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* em altas concentrações. No modelo de peritonite, o tratamento reduziu o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal e os mastócitos na lâmina própria do intestino, mas os níveis de histamina não mostraram diferença. Na mucosa intestinal dos animais tratados a expressão da AnxA1 foi diminuída. O extrato alcoólico da *G. brasiliensis* apresenta ação anti-inflamatória com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos.

1. Introdução

A inflamação é uma resposta biológica protetora que envolve vasos sanguíneos, células imunológicas e mediadores inflamatórios.¹ Entre as células inflamatórias, os mastócitos (MCs) liberam mediadores pró-inflamatórios, por meio da desgranulação, como a histamina, a qual provoca a vasodilatação e consequentemente o extravasamento de plasma, resultando no acúmulo de líquido na região e lesão tecidual.²

Contudo, o processo também conta com os mediadores anti-inflamatórios, entre os quais a proteína Anexina A1 (AnxA1), que mantém o equilíbrio da resposta imunológica³. A AnxA1 foi o primeiro membro clonado de uma superfamília de proteínas estruturalmente relacionadas, denominadas anexinas, que apresentam uma sequência de 70 a 80 aminoácidos altamente conservada nos vertebrados, sendo capazes de se ligarem aos fosfolípidios de membrana de maneira dependente de cálcio^{3,4}. A AnxA1 está envolvida em processos celulares presentes no reparo tecidual, como regulação da inflamação, crescimento celular, migração celular, transporte de membrana, proliferação, diferenciação e apoptose.^{5,4}

Atualmente os medicamentos anti-inflamatórios disponíveis apresentam efeitos colaterais adversos, que inibem o seu uso clínico.⁶ Desse modo, há grande demanda por novas terapias anti-inflamatórias. Na busca de novas opções terapêuticas que podem causar menos efeitos colaterais adversos, os compostos naturais têm sido amplamente estudados.⁷ Entre as plantas brasileiras com esse potencial, destaca-se a *Garcinia brasiliensis*, espécie da família *Clusiaceae*, nativa da Amazônia,^{8,9} comumente conhecida como bacupari, que tem sido usada na medicina tradicional brasileira para tratamento de tumores, inflamação do trato urinário, artrite e alívio da dor.¹⁰ Diferentes estudos mostraram propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antitumorais, antioxidantes e vasodilatadoras em representantes do gênero *Garcinia* em vários modelos experimentais.^{11,12,13,14} Contudo as atividades anti-inflamatórias da *G. brasiliensis* em estudos de inflamação ainda são limitadas.

Considerando o uso popular e a valorização das plantas medicinais como alternativas terapêuticas, procedemos a padronização e o estudo de citotoxicidade do extrato bruto das folhas de *G. brasiliensis*, bem como avaliamos suas propriedades anti-inflamatórias em modelo de peritonite.

2. Materiais e métodos

2.1. Padronização do extrato alcoólico

Folhas de *Garcinia brasiliensis* (exsicatas foram depositadas no herbário IRINA DELANOVA GEMTCHUJNICOV(BOTU) número:33511(bacupari) foram coletadas no segundo trimestre do ano de 2017 (22 de maio) e submetidas ao procedimento de extração. O extrato de *G. brasiliensis* foi obtido por percolação, com o uso de 20g de folhas secas e trituradas com 100 mL de álcool de cereais, resultando no extrato bruto final a 20%. Para padronização, o extrato foi evaporado pelo evaporador rotativo à vácuo (MA120/TH, Marconi).

O extrato foi utilizado para análises de identificação de componentes químicos, taninos, flavonoides, saponinas e alcaloides, por meio de reações com Cloreto Férrico, Acetato de Chumbo, Acetato de cobre, Cloreto de alumínio e Hidróxido de sódio¹⁵.

2.2. Análise em cromatografia em camada delgada por HPTLC

O extrato da *G. brasiliensis* foi submetido à cromatografia em camada delgada usando sílica gel. Esse extrato foi eluído com quantidades crescentes de Tolueno/Metanol (9:1), sendo usado o revelador de Ácido Acético / Ác. Sulfúrico (70:30) com 2% de vanilina.^{16,17}

O perfil cromatográfico foi desenvolvido no CE e suas Frações. Todas as análises cromatográficas foram realizadas com o aplicador automático CAMAG Linomat 5) com gás N (60 psi) e em camadas de sílica Thyn de 10X10 cm (Ref. 818333 - Macherey-Nagel / Alemanha - ALUGRAM® Xtra SIL G / UV254). O método de aplicação foi o mesmo para todas as análises, utilizando seringa (100 µL; Hamilton), velocidade de dosagem de 50 nL / s, 0,2 µL por volume de dosagem, manchas feitas com aplicação de 10 µL e comprimento de 8 mm e distância entre manchas de 5 mm.

Os padrões e fases móveis usados neste trabalho foram: Lupeol (Sigma – 18692), Eluentes Tol / MeOH (9:1) e derivação Vanilina (2%) diluída em AcOH (30%) e solução de H₂SO₄ (esta solução foi diluída em 1% em EtOH) – a placa permaneceu na estufa a 70 °C por 10 minutos.

2.3. Análise antimicrobiana

Para análises antimicrobianas, as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 0022), *Shigella dysenteriae* (ATCC 0122), *Salmonella entérica* (ATCC 0028), *Proteus mirabilis* (ATCC 0133), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 0083) foram incubadas em placa de Petri à 37 °C por 24 horas com discos embebidos de diferentes concentrações do extrato da *G. brasiliensis* seco e diluído em solução de glicose. No centro das placas foram colocados discos com antibióticos de referência para as respectivas bactérias: estreptomicina para *E. coli*, polimixina para *Klebsiella*, ampicilina para *Proteus e Shigella* e cloranfenicol para *Salmonella*. Após esse período foram medidos os halos de todos os discos.

2.4. Análises Citotóxicas

2.4.1. In Vitro

O extrato foi avaliado quanto à citotoxicidade *in vitro* por meio da análise da hemólise. Solução glicosilada (5%) de sangue humano (4%) foi misturada a diferentes concentrações das amostras¹⁸ (4%, 6%, 8% e 10%). Para controle positivo foi preparada solução 0,1% de Triton e, para solução negativa, apenas soro fisiológico foi adicionado à solução de hemácias. As amostras e os controles foram levados ao banho-maria a 37° C por 15 minutos centrifugados à 2.000 RPM por 10 min e, posteriormente, levados para leitura no espectrofotômetro a 540 nm após zerar-se o aparelho com a solução glicosilada.

2.4.2. In Vivo

2.4.2.1. Ensaio da membrana corioalantoide (*Chorioallantoic membrane* (CAM) assay)

Para a realização do ensaio da membrana corioalantoide, foram utilizados ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus domesticus*), incubados à temperatura 38°C e umidade relativa de 45 a 65%. Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) (Certificado nº 06/18) UNIFIPA.

Os ovos embrionados foram divididos em três grupos experimentais (n = 3/grupo) Grupo controle, ovos permaneceram fechados, sem intervenções, Grupo Sham, onde

os ovos foram injetados com PBS (solução salina tamponada com fosfato, injetado na câmara de ar), Grupos tratados, nos quais foram aplicados 100 µL do extrato em diferentes concentrações (4%, 6%, 8% e 10%). A casca dos ovos foi perfurada na região da câmara de ar, para administração do PBS ou do extrato e após, o orifício foi selado com parafilme. No terceiro dia de incubação, a casca do ovo ao redor da câmara de ar foi removida, para avaliação da vascularização na membrana corioalantoide e o desenvolvimento morfológico do embrião.¹⁹

2.4.2.2. Modelo de peritonite

Ratas da linhagem *Wistar* (n = 15), pesando entre 200g a 250g, foram obtidas da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) de Catanduva, SP, Brasil. Os animais foram abrigados sob o ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a comida e água, mantidos em gaiolas padrão. Os procedimentos experimentais foram realizados nos Laboratórios de Cirurgia Experimental e Multidisciplinar da UNIFIPA, após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFIPA) (certificado nº 05/18), com acompanhamento de médico veterinário.

Para a realização dos experimentos as ratas foram divididas em 3 grupos (n = 5 / grupo): Controle (C), Peritonite induzida por endotoxina (PIE) sem tratamento e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. brasiliensis* a 4% (PIE + *G. brasiliensis*).

2.5. Indução da peritonite e protocolos de tratamento

A peritonite foi induzida, em dois grupos de ratas, com solução de 25 mg de LPS (sorotipo 0127: B8, Sigma Chemical Co.) diluído em 200 µL de PBS e aplicado intraperitonealmente (i.p)²⁰. Animais sem manipulação foram usados como grupo controle.

Para avaliação das atividades anti-inflamatórias da *G. brasiliensis*, um dos grupos foi administrado duas vezes, por gavagem, com o extrato a 4% (1mL / gavagem), sendo a primeira administração realizada imediatamente antes da injeção do LPS e a segunda 12h depois da indução da peritonite. Após 24h da injeção do LPS

os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico inalatório (isoflurano) para coleta de sangue, do lavado peritoneal e do intestino delgado.

2.6. Avaliações quantitativas e histopatológicas

Após coleta de sangue por punção cardíaca, a pele do abdome foi retirada e adicionados 2 mL de PBS, intraperitonealmente. O abdomen foi massageado suavemente e uma pequena incisão foi feita logo abaixo do externo para aspiração cuidadosa do lavado peritoneal, que foi então centrifugado a 1500 R.P.M. durante 10 min. A seguir, o excesso de PBS foi descartado e o *pellet* resuspendido em 900 µl de PBS e 100 µL de Turk para quantificação das células inflamatórias em câmara de Neubauer. Os valores foram obtidos como número de células x 10³ mL.

Fragmentos do intestino delgado foram lavados com PBS, fixados em formol a 4%, processados para inclusão em parafina e seccionados (3µm). Os mastócitos (MCs) foram corados pelo Azul de Toluidina a 0,1% e avaliados de acordo com suas características morfológicas e estado de ativação em intactos (inativos) e desgranulados (ativos). A quantificação dos MCs foi realizada em 10 imagens por lâmina, obtidas pela objetiva de 40X no microscópio *Leica* (DM500) do Laboratório Multidisciplinar UNIFIPA. As áreas de cada tecido foram obtidas com o auxílio do *software Leica Image Analysis*. Os dados foram expressos como média ± erro padrão (S.E.M.) do número de MCs por mm.^{2,21,22}

2.7. Estudo imuno-histoquímico

A expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 foi estudada por imuno-histoquímica e densitometria. Para isso, secções (3 µm) das diferentes amostras foram preparadas em lâminas gelatinizadas, desparafinizadas, reidratadas e, após a recuperação antigênica (tampão citrato pH 6,0 a 96° C, durante 10 minutos) e o bloqueio com metanol, as secções foram lavadas em PBS e incubadas *overnight* em câmara úmida a 4° C com o anticorpo primário *policlonal rabbit anti-AnxA1* (1:2000; *Abcam*) diluído em BSA a 1%. No dia seguinte, foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (kit *Zymed Invitrogen*), e a seguir, em substrato diaminobenzidina (DAB) (kit *Zymed Invitrogen*) para revelação. Após, as secções foram contracoradas com Hematoxilina.

Para as análises densitométricas, 20 pontos distintos do epitélio e da lâmina própria da mucosa intestinal, em 10 imagens por lâmina, obtidas pela objetiva de 40X, foram avaliados para obtenção da média relacionada a intensidade da imunomarcção. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (de 0 a 255) pelo programa analisador de imagem *Leica Image Analysis*.^{21,22}

2.8. Análises do plasma sanguíneo

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas, as alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 3.000 R.P.M. e o plasma congelado a -70°C para posterior dosagem da histamina, que foi realizada por ELISA, com kits comercialmente disponíveis e de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram expressos como média \pm S.E.M. de ng de proteínas/mL.

2.9. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade. Para distribuição normal foi usada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados

3.1. Análises fitoquímicas e microbiológicas

Nossos resultados da identificação de componentes no extrato da *G. brasiliensis* foram positivos para presença de tanino, glicosídeos flavanoídios e alcaloides e negativos para glicosídeos saponínicos. A análise por cromatografia em camada delgada por HPTLC indicou a presença do composto lupeol nas concentrações de 4%, 6%, 8% e 10% do extrato da *G. brasiliensis* (Figura 1.1)

Nos ensaios antimicrobianos foram observadas inibições do crescimento das diferentes bactérias (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella*) promovidas pelo extrato vegetal bruto (#) e/ou em 75% (*) por meio da formação de halos ao redor

dos discos embebidos em diferentes concentrações do extrato comparados aos antibióticos de referência (Figura 1.2).

3.2. Análises de citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* mostraram baixa citotoxicidade do extrato nas concentrações do controle negativo (0,100A), 4% (0,188A), 6% (0,683A) e 8% (0,906A) dos ensaios de sangue humano e potencialmente citotóxica no controle positivo (2,500A) e concentrações acima de 10% (1,008A) (Figura 2.1).

As análises de CAM não mostraram citotoxicidade do extrato em 4%, 6%, 8% e 10%, com ausência de vasoconstrição e coagulação, comparados ao controle (não manuseado) e PBS (Figura 2.2).

Baseados nesses resultados, a concentração do extrato em 4% foi selecionada para análise do potencial inflamatório no modelo de peritonite.

3.3. Ação anti-inflamatória do extrato na peritonite experimental

Nas avaliações histopatológicas da mucosa intestinal (Figura 3), os MCs foram identificados na lâmina própria, pela presença de grânulos metacromáticos no citoplasma sendo considerados intactos quando as células mostraram contornos bem definidos (Figura 3C) e desgranulados (Figura 3D) quando os grânulos foram observados dispersos ao redor. A quantificação indicou aumento significativo ($p < 0,01$) dos MCs, intactos (Figura 3A) e desgranulados (Figura 3B) no grupo peritonite sem tratamento em comparação com o controle. A administração do extrato de *G. brasiliensis* reduziu a quantidade dessas células ($p < 0,05$). Contudo, as análises do plasma sanguíneo mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos para a histamina (Figura 3E).

A análise de leucócitos do lavado peritoneal (Figura 3F) indicou grande influxo de neutrófilos ($p < 0,01$) nos animais induzidos à peritonite e não tratados, comparado ao controle. Contudo, nos animais tratados com o extrato de *G. brasiliensis* ocorreu redução do influxo de neutrófilos ($p < 0,05$) em relação ao grupo sem tratamento.

Os estudos imuno-histoquímicos mostraram expressão da proteína AnxA1 no citoplasma do epitélio e lâmina própria da mucosa intestinal (Figura 4). O padrão de expressão foi semelhante nos grupos controle (Figura 4A) e peritonite tratado com

extrato de *G. brasiliensis* (Figura 4C). Diferentemente, foi observado aumento da expressão da proteína nos animais não tratados.

As análises densitométricas da expressão da AnxA1 foram realizadas no epitélio (Figura 4D) e na lâmina própria (Figura 4E) da mucosa intestinal. A especificidade da imunomarcação foi comprovada pelo controle de reação (Figura 4F). Essas análises corroboram as observações histológicas e indicaram aumento na expressão da proteína no grupo não tratado, no tecido epitelial ($p < 0,05$) e redução da expressão após tratamento no epitélio ($p < 0,01$) e na lâmina própria ($p < 0,05$).

4. Discussão

A padronização do extrato da *G. brasiliensis* é fundamental para o conhecimento dos compostos presentes e o estabelecimento de dosagens seguras. Desse modo, procedemos a análises fitoquímicas, seguidas de estudos da ação antimicrobiana e da avaliação de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Nossos resultados mostraram a presença de taninos, glicosídeos flavoinídeos e alcalóides, o que evidencia as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes do extrato bruto de folhas de *G. brasiliensis*. Para aprofundar as análises do perfil fitoquímico, outro componente, o lupeol, foi identificado, no nosso estudo, pela cromatografia em camada delgada (HPTLC). Também observamos a capacidade antimicrobiana do extrato, nas concentrações mais altas, sobre *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella*. Além disso, nossos estudos indicaram ausência de citotoxicidade do extrato em baixas concentrações, tanto nos testes de hemólise quanto no ensaio da membrana corioalantoide.

Estudos anteriores de outros grupos de pesquisa mostraram a presença de diferentes componentes do metabolismo secundário no extrato das espécies do gênero *Garcinia*, nas diversas partes do vegetal.²³ Nas folhas foram encontrados componentes como garcinol, 1-epiclusianona, ácido gálico e procidianina,^{24, 25, 26, 27} que apresentam atividade anti-inflamatória, o que mostra a possibilidade terapêutica de extratos obtidos das folhas de *G. brasiliensis*. Similarmente, outras investigações apontaram a presença do lupeol nos extratos de *G. brasiliensis*¹⁰ e indicaram sua eficácia anti-inflamatória.^{16, 17} Ainda, estudos têm mostrado que a presença dos componentes guttiferona-A e 7-epiclusianona, encontrados em sementes, folhas e frutos das diferentes espécies de *Garcinia* apresenta potencial atividade

antimicrobiana.²³ Assim, nossas análises estão de acordo com outras pesquisas sobre a caracterização do perfil do extrato de folhas da *G. brasiliensis*.^{27,28}

Após a identificação da presença de componentes anti-inflamatórios, da capacidade antimicrobiana e do estabelecimento de concentrações seguras do extrato de folhas de *G. brasiliensis*, testamos o seu potencial anti-inflamatório, na concentração de 4% em modelo de peritonite. No nosso estudo, a administração da endotoxina induziu intensa resposta inflamatória com influxo de leucócitos, especialmente monócitos, linfócitos e neutrófilos na cavidade peritoneal e de mastócitos na mucosa intestinal. O LPS liga-se aos receptores Toll-like (TLR4) presentes em células epiteliais e fagocitárias e promove a produção de citocinas pró-inflamatórias e migração de leucócitos.²⁹ Entretanto, o tratamento com o extrato de *G. brasiliensis* reduziu significativamente a resposta inflamatória. O efeito protetor de fitoterápicos no modelo de peritonite também foi demonstrado em outras investigações,^{30,31} reforçando a potencialidade de aplicação de ervas medicinais na inflamação.

Nossas análises também indicaram diminuição no número de mastócitos intactos e desgranulados na lâmina própria da mucosa intestinal, no grupo tratado. O conteúdo dos grânulos dos MCs pode ser liberado por meio da ativação com ligação da IgE aos receptores FcεR, mas também, por outros mecanismos como ativação dos receptores *Toll-like* por produtos microbianos.^{2,32} Desse modo, nossos resultados mostram o papel anti-inflamatório do extrato de *G. brasiliensis* também em células de defesa do tecido conjuntivo. De maneira interessante, nas dosagens de histamina, nossos dados não mostraram diferenças de dosagens entre os grupos. Isto pode estar relacionado ao momento de coleta do sangue, após 24h da indução da peritonite, pois a liberação de histamina pelos MCs provavelmente ocorreu nas primeiras horas da aplicação do LPS conforme observado no trabalho de Seeley e colaboradores.³³

Na sequência do nosso trabalho, estudamos a expressão da proteína anti-inflamatória AnxA1 na mucosa intestinal. Nossas análises mostraram aumento da proteína AnxA1 no grupo induzido pelo LPS. Esse resultado era esperado, visto a AnxA1 ser um potente mediador anti-inflamatório endógeno e exógeno.⁵ Investigações *in vivo* e *in vitro*, indicaram que a AnxA1 promove fechamento de lesões provocadas em epitélio intestinal.^{34,35} Ferlazzo e colaboradores³⁶ observaram que, em cultivo de macrófagos com LPS, o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1,

induziu liberação de IL-10 de modo dose dependente, evidenciando que, parte da mediação anti-inflamatória da AnxA1 é devida ao estímulo da expressão de IL-10.

Em outro estudo, no modelo animal de inflamação pulmonar, o tratamento com *Camelia sinensis* promoveu aumento na expressão de AnxA1, sugerindo que a atividade anti-inflamatória do fitoterápico foi mediada pela mesma.³⁷ Uma investigação de nosso grupo de pesquisa, usando piperlongumina, um composto purificado de *Piper longum*, também mostrou que o composto bioativo natural aumentou a expressão de AnxA1.³⁸

Porém, nesta investigação, o grupo tratado com o extrato de *G. brasiliensis* apresentou níveis de expressão proteica semelhantes ao do grupo controle, o que mostra que a ação antiinflamatória do extrato das folhas de *G. brasiliensis* ocorre por meios independentes de AnxA1 no modelo estudado e está de acordo com os resultados obtidos por outra investigação do nosso grupo com a administração de uma mistura de ervas (*Arctium lappa*, *Plantago major*, *Mikania glomerata* Spreng e *Equisetum arvense*) que também diminuiu os níveis de mediadores inflamatórios plasmáticos e a expressão pulmonar de AnxA1.²² Esses resultados reforçam que os extratos de plantas medicinais são potentes agentes antiinflamatórios e podem modular os mediadores químicos de forma diferenciada.

5. Conclusões

Nossos dados evidenciam a presença de compostos com efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios, bem como ausência de citotoxicidade do extrato alcoólico de *G. brasiliensis* em concentrações baixas, com importante reversão do processo inflamatório em modelo de peritonite. O tratamento reduziu o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal e diminuiu o número de mastócitos intactos e desgranulados na lâmina própria da mucosa intestinal. A redução da proteína anti-inflamatória AnxA1, na mucosa do intestino delgado, com a administração do extrato, indica que o tratamento atua de maneira independente desse mediador. Em conjunto esses dados revelam a potencialidade terapêutica do extrato de *G. brasiliensis* para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios.

Referências

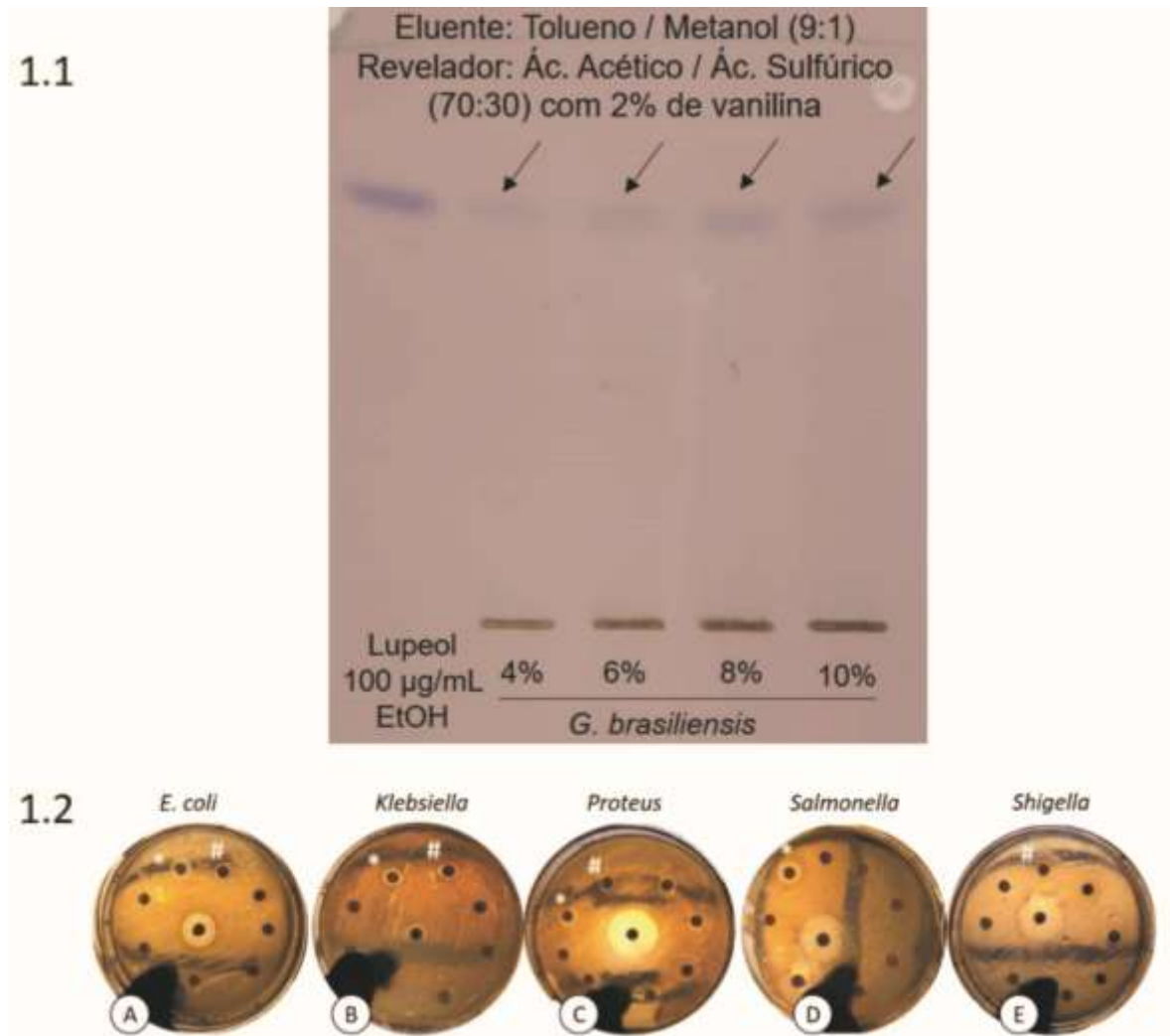
1. KALLIOLIAS, G.D.; IVASHKIV, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol.** 2016;12(1):49-62. doi:10.1038/nrrheum.2015.169
2. DA SILVA, E.Z.; JAMUR, M.C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **J Histochem Cytochem.** 2014;62(10):698-738. doi:10.1369/0022155414545334
3. LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J.** 2007;21(4):968-975. doi:10.1096/fj.06-7464
4. SHEIKH MH, SOLITO E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. **Int J Mol Sci.** 2018;19(4):1045. doi:10.3390/ijms19041045
5. GIROL, A.P.; MIMURA, K.K.; DREWES, C.C.; et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol.** 2013;190(11):5689-5701. doi:10.4049/jimmunol.1202030
6. SHUKLA, S.; MEHTA, A.; MEHTA, P.; VYAS, S.P.; SHUKLA, S.; BAJPAI, V.K. Studies on anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Caesalpinia bonducella* F. seed oil in experimental animal models. **Food Chem Toxicol.** 2010;48(1):61-64. doi:10.1016/j.fct.2009.09.015
7. PAN, X.; CAO, X.; LI, N.; et al. Forsythin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing JAK-STAT and p38 MAPK signalings and ROS production. **Inflamm Res.** 2014;63(7):597-608. doi:10.1007/s00011-014-0731-7
8. PRAKASH BABU, N.; SARAVANAN, S.; PANDIKUMAR, P.; et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of 3-hydroxy, 2-methoxy sodium butanoate from the leaves of *Clerodendrum phlomidis* L.f. **Inflamm Res.** 2014;63(2):127-138. doi:10.1007/s00011-013-0681-5
9. AMPOFO, S.A.; WATERMAN, P.G. Xanthenes and neoflavonoids from two asian species of *calophyllum*. **Phyrochtmisrry.** Vol 25: 2617-2020 p. 1986.
10. CORRÊA, R. S. et al. **Lupeol.** Acta Crystallographica Section C. 65: 97-99 p. 2008.
11. DÍAZ-CARBALLO, D.; SEEBER, S.; STRUMBERG, D.; HILGER, R.A. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **Int J Clin Pharmacol Ther.** 2003;41(12):622-623. doi:10.5414/cpp41622
12. HAY, A.E.; AUMOND, M.C.; MALLET, S.; et al. Antioxidant xanthenes from *Garcinia vieillardii*. **J Nat Prod.** 2004;67(4):707-709. doi:10.1021/np0304971
13. CRUZ, A.J.; LEMOS, V.S.; DOS SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J.; CORTES, S.F. Vascular effects of 7-epiclusionone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine.** 2006;13(6):442-445. doi:10.1016/j.phymed.2005.01.014
14. CASTARDO, J.C.; PRUDENTE, A.S.; FERREIRA, J.; et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **J Ethnopharmacol.** 2008;118(3):405-411. doi:10.1016/j.jep.2008.05.002

15. DAHANAYAKE, J.M.; PERERA, P.K.; GALAPPATTY, P.; PERERA, H.D.S.M.; ARAWWAWALA, L.D.A.M. Comparative Phytochemical Analysis and Antioxidant Activities of Tamalakyadi Decoction with Its Modified Dosage Forms. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2019;2019:6037137. doi:10.1155/2019/6037137
16. RATHEE, K.; DHULL, V.; DHULL, R; SINGH, S. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. **Biochem Biophys Rep.** 2015;5:35-54.. doi:10.1016/j.bbrep.2015.11.010
17. WEI, L.; ZHANG, W.; YIN, L.; et al. Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas* leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities. **Electronic Journal of Biotechnology.** 18:(2015)88–95. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.005>
18. DESOTI, V.C.; MALDANER, C.L.; CARLETTO, M.S.; HEINZ, A.A.; COELHO, M.S.; PIATI, D.; TIUMAN, T.S.; Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobianas e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arq. Ciên. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v.15, n.1, p. 3-13, jan/abril 2011.
19. RIBATTI D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reprod Toxicol.** 2017;70:97-101. doi:10.1016/j.reprotox.2016.11.004
20. GRUEN, M.; LAUX-BIEHLMANN, A.; ZOLLNER, T.M.; NAGEL, J. Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of abdominal pain in the LPS-induced peritonitis model in the rat. **J Neurosci Methods.** 2014;232:118-124. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.017
21. SOUZA, H.R.; DE AZEVEDO, L.R.; POSSEBON, L.; et al. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. **PLoS One.** 2017;12(3):e0173417. doi:10.1371/journal.pone.0173417
22. POSSEBON, L.; DE SOUZA LIMA LEBRON, I.; FURLAN DA SILVA, L.; et al. Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. **Biomed Pharmacother.** 2018a;99:591-597. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.106
23. ESPIRITO SANTO, B.L.S.D., SANTANA, L.F., KATO JUNIOR, W.H., DE ARAÚJO, F.O., BOGO, D., FREITAS, K.C., GUIMARÃES, R.C.A., HIANE, P.A., POTT, A., FILIÚ, W.F.O., ARAKAKI ASATO, M., FIGUEIREDO, P.O., BASTOS, P.R.H.O. Medicinal Potential of *Garcinia* Species and Their Compounds. **Molecules.** 2020;25(19):4513. doi: 10.3390/molecules25194513. PMID: 33019745; PMCID: PMC7582350.
24. SANTA-CECÍLIA, F.V.; VILELA, F.C.; DA ROCHA, C.Q.; DIAS, D.F.; CAVALCANTE, G.P.; FREITAS, L.A.; DOS SANTOS, M.H.;GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **J. Ethnopharmacol.** 2011,133, 467–473.
25. FIGUEIREDO, S.A.; VILELA, F.M.; DA SILVA, C.A.; CUNHA, T.M.; DOS-SANTOS, M.H.; FONSECA, M.J. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **J. Photochem. Photobiol. B** 2014, 131, 65–73.

26. NEVES, J.S.; COELHO, L.P.; CORDEIRO, R.S.B.; VELOSO, M.P.; SILVA, P.M.R.; DOS SANTOS, M.H.; Martins, M.A. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Med.** 2007, 73, 644–649
27. GONTIJO, V.S.; JUDICE, W.A.; CODONHO, B.; et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **Eur J Med Chem.** 2012;58:613-623. doi:10.1016/j.ejmech.2012.06.021
28. SARONI ARWA, P.; ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F.; et al. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **J Ethnopharmacol.** 2015;174:410-418. doi:10.1016/j.jep.2015.08.041
29. DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Neurol Clin.** 2006;24(3):441-460. doi:10.1016/j.ncl.2006.03.003
30. MARQUES, L.C.; PINHEIRO, A.J.; ARAÚJO, J.G.; et al. Anti-Inflammatory Effects of a Pomegranate Leaf Extract in LPS-Induced Peritonitis. **Planta Med.** 2016;82(17):1463-1467. doi:10.1055/s-0042-108856
31. DE LAVOR, É.M.; LEAL, A.E.B.P.; FERNANDES, A.W.C.; et al. Ethanolic extract of the aerial parts of *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) reduces nociceptive and inflammatory events in mice. **Phytomedicine.** 2018;47:58-68. doi:10.1016/j.phymed.2018.04.052
32. HARVIMA, I.T.; NILSSON, G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. **Acta Derm Venereol.** 2011;91(6):644-650. doi:10.2340/00015555-1197
33. SEELEY, E.J.; SUTHERLAND, R.E.; KIM, S.S.; WOLTERS, P.J. Systemic mast cell degranulation increases mortality during polymicrobial septic peritonitis in mice. **J Leukoc Biol.** 2011;90(3):591-597. doi:10.1189/jlb.0910531
34. LEONI, G.; ALAM, A.; NEUMANN, P.A.; et al. Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. **J Clin Invest.** 2013;123(1):443-454. doi:10.1172/JCI65831
35. LEONI, G.; NEUMANN, P.A.; KAMALY, N.; et al. Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. **J Clin Invest.** 2015;125(3):1215-1227. doi:10.1172/JCI76693
36. FERLAZZO, V.; D'AGOSTINO, P.; MILANO, S.; et al. Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. **Int Immunopharmacol.** 2003;3(10-11):1363-1369. doi:10.1016/S1567-5769(03)00133-4.
37. LU, Q.Y.; JIN, Y.; MAO, J.T.; et al. Green tea inhibits cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells through the induction of Annexin-1. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012;427(4):725-730. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.125.
38. SANT'ANA, M.; SOUZA, H.R.; POSSEBON, L.; et al. Effect of piperlongumine during exposure to cigarette smoke reduces inflammation and lung injury. **Pulm Pharmacol Ther.** 2020;61:101896. doi:10.1016/j.pupt.2020.101896

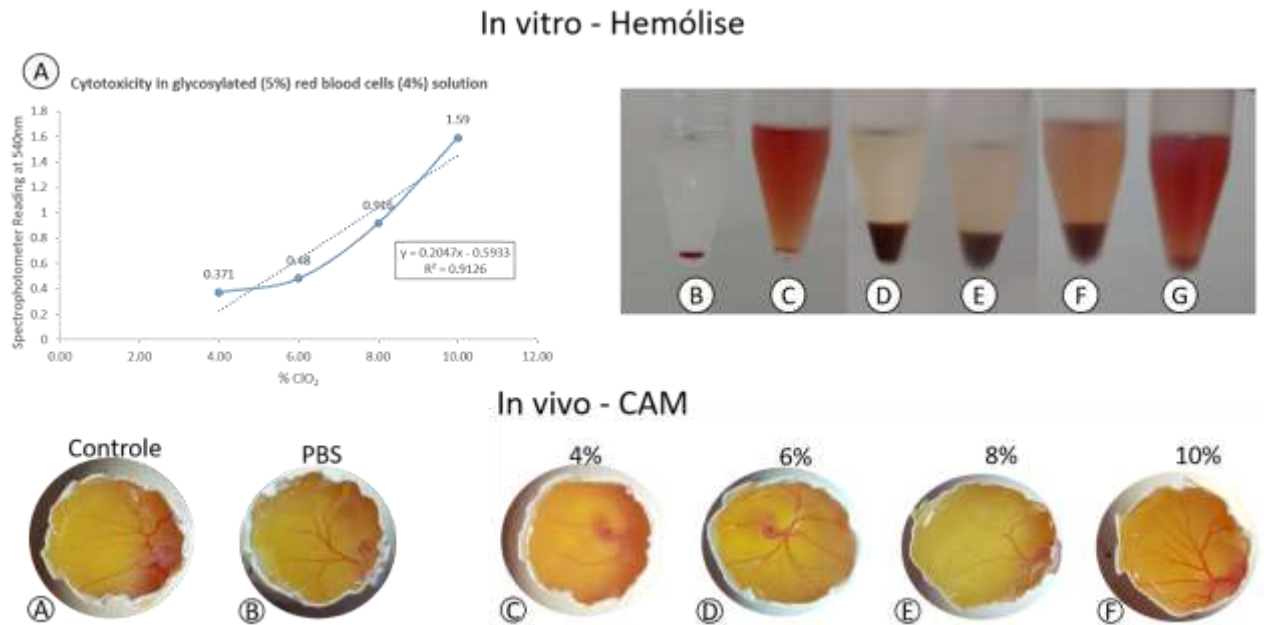
Figuras

Figura 1.1 – Análise em Cromatografia em camada delgada por HPTLC – presença do composto Lupeol (setas) no extrato da *G. brasiliensis* nas concentrações de 4%, 6%, 8% e 10%. **1.2 – Análise de antibiograma –** inibição microbiológica promovida pelo extrato da *G. brasiliensis* nas concentrações de 100% (*) e 75% (#) em *E. coli* (A), *Klebsiella* (B), *Proteus* (C), *Salmonella* (D) e *Shigella* (E).



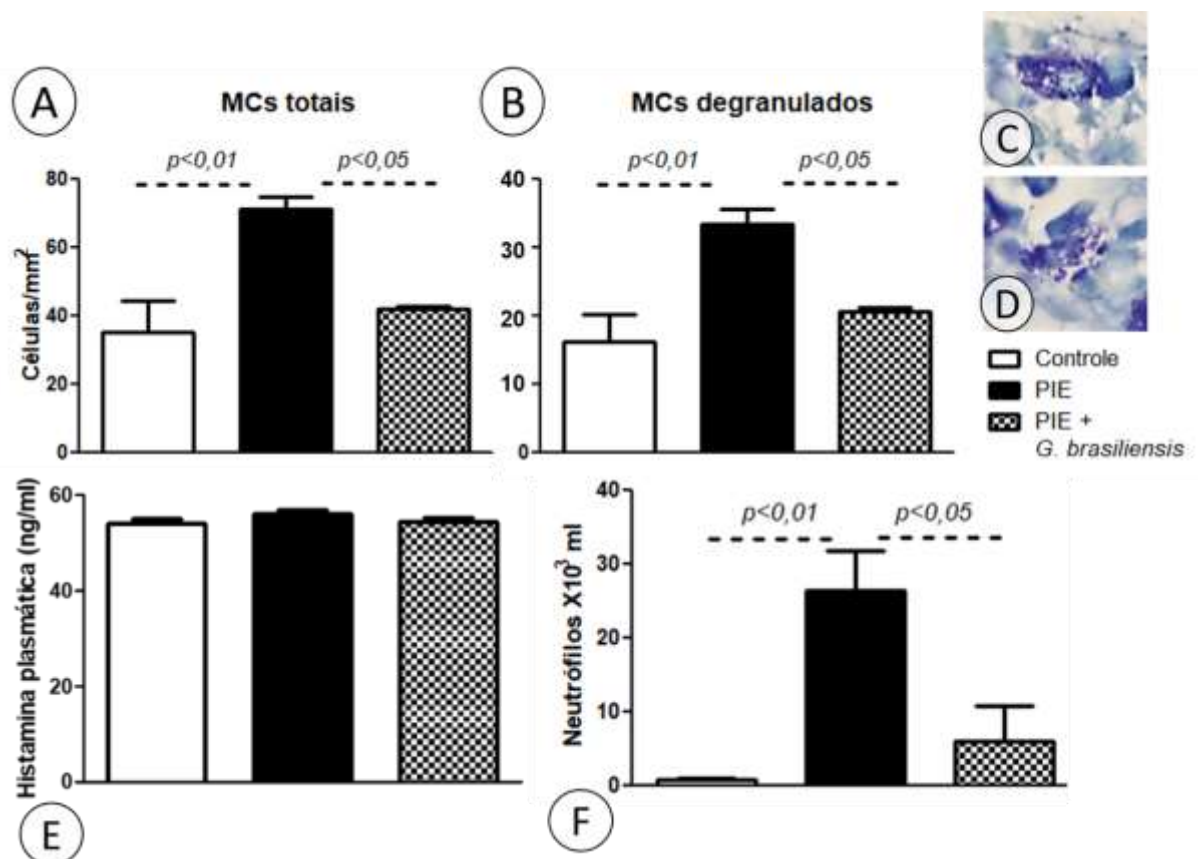
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2. Análises de citotoxicidade. 2.1 – Hemólise (*in vitro*) – Comparação das absorbâncias de hemólise (A). Controle negativo (solução salina) (B), controle positivo (Triton 0,1%) (C), diluições do extrato à 4% (D) 6% (E) 8% (F) 10% (G). **2.2 – CAM (*in vivo*)** – Controle (A), Sham, onde foi injetada solução salina (B). Diluições do extrato à 4% (C) 6% (D) 8% (E) 10% (F). Não houve mudanças na vascularização do CAM. Os embriões eram normais (n = 5 / grupo).



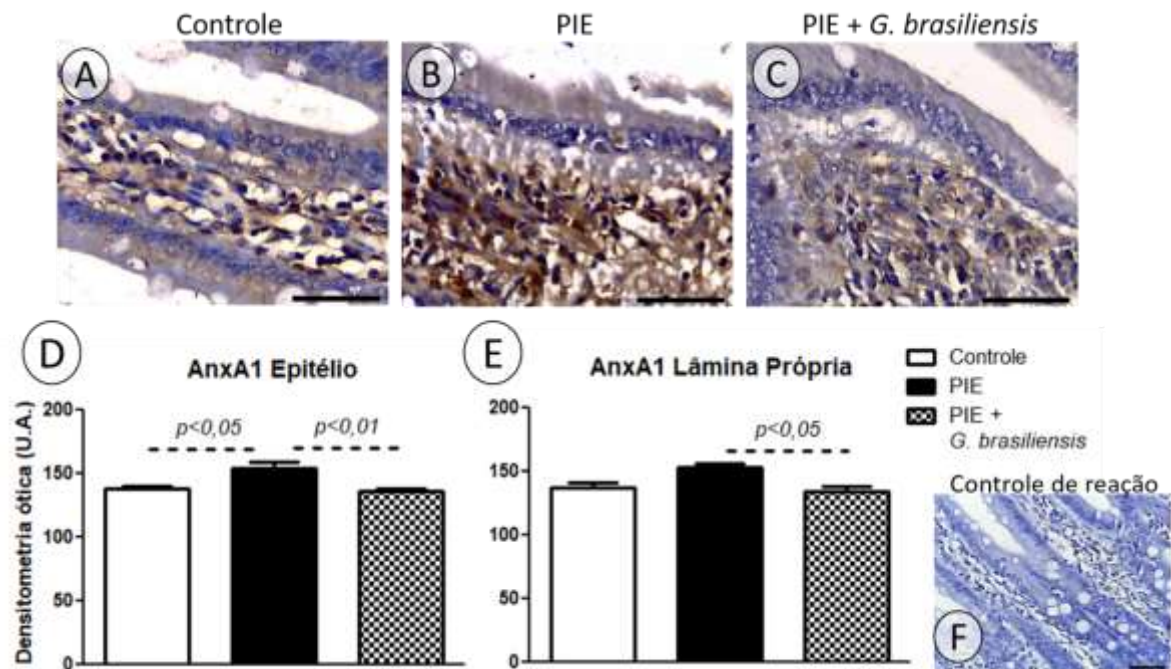
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 – Análises quantitativas. Mastócitos na lâmina própria do intestino delgado. Mastócitos (MCs) totais (A) e desgranulados (B). Detalhes das características histopatológicas das células intactas (C) e desgranuladas (D). Coloração Azul de Toluidina. Grupos Controle, Peritonite induzida por endotoxina sem tratamento (PIE) e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. brasiliensis* a 4% (PIE + *G. brasiliensis*). Os dados estão representados como média \pm erro padrão (S.E.M.) do número de MCs por mm². (n= 5/ grupo). **Níveis de histamina no plasma sanguíneo:** Os dados são representados como média \pm erro padrão da média (S.E.M) (E). **Neutrófilos no lavado peritoneal.** Grupos Controle, Peritonite induzida por endotoxina sem tratamento (PIE) e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. brasiliensis* a 4% (PIE + *G. brasiliensis*) (F) . Os dados estão representados como média \pm erro padrão (S.E.M.) do número de neutrófilos X 10³ mL (n= 5/ grupo).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 - Expressão da AnxA1 na mucosa intestinal. Expressão da AnxA1 no epitélio e lâmina própria dos grupos Controle (A), Peritonite induzida por endotoxina sem tratamento (PIE) (B) e peritonite induzida por endotoxina e tratado com extrato alcoólico de *G. brasiliensis* a 4% (PIE + *G. brasiliensis*) (C). A imunomarcação é aumentada no grupo não tratado (B). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 50µm. Ausência de imunorreatividade no controle de reação (F). **Análises densitométricas.** No epitélio (D) e lâmina própria (E). Os dados são representados como média ± erro padrão da média (S.E.M)



Fonte: Elaborado pelo autor

3. MANUSCRITO 2

Avaliação do efeito do extrato das folhas da *Garcinia brasiliensis* em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida pela fumaça do cigarro.

Lucas Possebon^{1,2}, Jéssica Messias da Silva¹, Ariane Harume Yoshikawa¹, Sara de Souza Costa^{1,2}, Helena Ribeiro Souza^{1,2}, Melina Mizusaki, Iyomasa Pilon¹, Sonia Maria Oliani², Ana Paula Girol^{1,2}

1 – Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

2 – Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.

Palavras-chave: DPOC; *G. brasiliensis*; inflamação.

Suporte financeiro: CAPES, UNIFIPA

Resumo

O fumo está fortemente associado ao desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e diferentes células e mediadores inflamatórios participam desse processo. O extrato da *Garcinia brasiliensis* têm mostrado resultados positivos em diferentes contextos de inflamações. Assim, o objetivo desta investigação foi avaliar o efeito da administração do extrato alcoólico da *G. brasiliensis* no modelo de tabagismo. Ratas e ratos da linhagem Wistar foram expostos à fumaça da queima de 10 cigarros comerciais um após o outro, 2x/ dia, por 8 semanas, em aparelho próprio para exposição ao fumo. Os animais do grupo tratado foram administrados por gavagem com uma solução contendo extrato (4%) da *G. brasiliensis* 3x/ semana, 10 minutos antes da exposição à fumaça do cigarro. Os grupos controles foram mantidos no mesmo regime de permanência no aparelho, porém na ausência da fumaça do cigarro e do tratamento. Os parâmetros fisiológicos avaliados foram pesagem, pressão arterial, plestismografia e raio-x. Sangue, lavado broncoalveolar (LBA), pulmões e traqueia foram coletados após eutanásia. A quantificação de leucócitos foi feita no LBA e os macrófagos pulmonares verificados por imunofluorescência. As expressões de MMP-2, MMP-9, COX-2, AnxA1, FPR1 e FPR2 foram avaliados por imuno-histoquímica. A hemoglobina foi dosada no sangue total e as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α no plasma sanguíneo e no sobrenadante do macerado do pulmão. Os ratos expostos ao fumo sem tratamento apresentaram menor peso, reduções macroscópicas das dimensões pulmonares por imagens de raio-X, aumento da pressão arterial, de frequência, volume e ventilação pulmonares, bem como da concentração de hemoglobina, comparados aos ratos tratados e controles. O influxo inflamatório no LBA e pulmões observado no grupo exposto à fumaça sem tratamento também foi reduzido pelo tratamento. Nas dosagens das citocinas, ocorreram aumentos significantes de citocina IL-1 β , TNF- α e MCP-1 nos animais expostos à fumaça do cigarro comparado aos demais, e aumento de IL-10 nos animais que receberam tratamento com extrato vegetal comparado aos animais não tratados. Ainda, houve redução da expressão de MMP-2, COX-2 e AnxA1 nos animais tratados. Tanto a inflamação mais acentuada, como a menor resposta aos tratamentos foi observada nas fêmeas. Nossos resultados evidenciaram a ação protetora da *G. brasiliensis* com atenuação do processo inflamatório causado pela exposição à fumaça do cigarro.

1. Introdução

O hábito tabagista é um importante problema de saúde mundial e mesmo pessoas não tabagistas, que convivem com a fumaça produzida por fumantes, sofrem os danos causados por esta exposição. O tabagismo predispõe, entre outras afecções, à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma grave condição de saúde caracterizada pela limitação progressiva do fluxo de ar (TERAMOTO, 2007; CARAMORI et al., 2014). Dado o papel central desempenhado pela inflamação na DPOC, o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias inovadoras é fundamental, em particular para retardar a progressão da doença e obter melhor controle das exacerbações (COMPTON et al., 2013; ARYAL; DIAZ-GUZMAN; MANNINO, 2014).

Os extratos bioativos naturais são candidatos interessantes na busca por mediadores anti-inflamatórios, em especial a *Garcinia brasiliensis* (SARONI ARWA et al., 2015). O gênero *Garcinia* contém uma ampla gama de metabólitos biologicamente ativos, sendo seus extratos ricos em derivados de benzofenonas poliiisopreniladas, polifenóis, bioflavonóides e xantonas (ACUÑA et al., 2012; ESPÍRITO SANTO et al., 2020). Na *G. brasiliensis*, foram encontradas quantidades significativas de compostos fenólicos totais e flavonoides, especialmente nas folhas (SARONI ARWA et al., 2015) e lupeol (CORRÊA et al., 2008), sendo que esses compostos apresentam perfil anti-inflamatório e supressor de células cancerígenas. Além disso, os biflavonóides da *G. brasiliensis* exibiram potente inibição da hemólise oxidativa e peroxidação lipídica em eritrócitos humanos, demonstrando as propriedades antiinflamatórias e antioxidantes dos compostos presentes nos extratos da planta (Arwa et al, 2015). Contudo poucos estudos *in vivo* foram realizados com extratos de *G. brasiliensis* em modelos pulmonares.

Diante do exposto e da grande incidência de DPOC, especialmente em fumantes, é importante o estudo dos efeitos da administração do extrato das folhas da *G. brasiliensis* como tratamento dos processos fisiológicos alterados induzidos pela exposição à fumaça do cigarro em modelo experimental como possível alternativa terapêutica no manejo das enfermidades causadas pelo hábito do tabagismo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Ratos e ratas da linhagem Wistar, com 6 semanas de idade, foram obtidos da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre

Albino (UNIFIPA) de Catanduva-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados na UDPE, no Laboratório Multidisciplinar (UNIFIPA) e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA UNIFIPA- certificado nº 06/17).

Para os protocolos experimentais os animais de ambos os sexos foram divididos em grupos: animais expostos à fumaça do cigarro e não tratados (grupos F), animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com o extrato de *G. brasiliensis* (grupos F+*G. brasiliensis*) e animais controles não expostos à fumaça, nem tratados.

2.2. Obtenção do extrato

Folhas de *Garcinia brasiliensis* (exsicatas foram depositadas no herbário IRINA DELANOVA GEMTCHUJNICOV(BOTU) número:33511(bacupari) foram coletadas e submetidas ao procedimento de extração. O extrato de *G. brasiliensis* foi obtido por percolação, com o uso de 20g de folhas secas e trituradas com 100 mL de álcool de cereais, resultando no extrato bruto final a 20%. Para padronização, o extrato foi evaporado pelo evaporador rotativo à vácuo (MA120/TH, Marconi).

O perfil fitoquímico e a seleção da concentração do extrato a 4% de *G. brasiliensis* foram obtidos em análises anteriores realizadas no nosso laboratório.

2.3. Exposição à fumaça do cigarro e protocolos de tratamentos

Para o desenvolvimento da DPOC, os animais foram expostos à fumaça da queima de 10 cigarros comerciais (contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono), um após o outro, duas vezes ao dia (total de 20 cigarros/dia), por 8 semanas, em aparato próprio para exposição ao fumo da UDPE, UNIFIPA. O grupo controle (C) não foi exposto à fumaça, mas somente ao ar comprimido (POSSEBON et al., 2018a; POSSEBON et al., 2018b)

O protocolo de tratamento foi realizado em dois dos grupos (machos e fêmeas) de animais expostos à fumaça do cigarro, nos quais foi administrado por gavagem, 1mL do extrato alcoólico na concentração de 4%, 1x/dia, imediatamente antes da exposição (grupo F + *G. brasiliensis*) 3x/semana (LI et al., 2015; TIAN et al., 2016).

2.4. Análises fisiológicas de pletismografia

No final do período de exposição à fumaça, os animais foram avaliados quanto à pletismografia, por meio da medição da capacidade de respiração, ventilação, frequência e volume inspirado, em aparelho específico e adaptado ao uso (*PowerLab, AD Instruments-Gas Analyzer, Austrália*) (POSSEBON et al., 2018b).

2.5. Análises por imagem de Raio X

Após as 8 semanas de exposição os animais foram anestesiados i.p. com Ketamina (0,8 mg/kg) e Xilasina (0,02 mg/kg) e em seguida foram realizadas imagens radiográficas da região do tórax antero superior, indicando a via respiratória por imagens macroscópicas de 18 cm de largura por 24 cm de altura das pranchas dos pulmões em um aparelho específico (*Raio X – Astex, Vet maq*) adaptado para o uso em ratos Wistar. As variáveis consideradas foram, altura retroesternal pulmonar do pulmão direito e os níveis de rebaixamento diafragmático direito e esquerdo (MARCOS et al. 2013, POSSEBON et al., 2018a).

2.6. Análises bioquímicas do sangue e lavado broncoalveolar

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas e separado em alíquotas para análise de hemoglobina com Kit comercial. Outras alíquotas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm e o plasma congelado a -70°C para posterior dosagem de citocinas.

Para obtenção do lavado broncoalveolar (LBA), os animais tiveram a traqueia canulada e o pulmão direito clampado. O pulmão esquerdo foi lavado 3 vezes com PBS e o líquido obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1.500 R.P.M. O sobrenadante foi armazenado a -70 °C para posterior dosagem de citocinas e o *pellet* foi ressuspenso em 500 µl de PBS e alíquotas de 10 µl foram corados em Turk (1:10) para contagem de células inflamatórias em câmara de Neubauer (valores como número de células x 10⁴/mL).

2.7. Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas

Após coleta do LBA, o pulmão direito e traqueia foram retirados, fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Secções de 5µm foram usadas

para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas no microscópio Leica (DM500) do Laboratório Multidisciplinar da UNIFIPA.

Nos estudos imuno-histoquímicos foram avaliadas as expressões de AnxA1, FPR1, FPR2, COX-2, MMP-2 e MMP-9 no pulmão de todos os animais. Para isso as secções foram processadas para recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena e incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti-MMP2 (1:100) (Abcam), anti-MMP-9 (1:100) (Abcam), anti-AnxA1 (1:1000) (*life Technologies*), anti-Cox2 (1:500) (*Demorelis*), anti-FPR1 (1:500) e anti-FPR2 (1:500) (Bioss) por 12 horas. A seguir, incubadas com o anticorpo secundário biotilado e imersas em complexo estreptavidina peroxidase conjugada (*kit Histostain, Invitrogen*). O substrato diaminobenzidina (DAB) (*Kit DAB, Invitrogen*) foi usado para revelação e, após, as secções foram contra coradas com Hematoxilina. As proteínas foram quantificadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador de imagens (*software Leica Image Analysis*) (SOUZA et al, 2017; POSSEBON et al, 2018a).

2.8. Quantificação de macrófagos por imunofluorescência

Cortes obtidos das amostras de pulmão foram desparafinizados, re-hidratados e a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 a 96 °C, durante 20 min. Os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos em PBS contendo 0,25% de Triton X-100, lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada). Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com soroalbumina bovina (BSA) a 2% em PBS-T por 30 minutos para o bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos e então, com o anticorpo ED-1 (1:100) (*Zymed Laboratories, Cambridge, UK*) diluído em BSA a 1%, por 1 hora, temperatura ambiente, em câmara úmida, a seguir, foram lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada). Após, incubados com o anticorpo secundário goat anti-mouse-FITC conjugado (1:100; Santa Cruz, USA) por 60 minutos, em câmara escura e lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada) e, em seguida, com DAPI por 1 minuto em câmara escura e posterior lavagem com PBS. As lâminas foram montadas com glicerina. O controle negativo da reação foi obtido pela omissão do anticorpo primário. A quantificação dos macrófagos nos tecidos pulmonares foi realizada na objetiva de

40X, com imagem do Microscópio Bel Photonics®. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.) do número de macrófagos por mm².

2.9. Dosagem de citocinas

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α foram quantificadas no plasma sanguíneo e no sobrenadante do macerado pulmonar, utilizando o Kit *MILLIPLEX MAP* de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) e analisadas no equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, EUA*). As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas no RECYTMAG-65K *Milliplex MAP Kit* (*Millipore*). Inicialmente, foram adicionados 25 μ l dos padrões, soluções controles e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada com o tampão de lavagem. Em seguida, 25 μ l de *assay buffer* foram adicionados às amostras, 25 μ l do meio apropriado aos padrões e, 25 μ l de *beads* magnéticas com anticorpos específicos em todos os poços (controles, padrões e amostras). Após, a placa foi selada com adesivo próprio, revestida com papel alumínio e incubada por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação no *shaker*. Na sequência, a placa foi lavada 2x com 200 μ l de tampão de lavagem e incubada com 25 μ l de anticorpo de detecção à temperatura ambiente, por uma hora, no *shaker*. Para completar a reação, 25 μ l de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada e incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi então lavada e incubada com 125 μ l do fluido (*Drive Fluid*) por cinco minutos à temperatura ambiente, no *shaker*. Em seguida, a leitura da placa foi realizada no *LUMINEX xMAP MAGPIX*. A concentração dos analitos foi determinada pelo *software MAGPIX xPONENT* (*Millipore Corporation, USA*). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.) das concentrações de citocinas (pg/mL).

2.10. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade pelo programa GraphPad Prism® Version 6.01. Para esses dados, que mostraram distribuição normal, foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Para análise da pressão arterial foi usada ANOVA com repetições. Enquanto as médias das pesagens foram

comparadas pelo *two-way* ANOVA. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados

3.1. Análises fisiológicas e níveis de hemoglobina

Nas análises das imagens por radiografias, foram observadas elevações macroscópicas do perímetro do pulmão direito no momento de inspiração nos grupos sem tratamento (M: 131.0 \pm 1.143; F: 111.1 \pm 2.677) (Figura 1B, E e G) em comparação aos grupos controles (M: 113.9 \pm 5.233; F: 94.01 \pm 2.052; $p < 0,001$) (Figura 1A, D e G). Ainda foi possível observar diferença significativa entre machos e fêmeas nos grupos controles ($p < 0,001$), sem tratamento ($p < 0,001$) e grupos tratados (M: 123,5 \pm 0,7358; F: 105,8 \pm 1,240; $p < 0,001$), com elevações menores nas fêmeas.

As análises da ventilação pulmonar mostraram aumento significativo nos animais expostos ao fumo e não tratados (M: 837,8 \pm 126,8; F: 1219 \pm 67,33) comparado aos controles (M: 318,9 \pm 64,93; F: 659,0 \pm 45,78; $p < 0,001$) e redução significativa nos machos tratados com a *G. brasiliensis* (M: 301,5 \pm 24,68) comparados aos não tratados. A diferença na ventilação nas fêmeas em comparação aos machos ocorreu nos grupos expostos à fumaça cigarro sem tratamento ($p < 0,01$) e tratados com a *G. brasiliensis* ($p < 0,001$) (Figura 1H).

No parâmetro de frequência pulmonar ocorreu aumento significativo nos animais machos expostos ao fumo e não tratados (M: 168,5 \pm 2,862) comparado aos controles (M: 151,4 \pm 4,307; $p < 0,05$) (Figura 1I). Não foi observada alteração desse parâmetro entre grupos controle e tratados com extrato, tampouco entre machos e fêmeas nesses grupos.

A capacidade de volume final também aumentou em todos animais dos grupos expostos sem tratamento (M: 9,054 \pm 0,8343; F: 7,412 \pm 0,3320) com relação ao grupo controle (M: 1,655 \pm 0,3934; F: 4,320 \pm 0,2782; $p < 0,001$) e novamente ocorreu redução nos machos tratados com *G. brasiliensis* (M: 1,735 \pm 0,1081; $p < 0,001$) comparado ao grupo sem tratamento. Entre machos e fêmeas do mesmo grupo, foi observado aumento significativo do volume final em fêmeas tratadas com o extrato ($p < 0,001$) (Figura 1J).

A dosagem no sangue total mostrou aumento significativo da quantidade de hemoglobina ($p < 0,01$) nas fêmeas sem tratamento ($18,43 \pm 1,167$) comparado aos grupos controle ($13,67 \pm 0,3258$), bem como maiores níveis de hemoglobina nas fêmeas do grupo tratado com *G. brasiliensis* ($p < 0,05$) em relação aos machos do mesmo grupo (Figura 2M).

3.2. Análises histopatológicas e quantificações do influxo inflamatório

Nas análises histopatológicas dos pulmões de machos e fêmeas foram observadas modificações nos espaços intra-alveolares, com aumento nos grupos expostos ao fumo (M: 26113 ± 2478 ; F: 24993 ± 1853) (Figura 2E e F), comparado aos controles (M: 9479 ± 597.3 ; F: 8865 ± 1150 ; $p < 0,001$) (Figura 2A e B) e tratados com o extrato da *G. brasiliensis* (M: 16909 ± 1565 ; F: 17698 ± 2343) (Figura 2I e J), os quais apresentaram redução significativa comparado aos não tratados (M: $p < 0,05$). Os animais do grupo exposto à fumaça e não tratado ainda apresentaram influxo de células inflamatórias no pulmão comparado aos outros grupos (Figuras 2).

As análises histopatológicas de machos e fêmeas em HE da traqueia (Figuras 2C, D, G, H, K e L) mostraram metaplasia no epitélio respiratório devido a exposição à fumaça do cigarro (Figuras 2G e H) com relação ao C (Figuras 2C e D) e grupo tratado com *G. brasiliensis* (Figuras 2K e L).

A quantificação dos macrófagos foi realizada por meio de imunofluorescência e avaliada no pulmão dos grupos controle e expostos ao fumo tratados ou não. No pulmão dos animais machos e fêmeas, essas análises indicaram aumento no grupo exposto à fumaça sem tratamento (M: $68,93 \pm 5.897$; F: $71,96 \pm 4,117$ $p < 0,001$) (Figura 2Q) comparado ao C (M: $32,50 \pm 3,639$; F: $17,14 \pm 0,8502$) (Figura 2Q) e redução dessas células nas fêmeas no grupo F+*G. brasiliensis* (F: $20,54 \pm 1,465$; $p < 0,01$) comparados ao controle (Figura 2Q). Também ocorreu redução significativa entre machos e fêmeas com o tratamento do extrato (M: $51,79 \pm 5,196$; $p < 0,001$) (Figura 2Q).

Similarmente, a quantificação de células inflamatórias no LBA em machos mostrou aumento significativo de linfócitos ($p < 0,05$) e macrófagos ($p < 0,05$) no grupo não tratado (Linfócitos: $47,61 \pm 2,942$; Macrófagos: $11,14 \pm 2,348$) comparado ao controle (Linfócito: $20,46 \pm 1,438$; Macrófago: $4,607 \pm 0,2720$), e redução significativa

dessas células nos tratados com a *G. brasiliensis* (Linfócito: $25,43 \pm 3,293$ $p < 0,001$; Macrófago $4,250 \pm 0,9805$ $p < 0,05$) (Figura 2O e P) comparado ao não tratado.

3.3. Estudos das expressões das proteínas

Nas análises de AnxA1, o grupo fumante sem tratamento (M: $162,9 \pm 2,604$; F: $180,4 \pm 5,727$) (Figura 4B e E) e os tratados (M: $170,7 \pm 2,747$; F: $165,7 \pm 3,238$) (Figura 4C e F), mostraram expressão aumentada da proteína, comparada com o grupo controle (M: $143,3 \pm 6,419$; F: $143,3 \pm 6,209$) (Figura 4A e D). As avaliações densitométricas (Figura 4T), corroboraram as análises imuno-histoquímicas, mostrando aumento significativo da expressão da AnxA1 no grupo fumante sem tratamento (M: $p < 0,05$ e F: $p < 0,001$) e também tratados (M: $p < 0,001$ e F: $p < 0,05$) comparados ao controle.

A expressão de FPR1 mostrou aumento no pulmão de fêmeas expostas à fumaça e não tratadas (F: $176,3 \pm 1,933$; $p < 0,01$) (Figura 4H, K e U) e nas tratadas com extrato da *G. brasiliensis* (F: $177,6 \pm 5,917$) (Figura 4I, L e U) comparadas aos controles (F: $143,3 \pm 11,64$) (Figura 4G, J e U). Padrão semelhante foi observado nas análises de imunomarcção para FPR2, com expressão aumentada nas fêmeas expostas à fumaça do cigarro e tratadas (F: $157,2 \pm 8,205$; $p < 0,005$) (Figura 4O, R e V) comparadas às não tratadas (F: $150,3 \pm 8,129$; $p < 0,05$) (Figura 4N, Q e V) e aos animais controles (F: $122,5 \pm 4,626$) (Figura 4M, P e V).

A expressão da COX-2 foi aumentada nos pulmões das fêmeas no grupo exposto à fumaça sem tratamento ($180,2 \pm 6,622$; $p < 0,05$; Figura 5E e T) comparado ao grupo C ($153,5 \pm 2,906$; Figura 5D e T) e aos machos expostos à fumaça do cigarro ($143,4 \pm 7,423$, $p < 0,01$; Figura 5B e T).

Nas análises da imunorreatividade para MMP-2, entre os animais controle, as fêmeas mostraram maior expressão da enzima ($p < 0,001$). A exposição à fumaça promoveu aumento da expressão da MMP2 nos pulmões dos machos expostos à fumaça do cigarro ($161,7 \pm 3,721$; $p < 0,001$) (Figura 5H e U) comparados ao grupo C (M: $119,3 \pm 2,277$) (Figura 5G e U). O grupo dos machos tratados com extrato da *G. brasiliensis* ($109,6 \pm 3,466$; $p < 0,001$) (Figura 5I e U) apresentou redução significativa da MMP-2 comparado aos animais não tratados (Figura 5H e U). Também foi possível observar diferença significativa entre os grupos de machos e fêmeas tratados com o extrato, com aumento na expressão da enzima nas fêmeas (M: $109,6 \pm 3,466$; F:

167,6±3,347; $p < 0,001$) (Figura 5I, L e U). Os estudos da imunorreatividade para MMP-9 não mostraram diferenças entre os grupos (Figura 5N e Q) (Figura 5M e P). A especificidade das imunomarcações foi comprovada pelos respectivos controles de reação (Figura 5S).

3.4. Dosagem de citocinas

No sobrenadante pulmonar dos animais do grupo exposto ao cigarro foram observados níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (M: 555,7±39,21; F: 545,7±42,44; $p < 0,001$) e TNF- α (M: 3,837±0,2290; $p < 0,001$) comparados aos animais controles (Figura 1A, D e E; Figura 6A e D). Também foram encontrados aumentos nas dosagens de IL-1 β nas dosagens plasmáticas em fêmeas ($p < 0,01$) (Figura 6F). Níveis de MCP-1 parecem aumentados no sobrenadante do macerado de machos e fêmeas expostos à fumaça e não tratados, mas sem significância estatística (Figura 6).

Com a administração do extrato da *G. brasiliensis* foi observada redução nos níveis dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α ($p < 0,001$) em machos (Figura 6D e I) e MCP-1 ($p < 0,001$) em fêmeas (Figura 6E), no sobrenadante do macerado pulmonar. Embora os níveis de IL-1 β estejam diminuídos após o tratamento com o extrato, não houve significância estatística (Figura 6A e F).

Não foi observada diferença entre nenhum dos grupos para a IL-6 (Figura 6B e G) tanto no sobrenadante do macerado quanto no plasma e para MCP-1 no plasma (Figura 6J). Na comparação entre machos e fêmeas, níveis menores de TNF- α ocorreram nas fêmeas, em todos os grupos, no plasma sanguíneo (Figura 6I).

Diferentemente, nos animais expostos ao fumo não tratados, níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10 foram observados no sobrenadante do macerado pulmonar (M: 9,266±1,945; $p < 0,001$), e no plasma (M: 0,6929±0,02570; $p < 0,05$) comparados aos respectivos controles (31,12±3,112; 0,6943±0,01212) (Figura 6C e H). Nos animais tratados com extrato da *G. brasiliensis*, níveis aumentados de IL-10 foram encontrados no sobrenadante pulmonar nos machos e no plasma sanguíneo em machos e fêmeas, embora sem significância estatística, enquanto no sobrenadante das fêmeas tratadas ocorreu redução nos níveis de IL-10.

4. Discussão

O fumo está fortemente associado, entre outras afecções, ao desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma grave condição de saúde, induzida por processo inflamatório e caracterizada pela limitação progressiva do fluxo de ar (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION: CONCERNS REGARDING TOBACCO USE, 2012; LU; GOTTLIEB; ROUNDS, 2018).

Nesse trabalho observamos os efeitos da administração do extrato de folhas de *G. brasiliensis* a 4%, por meio de análises fisiológicas, histopatológicas e bioquímicas, em machos e fêmeas no modelo de DPOC, como possibilidade de aplicação terapêutica. Como esperado, observamos redução de frequência e ventilação pulmonares nos animais expostos à fumaça do cigarro sem tratamento. Além disso, nossos estudos de imagem por radiografia mostraram aumentos no perímetro pulmonar direito no grupo sem tratamento comparado com os grupos controle e tratados e, portanto, estão de acordo com os obtidos da ventilação pulmonar neste trabalho e com dados de literatura que apontam que a limitação do fluxo de ar ocorre devido à redução do diâmetro das vias aéreas em nível baixo (VENEGAS, et al. 2005; DIJKSTRA, et al. 2011; POSSEBON et al., 2018a). Desse modo, os dados obtidos das nossas análises fisiológicas reforçam os efeitos prejudiciais e as comorbidades que acompanham o hábito tabagista (GAN et al., 2004; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION: CONCERNS REGARDING TOBACCO USE, 2012; CARAMORI et al., 2014).

De maneira interessante, nos animais tratados com o extrato de *G. brasiliensis*, os parâmetros de frequência, volume, ventilação e dimensões pulmonares foram semelhantes aos encontrados nos animais controle, evidenciando os efeitos benéficos do extrato contra os efeitos sistêmicos da exposição ao fumo. Os resultados encontrados no nosso estudo reforçam as características benéficas de fitoterápicos na DPOC experimental (POSSEBON et al., 2018b).

LÜDICKE e colaboradores demonstraram que o tabagismo pode estar ligado à elevação dos níveis de hemoglobina. Por essa razão, investigamos os níveis de hemoglobina e verificamos o efeito protetor do extrato da *G. brasiliensis* nos grupos tratados, com a manutenção da concentração de hemoglobina semelhante ao grupo controle, enquanto nos animais expostos ao fumo não tratados esses níveis foram

elevados. Nos casos de exacerbação de DPOC a eritropoetina (EPO) pode estar reduzida, indicando que na fase aguda da doença, a associação hemoglobina/ EPO é inversa e está ligada ao aumento de IL-6, mostrando resistência da EPO por meio de mecanismos que estão associados ao aumento do processo inflamatório sistêmico (SALA et al., 2010; SINGH et al., 2016).

Nas análises histopatológicas da arquitetura pulmonar e quantitativas das células inflamatórias observamos aumentos dos espaços intra-alveolares e maior número de linfócitos e macrófagos nos animais expostos à fumaça do cigarro. Contudo a administração do extrato de *G. brasiliensis* promoveu a preservação tecidual e redução do influxo inflamatório. A desorganização do parênquima pulmonar com consequente redução do fluxo de ar e dificuldade para respirar podem estar relacionadas ao desequilíbrio entre as proteases responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar e antiproteases que inibem a ação das enzimas proteolíticas, podendo ocasionar o enfisema pulmonar (RUFINO; LAPA; SILVA, 2006; KLENIEWSKA et al., 2016; AMARAL et al., 2017; BAHRI et al., 2017). Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, também mostramos o aumento de linfócitos e macrófagos nos animais expostos à fumaça do cigarro não tratados e a redução dessas células inflamatórias após tratamento com solução contendo associação de extratos de *Arctium lappa*, *Mikania glomerata* Spreng, *Plantago major* e *Equisetum arvense* (POSSEBON et al., 2018b) ou com a administração da piperlongumina (SANT'ANA et al., 2020), mostrando a eficácia dos fitoterápicos no combate à inflamação pulmonar. Nesta investigação, nossos dados indicam o efeito protetor do extrato da *G. brasiliensis* no pulmão, preservando a arquitetura dos alvéolos e inibindo o processo inflamatório. Também no pulmão, a 7-epiclusianona, composto presente no extrato da *G. brasiliensis*, reduz a viabilidade de células cancerígenas (IONTA et al., 2015). Esse mesmo composto tem mostrado atuação contra processo inflamatório em ratos obesos e combatendo o estresse oxidativo (SANTA-CECILIA et al., 2011; ARAUJO et al., 2019)

Na sequência dos nossos estudos, procedemos a análise de expressões de diferentes proteínas envolvidas nos processos inflamatórios. Nossas análises indicaram maior imunorreatividade para AnxA1 e os receptores FPR1 e FPR2 no grupo exposto ao fumo sem tratamento, o que reforça a participação dessa proteína na inflamação e sua interação com os FPRs. O aumento na expressão da AnxA1 e

FPRs também foi observado em diversas investigações em diferentes modelos de inflamação (DAMAZO et al., 2011; DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012; GIROL et al., 2013; TRENTIN et al., 2015; POSSEBON et al., 2018b). Especificamente no pulmão, estudos do nosso grupo também mostraram a expressão aumentada de AnxA1, em ratos e camundongos expostos à fumaça do cigarro (POSSEBON et al., 2018a, POSSEBON et al., 2018b; LEBRON et al., 2019). Contudo, no nosso modelo de DPOC o tratamento com o extrato da *G. brasiliensis* reduziu a expressão da AnxA1 e não alterou a expressão de ambos os FPRs. Embora alguns fitoterápicos induzam a expressão da AnxA1 para assim conter o processo inflamatório, como a piperlongumina (SANT'ANNA et al., 2020) e a *Camellia sinensis* (LU et al., 2012), respectivamente na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro e em células de câncer de pulmão, outros fitoterápicos reduzem a expressão da AnxA1 como observado nessa investigação e também em estudo anterior com a administração de mistura de fitoterápicos no modelo de DPOC (POSSEBON et al., 2018b). Desse modo, os nossos dados indicam que os fitoterápicos podem modular de maneira diferencial a expressão da AnxA1 e seus receptores e apontam que a ação anti-inflamatória da *G. brasiliensis* participam em cascatas de sinalização independentes da atuação da AnxA1 e seus receptores.

Nas análises de expressão da COX-2 observamos maior imunorreatividade da enzima nos animais expostos ao fumo não tratados comparados aos controles. A expressão aumentada da COX-2 foi associada ao elevado grau de inflamação na DPOC e ao câncer de pulmão (MIYATA et al., 2015). Outros estudos indicam que a COX-1 e COX-2 agem como mediadoras dos efeitos desfavoráveis do hábito tabagista, como a rigidez arterial (VLACHOPOULOS et al., 2015). Investigações mostram que o composto garcinol, presentes no gênero das garcinias, inibe a COX-2, o óxido nítrico e o NF- κ B, apresentando um perfil antiproliferativo (LIAO et al., 2004; AGGARWAL; DAS, 2016). Contudo, nossos resultados mostram baixa redução da COX-2 após o tratamento com a *G. brasiliensis*.

Ainda nas análises de imuno-histoquímica, identificamos maior imunorreação de MMP-2 no grupo exposto ao fumo sem tratamento, indicando a participação dessa enzima na destruição do tecido. Outras investigações associam várias MMPs, incluindo a MMP-9, às alterações de tecidos em paciente com enfisema pulmonar (GHOSH et al., 2015; MIYATA et al., 2015; OSTRIDGE et al., 2016). O tratamento

com *G. brasiliensis* reduziu os níveis de expressão das MMP-2 e MMP-9 semelhantes aos controles. Esses dados corroboram com outros estudos que mostram o perfil de compostos do gênero da garcinia que inibem a secreção de MMPs em um modelo de carcinoma hepatocelular em humanos (WUDTIWAI, PITCHAKARN, BANJERDPONGCHAI, 2018), como também a redução da expressão dos mesmos em um modelo de processo inflamatório causado pelo infarto do miocárdio (NA et al., 2018).

Na continuidade dos nossos estudos analisamos mediadores inflamatórios no sobrenadante pulmonar e plasma sanguíneo. Nossos resultados apresentaram aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e MCP-1 e redução da IL-10, anti-inflamatória, nos animais expostos à fumaça do cigarro. Nossos resultados corroboram com outros estudos que indicam a presença elevada de citocinas pró-inflamatórias na exposição ao fumo e desenvolvimento de DPOC (KLENIEWSKA et al., 2016), bem como a baixa dosagem de IL-10 em expostos ao fumo, com ou sem DPOC, comparados aos não expostos ao fumo (ZHANG et al., 2013).

O tratamento com o extrato da *G. brasiliensis* diminuiu os níveis das citocinas pró-inflamatórias e elevou a IL-10. Em modelo animal em exposição a radiação UV (FIGUEIREDO et al., 2014), o extrato da fruta de *G. brasiliensis* também atuou na redução das citocinas IL-1 β e TNF- α . Enquanto outro estudo com *Garcinia kola* mostrou a redução de MCP-1 em modelo de inflamação em ratos diabéticos (AYEPOLA, BROOKS, OGUNTIBEJU, 2014). Assim, nossos dados confirmam o perfil anti-inflamatório do extrato de *G. brasiliensis* no modelo de DPOC.

De maneira geral, nas fêmeas a resposta inflamatória à fumaça do cigarro foi mais exacerbada, enquanto os efeitos do tratamento com o extrato da *G. brasiliensis* na atenuação do processo inflamatório foram menos intensos do que os observados nos machos. Investigações apontam que as pacientes mulheres podem responder de formas diferentes quanto ao tipo e local do dano pulmonar (HAN et al., 2007, MARTINEZ et al., 2007). Em estudo com modelo animal, fêmeas ovariectomizadas expostas a fumaça do cigarro mostraram um declínio das funções pulmonares e aumento da atividade MMP-2 e apoptose, sendo mais susceptíveis à doenças pulmonares que animais machos, corroborando que a ausência de estradiol aumenta a chance de doenças pulmonares influenciadas pela fumaça do cigarro (GLASSBERG et al., 2016).

Oscilações dos hormônios sexuais durante o ciclo menstrual podem causar piora da asma e os níveis elevados de estradiol reduzem a frequência e severidade das crises asmáticas (HAGGERTY et al., 2003; STANFORD et al., 2006). Ainda, em modelo de alergia pulmonar, o tratamento com estradiol aumentou a liberação de IL-10 e óxido nítrico enquanto a progesterona aumentou TNF- α em células do LBA em cultura (de OLIVEIRA et al, 2010). Portanto as respostas diferentes entre machos e fêmeas podem estar relacionadas aos hormônios sexuais femininos.

5. Conclusão

Nossos dados mostram que a administração da *Garcinia brasiliensis* promove efeitos anti-inflamatórios protetores contra a DPOC no modelo proposto, relacionados à preservação da arquitetura pulmonar e dos parâmetros fisiológicos pulmonares, bem como redução do influxo inflamatório e da liberação de mediadores pró-inflamatórios. Essas ações ocorrem independentemente da ação da proteína anti-inflamatória AnxA1 e são mais evidentes nos machos.

Referências

- ACUÑA, U.M.; DASTMALCHI, K.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Quantitative high performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC–PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species. *J. Food. Compos. Anal.* 2012, 25, 215–220.
- AGGARWAL, S., DAS, S.N. Garcinol inhibits tumour cell proliferation, angiogenesis, cell cycle progression and induces apoptosis via NF- κ B inhibition in oral cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7175-7184. doi:10.1007/s13277-015-4583-8
- AYEPOLA, O.R., BROOKS, N.L., OGUNTIBEJU, O.O. Kolaviron improved resistance to oxidative stress and inflammation in the blood (erythrocyte, serum, and plasma) of streptozotocin-induced diabetic rats. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:921080. Published 2014 Mar 24. doi:10.1155/2014/921080
- AMARAL, A.F.S.; STRACHAN, D.P.; BURNEY, P.G.J.; JARVIS, D.L. Female Smokers Are at Greater Risk of Airflow Obstruction Than Male Smokers. UK Biobank. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(9):1226-1235. doi:10.1164/rccm.201608-1545OC
- ARYAL, S.; DIAZ-GUZMAN, E.; MANNINO, D.M. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014;9:1145-1154. Published 2014 Oct 14. doi:10.2147/COPD.S54476

- BAHRI, S.; BEN ALI, R.; ABIDI, A.; JAMELEDDINE, S. The efficacy of plant extract and bioactive compounds approaches in the treatment of pulmonary fibrosis: A systematic review. **Biomed Pharmacother.** 2017;93:666-673. doi:10.1016/j.biopha.2017.06.052
- CARAMORI, G; ADCOCK, I.M.; DI STEFANO, A.; et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.** 2014;9:397-412. doi:10.2147/COPD.S42544
- COMPTON, C.; MCBRYAN, D.; BUCCHIONI, E.; PATALANO, F. The Novartis view on emerging drugs and novel targets for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Pulm Pharmacol Ther.** 2013;26(5):562-573. doi:10.1016/j.pupt.2013.05.009
- DA CUNHA, E.E.; OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulm Pharmacol Ther.** 2012;25(4):303-311. doi:10.1016/j.pupt.2012.04.002
- DAMAZO, A.S.; SAMPAIO, A.L.; NAKATA, C.M.; et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunol.** 2011;12:59. Published 2011 Oct 19. doi:10.1186/1471-2172-12-59
- DE MELO, M.S., QUINTANS, J.DE S., ARAÚJO, A.A., et al. A systematic review for anti-inflammatory property of clusiaceae family: a preclinical approach. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2014;2014:960258. doi:10.1155/2014/960258
- DE OLIVEIRA, A.P., PERON, J.P., DAMAZO, A.S., et al. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung E-selectin in rats. **Respir Res.** 2010;11(1):115. Published 2010 Aug 24. doi:10.1186/1465-9921-11-115
- DIJKSTRA, A.E.; POSTMA, D.S.; TEN HACKEN, N.; et al. Low-dose CT measurements of airway dimensions and emphysema associated with airflow limitation in heavy smokers: a cross sectional study. **Respir Res.** 2013;14(1):11. Published 2013 Jan 28. doi:10.1186/1465-9921-14-11
- FIGUEIREDO SA, VILELA FM, DA SILVA CA, CUNHA TM, DOS SANTOS MH, FONSECA MJ. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **J Photochem Photobiol B.** 2014;131:65-73. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004
- GAN, W.Q.; MAN, S.F.; SENTHILSELVAN, A.; SIN, D.D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. **Thorax.** 2004;59(7):574-580. doi:10.1136/thx.2003.019588
- GHOSH, A.; PECHOTA, A.; COLEMAN, D.; UPCHURCH, G.R.J.; ELIASON, J.L. Cigarette smoke-induced MMP2 and MMP9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. **Hum Pathol.** 2015;46(2):284-294. doi:10.1016/j.humpath.2014.11.003

GIROL, A.P.; MIMURA, K.K.; DREWES, C.C.; et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol.** 2013;190(11):5689-5701. doi:10.4049/jimmunol.1202030

GLASSBERG M.K., CATANUTO P., SHAHZEIDI,S., ALINIAZEE M., LILO S., RUBIO G.A., ELLIOT S.J. Estrogen Deficiency Promotes Cigarette Smoke-Induced Changes in the Extracellular Matrix in the Lungs of Aging Female Mice. **Tranlation Research**, 2016. doi: 10.1016/j.trsl.2016.07.015.

HAGGERTY, C.L., NESS, R.B., KELSEY, S., WATERER, G.W. The impact of estrogen and progesterone on asthma. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 2003;90(3):284-347. doi:10.1016/S1081-1206(10)61794-2

HAN MK, POSTMA D, MANNINO DM, et al. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. **Am J Respir Crit Care Med.** 2007;176(12):1179-84.

IONTA, M., FERREIRA-SILVA, G.A., NIERO, E.L., et al. 7-Epiclusianone, a Benzophenone Extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), Induces Cell Cycle Arrest in G1/S Transition in A549 Cells. **Molecules.** 2015;20(7):12804-12816. Published 2015 Jul 15. doi:10.3390/molecules200712804

KANG, H.; KO, J.; JANG, S.W. The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012;423(1):188-194. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.114

KLENIEWSKA, A.; WALUSIAK-SKORUPA, J.; PIOTROWSKI, W.; NOWAKOWSKA-ŚWIRTA, E.; WISZNIEWSKA, M. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **J Occup Health.** 2016;58(4):333-339. doi:10.1539/joh.15-0317-BR

KOZMA, R.L.; ALVES, E.M.; BARBOSA-DE-OLIVEIRA, V.A.; et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. **J Bras Pneumol.** 2014;40(1):46-54. doi:10.1590/S1806-37132014000100007

LEBRON, I.S.L.; DA SILVA, L.F.; PALETTA, J.T.; et al. Modulation of the endogenous Annexin A1 in a cigarette smoke cessation model: Potential therapeutic target in reversing the damage caused by smoking?. **Pathol Res Pract.** 2019;215(10):152614. doi:10.1016/j.prp.2019.152614

LI, J.; ZHAO, P.; LI, Y.; TIAN, Y.; WANG, Y. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufeì Yìshen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease. **Sci Rep.** 2015;5:15290. doi:10.1038/srep15290

LIAO, C.H., SANG, S., LIANG, Y.C., HO, C.T., LIN, J.K. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. **Mol Carcinog.** 2004;41(3):140-149. doi:10.1002/mc.20050

LU, Q.Y.; JIN, Y.; MAO, J.T.; et al. Green tea inhibits cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells through the induction of Annexin-1. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012;427(4):725-730. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.125

LU, Q.; GOTTLIEB, E.; ROUNDS, S. Effects of cigarette smoke on pulmonary endothelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2018;314(5):L743-L756. doi:10.1152/ajplung.00373.2017

LÜDICKE, F.; MAGNETTE, J.; BAKER, G.; WEITKUNAT, R. A Japanese cross-sectional multicentre study of biomarkers associated with cardiovascular disease in smokers and non-smokers. **Biomarkers.** 2015;20(6-7):411-421. doi:10.3109/1354750X.2015.1096303

MARCOS L., BICHINHO G.L., PANIZZI E.A., et al. Classificação da doença pulmonar obstrutiva crônica pela radiografia do tórax. **Radiol Bras.** 2013;46(6):327–332.

MARTINEZ F, CURTIS J, SCIURBA F, MUMFORD J, GIARDINO N, WEINMANN G, KAZEROONI E, MURRAY S, CRINER G, SIN D, et al.; NETT Research Group. Sex differences in severe pulmonary emphysema. **Am J Respir Crit Care Med** 2007;176:243–252.

MIYATA, Y.; MITSUNARI, K.; AKIHIRO, A.; et al. Smoking-induced changes in cancer-related factors in patients with upper tract urothelial cancer. **Mol Clin Oncol.** 2015;3(2):287-294. doi:10.3892/mco.2014.471

NA, D., AIJIE, H., BO, L., ZHILIN, M., LONG, Y. Gambogic acid exerts cardioprotective effects in a rat model of acute myocardial infarction through inhibition of inflammation, iNOS and NF-κB/p38 pathway. **Exp Ther Med.** 2018;15(2):1742-1748. doi:10.3892/etm.2017.5599

OLIANI, S.M.; PAUL-CLARK, M.J.; CHRISTIAN, H.C.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol.** 2001;158(2):603-615. doi:10.1016/S0002-9440(10)64002-3

OSTRIDGE, K.; WILLIAMS, N.; KIM, V.; et al. Distinct emphysema subtypes defined by quantitative CT analysis are associated with specific pulmonary matrix metalloproteinases. **Respir Res.** 2016;17(1):92. doi:10.1186/s12931-016-0402-z

Pan American Health Organization and World Health Organization: concerns regarding tobacco use. *Int Q Community Health Educ*, v. 33, n. 2, p. 225-7, 2012-2013 2012. ISSN 0272-684X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666165>>

POSSEBON, L.; COSTA, S.S.; SOUZA, H.R.; et al. Mimetic peptide AC2-26 of annexin A1 as a potential therapeutic agent to treat COPD. **Int Immunopharmacol.** 2018a; 63:270-281. doi:10.1016/j.intimp.2018.08.011

POSSEBON, L.; DE SOUZA LIMA LEBRON, I.; FURLAN DA SILVA, L.; et al. Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary

disease induced by cigarette smoke. **Biomed Pharmacother.** 2018b; 99:591-597. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.106

RUFINO, R.; LAPA E SILVA, J.R. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. **J Bras Pneumol.** 2006;32(3):241-248.

SALA, E.; BALAGUER, C.; VILLENA, C.; et al. Low erythropoietin plasma levels during exacerbations of COPD. **Respiration.** 2010;80(3):190-197. doi:10.1159/000264604

SANTA-CECÍLIA, F.V.; VILELA, F.C.; DA ROCHA, C.Q.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **J Ethnopharmacol.** 2011;133(2):467-473. doi:10.1016/j.jep.2010.09.036

SARONI ARWA, P.; ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F.; et al. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **J Ethnopharmacol.** 2015;174:410-418. doi:10.1016/j.jep.2015.08.041

SINGH, V.; TANWAR, A.S.; HUNGUND, A.S.; HUNGUND, S.A.; NAGARAJA, C. Comparison of serum erythropoietin levels in smokers and nonsmokers with periodontitis: A biochemical study. **J indian soc periodontol.** 2016;20(3):249-253. doi:10.4103/0972-124X.181242

SOUZA, H.R.; DE AZEVEDO, L.R.; POSSEBON, L.; et al. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. **PLoS One.** 2017;12(3):e0173417. Published 2017 Mar 9. doi:10.1371/journal.pone.0173417

STANFORD, K.I., MICKLEBOROUGH, T.D., RAY, S., LINDLEY, M.R., KOCEJA, D.M., STAGER, J.M. Influence of menstrual cycle phase on pulmonary function in asthmatic athletes. **Eur J Appl Physiol.** 2006;96(6):703-710. doi:10.1007/s00421-005-0067-7

TERAMOTO, S. 1. COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors. **Intern Med.** 2007;46(2):77-79. doi:10.2169/internalmedicine.46.1775.

TIAN, Y.; LI, J.; LI, Y.; et al. Effects of Bufe Yishen Granules Combined with Acupoint Sticking Therapy on Pulmonary Surfactant Proteins in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats. **Biomed Res Int.** 2016;2016:8786235. doi:10.1155/2016/8786235

TRENTIN, P.G., FERREIRA, T.P., ARANTES, A.C., et al. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. **Br J Pharmacol.** 2015;172(12):3058-3071. doi:10.1111/bph.13109

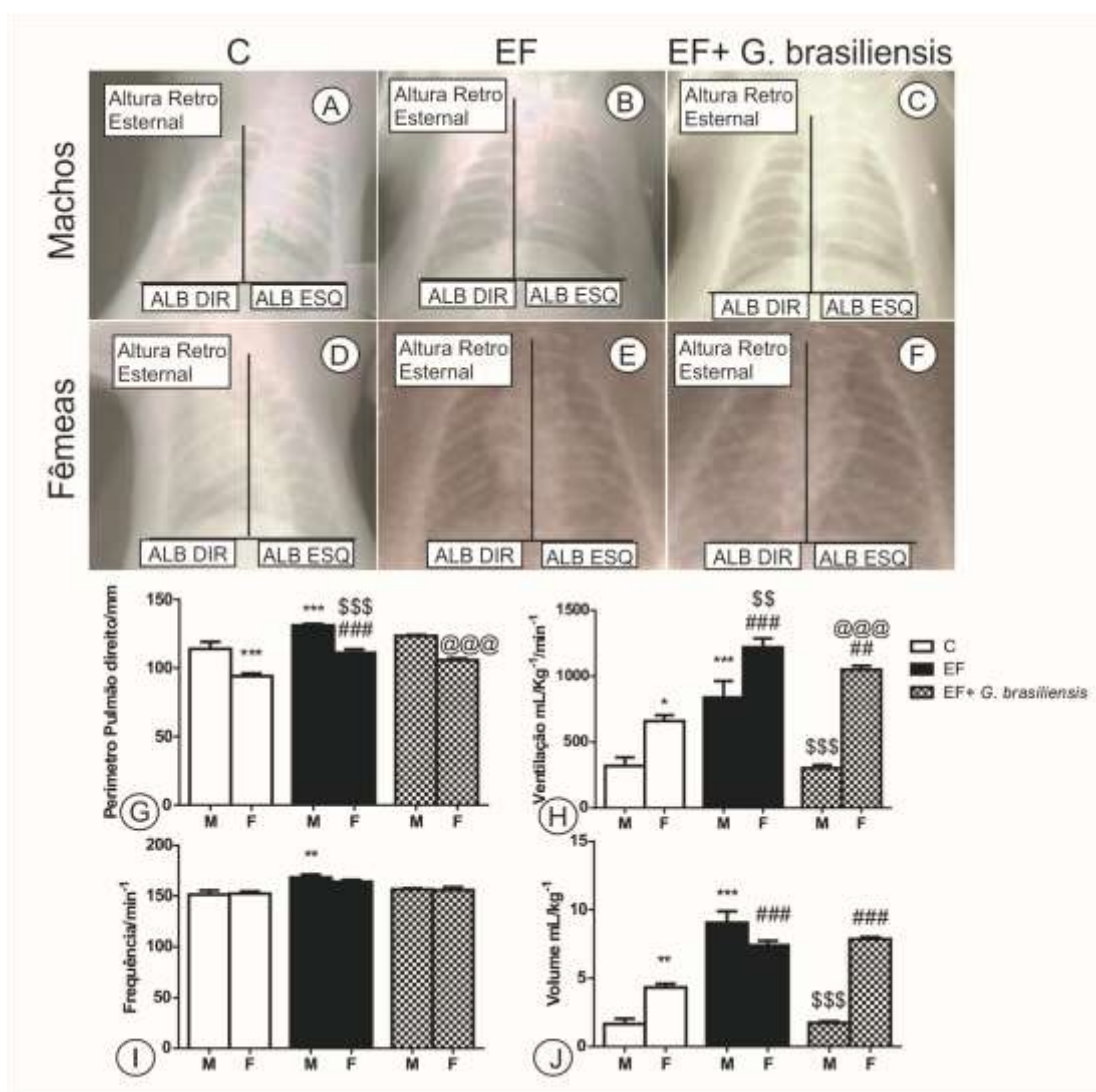
VENEGAS, J.G.; WINKLER, T.; MUSCH, G.; et al. Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts. **Nature.** 2005;434(7034):777-782. doi:10.1038/nature03490

VLACHOPOULOS, C.; AZNAOURIDIS, K.; BRATSAS, A.; et al. Arterial stiffening and systemic endothelial activation induced by smoking: The role of COX-1 and COX-2. **Int J Cardiol.** 2015;189:293-298. doi:10.1016/j.ijcard.2015.04.029

WU DTI WAI, B., PITCHAKARN, P., BANJERDPONGCHAI, R. Alpha-mangostin, an active compound in *Garcinia mangostana*, abrogates anoikis-resistance in human hepatocellular carcinoma cells. **Toxicol In Vitro**. 2018;53:222-232. doi:10.1016/j.tiv.2018.09.003

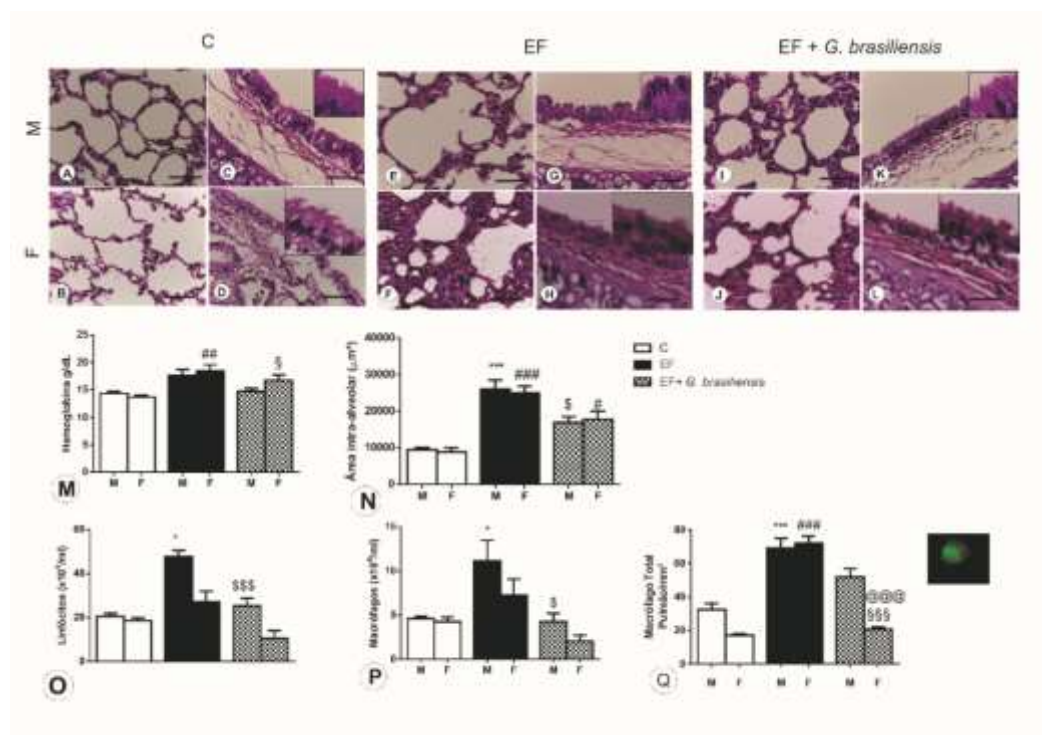
ZHANG, L.; CHENG, Z.; LIU, W.; WU, K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. **COPD**. 2013;10(4):459-465. doi:10.3109/15412555.2013.770456

Figura 1- Análises fisiológicas e radiográficas do pulmão – Nesses dados foram avaliadas as regiões do tórax, comparando o pulmão entre os grupos controles (A e D), expostos ao fumo (B e E) e expostos ao fumo e tratados com o extrato de *G. brasiliensis* (C e F). Medida de 18cmx24cm. Variáveis: altura retroesternal pulmonary, perímetro pulmonar: do início ao fim do pulmão direito (G). **Análises fisiológicas de pletismografia** - Avaliação da capacidade de ventilação pulmonar por minuto (H); frequência pulmonar por minutos (I) e capacidade do volume de ar inspirado em mL por minutos (J), Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=7), * p<0,05; ** p<0,01 e ***p< 0,001 vs controle machos; ## p<0,01 e ### p< 0,001 vs controle fêmeas; \$\$ p<0,01 e \$\$\$ p< 0,001 vs EF machos e @@@ p<0,001 vs EF+*G.brasiliensis* machos.



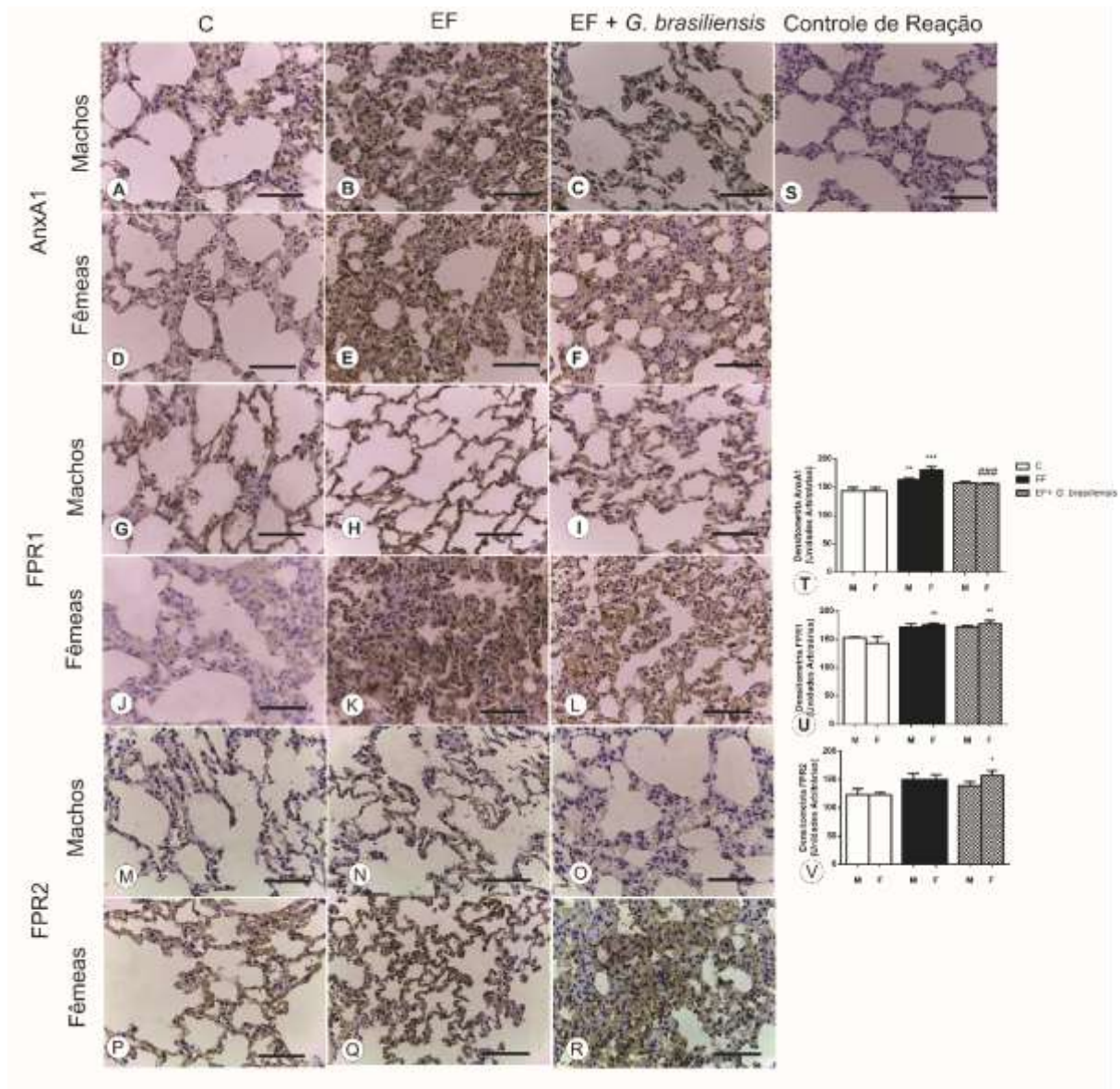
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2 – Análise histopatológica do pulmão– Grupos controles com aspecto tecidual normal (A e B), grupos expostos ao fumo sem tratamento (E e F) com aumento dos espaços intra-alveolares e BALT e grupos expostos ao fumo tratado com o extrato da *G. brasiliensis* (I e J). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 10 µm. **Análise histopatológica da traqueia** – Controles (C e D), grupo exposto ao fumo sem tratamento com alteração no tecido e perda dos cílios (G e H) e grupo tratado com o extrato da *G. brasiliensis* (K e L), com preservação do tecido epitelial. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 10 µm. **Análise bioquímicas do sangue** – A dosagem de hemoglobina (M) foi realizada no sangue total por g/dl nos grupos controle, exposto ao fumo e exposto ao fumo tratado. Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=7/grupo). * p<0,05 *** p<0,001 vs C machos; \$ p< 0,05 \$\$ p< 0,01 e \$\$\$ p<0,01 vs EF machos. # p<0,05; ## p< 0,01 vs C fêmeas; § p<0,05; vs EF fêmeas. **Análise quantitativa do lavado bronco alveolar** – Quantificação de linfócitos (O) e macrófagos (P), em câmara de Neubauer. Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=7); **Imunofluorescência de macrófagos no pulmão em machos e fêmeas- Poucos** macrófagos nos grupos controles e aumento dessas células nos animais expostos à fumaça do cigarro e redução após tratamento com o peptídeo (Q). Barras 10 µm. Resultados apresentados como média ± S.E.M. *** p< 0,001 vs C macho; ### p<0,001 vs C fêmea; \$\$\$ p<0,001 vs EF fêmeas; @@@ p<0,001 vs EF+*G. brasiliensis* Machos. No detalhe um macrófago imunomarcado.



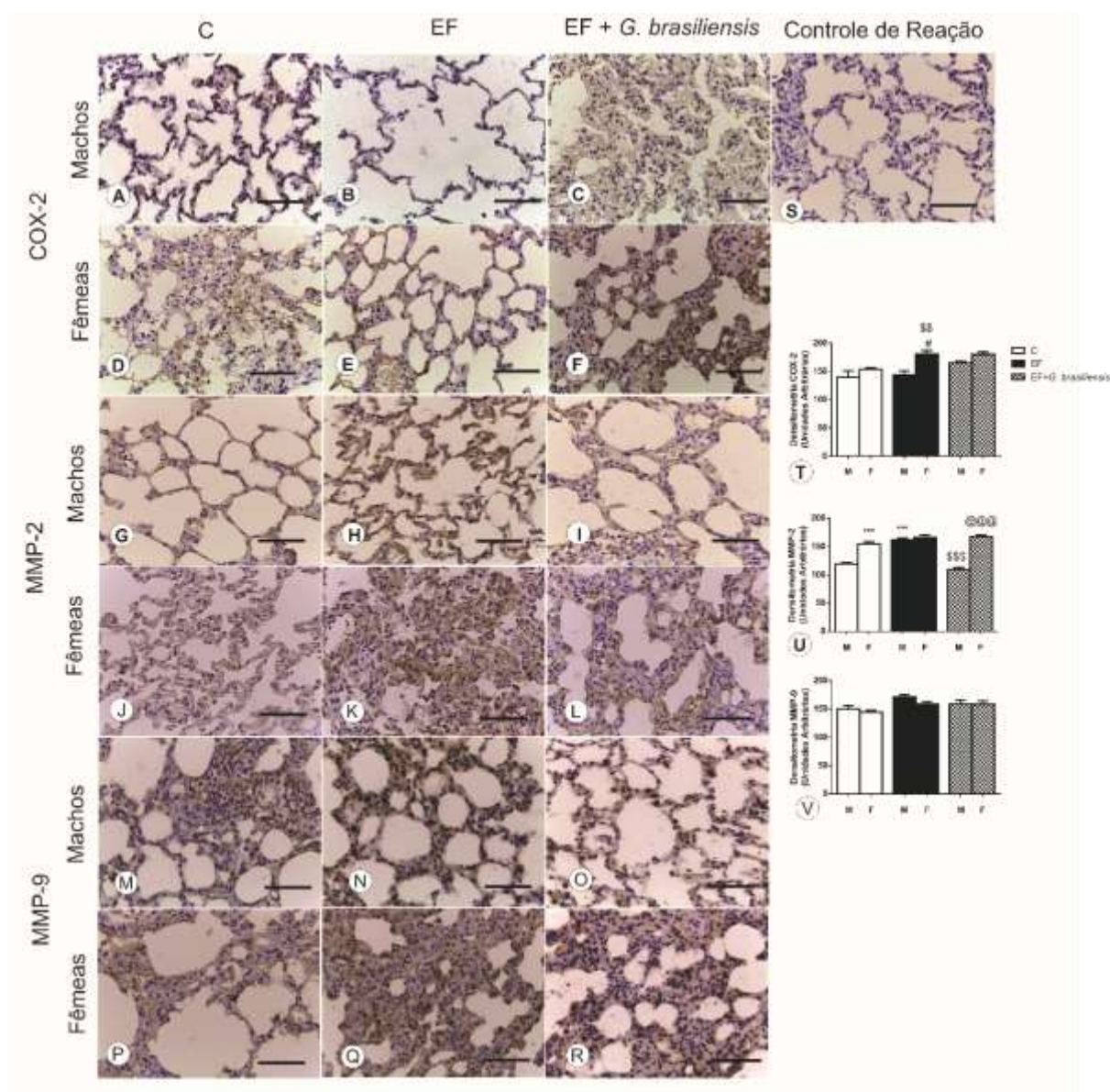
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 - Expressão das proteínas AnxA1, FPR1 e FPR2 no pulmão de machos e fêmeas: Menor expressão das proteínas nos grupos controles (A, D, G, J, M e P), aumento da imunomarcação no grupo exposto ao fumo sem tratamento (B, E, H, K, N e Q) e redução na expressão da AnxA1, FPR1 e FPR2 após tratamento com o extrato (C, F, I, L, O e R). Ausência de marcação no controle de reação (S). Contra-colora o: Hematoxilina. Barras 10  m.



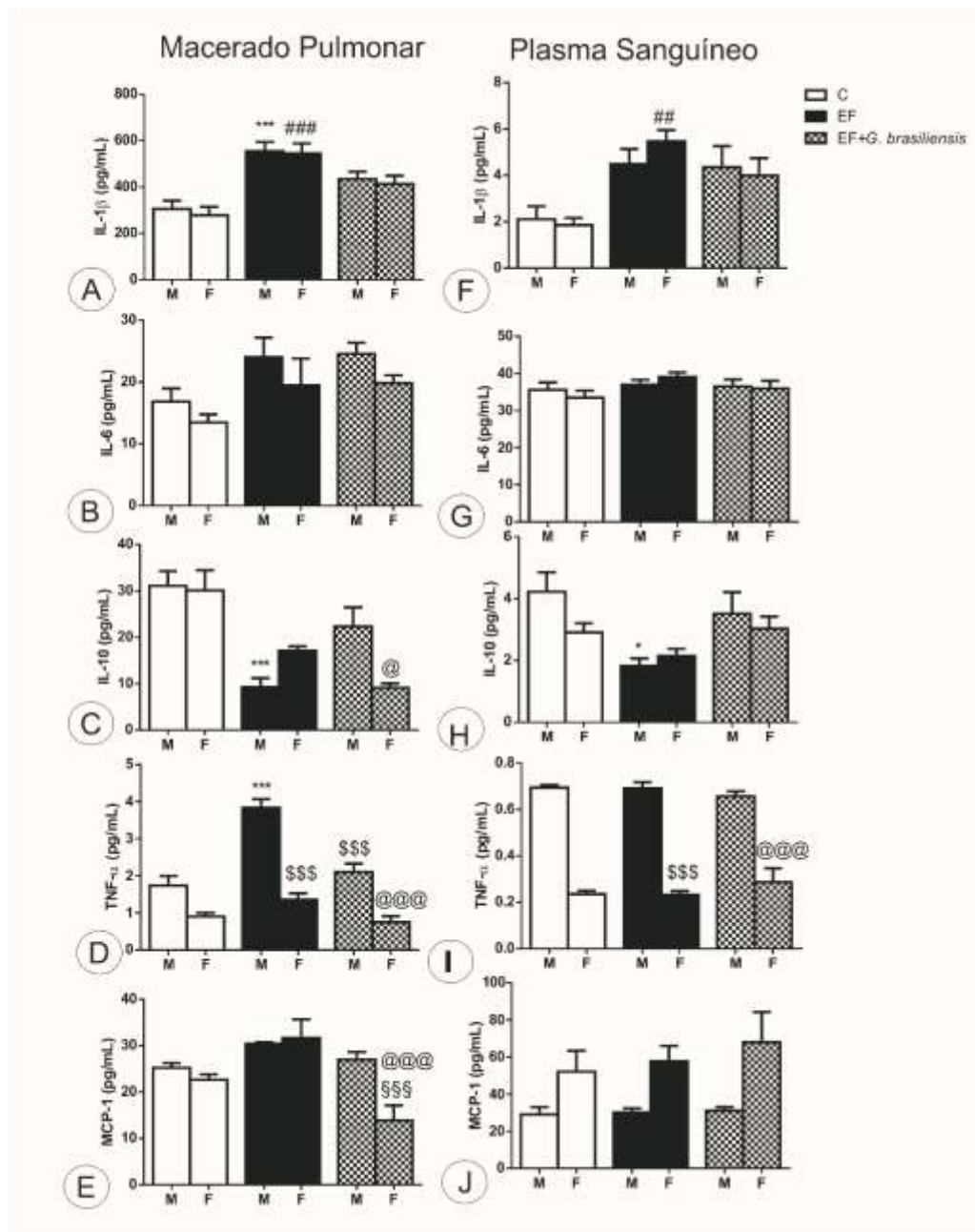
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 - Expressão das proteínas COX-2, MMP-2 e MMP-9 no pulmão de machos e fêmeas: Menor expressão das proteínas nos grupos controles (A, D, G, J, M e P), aumento da imunomarcação no grupo exposto ao fumo sem tratamento (B, E, H, K, N e Q) e redução na expressão da COX-2, MMP-2 e MMP-9 após tratamento com o extrato (C, F, I, L, O e R). Ausência de marcação no controle de reação (S). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 10 µm. Análises Densitométricas: Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=7/grupo) (T, U e V). *** p< 0,001 vs C machos; # p<0,05 vs C fêmeas; \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001 vs EF machos; @@@ p<0,001 vs EF+*G. brasiliensis* machos.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 - Dosagem de citocinas no macerado do pulmão e plasma sanguíneo em machos e fêmeas - IL-1 β (A e F); IL-6 (B e G); IL-10 (C e H); TNF- α (D e I) e MCP-1 (E e J). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=7/grupo). * p<0,05; ** p< 0,01; * p< 0,001 vs C machos # p<0,05; ## p<0,01 ### p<0,001 vs C Fêmeas; \$\$\$ p<0,001 vs EF machos; \$\$\$ p<0,001 vs EF fêmeas; @ p<0,05; @@@ p<0,001 vs EF+G. brasiliensis machos.**



Fonte: Elaborado pelo autor

4. MANUSCRITO 3

Potencial terapêutico do peptídeo Ac2-26 da Anexina A1 em doenças pulmonares obstrutiva crônica

Lucas Possebon^{1,2}, Jéssica Messias da Silva¹, Ariane Harume Yoshikawa¹, Sara de Souza Costa^{1,2}, Helena Ribeiro Souza^{1,2}, Melina Mizusaki, Iyomasa Pilon¹, Sonia Maria Oliani², Ana Paula Girol^{1,2}

1 – Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) – Catanduva/SP, Brasil.

2 – Universidade Estadual Paulista/ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE) – São José do Rio Preto/SP, Brasil.

Palavras-chave: DPOC; Anexina A1; inflamação.

Suporte financeiro: CAPES

Resumo

O tabagismo está ligado ao processo inflamatório induzido por substâncias nocivas o que pode desenvolver doenças pulmonares. Diferentes leucócitos participam desse processo com implicação em alterações estruturais da arquitetura pulmonar. Investigações anteriores mostraram que o peptídeo mimético Ac2-26 da proteína Anexina A1 apresenta perfil anti-inflamatório em diferentes modelos de inflamação pulmonar. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do Ac2-26 da proteína Anexina A1 em modelo de indução por longo período à fumaça do cigarro. Ratos (machos e fêmeas, Wistar) foram expostos à fumaça da queima de 10 cigarros comerciais, 2x/dia, por 8 semanas, em aparelho próprio para exposição ao fumo. Animais dos grupos tratados receberam via intraperitoneal com o Ac2-26 (1mg/Kg). Os grupos controles foram mantidos no mesmo regime, porém na ausência da fumaça do cigarro. Foram avaliados parâmetros fisiológicos relacionados a pesagem, pressão arterial, plestismografia e raio-x. Sangue, lavado broncoalveolar (LBA), pulmões e traqueia foram coletados após eutanásia. A quantificação de linfócitos e macrófagos foi feita no LBA e ainda, os macrófagos também foram observados por imunofluorescência. As expressões de MMP-2, MMP-9, COX-2, AnxA1, FPR1 e FPR2 foram avaliadas por imuno-histoquímica. A hemoglobina foi dosada no sangue total e as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α no plasma sanguíneo e no sobrenadante do macerado do pulmão. Os ratos expostos ao fumo sem tratamento apresentaram reduções macroscópicas das dimensões pulmonares, bem como, de frequência, volume e ventilação pulmonares e alta concentração de hemoglobina comparados aos ratos tratados e controles. Linfócitos e macrófagos foram encontrados no LBA do grupo exposto à fumaça sem tratamento, com redução significativa dessas células nos grupos tratados. A redução da expressão de MMP-2, MMP-9, COX-2 e AnxA1 e o aumento de FPR1 e FPR2 foram observados nos animais tratados. Ainda, níveis reduzidos de IL-1 β , TNF- α e MCP-1 e aumento de IL-10 ocorreram nos animais que receberam tratamento com peptídeo mimético comparado aos animais não tratados. Nossos resultados reforçam o efeito protetor do Ac2-26 da Anexina A1 no processo inflamatório causado pela exposição à fumaça do cigarro em modelo de DPOC, em machos e fêmeas.

1. Introdução

A DPOC é causada por processo inflamatório induzido pela inalação de partículas e gases nocivos, o que leva a mudanças estruturais nas vias respiratórias e alvéolos. Diferentes células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e linfócitos participam do processo da doença, sendo responsáveis pela liberação de vários mediadores químicos como o fator de necrose tumoral (TNF) α , o interferon (IFN) γ e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 (CCLX8), IL-17 e IL-18, que a longo prazo e pelo desequilíbrio da resposta imune, causam danos teciduais e levam ao declínio da função pulmonar (RABE et al., 2007; TERAMOTO, 2007; SARIR et al., 2008; CARAMORI et al., 2014; KUBYSHEVA et al., 2020).

Dado o papel central desempenhado pela inflamação na DPOC, o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias inovadoras é fundamental, em particular para retardar a progressão da doença e obter melhor controle das exacerbações (COMPTON et al., 2013; ARYAL; DIAZ-GUZMAN; MANNINO, 2014). Entre os mediadores anti-inflamatórios, a proteína endógena Anexina A1 (AnxA1), o primeiro membro caracterizado da superfamília das anexinas, pode representar uma terapia alternativa para o tratamento da DPOC (LIM; PERVAIZ, 2007; OLIANI et al, 2008; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; GIROL et al, 2013). Ainda, a anexina A1 tem mostrado sua atuação com efeitos protetores contra a lesão pulmonar induzida por isquemia, utilizando a via FPR (LIAO et al., 2017; POSSEBON et al., 2018a).

Com essas considerações, é importante o estudo da administração do peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26 como estratégia de reversão dos processos fisiológicos e teciduais alterados induzidos pela exposição à fumaça do cigarro, em modelo experimental, como possível alternativa terapêutica na DPOC.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Ratos e ratas da linhagem Wistar, com 6 semanas de idade, foram obtidos da Unidade Didática e de Pesquisa Experimental (UDPE) do Centro Universitário Padre Albino (UNIFIPA) de Catanduva-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas, em um ambiente com temperatura controlada (22 a 25°C) com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados na UDPE, no Laboratório

Multidisciplinar (UNIFIPA) e conduzidos de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA UNIFIPA- certificado nº 06/17).

Para os protocolos experimentais os animais de ambos os sexos foram divididos em grupos: expostos à fumaça do cigarro e não tratados (grupos F), expostos à fumaça e tratados com o peptídeo (grupos F+Ac2-26) e animais controles não expostos à fumaça nem tratados.

2.2. Exposição à fumaça do cigarro e protocolos de tratamentos

Para o desenvolvimento da DPOC, os animais foram expostos à fumaça da queima de 10 cigarros comerciais (contendo 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono), um após o outro, duas vezes ao dia (total de 20 cigarros/dia), por 8 semanas, em aparato próprio para exposição ao fumo da UDPE, UNIFIPA. O grupo controle (C) não foi exposto à fumaça, mas somente ao ar comprimido (POSSEBON et al., 2018a, POSSEBON et al., 2018b).

O protocolo de tratamento foi realizado em dois dos grupos (machos e fêmeas) de animais expostos à fumaça do cigarro, nos quais foi administrado intraperitonealmente (i.p) com o Ac2-26 na dosagem de 1mg/Kg (GIROL et al., 2013; POSSEBON et al., 2018a), 3x/semana, antes da primeira exposição à fumaça do cigarro (grupo F + Ac2-26).

2.3. Análises fisiológicas de pletismografia

No final do período de exposição à fumaça e tratamento, os animais foram avaliados quanto à pletismografia, por meio da medição da capacidade de respiração, ventilação, frequência e volume inspirado, em aparelho específico e adaptado ao uso (*PowerLab, AD Instruments-Gas Analyzer, Austrália*) (POSSEBON et al., 2018a).

2.4. Análises por imagem de Raio X

Após as 8 semanas de exposição os animais foram anestesiados i.p. com Ketamina (0,8 mg/kg) e Xilasina (0,02 mg/kg) e em seguida foram realizadas imagens radiográficas da região do tórax antero superior, indicando a via respiratória por imagens macroscópicas de 18 cm de largura por 24 cm de altura das pranchas dos pulmões em um aparelho específico (*Raio X – Astex, Vet maq*) adaptado para o uso

em ratos Wistar. As variáveis consideradas foram: a altura retroesternal pulmonar do pulmão direito e os níveis de rebaixamento diafragmático direito e esquerdo (POSSEBON et al., 2018a).

2.5. Análises bioquímicas do sangue e lavado broncoalveolar

O sangue foi coletado por punção cardíaca em seringas heparinizadas e separado em alíquotas para análise de hemoglobina com Kit comercial. Outras alíquotas foram centrifugadas por 15 minutos a 3.000 rpm e o plasma congelado a -70°C para posterior dosagem de citocinas.

Para obtenção do lavado broncoalveolar (LBA), os animais tiveram a traqueia canulada e o pulmão direito clampado. O pulmão esquerdo foi lavado 3 vezes com PBS e o líquido obtido será centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi armazenado a -70 °C para posterior dosagem de citocinas e o *pellet* foi ressuspenso em 500 µl de PBS e alíquotas de 10 µl foram corados em Turk (1:10) para contagem de linfócitos e macrófagos em câmara de Neubauer (valores como número de células x 10⁴/mL).

2.6. Análises histopatológicas e imuno-histoquímicas

Após coleta do LBA, o pulmão direito e traqueia foram retirados, fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. Secções de 5µm foram usadas para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas no microscópio Leica (DM500) do Laboratório Multidisciplinar da UNIFIPA.

Nos estudos imuno-histoquímicos foram avaliadas as expressões de AnxA1, FPR1, FPR2, COX-2, MMP-2 e MMP-9 no pulmão de todos os animais. Para isso as secções foram processadas para recuperação antigênica com tampão citrato pH 6,0 e bloqueio da atividade da peroxidase endógena e incubadas com os anticorpos primários policlonais rabbit: anti-MMP2 (1:100) (Abcam), anti-MMP-9 (1:100) (Abcam), anti-AnxA1 (1:1000) (*life Technologies*), anti-Cox2 (1:500) (*Demorelis*), anti-FPR1 (1:500) e anti-FPR2 (1:500) (Bioss) por 12 horas. A seguir, incubadas com o anticorpo secundário biotilado e imersas em complexo estreptavidina peroxidase conjugada (*kit Histostain, Invitrogen*). O substrato diaminobenzidina (DAB) (*Kit DAB, Invitrogen*) foi usado para revelação e, após, as secções foram contra coradas com Hematoxilina.

As proteínas foram quantificadas por densitometria (unidades arbitrárias de 0 a 255) no analisador de imagens (*software Leica Image Analysis*) (SOUZA et al, 2017; POSSEBON et al, 2018a).

2.7. Quantificação de macrófagos por imunofluorescência

Cortes obtidos das amostras de pulmão foram desparafinizados, re-hidratados e a recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato pH 6,0 a 96 °C, durante 20 min. Os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos em PBS contendo 0,25% de Triton X-100, lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada). Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com soroalbumina bovina (BSA) a 2% em PBS-T por 30 minutos para o bloqueio de ligação inespecífica dos anticorpos e então, com o anticorpo ED-1 (1:100) (*Zymed Laboratories, Cambridge, UK*) diluído em BSA a 1%, por 1 hora, temperatura ambiente, em câmara úmida, a seguir, foram lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada). Após, incubados com o anticorpo secundário goat anti-mouse-FITC conjugado (1:100; Santa Cruz, USA) por 60 minutos, em câmara escura e lavados em PBS por 15 minutos (três lavagens de 5 minutos cada) e, em seguida, com DAPI por 1 minuto em câmara escura e posterior lavagem com PBS. As lâminas foram montadas com glicerina. O controle negativo da reação foi obtido pela omissão do anticorpo primário. A quantificação dos macrófagos nos tecidos pulmonares foi realizada na objetiva de 40X, com imagem do Microscópio Bel Photonics®. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.) do número de macrófagos por mm².

2.8. Análises de *Western Blotting*

A determinação da concentração de proteínas, presentes nos sobrenadantes dos fragmentos de pulmão após maceração, foi feita em ensaio de Bradford (*Biorad, Hemel Hempsted, UK*) e ajustada para 2 mg/mL. Uma alíquota foi misturada (1:1) com 2X *loading buffer* (Tris base a 125 mM, pH 6,8, contendo mercaptoetanol a 10%, dodecil sulfato de sódio a 4%, glicerol a 20% e azul de bromofenol a 0.1%) e desnaturada em água a 100°C por 5 minutos. As amostras (20 mg de proteína por poço) e marcadores de peso molecular foram separados em gel SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio a 10% – gel de poliacrilamida a 10%) e, posteriormente, transferidas

para membrana de nitrocelulose. A proteína AnxA1 foi detectada utilizando-se o anticorpo primário anti-AnxA1 (1:1000) (*life Technologies*). O sinal foi amplificado utilizando anticorpos secundários anti-rabbit IgG HRP conjugado (*Promega*) e o produto da reação foi visualizado com revelação em DAB (*Kit DAB, Invitrogen*).

2.9. Dosagem de citocinas

As citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, MCP-1 e TNF- α foram quantificadas no plasma sanguíneo e no sobrenadante do macerado pulmonar, utilizando o Kit *MILLIPLEX MAP* de citocinas de rato (RECYTMAG-65K; *Millipore Corporation, EUA*) e analisadas no equipamento *LUMINEX xMAP MAGPIX* (*Millipore Corporation, EUA*). As *beads* magnéticas, soluções controles, tampão de lavagem, soro matriz e padrões foram preparados e homogeneizados conforme as instruções descritas no RECYTMAG-65K *Milliplex MAP Kit* (*Millipore*). Inicialmente, foram adicionados 25 μ l dos padrões, soluções controles e amostras na placa magnética de 96 poços, lavada com o tampão de lavagem. Em seguida, 25 μ l de *assay buffer* foram adicionados às amostras, 25 μ l do meio apropriado aos padrões e, 25 μ l de *beads* magnéticas com anticorpos específicos em todos os poços (controles, padrões e amostras). Após, a placa foi selada com adesivo próprio, revestida com papel alumínio e incubada por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação no *shaker*. Na sequência, a placa foi lavada 2x com 200 μ l de tampão de lavagem e incubada com 25 μ l de anticorpo de detecção à temperatura ambiente, por uma hora, no *shaker*. Para completar a reação, 25 μ l de ficoeritrina conjugada à estreptavidina foi adicionada e incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação. A placa foi então lavada e incubada com 125 μ l do fluido (*Drive Fluid*) por cinco minutos à temperatura ambiente, no *shaker*. Em seguida, a leitura da placa foi realizada no *LUMINEX xMAP MAGPIX*. A concentração dos analitos foi determinada pelo *software MAGPIX xPONENT* (*Millipore Corporation, USA*). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.) das concentrações de citocinas (pg/mL).

2.10. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos previamente à análise descritiva e determinação da normalidade pelo programa GraphPad Prism® Version 6.01. Para

esses dados, que mostraram distribuição normal, foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de *Bonferroni*. Para análise da pressão arterial foi usada a ANOVA com repetições. Enquanto as médias das pesagens foram comparadas pelo *two-way* ANOVA. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm S.E.M. e os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados

3.1. Análises fisiológicas e bioquímicas do sangue total

Nas análises das imagens por radiografias, foram observadas elevações macroscópicas do perímetro do pulmão direito no momento de inspiração nos grupos sem tratamento (M: 131.0 ± 1.143 ; F: 111.1 ± 2.677) (Figura 1C) em comparação aos grupos controles (M: 113.9 ± 5.233 ; F: 94.01 ± 2.052 ; $p < 0,01$) (Figura 1C). Ainda foi possível observar diferença significativa entre machos e fêmeas nos grupos controles ($p < 0,001$), expostos à fumaça sem tratamento ($p < 0,001$) e grupos tratados com o Ac2-26 (M: 125.1 ± 2.397 ; F: 101.4 ± 1.985 ; $p < 0,001$), com redução nas fêmeas.

Pela pletismografia, ocorreu aumento significativo da frequência pulmonar nos animais machos e fêmeas expostos ao fumo e não tratados (M: $168,5 \pm 2,862$ e F: $164,0 \pm 1,994$) comparados ao controle (M: $151,4 \pm 4,307$; $p < 0,001$ e F: $152,4 \pm 2,103$ $p < 0,05$) e redução significativa nos machos tratados com o peptídeo da AnxA1 ($153,4 \pm 1,450$; $p < 0,001$) (Figura 1D).

A capacidade de ventilação e volume final também aumentaram nos grupos de machos e fêmeas sem tratamento (Ventilação M: $837,8 \pm 126,8$; Ventilação F: $1219 \pm 67,33$; Volume M: $9,054 \pm 0,834$; Volume F: $7,412 \pm 0,3320$) com relação ao grupo controle (Ventilação M: $318,9 \pm 64,93$; $p < 0,001$; Ventilação F: $659,0 \pm 45,78$ $p < 0,001$; Volume M: $1,655 \pm 0,3934$; $p < 0,001$; Volume F: $4,320 \pm 0,2782$ $p < 0,001$) e ocorreu redução no grupo de machos tratados com Ac2-26 (Ventilação: $269,6 \pm 17,60$; Volume: $1,840 \pm 0,2099$; $p < 0,001$) (Figura 1E e F). Além desses dados, obtivemos resultados diferentes entre os grupos de machos e fêmeas tratados com o peptídeo, com redução significativa nos animais machos nos parâmetros de ventilação e volume (Ventilação M: $269,6 \pm 17,60$; Ventilação F: $1061 \pm 57,58$; $p < 0,001$) (Volume M: $1,840 \pm 0,2099$; Volume F: $6,558 \pm 0,3522$; $p < 0,001$).

A dosagem no sangue total mostrou aumento significativo da quantidade de hemoglobina nas fêmeas expostas à fumaça do cigarro e sem tratamento ($18,43 \pm 1,167$) comparada aos grupos controle ($13,67 \pm 0,3258$; $p < 0,01$) (Figura 2V).

3.2. Histopatologia e influxo inflamatório nos tecidos e lavado broncoalveolar

Nas análises histopatológicas (Figuras 2A-R) foram observadas modificações nos espaços intra-alveolares no pulmão e traqueia de animais machos e fêmeas, com aumento nos grupos expostos ao fumo (M: 26113 ± 2478 ; F: 24993 ± 1853) (Figura 2G, H, J, K e S), comparado aos controles (M: 9479 ± 597.3 ; F: 8865 ± 1150 ; $p < 0,001$) (Figura 2A, B, D, E e S) e tratados com o peptídeo Ac2-26 (M: 16261 ± 1627 ; F: 15689 ± 2201) (Figura 2M, N, P, Q e S) os quais apresentaram reduções comparados aos não tratados (M: $p < 0,01$; F: $p < 0,05$). Os animais F (Figuras 2G, H, J e K) ainda influxo de células inflamatórias no pulmão comparado aos outros grupos (Figuras 2A, B, D e E, M, N, P e Q).

As análises histopatológicas em HE da traqueia mostraram alterações no epitélio respiratório de animais machos e fêmeas devido a exposição à fumaça do cigarro, com a perda dos cílios nos grupos expostos ao fumo e não tratado (Figuras 2I e L) com relação ao C (Figuras 2C e F) e F+Ac2-26 (Figuras 2O e R).

A quantificação de linfócitos e macrófagos no LBA, mostrou aumento significativo de macrófagos ($11,14 \pm 2,348$) (Figura 2S) e linfócitos ($47,61 \pm 2,942$) (Figura 2T) no grupo de machos não tratados comparados ao controle (Macrófago: $4,321 \pm 0,1515$; $p < 0,05$; Linfócito: $20,46 \pm 1,438$; $p < 0,05$), e redução significativa dessas células nos machos tratados com o Ac2-26 (Macrófago: $4,643 \pm 1,152$; Linfócito: $22,11 \pm 3,027$) (Figura 2S e T) e também nos linfócitos de fêmeas tratadas com o peptídeo ($10,93 \pm 0,6540$) (Figura 2T) comparado ao não tratado ($27,14 \pm 4,870$; $p < 0,05$).

Os macrófagos também foram quantificados nos tecidos pulmonares por meio de imunofluorescência. No pulmão dos animais machos e fêmeas, essas análises indicaram aumento nos grupos sem tratamento (M: $68,93 \pm 5,897$; F: $71,96 \pm 4,117$ $p < 0,001$) (Figura 3) comparado aos C (M: $32,50 \pm 3,639$; F: $17,14 \pm 0,8502$) (Figura 3) e redução dessas células no grupo F+Ac2-26 (Machos: $41,07 \pm 6,728$; Fêmeas: $41,25 \pm 4,507$) ($p < 0,01$) (Figura 3).

3.3. Avaliações de expressão de proteínas

A imunomarcação da proteína AnxA1 e dos receptores para peptídeo formilados, FPR1 e FPR2, foi analisada no pulmão de todos os grupos. A especificidade da imunomarcação foi comprovada pelo controle de reação (Figura 4S).

Nas análises de AnxA1, os grupos sem tratamento (M:162,9±2.604; F:180,4±5,727) (Figura 4B e E), mostraram expressão aumentada da proteína, comparada com os respectivos controles (M:143,3±6,419; F:143,3±6,209) (Figura 4A e D) e grupos tratados (M: 149,8±2,226; F:157,58±2,573) (Figura 4C). As análises estatísticas (Figura 4T), corroboraram com as análises imuno-histoquímicas, mostrando aumento significativo (M: $p<0,05$ e F: $p<0,01$) da expressão da AnxA1 no grupo sem tratamento, comparado aos controles e redução significativa do grupo de fêmeas tratadas ($p<0,001$) em comparação às fêmeas expostas à fumaça sem tratamento. Os resultados de *Western blotting* foram similares aos da imuno-histoquímica, indicando aumento significativo nos animais expostos à fumaça do cigarro (M:102,9±4,232; F:103,4±4,102; $p<0,001$) (Figura 4W e X), comparados aos controles (M: 64,43±7,853; F: 65,57±7,359) (Figura 4W e X), e redução significativa nos animais machos e fêmeas tratados com o peptídeo Ac2-26 (M: 77,50±7,922; F: 77,71±7,914; $p<0,01$) (Figura 4W e X). A Tubulina foi detectada como controle de reação para esta técnica (Figura 4W).

Com relação às expressões dos receptores, nas avaliações do FPR1, foi observado aumento da expressão deste receptor no pulmão de machos e fêmeas que foram expostos à fumaça (M: 171,1±6,131; F: 176,3±1,933 ; $p<0,001$) (Figura 4H, K e U) comparados aos controles (M:153,2± 1,376; F:143,3± 11,64) (Figura 4G, J e U). Nos animais tratados com Ac2-26 (M:173,1± 0,6602; F:187,0± 2,283; $p<0,001$) (Figura 4I, L e U), os valores de expressão do FPR1 foram semelhantes aos não tratados. Do mesmo modo, a imunomarcação do FPR2 mostrou aumento da expressão desse receptor em machos e fêmeas expostos à fumaça do cigarro tratados (M: 167,3± 7,509; F:171,4± 7,329; $p<0,001$) (Figura 4O, R e V) ou não (M:150,3±10,36; F:150,3± 8,129; $p<0,05$) (Figura 4N, Q e V) comparados aos animais controles (M: 123,4± 10,27; F: 122,5± 4,626) (Figura 4M, P e V).

As expressões das enzimas COX-2, MMP-2 e MMP-9 também foram analisadas no pulmão dos grupos de machos e fêmeas expostos ao fumo, tratados ou não e nos

animais controle. A especificidade das imunomarcações foi comprovada pelos respectivos controles de reação (Figura 5S).

A expressão da COX-2 foi aumentada nos pulmões das fêmeas no grupo exposto à fumaça e não tratado ($180,2 \pm 6,622$; $p < 0,05$; Figura 5E e T) comparado ao grupo C ($153,5 \pm 2,906$; Figura 5D e T) e aos machos expostos a fumaça do cigarro ($143,4 \pm 7,423$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$; Figura 5B e T). O tratamento com o peptídeo não alterou a expressão dessa enzima no tecido pulmonar nos machos. Entre machos e fêmeas tratados a imunomarcação para COX-2 foi maior nas fêmeas ($186,2 \pm 3,436$; $p < 0,001$; Figura 5C, F e T).

Nas análises da imunorreatividade para MMP-2 foi observado aumento da expressão da enzima nos animais de ambos os sexos expostos à fumaça do cigarro (M: $161,7 \pm 3,721$; F: $165,9 \pm 4,834$; $p < 0,001$) (Figura 5H, K e U) comparados aos grupos C (M: $119,3 \pm 2,277$; F: $155,2 \pm 3,439$) (Figura 5G, J e U). Ainda houve diferença significativa entre os grupos controles, com aumento nas fêmeas ($p < 0,001$). As fêmeas tratadas com o peptídeo (Figura 5L e U) também apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) comparado ao grupo tratado de machos (Figura 5I e U). Já o grupo de machos tratados com o peptídeo apresentou redução significativa da metaloproteinase comparado aos animais não tratados ($p < 0,001$) (Figura 5H e U).

Estudos da MMP-9 mostraram aumento na expressão da enzima no pulmão de animais machos e fêmeas expostos ao fumo não tratados (Figura 5N e Q) com relação aos animais controle (Figura 5M e P). Novamente, nos machos, reduções na expressão de MMP-9 ($p < 0,01$) foram observadas após o tratamento com o peptídeo ($159,9 \pm 12,94$; Figura 5O) em relação aos animais não tratados (Figura 5N).

3.4. Níveis de mediadores químicos no plasma e sobrenadante do macerado pulmonar

No sobrenadante pulmonar dos animais machos e fêmeas exposto ao cigarro foram observados níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (M: $555,7 \pm 39,21$; F: $545,7 \pm 42,44$), do TNF- α (M: $3,837 \pm 0,2290$; F: $1,356 \pm 0,1711$; $p < 0,001$) e somente em fêmeas da quimiocina MCP-1 ($31,64 \pm 4,028$; $p < 0,01$) comparados aos respectivos animais controle (IL-1 β M: $305,4 \pm 36,55$ $p < 0,01$; IL-1 β F: $278,2 \pm 36,10$; $p < 0,01$; TNF- α M: $1,739 \pm 0,2542$; $p < 0,001$; TNF- α F: $0,9029 \pm 0,1006$; $p < 0,001$ e MCP-1 F: $21,75 \pm 0,9114$) (Figura 6A, D e E). A administração do peptídeo

promoveu redução significativa nos níveis dos mediadores pró-inflamatórios no sobrenadante do macerado pulmonar de TNF- α em machos (2.744 ± 0.1859 ; $p<0,01$), MCP-1 em fêmeas (19.47 ± 2.112 ; $p<0,001$) comparados aos animais não tratados e ainda diferença significativa de TNF- α entre machos e fêmeas tratados com o peptídeo (M: 2.744 ± 0.1859 ; F: 0.7714 ± 0.04973 $p<0,001$) (Figura 6D e E).

Similarmente, foram encontrados aumentos nas dosagens de IL-1 β em fêmeas no plasma sanguíneo (5.461 ± 0.4855) comparado ao grupo controle (1.851 ± 0.3126 ; $p<0,001$), e ainda diferença significativa de TNF- α entre machos e fêmeas nos grupos controle (M: 0.6943 ± 0.01212 ; F: 0.2357 ± 0.01462 $p<0,001$), expostos à fumaça tratados (M: 0.6471 ± 0.01700 F: 0.1957 ± 0.01478 $p<0,001$) e sem tratamento (M: 0.6929 ± 0.02570 ; F: 0.2314 ± 0.01752 ; $p<0,001$) com o peptídeo (Figura 6, I e J).

Diferentemente, nos machos e fêmeas expostos ao fumo não tratados, níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10 foram observados no sobrenadante do macerado pulmonar (M: 9.266 ± 1.945 ; F: 17.16 ± 0.8888) e no plasma sanguíneo (M: 1.817 ± 0.2458) comparados aos controles (M: 31.12 ± 3.112 ; $p<0,001$ F: 30.10 ± 4.339 $p<0,05$). Também foi possível observar aumento significativo de IL-10 no sobrenadante do macerado pulmonar do grupo de machos tratados com o peptídeo (2.744 ± 0.1859) comparados aos machos não tratados ($p<0,05$) (Figura 6C e H).

4. Discussão

O hábito tabagista é um importante problema de saúde mundial e mesmo pessoas não tabagistas, que convivem com a fumaça produzida por fumantes, sofrem os danos causados por esta exposição (COMPTON *et al.*, 2013; CAMARONI *et al.*, 2014). Por essas razões, procedemos aos experimentos *in vivo* no modelo de DPOC em ratos, com a administração do peptídeo Ac2-26 da proteína AnxA1, que apresenta grande potencial anti-inflamatório (POSSEBON *et al.*, 2018a; HAN *et al.*, 2020).

Nas análises de pletismografia foram observados aumentos nos parâmetros de frequência, volume e ventilação nos animais expostos à fumaça sem tratamento, que corroboram com outros estudos anteriores em modelo de DPOC animal (RAMÍREZ-RAMÍREZ *et al.*, 2017; POSSEBON *et al.*, 2018a; SANT'ANA *et al.*, 2020). Além disso, os estudos de radiografia indicaram aumentos no perímetro pulmonar direito no grupo sem tratamento, o que indica limitação do fluxo de ar (VENEGAS, *et al.* 2005; DIJKSTRA, *et al.* 2011; POSSEBON *et al.*, 2018a).

Nos animais tratados com o peptídeo Ac2-26 da AnxA1 os parâmetros de frequência, volume, ventilação e dimensões pulmonares foram semelhantes aos encontrados nos animais controle, evidenciando os efeitos benéficos do peptídeo contra as ações sistêmicas da exposição ao fumo. Os resultados encontrados no nosso estudo reforçam o papel protetor do Ac2-26 no modelo de DPOC em concordância com pesquisas sobre a ação do peptídeo na fibrose pulmonar (DAMAZO et al., 2011), na endotoxemia pulmonar induzida por LPS (DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012) e em período agudo no modelo de DPOC em ratas (POSSEBON et al., 2018a).

Ainda relacionado às análises sistêmicas, nossos resultados mostraram aumento dos níveis de hemoglobina em ratas expostas à fumaça do cigarro sem tratamento e em ambos os grupos tratados as dosagens foram semelhantes aos controles. Animais induzidos à enfisema pulmonar pelo poluente atmosférico NO₂ apresentaram taxa de hemoglobina elevada, contudo os tratados com desmetilação 5-Azacitidina, essa taxa foi reduzida e com melhora efetiva do enfisema pulmonar (ZHANG et al., 2019). Estudos mostram que a hemoglobina pode ser reajustada de acordo com o perfil do tabagista crônico ou agudo. Estudos ainda mostram que o aumento de glóbulos vermelhos está intimamente ligado ao tabagismo crônico (STUART e VIERA, 2004). Além disso, outro estudo mostra o aumento do risco de morte em pacientes com taxa de hemoglobina elevada em população com DPOC e doença renal crônica (XU et al., 2019).

Nas análises de quantificação de células inflamatórias, observamos aumento de linfócitos e macrófagos no LBA quanto de macrófagos no tecido pulmonar nos animais expostos à fumaça do cigarro e a redução dessas células inflamatórias após tratamento com o peptídeo. Outras investigações mostraram também que essas células são afetadas pelo tabagismo em modelo de DPOC (QIU et al., 2017). Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, também mostramos o aumento de linfócitos e macrófagos nos animais expostos à fumaça do cigarro não tratados e a redução dessas células inflamatórias após tratamento com o peptídeo (POSSEBON et al., 2018a, WANG et al., 2018).

Na continuidade do trabalho, os estudos histopatológicos indicaram alterações morfológicas no pulmão que reforçam investigações anteriores sobre o desarranjo tecidual causado pela fumaça do cigarro (POSSEBON et al., 2018a; SANT'ANA et al.,

2020). O enfisema pulmonar causa desestruturação dos alvéolos com conseqüentemente a redução do volume de ar no pulmão (KOZMA et al., 2014; SHAH et al., 2017; POSSEBON et al., 2018b). O tratamento com o peptídeo Ac2-26 atenuou as alterações nos pulmões.

Ainda, nas análises histopatológicas da traqueia foi possível observar alteração no epitélio, como perda dos cílios, nos animais que foram expostos a fumaça do cigarro sem tratamento, enquanto a preservação do tecido ocorreu nos animais que foram tratados com o peptídeo mimético. Outros estudos já realizados em nosso laboratório em modelo de indução à DPOC também mostraram a atuação do peptídeo na preservação do epitélio da traqueia (POSSEBON et al., 2018a) em período mais agudo da inflamação. O trabalho atual indica que a proteção oferecida pelo peptídeo é mantida mesmo em períodos mais longos de exposição à fumaça do cigarro, com características de afecção inflamatória crônica.

Nos estudos de imuno-histoquímica ocorreu maior expressão da AnxA1 no grupo exposto ao fumo sem tratamento, comparado aos demais grupos, indicando a participação da proteína no controle da inflamação e da alteração no tecido. O aumento na expressão da AnxA1 também foi observado em outras investigações, em fases aguda do processo inflamatório em diferentes modelos (OLIANI et al., 2001; DAMAZO et al., 2011; DA CUNHA; OLIANI; DAMAZO, 2012; GIROL et al., 2013; POSSEBON et al., 2018a). Por outro lado, no grupo exposto ao fumo e tratado observamos a redução da imunomarcagem, o que reforça o envolvimento da AnxA1 na fisiologia das células epiteliais e inflamatórias do pulmão, comprovando a ação anti-inflamatória do Ac2-26, que, possivelmente, está associada a um processo de *feedback* negativo da expressão endógena da proteína (GIROL et al., 2013).

Sabendo que a proteína AnxA1 se liga aos receptores FPR investigamos a expressão desses receptores no pulmão. Nossos resultados indicaram aumento da expressão dos FPR1 e FPR2 no grupo exposto ao fumo não tratado e superexpressão pelo Ac2-26 tratamento. Essas descobertas corroboram a ideia de que AnxA1 e Ac2-26 agem por meio dos receptores FPRs para contenção do processo inflamatório pulmonar (POSSEBON et al., 2018a). Resultados semelhantes foram encontrados por nosso grupo de pesquisa em um modelo de uveíte induzida por endotoxina (GIROL et al., 2013). Além disso, análises *in vitro* apontaram que FPR1 e FPR2 mediam a

inibição da ativação de fibroblastos pulmonares pelo peptídeo Ac2-26 (TRENTIN et al., 2015).

Nas análises de expressão da COX-2 foi observada maior expressão da enzima nas fêmeas expostas ao fumo tratadas ou não comparadas aos controles. A expressão aumentada da COX-2 já foi observada em outros estudos sobre afecções pulmonares em animais não tratados expostos por um período mais curto de exposição. Nessas condições os tratamentos com o peptídeo e um extrato bioativo natural, apresentaram efeitos protetores (POSSEBON et al., 2018a; SANT'ANA et al., 2020).

Ainda nas análises de imuno-histoquímica, identificamos maior imunorreação de MMP-2 e MMP-9 no grupo exposto ao fumo sem tratamento, indicando a participação dessas metaloproteinasas na destruição do tecido (SNG et al., 2017). Outro estudo indica a COX-2 associada a inflamação das vias aéreas e limitação do fluxo aéreo mediado pela MMP-2 em casos de DPOC (CHEN et al., 2008). Novamente, a administração do Ac2-26 mostrou efeitos protetores, por meio da redução da MMP2.

Para complementação dos estudos, procedemos a dosagem de citocinas. No sobrenadante pulmonar dos animais machos expostos a fumaça do cigarro foram observados níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α e nas fêmeas, ocorreu aumento de IL-1 β e da quimiocina MCP-1. Dosagens maiores de IL-1 β também foram observadas no plasma sanguíneo em fêmeas. Nossos resultados corroboram com outros estudos que indicam a presença elevada dessas citocinas na exposição ao fumo e desenvolvimento de DPOC (KLENIEWSKA et al., 2016; BARNES, 2016; WANG et al., 2018).

Diferentemente, nos animais expostos ao fumo não tratados, níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10 foram observados no sobrenadante do macerado pulmonar e no plasma sanguíneo. A baixa dosagem de IL-10 em pacientes ou modelo animal, com ou sem DPOC, comparados aos não expostos ao fumo, indicam que esta citocina é afetada pela exposição a fumaça do cigarro (ZHANG *et al.*, 2013; SILVA et al., 2018, POSSEBON et al., 2018a).

O tratamento com o peptídeo promoveu a redução dos níveis de TNF- α e MCP-1 e aumentou as concentrações de IL-10, indicando seus efeitos protetores contra a inflamação causada pela exposição à fumaça do cigarro. Em outros estudos, também foram observados o uso do peptídeo Ac2-26 em diferentes processos inflamatórios

em pulmão, que promoveram a redução dos níveis de TNF- α e MCP-1, concomitante com o aumento de IL-10, o que indica como perfil anti-inflamatório do tratamento (DAMAZO et al., 2011; POSSEBON et al., 2018a).

5. Conclusão

No conjunto dos dados, observamos o efeito protetivo do peptídeo mimético Ac2-26 da AnxA1 em modelo de DPOC em período mais longo de exposição à fumaça do cigarro, como modelo de cronicidade, o que complementa nossas investigações anteriores sobre efeito positivo do peptídeo em fase aguda da doença em fêmeas (POSSEBON et al., 2018a).

Referências

- ARYAL, S.; DIAZ-GUZMAN, E.; MANNINO, D.M. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2014;9:1145-1154. Published 2014 Oct 14. doi:10.2147/COPD.S54476
- BARNES, P.J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J Allergy Clin Immunol**. 2016;138(1):16-27. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.011
- CARAMORI, G; ADCOCK, I.M.; DI STEFANO, A.; et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2014;9:397-412. doi:10.2147/COPD.S42544
- CHEN, Y.; CHEN, P.; HANAOKA, M.; DROMA, Y.; KUBO, K. Enhanced levels of prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-2 correlate with the severity of airflow limitation in stable COPD. **Respirology**. 2008;13(7):1014-1021. doi:10.1111/j.1440-1843.2008.01365.x
- COMPTON, C.; MCBRYAN, D.; BUCCHIONI, E.; PATALANO, F. The Novartis view on emerging drugs and novel targets for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Pulm Pharmacol Ther**. 2013;26(5):562-573. doi:10.1016/j.pupt.2013.05.009
- DA CUNHA, E.E.; OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulm Pharmacol Ther**. 2012;25(4):303-311. doi:10.1016/j.pupt.2012.04.002
- DAMAZO, A.S.; SAMPAIO, A.L.; NAKATA, C.M.; et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunol**. 2011;12:59. Published 2011 Oct 19. doi:10.1186/1471-2172-12-59

DIJKSTRA, A.E.; POSTMA, D.S.; TEN HACKEN, N.; et al. Low-dose CT measurements of airway dimensions and emphysema associated with airflow limitation in heavy smokers: a cross sectional study. **Respir Res.** 2013;14(1):11. Published 2013 Jan 28. doi:10.1186/1465-9921-14-11

ERIKSSON STRÖM, J., POURAZAR, J., LINDER, R., et al. Cytotoxic lymphocytes in COPD airways: increased NK cells associated with disease, iNKT and NKT-like cells with current smoking. **Respir Res.** 2018;19(1):244. doi:10.1186/s12931-018-0940-7

GAN, W.Q.; MAN, S.F.; SENTHILSELVAN, A.; SIN, D.D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. **Thorax.** 2004;59(7):574-580. doi:10.1136/thx.2003.019588

GIROL, A.P.; MIMURA, K.K.; DREWES, C.C.; et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol.** 2013;190(11):5689-5701. doi:10.4049/jimmunol.1202030

HAN, P.F., Che, X.D., Li, H.Z., Gao, Y.Y., Wei, X.C., Li, P.C. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. **Chin J Traumatol.** 2020;23(2):96-101. doi:10.1016/j.cjtee.2020.02.002

KANG, H.; KO, J.; JANG, S.W. The role of annexin A1 in expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2012;423(1):188-194. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.114

KLENIEWSKA, A.; WALUSIAK-SKORUPA, J.; PIOTROWSKI, W.; NOWAKOWSKA-ŚWIRTA, E.; WISZNIEWSKA, M. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **J Occup Health.** 2016;58(4):333-339. doi:10.1539/joh.15-0317-BR

KLENIEWSKA, A.; WALUSIAK-SKORUPA, J.; PIOTROWSKI, W.; NOWAKOWSKA-ŚWIRTA, E.; WISZNIEWSKA, M. Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **J Occup Health.** 2016;58(4):333-339. doi:10.1539/joh.15-0317-BR

KOZMA, R.L.; ALVES, E.M.; BARBOSA-DE-OLIVEIRA, V.A.; et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. **J Bras Pneumol.** 2014;40(1):46-54. doi:10.1590/S1806-37132014000100007

KUBYSHEVA, N., BOLDINA, M., ELISEEVA, T., et al. Relationship of Serum Levels of IL-17, IL-18, TNF- α , and Lung Function Parameters in Patients with COPD, Asthma-COPD Overlap, and Bronchial Asthma. **Mediators Inflamm.** 2020;2020:4652898. Published 2020 Jul 12. doi:10.1155/2020/4652898

LIAO, W.I., WU, S.Y., WU, G.C., et al. Ac2-26, an Annexin A1 Peptide, Attenuates Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Lung Injury [published correction appears in *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):]. **Int J Mol Sci.** 2017;18(8):1771.. doi:10.3390/ijms18081771

LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J.** 2007;21(4):968-975. doi:10.1096/fj.06-7464rev

OLIANI, S.M.; CIOCCA, G.A.; PIMENTEL, T.A.; et al. Fluctuation of annexin-A1 positive mast cells in chronic granulomatous inflammation. **Inflamm Res.** 2008;57(10):450-456. doi:10.1007/s00011-008-7222-7

OLIANI, S.M.; PAUL-CLARK, M.J.; CHRISTIAN, H.C.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Neutrophil interaction with inflamed postcapillary venule endothelium alters annexin 1 expression. **Am J Pathol.** 2001;158(2):603-615. doi:10.1016/S0002-9440(10)64002-3

Pan American Health Organization and World Health Organization: concerns regarding tobacco use. *Int Q Community Health Educ*, v. 33, n. 2, p. 225-7, 2012-2013 2012. ISSN 0272-684X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666165>>

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.** 2009;9(1):62-70. doi:10.1038/nri2470

POSSEBON, L.; COSTA, S.S.; SOUZA, H.R.; et al. Mimetic peptide AC2-26 of annexin A1 as a potential therapeutic agent to treat COPD. **Int Immunopharmacol.** 2018a; 63:270-281. doi:10.1016/j.intimp.2018.08.011

POSSEBON, L.; DE SOUZA LIMA LEBRON, I.; FURLAN DA SILVA, L.; et al. Anti-inflammatory actions of herbal medicines in a model of chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke. **Biomed Pharmacother.** 2018b; 99:591-597. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.106

QIU, F., LIANG, C.L., LIU, H., et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down?. **x** 2017;8(1):268-284. doi:10.18632/oncotarget.13613

RABE, K.F.; HURD, S.; ANZUETO, A.; et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med.** 2007;176(6):532-555. doi:10.1164/rccm.200703-456SO

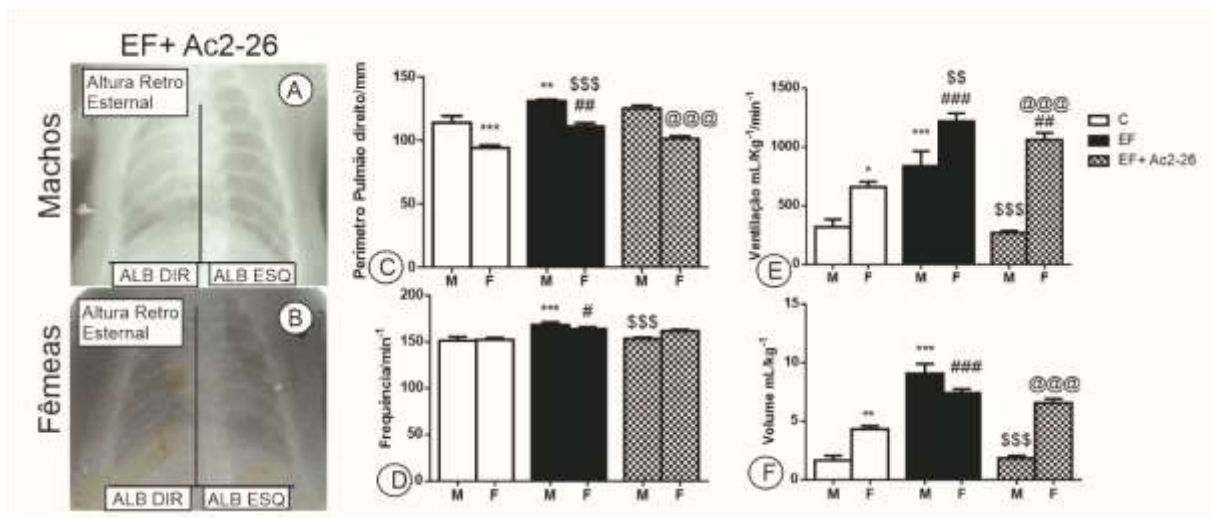
RAMÍREZ-RAMÍREZ, E.; TORRES-RAMÍREZ, A.; ALQUICIRA-MIRELES, J.; et al. Characteristic plethysmographic findings in a guinea pig model of COPD. **Exp Lung Res.** 2017;43(2):57-65. doi:10.1080/01902148.2017.1294632

SANT'ANA, M.; SOUZA, H.R.; POSSEBON, L.; et al. Effect of piperlongumine during exposure to cigarette smoke reduces inflammation and lung injury. **Pulm Pharmacol Ther.** 2020;61:101896. doi:10.1016/j.pupt.2020.101896

SARIR, H.; HENRICKS, P.A.; VAN HOUWELINGEN, A.H.; et al. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. **Eur J Pharmacol.** 2008;585(2-3):346-353. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.009

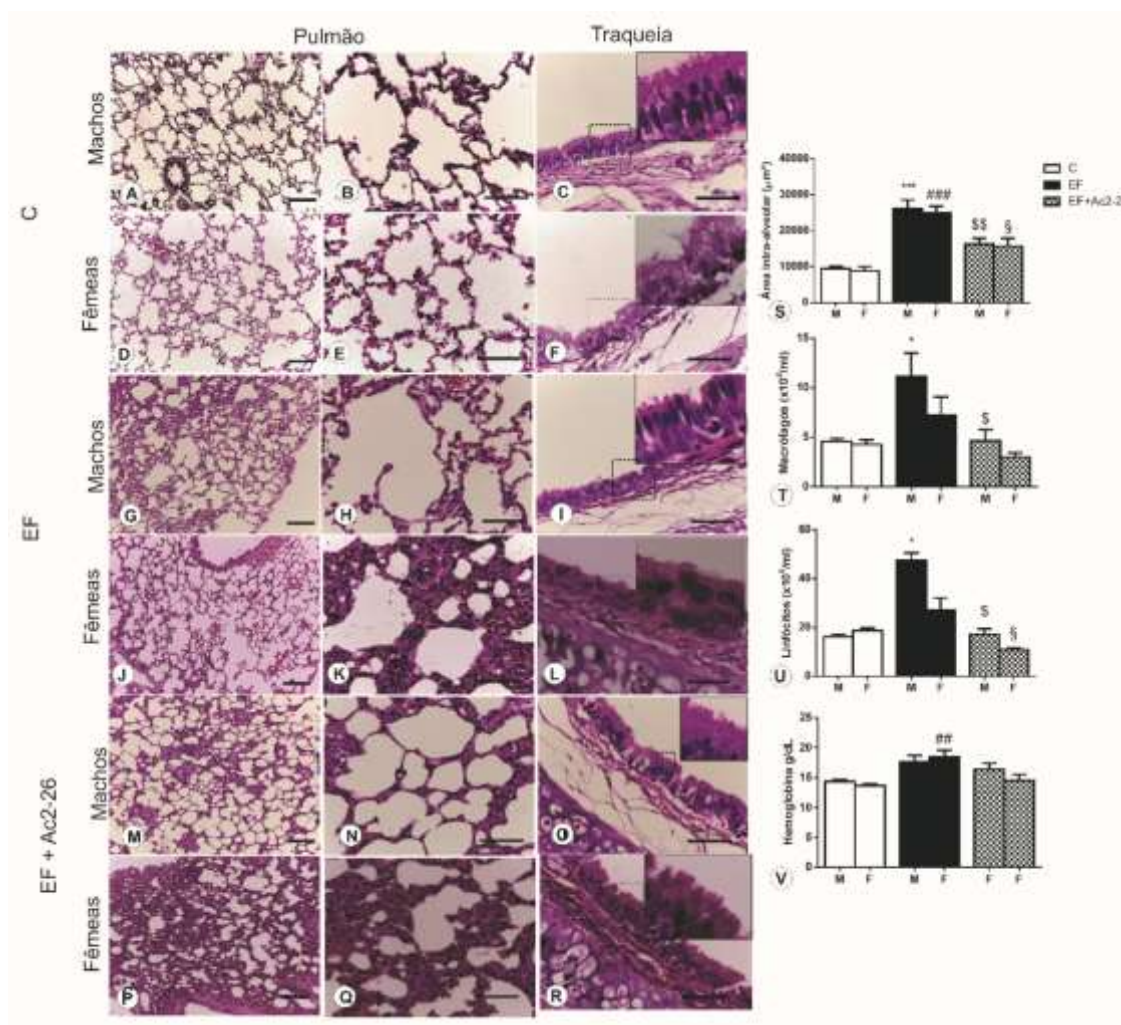
- SILVA, B.S.A.; LIRA, F.S.; RAMOS, D.; et al. Severity of COPD and its relationship with IL-10. **Cytokine**. 2018;106:95-100. doi:10.1016/j.cyto.2017.10.018
- SHAH, P.L., HERTH, F.J., VAN GEFFEN, W.H., DESLEE, G., SLEBOS, D.J. Lung volume reduction for emphysema **Lancet Respir Med**. 2017;5(2):147-156. doi:10.1016/S2213-2600(16)30221-1
- SOUZA, H.R.; DE AZEVEDO, L.R.; POSSEBON, L.; et al. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. **PLoS One**. 2017;12(3):e0173417. Published 2017 Mar 9. doi:10.1371/journal.pone.0173417
- SNG, J.J., PRAZAKOVA, S., THOMAS, P.S., HERBERT, C. MMP-8, MMP-9 and Neutrophil Elastase in Peripheral Blood and Exhaled Breath Condensate in COPD. **COPD**. 2017;14(2):238-244. doi:10.1080/15412555.2016.1249790
- STUART, B.J., VIERA, A.J. Polycythemia vera. **Am Fam Physician**. 2004;69(9):2139-2144.
- TERAMOTO, S. 1. COPD pathogenesis from the viewpoint of risk factors. **Intern Med**. 2007;46(2):77-79. doi:10.2169/internalmedicine.46.1775.
- TRENTIN, P.G.; FERREIRA, T.P.; ARANTES, A.C.; et al. Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice. **Br J Pharmacol**. 2015;172(12):3058-3071. doi:10.1111/bph.13109
- VENEGAS, J.G.; WINKLER, T.; MUSCH, G.; et al. Self-organized patchiness in asthma as a prelude to catastrophic shifts. **Nature**. 2005;434(7034):777-782. doi:10.1038/nature03490
- WANG, Y.; XU, J.; MENG, Y.; ADCOCK, I.M.; YAO, X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2018;13:3341-3348. Published 2018 Oct 12. doi:10.2147/COPD.S176122
- WANG, Y.; XU, J.; MENG, Y.; ADCOCK, I.M.; YAO, X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2018;13:3341-3348. Published 2018 Oct 12. doi:10.2147/COPD.S176122
- XU, L.; CHEN, Y.; XIE, Z.; et al. High hemoglobin is associated with increased in-hospital death in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic kidney disease: a retrospective multicenter population-based study. **BMC Pulm Med**. 2019;19(1):174. doi:10.1186/s12890-019-0933-4
- ZHANG, L.; CHENG, Z.; LIU, W.; WU, K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. **COPD**. 2013;10(4):459-465. doi:10.3109/15412555.2013.770456
- ZHANG, Z.; WANG, J.; LIU, F.; et al. Non-inflammatory emphysema induced by NO₂ chronic exposure and intervention with demethylation 5-Azacytidine. **Life Sci**. 2019;221:121-129. doi:10.1016/j.lfs.2019.02.022

Figura 1 – Análises fisiológicas e radiográficas do pulmão – Nesses dados foram avaliadas as regiões do tórax, comparando o pulmão entre os grupos controles, expostos ao fumo e expostos ao fumo tratado (A e B). Medida de 18cmx24cm. Variáveis: altura retroesternal pulmonary e perímetro pulmonar direito: do início ao fim do pulmão direito (C); **Análises fisiológicas de pletismografia** - Avaliação da frequência pulmonar por minutos (D); capacidade de ventilação pulmonar por minuto (E) e capacidade do volume de ar inspirado em mL por minutos (F), Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=7), * p<0,05; ** p<0,01 e ***p< 0,001 vs C machos; # p<0,05; ## p<0,01 e ### p< 0,001 vs C fêmeas; \$\$ p<0,01 e \$\$\$ p< 0,001 vs EF machos e @@@ p<0,001 vs EF+Ac2-26 machos.



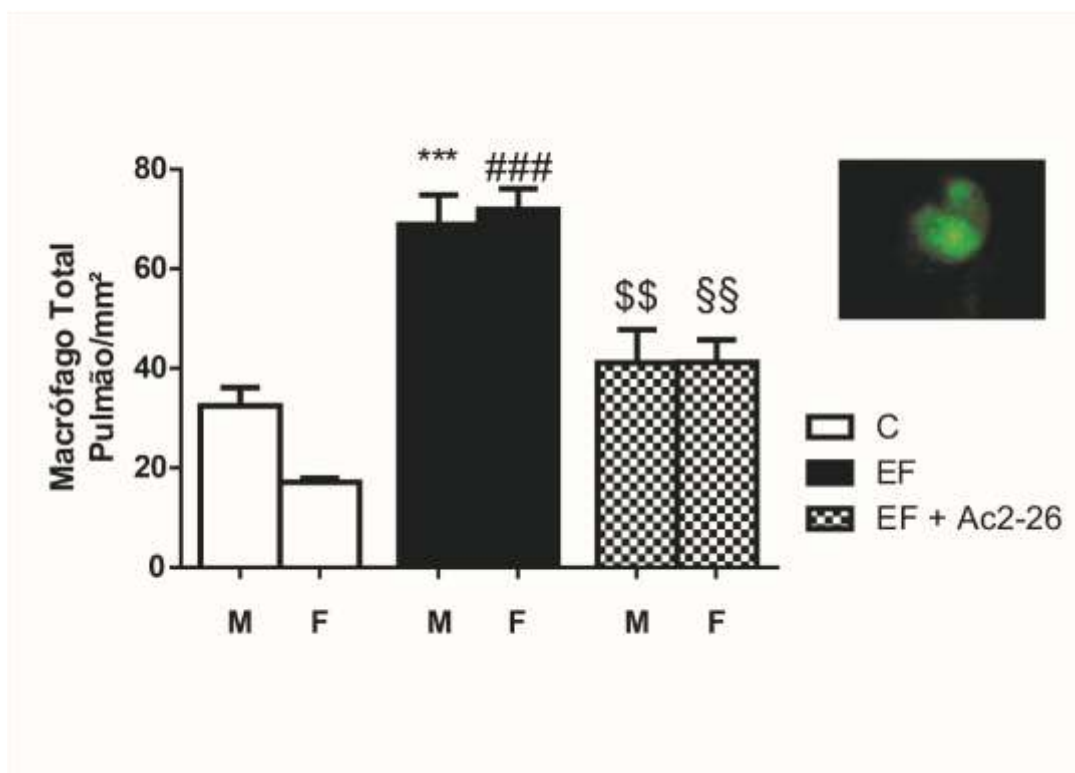
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2 – Análise histopatológica do pulmão – Grupos controles com aspecto normal do pulmão (A, B, D, E e S), grupos expostos ao fumo sem tratamento (G, H, J, K e S) com aumento dos espaços intra-alveolares e grupos expostos ao fumo tratado com o peptídeo Ac2-26 (M, N, P, Q e S). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 10 μ m. **Análise histopatológica da traqueia** – Controles (C e F), grupo exposto ao fumo sem tratamento com alteração no tecido e perda dos cílios (I e L) e grupo tratado com o peptídeo mimético Ac2-26 (O e R), com preservação do tecido epitelial. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barras: 10 μ m. **Análise quantitativa do lavado bronco alveolar** – Quantificação de macrófagos (T) e linfócitos (U), em câmara de Neubauer. Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=7). **Análise bioquímicas do sangue** – A dosagem de hemoglobina (V) foi realizada no sangue total por g/dl nos grupos controle, exposto ao fumo e exposto ao fumo tratado. Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=7/grupo). * p<0,05 e *** p<0,001 vs C machos; ## p<0,01 e ### p<0,001 vs C fêmeas; \$ p<0,05 e \$\$ p<0,01 vs EF machos; § p<0,05; vs EF fêmeas.



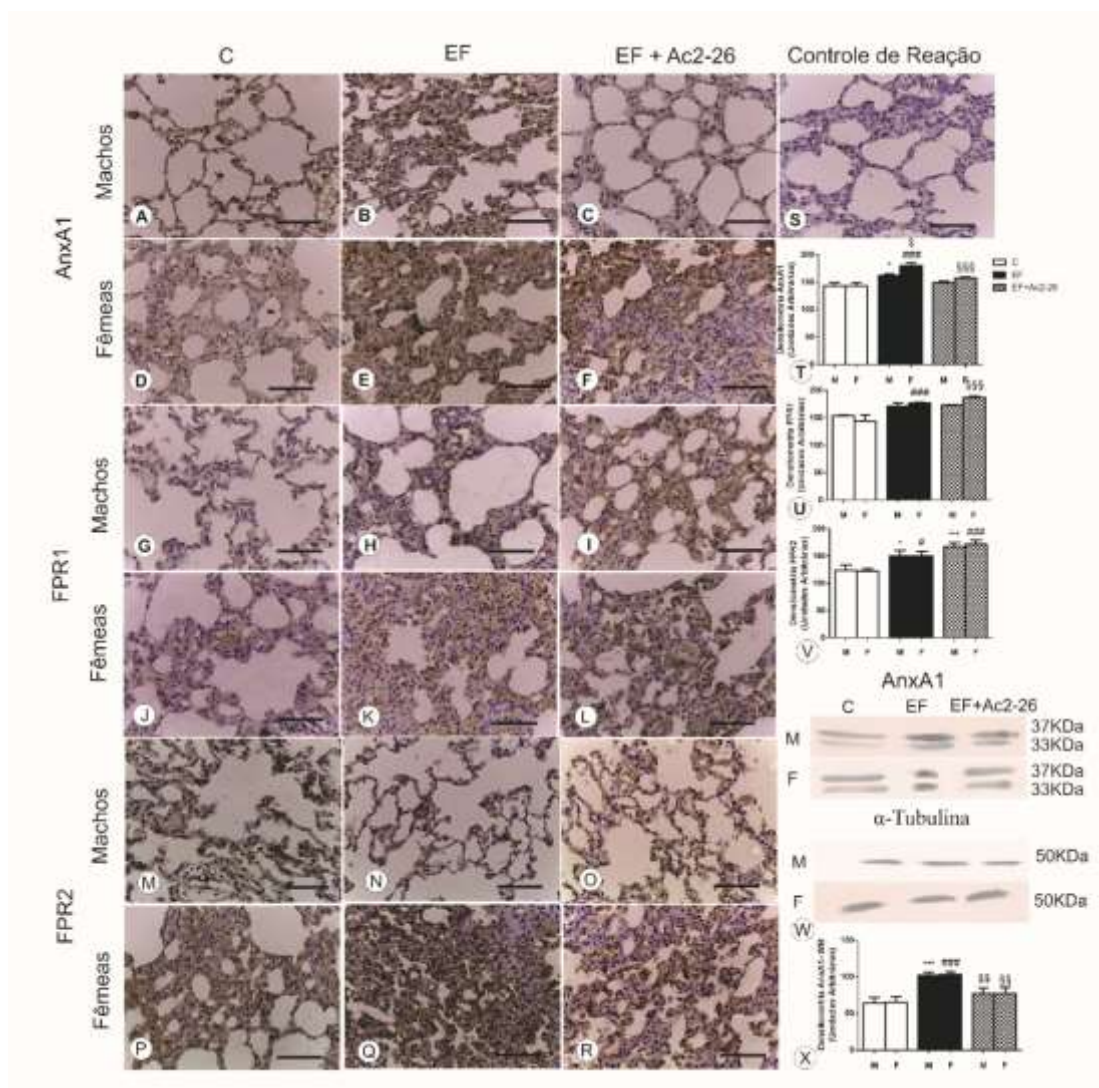
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 – Imunofluorescência de macrófagos no pulmão em machos e fêmeas – Poucos macrófagos nos grupos controles e aumento dessas células nos animais expostos à fumaça do cigarro e redução após tratamento com o peptídeo. Barras 10 μ m. Resultados apresentados como média \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs C macho; ### $p < 0,001$ vs C fêmea; §§ $p < 0,01$ vs EF fêmeas; \$\$ $p < 0,01$ vs EF Machos.



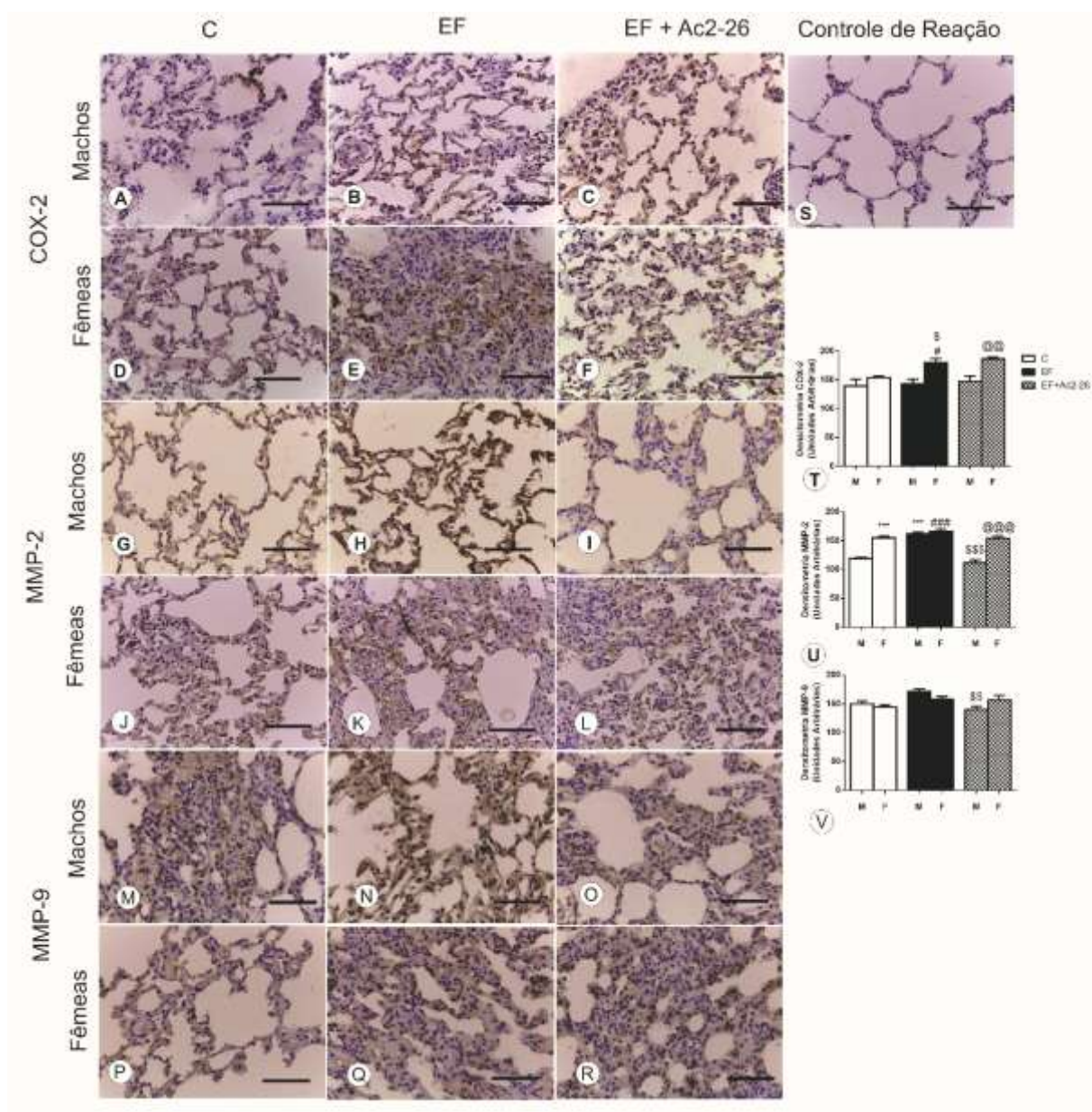
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 – Expressão das proteínas AnxA1, FPR1 e FPR2 no pulmão de machos e fêmeas – Menor expressão das proteínas nos grupos controles (A, D, G, J, M e P), aumento da imunomarcação no grupo exposto ao fumo sem tratamento (B, E, H, K, N e Q) e redução na expressão da AnxA1, FPR1 e FPR2 após tratamento com o peptídeo Ac2-26 (C, F, I, L, O e R). Ausência de marcação no controle de reação (S). Contra-coloração: Hematoxilina. Barras 10 µm. Análises Densitométricas: Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=7/grupo) (T, U e V). *p<0,05; *** p<0,001 vs C Macho; # p<0,05; ### p<0,001 vs C Fêmea; \$ p<0,05 vs EF machos; §§§ p<0,001 vs EF fêmeas. Análise de AnxA1 e α-tubulina em Western blotting: menor marcação nos grupos controles e tratados, com aumento da expressão nos grupos expostos à fumaça sem tratamento (W). Análises Densitométricas: Resultados apresentados como média ± S.E.M. (n=7/grupo) (X). *** p< 0,001 vs C machos; ### p<0,001 vs C fêmeas; \$\$ p<0,01 vs EF machos; §§ p<0,01 vs EF fêmeas.



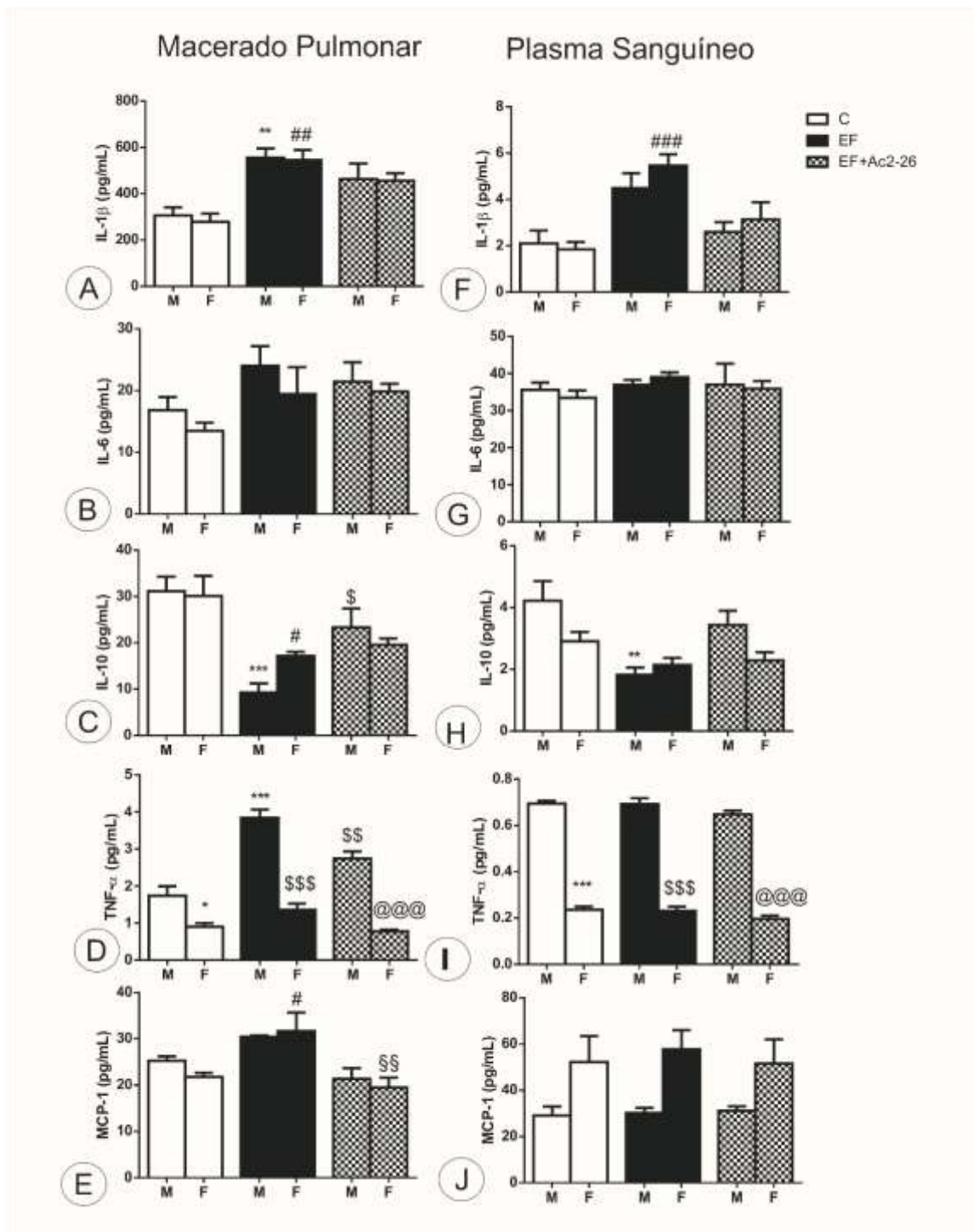
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 – Expressão das proteínas COX-2, MMP-2 e MMP-9 no pulmão de machos e fêmeas – Menor expressão das proteínas nos grupos controles (A, D, G, J, M e P), aumento da imunomarcação no grupo exposto ao fumo sem tratamento (B, E, H, K, N e Q) e redução na expressão da COX-2, MMP-2 e MMP-9 após tratamento com o peptídeo Ac2-26 (C, F, I, L, O e R). Ausência de marcação no controle de reação (S). Contra-colora o: Hematoxilina. Barras 10  m. Análises Densitométricas: Resultados apresentados como média   S.E.M. (n=7/grupo) (T, U e V). *** p< 0,001 vs C macho; # p<0,05; ### p<0,001 vs C fêmeas; \$ p<0,05; \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001 vs EF machos; @@ p<0,01; @@@ p<0,001 vs EF+Ac2-26 machos.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 - Dosagem de citocinas no macerado do pulmão e plasma sanguíneo em machos e fêmeas - IL-1 β (A e F); IL-6 (B e G); IL-10 (C e H); TNF- α (D e I) e MCP-1 (E e J). Resultados apresentados como média \pm S.E.M. (n=7/grupo). * p<0,05; ** p< 0,01; * p< 0,001 vs C machos # p<0,05; ## p<0,01 ### p<0,001 vs C Fêmeas; \$ p<0,05; \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001 vs EF machos; §§ p<0,01 vs EF fêmeas; @@@ p<0,001 vs EF+Ac2-26.**



Fonte: Elaborado pelo autor

5. CONCLUSÃO

As análises de padronização do extrato mostram presença de tanino, glicosídeos flavanoídeos e alcaloides e ausência de glicosídeos saponínicos.

Em concentrações baixas o extrato não apresenta toxicidade e em concentrações mais altas inibe os microorganismos *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella*.

Os resultados obtidos, no modelo de DPOC, permitem concluir que a administração do peptídeo mimético Ac2-26 da Anexina A1 e o extrato de folhas da *G. brasiliensis*:

1. mantem os perfis fisiológicos e radiográficos e níveis de hemoglobina semelhantes aos controles;
2. promove a melhora do processo inflamatório pela redução de linfócitos e macrófagos no LBA, e dos macrófagos nos pulmões, com preservação tecidual das vias respiratórias.
3. o peptídeo reduz a expressão endógena de AnxA1, MMP-2 e MMP-9 no pulmão e aumenta a expressão de FPR-1 e FPR-2. Enquanto o extrato reduz as expressões de AnxA1 e MMP-2.
4. ambos os tratamentos inibem a liberação dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , TNF- α e MCP-1 e estimulam a produção de IL-10 no plasma e sobrenadante do macerado pulmonar.
5. nas fêmeas, as alterações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas provocadas pela exposição à fumaça do cigarro são mais acentuadas, bem como, a atenuação desses parâmetros oferecida pelos tratamentos é menor.

No conjunto dos dados, foi possível observar que o peptídeo mimético Ac2-26 da Anexina A1 e o extrato de folhas de *G. brasiliensis* foram eficazes na reversão do processo inflamatório causado pela exposição à fumaça do cigarro, com possibilidades terapêuticas futuras nas doenças pulmonares provocadas pela fumaça do cigarro.

REFERÊNCIAS

AMPOFO, S.A.; WATERMAN, P.G. Xanthenes and neoflavonoids from two asian species of calophyllum. **Phytochemistry**. Vol 25: 2617-2020 p. 1986.

ARYAL, S.; DIAZ-GUZMAN, E.; MANNINO, D.M. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease risk and treatment outcomes. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2014;9:1145-1154. Published 2014 Oct 14. doi:10.2147/COPD.S54476

ASSIS, D.M.; GONTIJO, V.S.; DE OLIVEIRA PEREIRA, I.; et al. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **J Enzyme Inhib Med Chem**. 2013;28(4):661-670. doi:10.3109/14756366.2012.668539

BOTTA, B. et al. Chemical investigation of the genus rheedia, v. Biflavonoids and xanthochymol. **Communication Brief Reports**: 1053 p. 1984.

BOZINOVSKI, S.; ANTHONY, D.; VLAHOS, R.; Targeting pro-resolution pathways to combat chronic inflammation in COPD. **J Thorac Dis**. 2014;6(11):1548-1556. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.08

CARAMORI, G; ADCOCK, I.M.; DI STEFANO, A.; et al. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2014;9:397-412. doi:10.2147/COPD.S42544

CASTARDO, J.C.; PRUDENTE, A.S.; FERREIRA, J.; et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **J Ethnopharmacol**. 2008;118(3):405-411. doi:10.1016/j.jep.2008.05.002

COELHO, L.P.; SERRA, M.F.; PIRES, A.L.; et al. 7-Epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone, relaxes airway smooth muscle through activation of the nitric oxide-cGMP pathway. **J Pharmacol Exp Ther**. 2008;327(1):206-214. doi:10.1124/jpet.108.138032

CORMINBOEUF, O.; LEROY, X.; FPR2/ALXR agonists and the resolution of inflammation. **J Med Chem**. 2015;58(2):537-559. doi:10.1021/jm501051x

CORRÊA, R.S.; COELHO, C.P.; DOS SANTOS, M.H.; et al. Lupeol. **Acta Crystallogr C**. 2009;65(Pt 3):o97-o99. doi:10.1107/S0108270109004910

CRUZ, A.J.; LEMOS, V.S.; DOS SANTOS, M.H.; et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**. 2006;13(6):442-445. doi:10.1016/j.phymed.2005.01.014

DA CUNHA, E.E.; OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S. Effect of annexin-A1 peptide treatment during lung inflammation induced by lipopolysaccharide. **Pulm Pharmacol Ther.** 2012;25(4):303-311. doi:10.1016/j.pupt.2012.04.002

D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J.; Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **Br J Pharmacol.** 2008;155(2):152-169. doi:10.1038/bjp.2008.252

D'ACUNTO, C.W.; GBELCOVA, H.; FESTA, M.; et al. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cell Signal.** 2014;26(1):173-178. doi:10.1016/j.cellsig.2013.09.020

DAMAZO, A.S.; SAMPAIO, A.L.; NAKATA, C.M.; et al. Endogenous annexin A1 counter-regulates bleomycin-induced lung fibrosis. **BMC Immunol.** 2011;12:59. Published 2011 Oct 19. doi:10.1186/1471-2172-12-59

ESPIRITO SANTO, B.L.S.D., SANTANA, L.F., KATO JUNIOR, W.H., DE ARAÚJO, F.O., BOGO, D., FREITAS, K.C., GUIMARÃES, R.C.A., HIANE, P.A., POTT, A., FILIÚ, W.F.O., ARAKAKI ASATO, M., FIGUEIREDO, P.O., BASTOS, P.R.H.O. Medicinal Potential of *Garcinia* Species and Their Compounds. *Molecules.* 2020 Oct 1;25(19):4513. doi: 10.3390/molecules25194513. PMID: 33019745; PMCID: PMC7582350.

GENG, W.Y.; LIU, Z.B.; SONG, N.N.; et al. Effects of electroacupuncture at Zusanli (ST36) on inflammatory cytokines in a rat model of smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **J Integr Med.** 2013;11(3):213-219. doi:10.3736/jintegrmed2013024.

GIROL, A.P.; MIMURA, K.K.; DREWES, C.C.; et al. Anti-inflammatory mechanisms of the annexin A1 protein and its mimetic peptide Ac2-26 in models of ocular inflammation in vivo and in vitro. **J Immunol.** 2013;190(11):5689-5701. doi:10.4049/jimmunol.1202030

GOBBETTI, T.; COORAY, S.N. Annexin A1 and resolution of inflammation: tissue repairing properties and signalling signature. **Biol Chem.** 2016;397(10):981-993. doi:10.1515/hsz-2016-0200

GONTIJO, V.S.; JUDICE, W.A.; CODONHO, B.; et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **Eur J Med Chem.** 2012;58:613-623. doi:10.1016/j.ejmech.2012.06.021

GOPALAKRISHNAN, G.; BANUMATHI, B.; SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. **J Nat Prod.** 1997;60(5):519-524. doi:10.1021/np970165u

GREWAL, T.; WASON, S.J.; ENRICH, C.; RENTERO, C. Annexins - insights from knockout mice. **Biol Chem.** 2016;397(10):1031-1053. doi:10.1515/hsz-2016-0168

GUIDO, B.C.; ZANATELLI, M.; TAVARES-DE-LIMA, W.; OLIANI, S.M.; DAMAZO, A.S. Annexin-A1 peptide down-regulates the leukocyte recruitment and up-regulates interleukin-10 release into lung after intestinal ischemia-reperfusion in mice. **J Inflamm (Lond)**. 2013;10(1):10. Published 2013 Mar 13. doi:10.1186/1476-9255-10-10

HAN, P.F., Che, X.D., Li, H.Z., Gao, Y.Y., Wei, X.C., Li, P.C. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. **Chin J Traumatol**. 2020;23(2):96-101. doi:10.1016/j.cjtee.2020.02.002

HE, X.D.; WANG, Y.; WU, Q.; et al. Xuebijing Protects Rats from Sepsis Challenged with *Acinetobacter baumannii* by Promoting Annexin A1 Expression and Inhibiting Proinflammatory Cytokines Secretion. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013;2013:804940. doi:10.1155/2013/804940

KOZMA, R.L.; ALVES, E.M.; BARBOSA-DE-OLIVEIRA, V.A.; et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. **J Bras Pneumol**. 2014;40(1):46-54. doi:10.1590/S1806-37132014000100007

LIM, L.H.; PERVAIZ, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. **FASEB J**. 2007;21(4):968-975. doi:10.1096/fj.06-7464rev

LU, Q.Y.; JIN, Y.; MAO, J.T.; et al. Green tea inhibits cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells through the induction of Annexin-1. **Biochem Biophys Res Commun**. 2012;427(4):725-730. doi:10.1016/j.bbrc.2012.09.125

MARTINS, F.T.; DOS SANTOS, M.H.; COELHO, C.P.; et al. A powder X-ray diffraction method for detection of polyprenylated benzophenones in plant extracts associated with HPLC for quantitative analysis. **J Pharm Biomed Anal**. 2011;54(3):451-457. doi:10.1016/j.jpba.2010.09.010

MERCADER, A.G.; POMILIO, A.B. Naturally-occurring dimers of flavonoids as anticarcinogens. **Anticancer Agents Med Chem**. 2013;13(8):1217-1235. doi:10.2174/18715206113139990300

NEVES, J.S.; COELHO, L.P.; CORDEIRO, R.S.; et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. **Planta Med**. 2007;73(7):644-649. doi:10.1055/s-2007-981534

OTUKI, M.F.; BERNARDI, C.A.; PRUDENTE, A.S.; et al. *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-inflammatory alternative for cutaneous inflammation. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 2011;109(1):56-62. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00689.x

Pan American Health Organization and World Health Organization: concerns regarding tobacco use. *Int Q Community Health Educ*, v. 33, n. 2, p. 225-7, 2012-2013 2012. ISSN 0272-684X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666165>>

- PAN, M.H.; CHANG, W.L.; LIN-SHIAU, S.Y.; et al. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. **J Agric Food Chem.** 2001;49(3):1464-1474. doi:10.1021/jf001129v
- PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.** 2009;9(1):62-70. doi:10.1038/nri2470
- PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Annexin 1 and the biology of the neutrophil. **J Leukoc Biol.** 2004;76(1):25-29. doi:10.1189/jlb.1103552.
- POSSEBON, L.; COSTA, S.S.; SOUZA, H.R.; et al. Mimetic peptide AC2-26 of annexin A1 as a potential therapeutic agent to treat COPD. **Int Immunopharmacol.** 2018;63:270-281. doi:10.1016/j.intimp.2018.08.011
- PRABHAKAR, B.T.; KHANUM, S.A.; JAYASHREE, K.; et al. Anti-tumor and proapoptotic effect of novel synthetic benzophenone analogues in Ehrlich ascites tumor cells. **Bioorg Med Chem.** 2006;14(2):435-446. doi:10.1016/j.bmc.2005.08.039
- RABE, K.F.; HURD, S.; ANZUETO, A.; et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med.** 2007;176(6):532-555. doi:10.1164/rccm.200703-456SO
- RESCHER, U.; GERKE, V; Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. **J Cell Sci.** 2004;117(Pt 13):2631-2639. doi:10.1242/jcs.01245
- SANTA-CECÍLIA, F.V.; VILELA, F.C.; DA ROCHA, C.Q.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **J Ethnopharmacol.** 2011;133(2):467-473. doi:10.1016/j.jep.2010.09.036
- SARIR, H.; HENRICKS, P.A.; VAN HOUWELINGEN, A.H.; et al. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. **Eur J Pharmacol.** 2008;585(2-3):346-353. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.009
- SARONI ARWA, P.; ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F.; et al. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **J Ethnopharmacol.** 2015;174:410-418. doi:10.1016/j.jep.2015.08.041
- SEIDEL, S.; NEYMEYER, H.; KAHL, T.; et al. Annexin A1 modulates macula densa function by inhibiting cyclooxygenase 2. **Am J Physiol Renal Physiol.** 2012;303(6):F845-F854. doi:10.1152/ajprenal.00704.2011
- SOLITO, E.; CHRISTIAN, H.C.; FESTA, M.; et al. Post-translational modification plays an essential role in the translocation of annexin A1 from the cytoplasm to the cell surface. **FASEB J.** 2006;20(9):1498-1500. doi:10.1096/fj.05-5319fje

SOLITO, E.; KAMAL, A.; RUSSO-MARIE, F.; et al. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils. **FASEB J.** 2003;17(11):1544-1546. doi:10.1096/fj.02-0941fje

STRZELAK, A.; RATAJCZAK, A.; ADAMIEC, A.; FELESZKO, W. Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. **Int J Environ Res Public Health.** 2018;15(5):1033. Published 2018 May 21. doi:10.3390/ijerph15051033.

WANG, Y.; XU, J.; MENG, Y.; ADCOCK, I.M.; YAO, X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.** 2018;13:3341-3348. Published 2018 Oct 12. doi:10.2147/COPD.S176122



WRIGHT, J.L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2008;295(1):L1-L15. doi:10.1152/ajplung.90200.2008

YAMAGUCHI, F.; ARIGA, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **J Agric Food Chem.** 2000;48(2):180-185. doi:10.1021/jf990845y

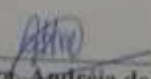
ZHENG, H.; LIU, Y.; HUANG, T.; et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke. **Toxicol Lett.** 2009;189(3):225-234. doi:10.1016/j.toxlet.2009.06.850.

ZHOU, S.; WRIGHT, J.L.; LIU, J.; et al. Aging does not enhance experimental cigarette smoke-induced COPD in the mouse. **PLoS One.** 2013;8(8):e71410. doi:10.1371/journal.pone.0071410

ANEXO A – Aprovação da CEUA

	Faculdades Integradas Padre Albino - FIPA Comissão de Ética para o Uso de Animais	
CERTIFICADO		
Nº 06/17		
<p>Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da administração da proteína Anexina A1 e do extrato da <i>Garcinia brasiliensis</i> em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica induzida por exposição à fumaça de cigarro”, registrada com o Número 06/17, sob a responsabilidade de Profa Dra Ana Paula Girol – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) das Faculdades Integradas Padre Albino – FIPA, em reunião de 29/09/2017.</p>		
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	06/03/2017 a 05/03/2021	
Espécie/ Linhagem/ Raça	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i>	
Nº de animais	28 machos e 28 fêmeas	
Peso/Idade	150g	
Sexo	Machos e Fêmeas	
Origem	Biotério UDPE	

Catanduva (SP), 29 de Setembro de 2017.


Prof. Dra. Andréia de Haro Moreno
Coordenadora da CEUA-FIPA

CEUA – FIPA
Rua dos Estudantes, 225 – Catanduva – SP – CEP: 15.809-144
Fone: (17) 3311-3229 – 3311-3540 – e-mail: ceua@fipa.com.br

ANEXO B – Aprovação da CEUA



CENTRO UNIVERSITÁRIO PADRE ALBINO
MANTIDO PELA FUNDAÇÃO PADRE ALBINO
Rua dos Estudantes, 225 - CEP 15809-144 - Catanduva-SP
www.unifipa.com.br



CERTIFICADO

Nº 06/18

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da atividade biológica dos extratos bioativos naturais em modelos experimentais”, registrada com o Número 06/18, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ana Paula Girol – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Centro Universitário Padre Albino – UNIFIPA, em reunião de 25/06/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/07/2018 a 15/07/2020
Espécie/ Linhagem/ Raça	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i> <i>Mus musculus/ BalbC</i> <i>Gallus gallus</i>
Nº de animais	40/40/40
Peso/Idade	250g/ 25g
Sexo	Machos
Origem	Biotério UNIFIPA

Catanduva (SP), 25 de junho de 2018.


Profa. Dra. Andréia de Haro Moreno
Coordenadora da CEUA-UNIFIPA

CEUA – UNIFIPA
Fone: (17) 3311-3340 – e-mail: ceua@unifipa.com.br

ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Standardization of extract leaves of <i>Garcinia brasiliensis</i> in phytochemical and cytotoxic assays, effects of administration in model of endotoxin-induced peritonitis	Feb 09, 2021	Feb 09, 2021	Submitted to Journal

Journal of Herbal Medicine

Standardization of extract leaves of *Garcinia brasiliensis* in phytochemical and cytotoxic assays, effects of administration in model of endotoxin-induced peritonitis --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research paper
Keywords:	phytochemical; cytotoxic; peritonitis; <i>G. brasiliensis</i> ; inflammation; AnxA1
Corresponding Author:	Ana Paula Paula Girol, Ph.D University Center Padre Albino (UNIFIPA) Catanduva, BRAZIL
First Author:	Lucas Possebon
Order of Authors:	Lucas Possebon Jéssica Messias Da Silva Ariane Harume Yoshikawa Sara de Souza Costa Melina Mizusaki Tomasa-Pilon Helena Ribeiro Souza Ana Paula Paula Girol, Ph.D
Abstract:	<p><i>Garcinia brasiliensis</i> is used in traditional Brazilian medicine to treat tumors, inflammations and pain. In this study, we standardize and evaluate the anti-inflammatory properties. The 20% ethanolic extract was obtained from the leaves of <i>Garcinia brasiliensis</i>. After being diluted in water in different concentrations, we performed a chromatographic profile (HPTLC), microbiological studies, cytotoxic analysis by hemolysis and Chorioallantoic membrane assay (CAM). The anti-inflammatory potential was tested in the peritonitis model induced by a single intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 1mg / kg). The extract of <i>G. brasiliensis</i> 4% was administered by gavage (1mL) before and after 12h of the LPS. After 24h of the induction, blood, intraperitoneal lavage and small intestine were collected for quantitative analysis of neutrophils and mast cells, histamine levels and immunohistochemistry of the expression of the protein Annexin A1 (AnxA1). Phytochemical analyzes were positive for tannins, flavanoid and alkaloid glycosides and negative for saponin glycosides. The HPTLC indicated the presence of lupeol. The extract showed low cytotoxicity at concentrations of 4%, 6% and 8%, showed no CAM toxicity and inhibited <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Proteus</i>, <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i> in high concentrations. In the peritonitis model, treatment reduced the influx of neutrophils into the peritoneal cavity and mast cells in the intestinal lamina propria, but histamine levels showed no difference. In the intestinal mucosa of the treated animals, the expression of AnxA1 was decreased. Together, the results show that the alcoholic extract of <i>G. brasiliensis</i> has an anti-inflammatory action with potential for the development of herbal medicines.</p>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 05/03/2021

Assinatura do autor