
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**Avaliação do Efeito Antiinflamatório da Silimarina em Linhagens de
Camundongos Geneticamente Selecionados para a Máxima e Mínima Resposta
Inflamatória Aguda**

Vinícius Dael-Olio Cesarino

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, sob orientação do Prof. Dr. Sílvio Luis de Oliveira.

BOTUCATU – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**Avaliação do Efeito Antiinflamatório da Silimarina em Linhagens de
Camundongos Geneticamente Selecionados para a Máxima e Mínima Resposta
Inflamatória Aguda**

Víncius Dael-Olio Cesarino

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Luis de Oliveira

Co-Orientador: Helanderson de Almeida Balderramas

Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, sob orientação do Prof. Dr. Sílvio Luis de Oliveira.

BOTUCATU – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Cesarino, Vinícius Dael-Olio.

Avaliação do efeito antiinflamatório da silimarina em linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para a máxima e mínima resposta inflamatória aguda / Vinícius Dael-Olio Cesarino. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Sílvia Luis de Oliveira

Capes: 21103003

1. Camundongo. 2. Ervas – Uso terapêutico. 3. Fígado – Doenças - Inflamação.

Palavras-chave: Camundongos; Inflamação; Silimarina.

Resumo

RESUMO

A silimarina é um flavonóide polifenólico extraído de frutos e sementes de *Silybum marianum*, que possui efeitos antiinflamatórios, citoprotetores e anti-carcinogênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antiinflamatório desse flavonóide sobre linhagens geneticamente selecionadas para máxima e mínima resposta inflamatória aguda, a intensidade dessa resposta foi avaliada através dos seguintes parâmetros: contagem total e diferencial de células, concentração protéica do exsudato inflamatório e dosagem de H₂O₂ através de cultura de células do infiltrado. Para a avaliação do efeito da silimarina, as linhagens foram divididas em dois grupos, grupo AIRmax e grupo AIRmin, e cada um desses grupos foi subdividido em outros três grupos, de acordo com a forma de tratamento determinada (grupo controle, grupo tratado com silimarina 200mg/kg e grupo tratado com silimarina 100mg/kg). Os animais foram tratados durante seis dias consecutivos, recebendo um total de seis doses; ao final do tratamento os animais foram submetidos à indução flogógena pelo composto BIOGEL-P100 por via subcutânea, ao final de 24 horas o exsudato inflamatório foi retirado do dorso dos animais e preparados para análise. Os resultados demonstraram que a silimarina afetou significativamente alguns dos parâmetros avaliados. A contagem total de células mostrou redução significativa no número de células presentes no infiltrado do grupo AIRmax tratado com silimarina 100mg/kg em relação ao seu grupo controle; na contagem diferencial de células houve redução significativa no número de neutrófilos encontrados em amostras do exsudato dos animais AIRmax tratados com silimarina 100mg/kg, assumindo um padrão de resposta semelhante ao da contagem total; a concentração protéica mostrou redução significativa nos grupos AIRmax tratados com 100 e 200mg/kg em relação ao seu controle, indicando um possível efeito modulador da silimarina sobre esses aspectos.

Sumário

SUMÁRIO

1. Introdução.....	07
1.1 Inflamação Aguda.....	08
1.2 Linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para resposta inflamatória aguda máxima e mínima.....	17
1.3 Silimarina.....	19
2. Objetivo.....	22
3. Delineamento Experimental.....	24
4. Material e Métodos.....	26
4.1 Animais.....	27
4.2 Tratamento.....	27
4.3 Indução da resposta inflamatória aguda.....	27
4.4 Contagem total e diferencial de células.....	28
4.5 Concentração protéica.....	28
4.6 Dosagem de espécies reativas do oxigênio (H₂O₂).....	28
4.7 Análise estatística.....	29
5. Resultados.....	30
5.1 Contagem total de células.....	31
5.2 Contagem diferencial de células.....	31
5.3 Concentração Protéica.....	33
5.4 Dosagem de espécies reativas do oxigênio (H₂O₂).....	34
6. Discussão.....	35
7. Referências Bibliográficas.....	41

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação Aguda

A inflamação aguda é uma resposta do sistema imune de um organismo a uma injúria causada em seus tecidos vascularizados por agentes infecciosos como os vírus e bactérias, bem como por agentes químicos ou físicos. Apesar de dolorosa, a inflamação é normalmente uma resposta benéfica ao hospedeiro, ela serve para erradicar o estímulo nocivo matando o agente infeccioso e eliminando as células lesionadas. (POBER & SESSA, 2007; TSIROGIANNI *et al.*, 2006).

Para que isso ocorra uma série coordenada de eventos celulares e moleculares deve acontecer no local da injúria, visando a homeostase do organismo (LAWRENCE & GILROY, 2007).

A fase inicial da inflamação é um processo altamente regulado que depende do agente indutor. Os agentes indutores ou sinais iniciadores de uma resposta inflamatória podem ser exógenos ou endógenos. Os indutores exógenos podem ser classificados em dois grupos: microbianos e não-microbianos. O grupo de indutores microbianos compreende os fatores de virulência e os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que são reconhecidos pelos receptores do tipo Toll (TLR – *Toll like receptors*), enquanto o grupo não microbiano inclui alérgenos, irritantes, corpos estranhos e componentes tóxicos. Já os indutores endógenos da inflamação são sinais produzidos por tecidos ou células do próprio hospedeiro em estresse, danificados ou em mau funcionamento (RAKOFF-NAHOUM *et al.*, 2004; MARIATHASAN *et al.*, 2006; BIANCHI, 2007; DOSTERT *et al.*, 2008; MEDZHITOV, 2008; ROCK & KONO, 2008; SOKOL *et al.*, 2008; TURER *et al.*, 2008).

Basicamente a resposta inflamatória aguda provocada por infecção ou lesão tecidual envolve o extravasamento coordenado dos componentes sanguíneos (plasma e leucócitos) ao local da injúria. Invariavelmente, essa resposta é iniciada por mastócitos e macrófagos residentes, os quais através da degranulação e ativação atraem uma bateria de mediadores inflamatórios, como por exemplo as quimiocinas da família CXC e aminas vasoativas como a histamina, que atuam respectivamente no recrutamento de

neutrófilos e no aumento da permeabilidade vascular, viabilizando a formação do edema (RUDDY *et al.*, 2004; CHARO & RANSOHOFF 2006; Y QIU & J ZHU, 2007)

Os sinais clínicos da inflamação aguda foram descritos por Celsus 90 A.D em quatro sinais cardeais: 1º) Rubor, 2º) Calor, 3º) Tumor e 4º) Dor, e em 1785, Virchow adicionou um quinto sinal: 5º) Perda da função (LAWRENCE *et al.*, 2002; LIBBY, 2007).

Os mediadores podem ser derivados de proteínas plasmáticas ou secretados por células. Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos especializados (particularmente macrófagos teciduais e mastócitos) ou por células presentes nos tecidos locais. Alguns mediadores (como histamina e serotonina) são pré-formados e armazenados nos grânulos das células que os produzem. Outros são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma, como os zimogênios inativos da cascata de coagulação (KRUPICZOJC *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2008; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados em sete grupos: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (STREETZ *et al.*, 2001)

As aminas vasoativas, como a histamina e serotonina, são especialmente importantes pois são armazenadas nas células e estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação (STREETZ *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2003).

A histamina pré-formada está armazenada nos grânulos de mastócitos principalmente, mas também está presente nos basófilos e plaquetas. A histamina quando liberada, por degranulação, atua na vasculatura, causando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. A serotonina é um mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina, está presente nas plaquetas e é liberada quando ocorre agregação plaquetária (STREETZ *et al.*, 2001; RUDDY *et al.*, 2004)

Peptídeos vasoativos podem ser armazenados em vesículas secretórias, como a substância P, ou através do processamento proteolítico de precursores inativos. A substância P, assim como o CGRP (Calcitonin gene-related protein) são neuropeptídeos liberados pelos neurônios sensoriais diretamente na vasculatura, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além da ativação de mastócitos (KUMAR *et al.*, 2003; MAJNO & JORIS, 2004; MEDZHITOV, 2008).

O sistema das cininas gera peptídeos vasoativos por proteólise, as cininas são produzidas através da ativação da via intrínseca da cascata de coagulação, que por sua vez depende da ativação por contato do fator XII ou fator de Hagemann, que quando ativado converte a pré-caliceína em sua forma proteolítica, a enzima caliceína. Esta cliva um precursor glicoprotéico do plasma, o cininogênio de alto peso molecular, para produzir a bradicinina que aumenta a permeabilidade vascular e causa contração do músculo liso, dilatação de vasos sanguíneos e sensação de dor pelo seu efeito pró-algésico (STREETZ *et al.*, 2001; BURKE & DENNIS, 2009).

O sistema complemento é um importante sistema de vigilância dos mamíferos que compreende mais de trinta proteínas presentes no plasma (WALLPORT, 2001). Os componentes do sistema complemento reconhecem agentes indutores na forma de patógenos ou células alteradas do hospedeiro e iniciam uma cascata proteolítica produzindo fragmentos que induzem a resposta inflamatória aguda, lise celular, fagocitose e ativação de células B. Existem três maneiras principais de ativação do sistema complemento: 1ª) Via Clássica, através da presença de imunocomplexos (que são anticorpos das classes IgG e IgM ligados a antígenos específicos) e proteína C reativa. 2ª) Via das Lectinas, através da ligação de lectinas (proteínas que se ligam a açúcares) a padrões moleculares (como manose, N-acetil-glicosamina ou fucose) encontrados em grande quantidade na superfície de microrganismos. 3ª) Via Alternativa, através de um mecanismo de ativação espontânea pela hidrólise do componente C3 do complemento, que ocorre em condições fisiológicas (GROS *et al.*, 2008).

Os fragmentos do complemento C3a, C4a e C5a resultantes da ativação dessas três vias do sistema complemento, também conhecidos como anafilatoxinas, atuam como fatores quimiotáticos, ou seja, promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos, além de induzirem a degranulação de mastócitos no local da injúria (GROS *et al.*, 2008; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores lipídicos (eicosanóides e fator ativador de plaquetas) são derivados da clivagem dos fosfolipídeos das membranas plasmáticas pela enzima citosólica fosfolipase A2 (cPLA2) em ácido aracdônico (AA) e ácido lisofosfatídico (BURKE & DENNIS, 2009). Os metabólitos do ácido aracdônico, também chamados de eicosanóides, são sintetizados por duas classes principais de enzimas: as ciclooxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e as lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas). As prostaglandinas, como a PGE2 e a PGI2 (ou prostaciclina) atuam como

vasodilatadores e estão envolvidas na patogenia da dor e da febre na inflamação. A prostaciclina atua também como um potente inibidor da agregação plaquetária; também potencializa o aumento da permeabilidade e efeito quimiotático de outros mediadores. A tromboxano A₂ (TxA₂) é um potente agente de agregação plaquetária e vasoconstritor. Por outro lado as lipoxinas (protectinas e resolvinas) são inibidoras da inflamação, as principais ações das lipoxinas são a inibição do recrutamento leucocitário e dos componentes celulares da inflamação. Já os leucotrienos correspondem a uma família de compostos derivados do 5-HETE, produto da enzima 5-lipoxigenase (5-LO), presente predominantemente em neutrófilos, quimiotaxia e ativação da resposta dos neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular são suas principais funções (LANTZ *et al.*, 2007; SCHWAB, 2006; CHENG, 2006; MASOODI *et al.*, 2008).

A segunda classe de mediadores lipídicos compreende o fator ativador de plaquetas (PAF – Platelet-activating factor) que é gerado pela acetilação do ácido lisofosfatídico. Vários tipos celulares, incluindo plaquetas, basófilos (e mastócitos), neutrófilos, monócitos/macrófagos e células endoteliais, podem produzir PAF. Além da estimulação das plaquetas, o PAF causa vasoconstricção e broncoconstricção e, em doses extremamente baixas, estimula a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Ele também causa um aumento da adesão leucocitária ao endotélio (aumentando a ligação dos leucócitos mediada pelas integrinas), quimiotaxia, desgranulação e surto oxidativo (SCHWAB, 2006)

As citocinas inflamatórias são produzidas por vários tipos celulares mas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados. Elas exercem diversas funções na resposta inflamatória e atuam em um grande número de células (MASOODI *et al.*, 2008).

As principais citocinas que participam da resposta inflamatória são o TNF-alfa e a IL-1, produzidas principalmente por macrófagos ativados. A secreção de TNF-alfa e IL-1 pode ser estimulada por endotoxina e outros produtos microbianos, complexos imunes, lesão física e vários tipos de estímulos inflamatórios. Suas ações mais importantes na inflamação são seus efeitos no endotélio, nos leucócitos e fibroblastos, e a indução de reações sistêmicas de fase aguda. No endotélio eles possuem ações variadas como indução do aumento da síntese de moléculas de adesão endotelial promovendo aumento da adesão leucocitária, aumento na síntese de prostaglandina entre outros. Atuam nos fibroblastos promovendo sua proliferação e aumento na síntese de colágeno e enzimas e também nos leucócitos ativando-os e aumentando a secreção

de mais citocinas (SAWAKI, 2007; SCHMAIER, 2008; WALLPORT, 2001; MASOODI *et al.*, 2008),

As quimiocinas são classificadas em quatro grupos principais, de acordo com a localização do resíduo conservado de cisteína nas proteínas maduras. Dependendo do arranjo aminoterminal dos resíduos conservados de cisteína(C) e de outros resíduos de aminoácidos (X) são classificadas em grupos CC, CXC, C e CX3C. As quimiocinas de forma geral agem primariamente como quimiotáticos para tipos específicos de leucócitos promovendo uma migração seletiva dessas células nos órgãos linfóides e tecidos inflamados (RUDDY *et al.*, 2004; QIU & JHU, 2007).

As quimiocinas CC, como a proteína de quimioatração do monócito-1 (MCP-1) e a eotaxina, geralmente atraem monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, mas não neutrófilos. As quimiocinas do grupo CXC atuam primariamente nos neutrófilos, causando ativação e quimiotaxia. O grupo C contém quimiocinas relativamente específicas para linfócitos e o grupo CX3C têm sua ação em células T e monócitos, promovendo forte adesão entre eles e recrutamento de mais células (CHENG, 2006; RAMESH & REEVES, 2002; COMEFORD, 2007).

As enzimas proteolíticas (elastase, catepsinas, metaloproteases de matriz) possuem diversos papéis na inflamação, podendo degradar a matriz extracelular e proteínas da membrana basal (PARKS *et al.*, 2004; MEDZHITOV, 2008).

A sequência de eventos que caracterizam uma resposta inflamatória, infecciosa ou não, começam imediatamente após a injúria, com a ativação da cascata de coagulação e início da fase inflamatória (MOORE *et al.*, 1999). Diante de uma injúria tecidual pode ocorrer o rompimento dos vasos sanguíneos com conseqüente extravasamento de sangue para o ambiente tecidual. Nesse contexto a via do ácido araquidônico é ativada gerando TXA2 e PGI2 que irão atuar na musculatura lisa das arteríolas produzindo vasoconstrição e vasodilatação respectivamente, com a finalidade de auxiliar o fluxo sanguíneo na microcirculação da região. O efeito de vasoconstrição é rápido e o que prevalece é a vasodilatação (PARKS *et al.*, 2004; MEDZHITOV, 2008).

Concomitantemente há ativação das plaquetas e da cascata de coagulação sanguínea que irão tentar reparar o dano formando agregados de plaquetas e fibrinas, respectivamente. Plaquetas ativadas nesse microambiente produzem mediadores inflamatórios como histamina e serotonina e fatores que visam a reconstituição do tecido vascular lesionado, como os fatores de crescimento PDGF (Platelet-derived growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) e TGF-beta (Transforming

growth factor beta), que também atuam como ativadores de macrófagos e fibroblastos (BRUKNER, 2004; CROSS *et al.*, 2004). O sistema de fibrinas por sua vez sob ação do sistema fibrinolítico e das cininas acaba resultando, respectivamente, na produção de peptídeos quimiotáticos derivados da degradação da fibrina e na ativação do sistema complemento, com produção de mais fatores quimiotáticos como as anafilotoxinas (WALLPORT, 2001; CROSS *et al.*, 2004).

A vasodilatação é rapidamente seguida de um aumento na permeabilidade da microcirculação, com o extravasamento de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o tecido extravascular (POBER & SESSA, 2007).

A histamina também provoca o aumento da permeabilidade agindo em receptores específicos que fazem a abertura das junções pela contração das fibras de actina e miosina presentes no citoplasma, esse processo permite o extravasamento de proteínas do plasma sanguíneo para o local da injúria. Além disso, a histamina também age na vasodilatação (POBER & SESSA, 2007).

Nesse momento da resposta inflamatória aguda, a maioria dos mediadores está focada no controle do fluxo sanguíneo e da permeabilidade dos vasos próximos à região afetada, atuando diretamente no endotélio. Substâncias como a histamina, leucotrienos e neuropeptídeos por exemplo estão atuando diretamente sobre as células endoteliais. A ligação desses mediadores nas células endoteliais ativa vias de sinalização intracelular mediadas pela ligação a receptores heterotriméricos acoplados à proteína G, ou GPCRs (G-Protein-coupled receptor), que levam a fosforilação de proteínas contráteis e do citoesqueleto, como a miosina. Essas proteínas contraem-se, causando a contração das células endoteliais e a separação das junções intercelulares, resultando no aumento da permeabilidade endotelial (WALLPORT, 2001; CHENG, 2006).

A ligação dos mediadores com receptores específicos na superfície da célula endotelial é rápida e geralmente reversível, por isso é conhecida como resposta imediata transitória (MJ CROSS, 2004)

O aumento da permeabilidade faz com que haja uma concentração de hemácias nos vasos de menor calibre e aumento da viscosidade sanguínea, o que resulta em pequenos vasos dilatados repletos de hemácias e um fluxo sanguíneo mais lento, condição conhecida como estase (WOODFIN, 2007; LANTZ *et al.*, 2007).

Com a evolução da estase, leucócitos, especialmente os neutrófilos, se acumulam ao longo do endotélio vascular e aderem a ele para que em seguida possam migrar através da parede vascular para o interstício. Mas para chegarem ao tecido, os

leucócitos passam por um processo chamado cascata de adesão, cujas fases (rolamento, adesão e transmigração endotelial ou diapedese) ocorrem nas vênulas pós-capilares (Y CHENG, 2006; LANTZ *et al.*, 2007).

A migração dos leucócitos para o foco inflamatório através das células endoteliais é um dos eventos centrais da inflamação, não somente para que ocorra a eliminação do agente indutor, mas também a reconstrução do tecido injuriado pelo processo de cicatrização e regeneração tecidual (Y LIN, 1995; CARMAN, 2009).

Para iniciar o processo de migração dos leucócitos antes é necessário que haja a ativação do endotélio, de modo que esse passe a apresentar em sua superfície moléculas de adesão específicas para os leucócitos (Y LIN, 1995; CARMAN, 2009; HWANG *et al.*, 1997).

As moléculas de adesão envolvidas pertencem a quatro famílias moleculares, as selectinas, a família das imunoglobulinas, as integrinas e as glicoproteínas semelhantes à mucina. As selectinas compreendem a E-selectina, confinada ao endotélio; a P-selectina, presente no endotélio e nas plaquetas; e a L-selectina, que se expressa na maioria dos tipos de leucócito. A família das imunoglobulinas inclui duas moléculas de adesão, a ICAM-1 e VCAM-1, ambas servem de ligantes para as integrinas dos leucócitos. As integrinas são expressas em vários tipos de células e se ligam à ligantes nas células endoteliais, em outros leucócitos e na matriz extracelular. E por fim as glicoproteínas semelhantes à mucina que como o heparan sulfato, servem de ligantes para a molécula de adesão leucocitária chamada CD44 (HWANG *et al.*, 1997)

Nessa etapa diversos mediadores estão atuando na ativação do endotélio. Mediadores como a histamina, a trombina e o fator ativador de plaquetas (PAF) estimulam a redistribuição da P-selectina de seus grânulos de armazenamento intracelular (corpos de Weibel-Palade) para a superfície celular. Citocinas como o TNF e a IL-1, liberadas por macrófagos por exemplo, irão induzir a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. O TNF e a IL-1 induzem a expressão de selectinas, como a E-selectina, nas vênulas pós-capilares adjacentes à infecção, e também a liberação de IL-8 (ou CXCL8) pelas células endoteliais, resultando em um recrutamento de neutrófilos mais efetivo (KONGER *et al.*, 2010; WOODFIN, 2007; LISTER *et al.*, 2007).

Os leucócitos expressam carboidratos que se ligam as selectinas, porém essas interações são de baixa afinidade, com uma taxa de desligamento muito rápida, de forma que os leucócitos se desprendam e se liguem ao endotélio, o que caracteriza a

fase de rolamento (KONGER *et al.*, 2010; WOODFIN, 2007)

O TNF e a IL-1 também induzem a expressão endotelial de ligantes para as integrinas, principalmente VCAM-1 (ligante para integrina VLA-4) e ICAM-1 (ligante para as integrinas LFA-1 e Mac-1). Essas integrinas geralmente são expressas em um estado de baixa afinidade pelos leucócitos porém quimiocinas presentes no local da lesão, fazem com que haja elevada expressão de ligantes para integrinas na superfície das células endoteliais e ativam os leucócitos, resultando na conversão das integrinas VLA-4 e LFA-1 para um estado de alta afinidade. A combinação desses fatores resultam na firme ligação dos leucócitos ao endotélio, fazendo com que parem de rolar, essa etapa é chamada adesão (KONGER *et al.*, 2010; WOODFIN, 2007; Y LIN, 1995; CARMAN, 2009).

A próxima etapa no processo de migração dos leucócitos através do endotélio é chamada de transmigração ou diapedese, nesse momento quimiocinas, como a IL-8, agem nos leucócitos aderidos e estimulam as células a migrar através dos espaços endoteliais. Moléculas de adesão presentes nas junções intercelulares do endotélio, como a PECAM-1, também estão envolvidas na migração dos leucócitos (BEUTLER, 2004).

Após terem atravessado o endotélio os leucócitos são capazes de aderir a matriz extracelular através da ligação das integrinas beta e CD44 às proteínas da matriz, favorecendo a permanência dos leucócitos no local enquanto necessários (HWANG *et al.*, 1997; BRUKNER, 2004)

Uma vez presentes no local da injúria, os neutrófilos, são eficientes fagócitos que engolfam e degradam microrganismos e detritos celulares, através de compartimentos chamados fagolisossomos, que utilizam uma combinação de mecanismos oxidativos, através da geração de espécies reativa do oxigênio (ROS – Reactive oxygen species) e não oxidativos, através da fusão de seus grânulos contendo peptídeos e proteases (grânulos lisossomais) ao fagossomo (SERHAN *et al.*, 2008; PHAM, 2006), além da liberação do conteúdo destes grânulos por exocitose no local da inflamação (NATHAN, 2006).

Os grânulos lisossomais dos neutrófilos podem ser de dois tipos, grânulos específicos (ou secundários) e os grânulos azurofílicos (ou primários). Nos grânulos específicos, existem moléculas de adesão (CD11b/CD18), pentraxina 3, lisozima, lactoferrina, colagenase, leucolisina (MMP25), gelatinase (MMP9) entre outras classes de proteínas, os grânulos específicos são secretados no espaço extracelular mais

rapidamente e estimulados por concentrações menores de agonistas. Os grânulos azurofílicos, maiores e potencialmente mais destrutivos, sofrem uma limitada exocitose, podendo atuar em microrganismos extracelulares, na presença de mais antagonistas, entretanto, parecem contribuir principalmente na degradação intracelular de microrganismos presentes nos fagolisossomos. Possuem um grande conteúdo de mieloperoxidase (MPO), defensinas, BPI (Bactericidal permeability increasing protein), lisozimas e uma família estruturalmente relacionada com serino proteases (catepsina G, elastase e proteinase 3, entre outras classes de proteínas (PHAM, 2006; NATHAN, 2006; BORREGAARD *et al.*, 2007).

Portanto, os neutrófilos atuam na destruição tecidual, que apesar de aparentemente prejudicial, facilita a entrada de mais neutrófilos no local, permitindo o encontro dos neutrófilos com o agente infeccioso, possibilitando a fagocitose e o contato do agente infeccioso com o conteúdo de seus grânulos liberados por exocitose no tecido (PHAM, 2006).

No decorrer de todo esse processo e à medida que o agente indutor da inflamação é eliminado, os neutrófilos também geram sinais para reduzir o seu próprio acúmulo, promover a sua própria morte por apoptose, atrair monócitos que irão se diferenciar em macrófagos teciduais que irão atuar na eliminação das células mortas, encerrando o processo de dano tecidual para iniciar o de reparo (PHAM, 2006; SERHAN *et al.*, 2008).

As lipoxinas, derivadas dos neutrófilos, assim como as resolvinas e protectinas produzidas por macrófagos em resposta à ingestão de neutrófilos apoptóticos são os principais mediadores antiinflamatórios liberados nessa fase de reparo. Esses mediadores inibem o recrutamento de neutrófilos à área afetada. Além disso, esses mediadores antiinflamatórios e de pró-resolução recrutam monócitos não inflamatórios, que se diferenciam em macrófagos teciduais que irão secretar TGF- β . Alguns destes macrófagos podem deixar o tecido e migrar para o sistema linfático (PHAM, 2006; SERHAN *et al.*, 2008).

De forma geral, essas moléculas endógenas de pró-resolução atuam de diversas formas e em diversas células, estimulando a produção de fatores de resolução e inibindo a produção de mediadores inflamatórios, a ativação das células endoteliais e a migração de leucócitos (neutrófilos e eosinófilos) (SERHAN *et al.*, 2008). Após a resolução da resposta inflamatória ocorre o preenchimento do espaço danificado, através da formação de um novo tecido, epitélio e vasos sanguíneos (TSIROGIANNI *et al.*, 2006). O

processo de reparo tipicamente envolve duas fases: a regenerativa, na qual as células destruídas são substituídas pelo mesmo tipo celular, não deixando evidências de dano tecidual; e a fase conhecida como fibroplasia ou fibrose, na qual o tecido conjuntivo é substituído pelo parênquima normal (WYNN, 2008).

Como descrito anteriormente, a inflamação aguda é uma resposta rápida, que envolve o recrutamento e ativação de neutrófilos, macrófagos e de proteínas plasmáticas ao local injuriado ou infectado. Estas células atuam na eliminação do estímulo inicial, através da destruição de patógenos e remoção de detritos celulares. Porém se o estímulo não é eliminado, o processo inflamatório irá persistir e evoluir, alterando o perfil de células recrutadas de neutrófilos para uma mistura inicial de fagócitos mononucleares e posteriormente de células T (POBER & SESSA, 2007). Essa mudança no caráter celular predominante decorre de alterações no balanço homeostático entre os fatores que aumentam a celularidade e os que diminuem (BUCLEY *et al.*, 2004).

O predomínio do estímulo indutor da inflamação por um período prolongado pode conduzir a uma inflamação crônica, que resumidamente resulta ou em regeneração ou cicatrização (BUCLEY *et al.*, 2004).

1.2 Linhagens de camundongos geneticamente selecionados para resposta inflamatória aguda máxima e mínima

Os mecanismos genéticos que controlam a intensidade da resposta inflamatória aguda e a resposta imune específica, bem como as reações biológicas desencadeadas por estes processos, são alvo de grande interesse e foram estudados em modelos murinos (STIFFEL *et al.*, 1990; IBANEZ *et al.*, 1992; SANT' ANNA *et al.*, 1994). Pesquisadores do laboratório de Imunogenética do Instituto Buntantan têm se dedicado ao estudo do controle genético da resposta imunológica através da produção, manutenção e utilização de linhagens de camundongos de alta e baixa reatividade inflamatória aguda, seguindo protocolos de seleção genética bidirecional (STIFFEL *et al.*, 1990; IBANEZ *et al.*, 1992).

O processo de seleção genética bidirecional visa a obtenção de animais com fenótipos extremos e opostos para uma determinada característica quantitativa, baseado em acasalamentos seletivos partindo de uma população inicial geneticamente heterogênea (STIFFEL *et al.*, 1990).

Para a seleção das linhagens, foi utilizado como agente inflamatório o BIOGEL-100 (microesferas de poliacrilamida), injetado no tecido subcutâneo. A intensidade da

resposta inflamatória aguda foi avaliada após 24h através da análise do exsudato inflamatório, utilizando como parâmetros a celularidade e o extravasamento protéico (FONTAN & FAUVE, 1983)

Para o início do processo seletivo foi utilizada uma população inicial, geneticamente heterogênea, chamada F0, formada através do inter cruzamento balanceado de oito linhagens isogênicas de camundongos: A/J, DBA2/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ e C57BL/6j (STIFFEL *et al.*, 1990; IBANEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO, 1994).

O inter cruzamento balanceado dessas oito linhagens isogênicas gerou quatro populações filiais (F1), de caráter híbrido geneticamente, o inter cruzamento das populações F1 promoveu a obtenção de duas populações filiais segregantes (F2) que por sua vez deram origem a uma terceira geração (F3), chamada de população inicial ou F0.

O inter cruzamento balanceado destas oito linhagens isogênicas possibilitou que cada indivíduo da população F0 contivesse cerca de 12,5% do pool gênico de cada uma das oito linhagens isogênicas parentais (STIFFEL *et al.*, 1990).

Os animais foram submetidos à injeção do agente flogístico Biogel, no tecido subcutâneo. A intensidade da resposta inflamatória aguda foi avaliada após 24h após o tratamento, considerando o número e a morfologia das células infiltradas além da determinação do conteúdo protéico no exsudato inflamatório (FONTAN & FAUVE, 1983; FAUVE *et al.*, 1983). A população F0 analisada apresentou grande variação fenotípica, obedecendo a uma distribuição normal de frequências para o caráter selecionado, intensidade da resposta inflamatória aguda (STIFFEL *et al.*, 1990).

Para o início do processo seletivo, os acasalamentos foram feitos com base nos valores obtidos nos parâmetros que caracterizavam alta ou baixa resposta inflamatória aguda, selecionando os animais com valores fenotípicos situados nos extremos da curva normal de Gauss. Para manter o fundo genético heterogêneo, foram sempre evitados os acasalamentos cosanguíneos (IBANEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO, 1994).

Após 20 gerações de acasalamentos seletivos admitiu-se ter sido atingido o limite de seleção (diminuição da variação fenotípica). No limite de seleção foi considerado que os alelos envolvidos na determinação do fenótipo inflamatório estariam segregados em homozigose em cada linhagem, porém mantendo-se um background heterogêneo (RIBEIRO, 1994). A análise do processo de seleção, empregando métodos de genética clássica, demonstrou a regulação poligênica da intensidade da resposta

inflamatória aguda, com envolvimento de 7 a 12 loci gênicos com efeito aditivo (BIOZZI *et al.*, 1998; IBANEZ *et al.*; 1992).

A resposta imunológica específica dos camundongos AIRmax e AIRmin parece não ter sido afetada pelo processo seletivo, uma vez que estas linhagens produzem níveis equivalentes de anticorpos após o estímulo contra antígenos naturais complexos (eritrócitos, proteínas heterólogas e bactérias inativadas). Igualmente a reação de hipersensibilidade tardia a eritrócitos ou a *Salmonella typhimurium* foram idênticas nas duas linhagens. Por outro lado, a linhagem AIRmax é mais resistente do que AIRmin à infecção por *Salmonella typhimurium*. De fato estudos de dose letal 50% (DL50) mostraram que a DL50 é 1000 e 100 vezes, respectivamente, maior para camundongos AIRmax. Disto resulta a indicação de que esta linhagem é significativamente mais resistente a infecções por patógenos intracelulares do que a linhagem AIRmin. Admite-se que esta maior resistência dos AIRmax está diretamente relacionada à sua capacidade de controlar o crescimento bacteriano no baço, a resposta inflamatória local e a produção de citocinas (ARAÚJO *et al.*, 1998). Dados indicam que nessas linhagens existem diferenças significativas nos mecanismos inflamatórios e imunológicos que compõem o desenvolvimento de doenças auto-imunes. Ainda animais AIRmax são mais susceptíveis à artrite, na qual a deficiência de alelos associados ao *Slc11a1* (gene relacionado ao transporte de íons de neutrófilos e macrófagos interferindo na sua ativação) está envolvida com a maior/menor incidência de artrite (PETERS *et al.*, 2007; VIGAR *et al.*, 2000). Ainda estudos do controle genético da inflamação revelam que a linhagem AIRmax é mais sensível que a linhagem AIRmin aos efeitos tóxicos do veneno de jararaca, demonstrando uma significativa diferença entre as linhagens em termos de reação inflamatória local. Estes resultados demonstram que fatores genéticos selecionados nas linhagens AIRmax e AIRmin interferem no controle da reação inflamatória local (CARNEIRO *et al.*, 2002).

1.3 Silimarina

A silimarina é um flavonóide polifenólico extraído de frutos e sementes de *Silybum marianum*, constituída por uma mistura de três isômeros estruturais: silybinin, silydianin e silychristin, sendo a flavolignina silybinin o componente mais ativo (VALENZUELA & GARRIDO, 1994; YAO-CHENG, 1991; SKOTTOVA *et al.*, 2004).

Sabe-se que a silimarina possui efeitos citoprotetores, antiinflamatórios e anticarcinogênicos, porém os mecanismos envolvidos nesses efeitos ainda não estão bem esclarecidos, mas parecem estar relacionados com a supressão do fator de transcrição nuclear NF-kappaB, que regula a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, citoproteção e carcinogênese (KANG *et al.*, 2002; MANNA *et al.*, 1999).

A silimarina protege as membranas dos hepatócitos contra agentes tóxicos, melhorando sua função, tanto em animais como em seres humanos (MANNA *et al.*, 1999). A inibição da peroxidação lipídica, induzida pela silimarina, protege contra a toxicidade hepática, causada por uma grande variedade de agentes, como radicais livres, tetracloreto de carbono, tolueno ou xileno (BONISIO *et al.*, 1992; CARINI *et al.*, 1992; LETTERON *et al.*, 1990; MEIRESH *et al.*, 1991; MOURELLE *et al.*, 1989; WELLINGTON & JARVIS, 2001).

YAO-CHENG (1991) descreveu a provável ação protetora da silimarina ao observar que a peroxidação lipídica, induzida pela ação de algumas toxinas hepáticas, favorece a formação de prostaglandinas, que determinam o aparecimento de sintomas clínicos, e que os três componentes da silimarina podem suprimir a formação dessas prostaglandinas juntamente com a decomposição dos lipídeos de membrana. Segundo DEHMLow *et al.* (1996) a silimarina possui não apenas propriedades hepatoprotetoras, mas também ação citoprotetora em outros órgãos e tecidos.

Além do princípio hepatoprotetor, esse flavonóide é considerado um potente agente anti-carcinogênico, proporcionando proteção contra diferentes estágios de carcinogênese induzida por radiação ultra-violeta (KATIYAR, 2002) e na promoção de tumor induzido por éster de forbol (PMA) (LAHIRI-CHATERJEE *et al.*, 1997) Segundo ZI *et al.* (1997), a silimarina exerce efeito preventivo sobre a carcinogênese induzida por agentes químicos em tumores de pele, por inibir a expressão de m RNA para o fator de necrose tumoral (TNF) na epiderme de camundongos.

A silimarina também exerce importante ação antiinflamatória *in vivo*. DE LA PUERTA *et al.* (1996) observou que a administração oral de silimarina em modelo experimental reduziu o abscesso do coxim plantar de ratos, induzido por carragenina e inibiu o acúmulo de leucócitos no infiltrado inflamatório peritoneal após inoculação com carragenina, diminuindo principalmente o número de neutrófilos. Outros modelos experimentais de inflamação em ratos demonstram que a silimarina apresenta atividade anti-inflamatória induzida por látex de papaya. Os resultados do estudo indicam que essas atividades são decorrentes da inibição da 5-lipoxigenase (GUPTA *et al.*, 2000).

A silimarina também exerce importante ação antiinflamatória *in vivo*, sendo utilizada no tratamento clínico de doenças hepáticas inflamatórias e alcoólicas (JOHNSON *et al.*, 2003; FALASCA *et al.*, 2008). Estudos farmacológicos indicam que, no tratamento de cirrose hepática alcoólica, a silimarina não é tóxica, mesmo em altas concentrações (FEHÉR *et al.*, 1987; FERENCI *et al.*, 1989; JOHNSON *et al.*, 2003).

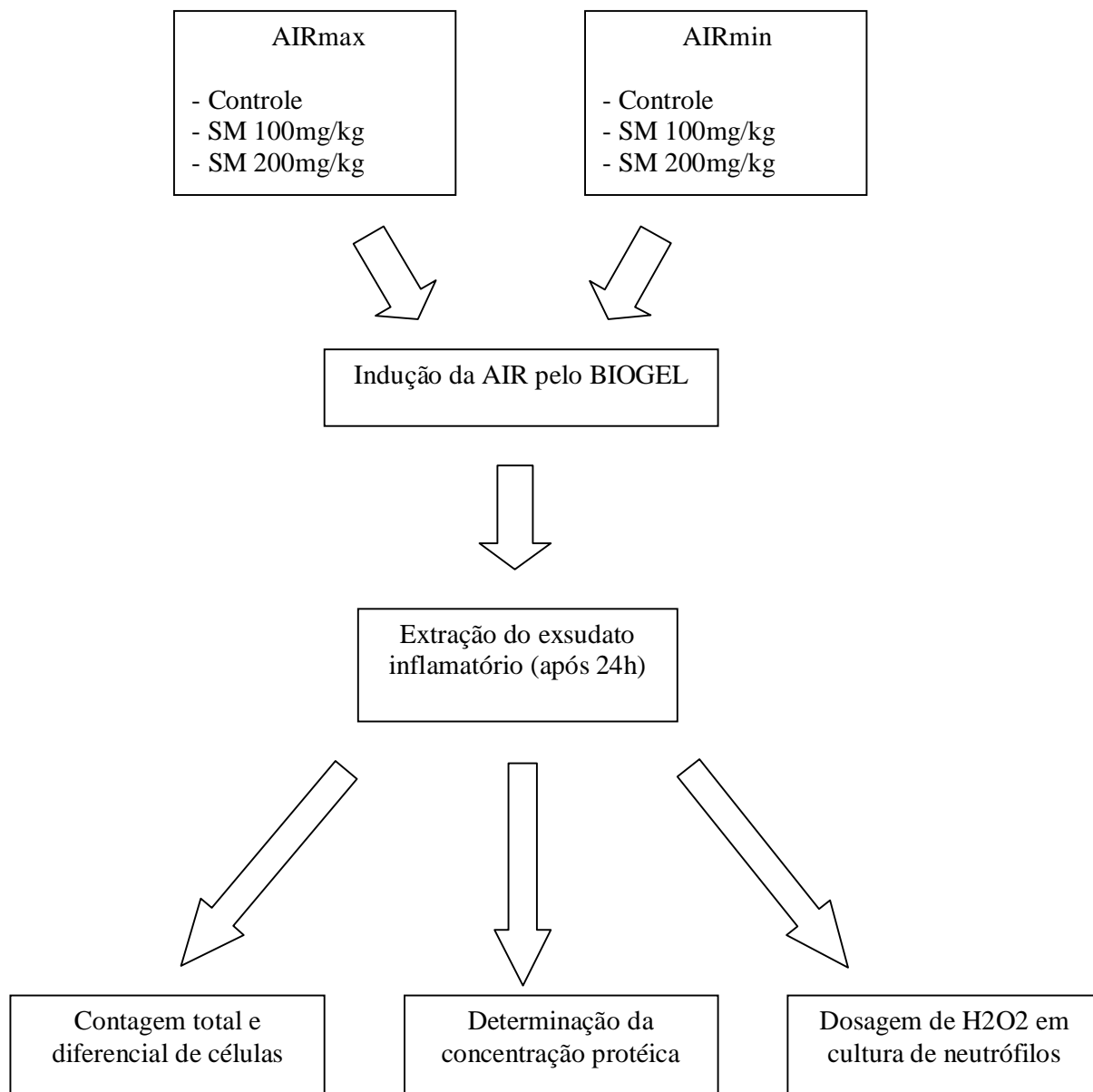
Objetivo

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito antiinflamatório da Silimarina (*Silybum marianum*) em linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para máxima e mínima resposta inflamatória aguda através da indução flogógena pelo composto BIOGEL-100.

Delineamento Experimental

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens geneticamente selecionadas para máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) reatividade inflamatória aguda, com 8-12 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Imunogenética do Instituto Butantan e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu. Os animais permaneceram em gaiolas de polietileno, forradas com maravalha, sob temperatura ambiente e fotoperíodo de 12 horas. Água e ração foram oferecidos "ad libidum". Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo n.537/2006).

4.2 Tratamento

As linhagens AIRmax e AIRmin foram divididas em 3 grupos experimentais cada, de acordo com o tipo de tratamento: grupo controle, grupo tratado com Silimarina 100mg/kg (SM 100mg/kg) e grupo tratado com 200mg/kg (SM 200mg/kg), totalizando 6 grupos, cada um com n=8. O tratamento dos camundongos com a silimarina foi realizado por via oral (gavage) durante 6 dias consecutivos, totalizando seis doses ao final do tratamento, o acerto na concentração para os diferentes grupos foi estabelecido através da administração de 0,5ml para os camundongos tratados com Silimarina na concentração de 100mg/kg e 1ml para os que receberam a dose na concentração de 200mg/kg. O grupo controle recebeu o volume de 0,5ml de solução salina (PBS) também por gavage. No sétimo dia os animais foram submetidos a indução da resposta inflamatória e após 24 horas o exsudato inflamatório foi colhido para análise.

4.3 Indução da Resposta Inflamatória Aguda

Para a indução da resposta inflamatória aguda os camundongos tiveram parte da região dorsal depilada para exposição da pele e então foram injetados com 0,75ml do composto BIOGEL-P100 por via subcutânea, formando uma bolha.

Após 24h foi injetado na bolsa 1ml de PBS contendo 20u/ml de heparina por animal, lavando duas vezes o infiltrado antes de fazer a coleta do material. O material coletado foi direto para tubos de ensaio, em gelo, onde aguardaram o tempo necessário para a sedimentação do BIOGEL P-100. Após esse período 0,5ml do material em

suspensão foi retirado e transferido para um segundo tubo contendo 2ml de PBS, diluindo a solução em 1:5, para que então essa amostra possa ser utilizada de formas diferentes, dependendo do parâmetro avaliado.

4.4 Contagem total e diferencial de células

Para a contagem total de células, 0,1 ml do segundo tubo foi para um quarto tubo, contendo 0,4ml de azul de metileno a 1% em ácido acético 1%, de forma que a diluição final seja de 1:25. As células foram contadas em câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas a partir do exsudato sobrenadante do primeiro tubo referente a cada animal, a preparação da amostra foi feita em lâminas de microscopia óptica e submetidas à coloração por Panótico (Laborclin LTDA, Pinhais-Paraná, Brasil), em seguida as lâminas foram observadas em microscópio óptico para contagem diferencial de células.

4.5 Concentração protéica

Para determinação da concentração protéica o segundo tubo foi centrifugado a 1200rpm por 10min em centrífuga refrigerada a 4,5°C, em seguida 1,5 ml foi transferido para um terceiro tubo, contendo 1,5ml de PBS. Esse terceiro tubo foi novamente centrifugado, agora a 6000rpm durante 10min, esse processo separa as células e o BIOGEL-P100 das proteínas. As amostras do terceiro tubo foram lidas em espectrofotômetro calibrados para comprimento de onda de 280nm.

4.6 Dosagem de espécies reativas do oxigênio (H₂O₂)

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por PICK & KEISARI (1980) e adaptado por PICK & MIZEL (1981). O conteúdo celular foi retirado do exsudato inflamatório e colocado em meio de cultura RPMI-c, em seguida centrifugado e ressuspenso em 1mL do mesmo meio. A concentração celular foi acertada para 2x10⁶ células em câmara de Neubauer. Em seguida 100 uL dessa suspensão foi distribuída em placas de microcultura de 96 orifícios e incubados por 18h à 37°C sem estímulo.

Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 0,01 mL de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em microleitor automático de ELISA, com filtro de 620nm, contra um branco constituído de solução de vermelho fenol e NaOH 1N. Os resultados foram expressos em nanomols (nmols) de H₂O₂/2x10⁶ células, a partir da

curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída por concentrações molares conhecidas de H₂O₂ variando de 0,25 a 2,0nM.

4.7 Análise Estatística

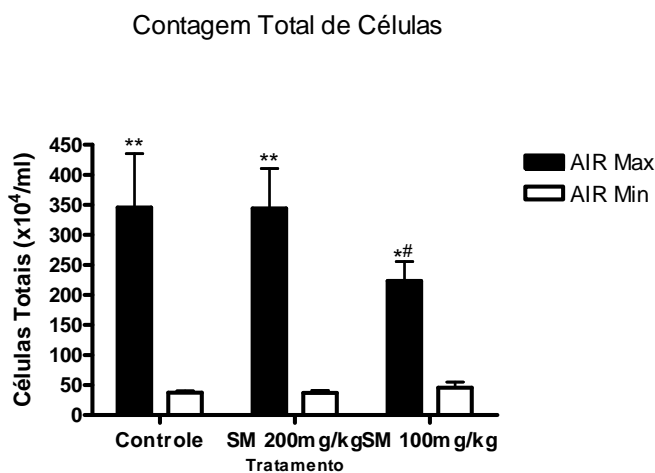
Os resultados são expressos como média +- EPM e os mesmos foram analisados utilizando ANOVA seguido de teste Tukey. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4 (Califórnia, USA). As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Contagem Total de Células

Os resultados da contagem total de células do exsudato inflamatório dos animais estão representados na Figura 1. Como esperado, observa-se que há diferença estatística entre os grupos AIRmax e AIRmin quanto ao número total de células encontradas no infiltrado, confirmando o caráter genético dessas linhagens. Em relação ao tratamento com a Silimarina nas doses de 200mg/kg e 100mg/kg, essa última quando comparada ao controle apresentou diferença significativa, indicando um potencial efeito inibidor desse flavonóide na atração de células inflamatórias ao local afetado.



* Diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin), no mesmo grupo

Diferença estatística entre animais da mesma linhagem com tratamentos diferentes

Figura 1. Efeito da administração de diferentes concentrações de silimarina em camundongos AIRmax e AIRmin sobre a concentração total de células contadas a partir do exsudato inflamatório da região inflamada. Os resultados são expressos como média +- desvio padrão do número estimado de células encontradas nos diferentes grupos.

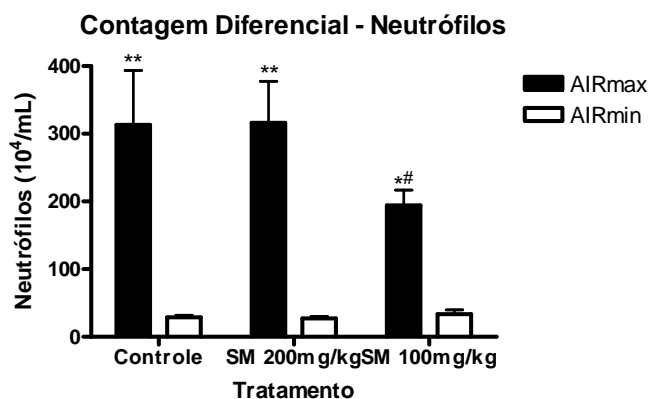
5.2 Contagem Diferencial de Células

A Figura 2 demonstra a concentração de células polimorfonucleares, representadas pelos neutrófilos, nas linhagens AIRmax e AIRmin diante os diferentes

tipos de tratamento e a Figura 4 a concentração de células mononucleares, representadas por monócitos também diante das diferentes linhagens e formas de tratamento.

Na Figura 2 a contagem dos neutrófilos seguiu o mesmo padrão que a contagem total de células, pois esse tipo celular é predominante no infiltrado representando quase que sua totalidade. Portanto nota-se diferença significativa no número de neutrófilos entre as linhagens (AIRmax x AIRmin) e também na linhagem AIRmax tratada com silimarina 100mg/kg em relação ao controle.

Já na Figura 3, representando a contagem de monócitos, há diferença estatística somente entre as linhagens (AIRmax x AIRmin), porém nota-se pequena redução do influxo desse tipo celular no grupo AIRmax tratado com silimarina 100mg/kg, mas sem significado estatístico.

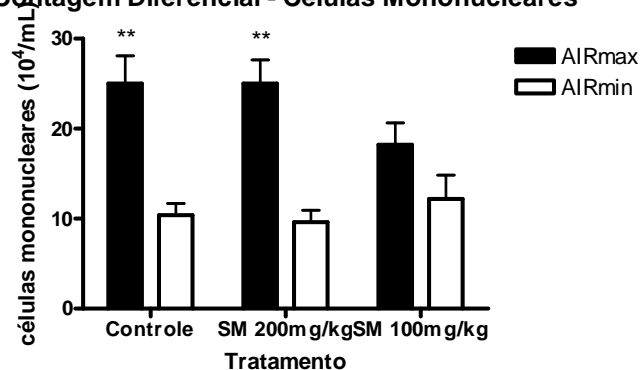


* Diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin), no mesmo grupo

Diferença estatística entre animais da mesma linhagem com tratamentos diferentes

Figura 2. Efeito da administração de diferentes concentrações de silimarina em camundongos AIRmax e AIRmin sobre a concentração de células polimorfonucleares, ou neutrófilos, contadas a partir do exsudato inflamatório da região inflamada. Os resultados são expressos como média +- desvio padrão do número estimado de células encontradas nos diferentes grupos.

Contagem Diferencial - Células Mononucleares

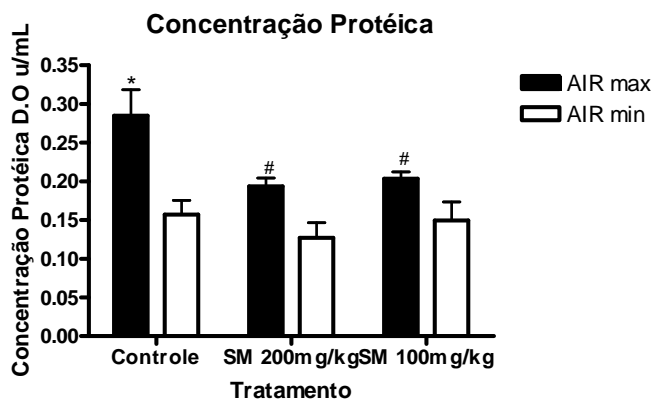


* Diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin), no mesmo grupo

Figura 3. Efeito da administração de diferentes concentrações de silimarina em camundongos AIRmax e AIRmin sobre a concentração de células mononucleares, contadas a partir do exsudato inflamatório da região inflamada. Os resultados são expressos como média +- desvio padrão do número estimado de células encontradas nos diferentes grupos.

5.3 Concentração Protéica

Os resultados obtidos pela leitura da concentração protéica do exsudato estão expressos na Figura 4, nesse aspecto nota-se que os animais da linhagem AIRmax tratados com doses de 100mg/kg e 200mg/kg tiveram os valores de concentração protéica diminuídos significativamente em relação ao controle, evidenciando um provável papel modulador da silimarina apenas sobre as linhagens AIRmax, já que os resultados obtidos com animais AIRmin mantiveram-se equilibrados diante os diferentes tipos de tratamento. Entre as linhagens (AIRmax x AIRmin) há diferença estatística apenas no grupo controle, visto que nos grupos tratados os valores absolutos encontrados na linhagem AIRmax se aproximaram aos encontrados em AIRmin.



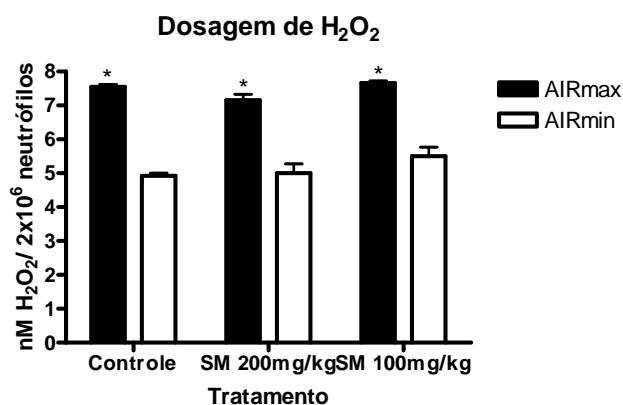
* Diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin)

#Diferença estatística entre animais da mesma linhagem com tratamentos diferentes

Figura 4. Efeito da administração de diferentes concentrações de silimarina em camundongos AIRmax e AIRmin sobre a concentração protéica do exsudato inflamatório da região inflamada.. Os resultados são expressos como média +- desvio padrão dos valores de concentração protéica obtidos pela leitura em espectrofotômetro das amostras do exsudato inflamatório dos diferentes grupos.

5.4 Dosagem de Espécies Reativas do Oxigênio (H₂O₂)

Na figura 5 estão os resultados da dosagem de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) realizada com cultura de células do infiltrado. Os resultados mostraram que o tratamento com a silimarina não afetou a produção de H₂O₂ nos diferentes grupos de tratamento, houve diferença apenas na comparação AIRmax x AIRmin.



* Diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin), no mesmo grupo

Figura 5. Efeito da administração de diferentes concentrações de silimarina em camundongos AIRmax e AIRmin sobre a liberação de espécies reativas do oxigênio (H₂O₂) por leucócitos polimorfonucleares presentes na região inflamada. Os resultados são expressos como média +- desvio padrão do concentrado de H₂O₂ detectados em cultura de neutrófilos provenientes do exsudato dos diferentes grupos de tratamento

Discussão

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para máxima e mínima resposta inflamatória aguda foram utilizadas para investigar se um agente externo, no caso a silimarina, é capaz de modular um caráter geneticamente selecionado. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito antiinflamatório da silimarina sobre essas linhagens, avaliando-se os seguintes parâmetros: contagem total e diferencial de células, concentração protéica do exsudato e dosagem de espécies reativas do oxigênio (H₂O₂).

Embora na literatura já estejam bem descritos os efeitos antiinflamatórios da silimarina e seus componentes sobre modelos *in vivo* e *in vitro* (KANG *et al.*, 2002; MANNA *et al.*, 1996), não existem estudos relacionados aos efeitos desse flavonóide sobre as linhagens AIRmax e AIRmin.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam uma provável ação moduladora da silimarina sobre a capacidade de migração de células ao local inflamado. A contagem total de células mostrou que houve redução estatisticamente significativa no número de células encontradas no grupo de camundongos da linhagem AIRmax tratados com silimarina 100mg/kg, quando comparadas ao controle. A diferença observada entre as linhagens é esperada, devido ao seu caráter geneticamente selecionado.

Realizamos também a contagem diferencial de células e os resultados obtidos se assemelharam com a contagem total nos diferentes grupos, o tratamento com a silimarina reduziu significativamente o número de células polimorfonucleares encontradas no exsudato de camundongos da linhagem AIRmax tratados com silimarina 100mg/kg, indicando um provável efeito inibidor desse flavonóide sobre esse caráter geneticamente selecionado. A comparação interlinhagens (AIRmax x AIRmin) é compatível com os resultados obtidos na contagem total e também com os resultados obtidos por IBAÑEZ *et al.* (1992).

IBAÑEZ *et al.* (1992) demonstrou que a diferença entre as duas linhagens no número médio de leucócitos migrados ao sítio de injeção do Biogel é aproximadamente 20 vezes a favor da AIRmax, sendo os neutrófilos as células predominantes no exsudato inflamatório, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho.

RIBEIRO (1994) concluiu que o maior número de neutrófilos encontrados no exsudato inflamatório dos camundongos AIRmax é decorrente de três fatores: 1) Maior

capacidade funcional da medula óssea em produzir neutrófilos maduros; 2) Maior produção de fatores quimiotáticos pelas células residentes ou infiltrantes após estímulo com o Biogel e 3) Maior resistência a apoptose das células encontradas no exsudato. Apesar das diferenças quantitativas, os neutrófilos maduros das linhagens AIRmax e AIRmin possuem a mesma capacidade funcional, ou seja, expressam níveis semelhantes de moléculas de superfície reguladoras tanto da diferenciação como ativação e migração destas células (RIBEIRO *et al.*, 2003).

O tratamento com a silimarina, em diferentes doses, não alterou significativamente o número de células mononucleares encontradas no exsudato das linhagens, indicando ausência de efeito desse flavonóide nas linhagens nesse aspecto. Já em relação a comparação entre as linhagens, os animais AIRmax apresentaram quantidade significativamente maior desse tipo celular em relação aos animais AIRmin, de acordo com o esperado, devido ao caráter genético.

Outro aspecto interessante observado nesse estudo e que corrobora com resultados obtidos por IBAÑEZ *et al.* (1992), é que na linhagem AIRmax a proporção de células polimorfonucleares que migram ao local em relação às mononucleares é maior que na AIRmin, sendo que a proporção neutrófilos/monócitos na linhagem AIRmin está mais equilibrada que na AIRmax. IBAÑEZ *et al.* (1992) demonstrou que a porcentagem de células polimorfonucleares encontradas no exsudato inflamatório dos animais foi de 87% na linhagem AIRmax e 64% na linhagem AIRmin, já a porcentagem de monócitos foi de 11% para a primeira e 36% para a segunda linhagem. Resultados que se assemelham com os obtidos nesse trabalho, visto que as proporções relatadas foram semelhantes às aquelas encontradas em nosso estudo.

Os resultados obtidos com a determinação da concentração protéica mostraram que a silimarina reduziu significativamente esses valores nos grupos tratados com doses de 100mg/kg e 200mg/kg da linhagem AIRmax em relação ao controle. Este resultado também pode estar relacionado com o menor influxo celular nos animais AIRmax tratados com a silimarina, sugerindo que a redução da quantidade de proteínas no exsudato inflamatório pode ter relação com fatores quimiotáticos envolvidos no recrutamento celular intrínsecos à linhagem AIRmax e não na AIRmin. Observamos ainda que no grupo controle há uma diferença significativa nos valores obtidos entre AIRmax e AIRmin, o que não ocorre nos grupos tratados pois nos animais AIRmax houve uma redução desses valores, indicando uma possível ação moduladora da silimarina sobre esse aspecto somente na linhagem AIRmax.

RIBEIRO *et al.* (2003) a partir da análise do conteúdo protéico dos exsudatos inflamatórios das linhagens AIRmax e AIRmin, identificaram a produção diferencial de fatores quimiotáticos pelas linhagens. O exsudato dos animais AIRmax apresentou diferenças quantitativas importantes às 24 horas de resposta ao Biogel pela presença de proteínas de baixo peso molecular que estão diretamente envolvidas nos processo de recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios, como as anafilotoxinas C3a e C5a, a proteína 14 induzível de fator de crescimento de fibroblasto (FGF-inducible 14), a proteína precursora de linfotaxia (XCL1) e a proteína 2 ativadora de macrófagos (MIP-2), que foram encontradas em menor quantidade nos animais AIRmin.

O exsudato inflamatório de 24 horas dos animais AIRmax exerceu um efeito quimiotático intenso em neutrófilos oriundos da medula óssea de animais BALB/C, efeito esse que não foi tão intenso quando o exsudato inflamatório utilizado pertencia aos animais AIRmin. Estes resultados indicam que o exsudato dos AIRmax contém altas concentrações desses fatores quimiotáticos que promovem uma intensa transmigração de neutrófilos para o sítio inflamatório (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A avaliação da liberação de H₂O₂ por leucócitos polimorfonucleares do exsudato inflamatório dos camundongos mostrou que o tratamento com a silimarina, em diferentes doses, não foi capaz de modular essa característica nas linhagens de camundongos AIRmax e AIRmin. A comparação entre as linhagens, independente do tratamento, mostra uma diferença significativa quanto à liberação de H₂O₂, apenas confirmando o caráter genético da seleção.

O efeito antioxidante de diferentes componentes da silimarina foi descrito por VARGA *et al.* (2001), estudando a produção de ânion superóxido e H₂O₂ por leucócitos polimorfonucleares humanos, estimulados por PMA.

KANG *et al.* (2002) sugerem que a ação antiinflamatória da silimarina pode ser explicada por seu efeito inibidor sobre a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos peritoneais murinos e células RAW 264.7. Esses efeitos são decorrentes do bloqueio da ativação do fator de transcrição NF-κB pela silimarina, regulando muitos genes envolvidos na reação inflamatória (MANNA *et al.*, 1999). Segundo KANG *et al.* (2002) o efeito inibitório da silimarina sobre a produção de NO e , o fato desse flavonóide ser um componente farmacologicamente ativo e não-tóxico, sugere sua possível aplicação como agente antiinflamatório.

RASO *et al.* (2001), avaliaram a ação moduladora de vários flavonóides, entre eles a silimarina, sobre a produção de NO e prostaglandina E2 (PGE2), bem como sobre a expressão da enzima iNOS e da ciclooxigenase 2 (COX-2) induzidos por LPS em linhagem celular de macrófagos. Os autores concluíram que o efeito inibidor da silimarina sobre os parâmetros estudados pode explicar seu papel antiinflamatório *in vitro*. Recentemente, KANG *et al.* (2004), estudando o efeito protetor da silimarina em modelo experimental de sepse induzido por LPS em camundongos, demonstraram que a administração *in vivo* do flavonóide aumentou a sobrevivência dos animais. O cultivo *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos com diferentes doses de silimarina e LPS revelou efeito inibidor dose-dependente da silimarina sobre a produção de IL-1B e PGE2 e sobre a expressão de mRNA para IL-1B e COX-2. Segundo os autores, o efeito antiinflamatório e protetor na sepse apresentado pela silimarina é mediado, pelo menos em parte, por sua ação inibidora sobre a produção de citocinas e mediadores inflamatórios.

KANG *et al.* (2002) demonstrou que a administração *in vivo* de silimarina inibe a produção de óxido nítrico e a expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com lipopolissacáride (LPS). Esses efeitos estão relacionados com a provável ação inibidora da silimarina sobre a ativação do fator nuclear NK-kappaB, que regula vários genes envolvidos na resposta imune e na reação inflamatória.

Em resumo, a produção quantitativa de neutrófilos na medula óssea de animais da linhagem AIRmax é maior, pois suas células precursoras são muito mais responsivas aos processos de proliferação e diferenciação em granulócitos quando comparadas à linhagem AIRmin, que responde fracamente aos sinais de estímulo provenientes dos exsudatos inflamatórios (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Estudos de imunogenética demonstraram a regulação poligênica da intensidade da resposta inflamatória aguda (AIR), ou seja, que este fenótipo é quantitativamente regulado por vários genes, aproximadamente 11 loci gênicos, que segregam independentemente e que são dotados de efeito aditivo (IBANEZ *et al.*, 1992; RIBEIRO, 1994; BIOZZI *et al.*, 1998).

Estudos realizados em híbridos F1 (AIRmax x AIRmin), segregantes F2 e retrocruzados das linhagens AIRmax e AIRmin estimaram 7 a 11 QTL (Quantitative Trait Loci) com efeito aditivo regulam a Intensidade da Resposta Inflamatória Aguda,

sendo que 7 QTL controlariam o extravasamento protéico e 11 QTL regulariam o infiltrado celular (IBANEZ *et al.*, 1992; BIOZZI *et al.*, 1998).

A alta resposta inflamatória observada nos animais AIRmax é resultado da soma de elementos convergentes durante o processo de seleção genética e da ativação dos genes envolvidos nessa resposta. No presente trabalho avaliamos a intensidade da resposta inflamatória aguda através de análises fenotípicas das linhagens, mas podemos inferir, com base em dados da literatura, que genes específicos estão modulando essa resposta entre as linhagens. A regulação dessa resposta por um agente externo, no caso a silimarina, provavelmente está relacionada à modulação desses genes direta ou indiretamente.

Concluindo, observamos que a silimarina exerceu efeitos antiinflamatórios em alguns aspectos observados apenas nas linhagens AIRmax, como na diminuição da concentração total de células e de neutrófilos nos animais AIRmax tratados com 100mg/kg de silimarina e diminuição também da concentração protéica em ambos os grupos tratados, quando comparados ao controle. A partir desse estudo supomos que a silimarina pode estar atuando em genes específicos que controlam fatores como extravasamento protéico e migração celular ao local inflamado, sendo esse um possível objeto de estudo futuro.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO LM, RIBEIRO OG, SIQUEIRA M, STAROBINAS N, MASSA S, CABRERA WH, MOUTON D, SEMAN M, IBAÑEZ OM. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal acute inflammatory response. **Eur J Immunol**, 1998; 28:2913-20.

BEUTLER B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**, v.40, p.845-859, 2004.

BIANCHI ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J. Leuko Biol**, 2007; 81: 1-5.

BIOZZI G, RIBEIRO OG, SARAN A, ARAÚJO ML, MARIA DA. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, 1998; 19: 337-46.

BORREGO A, PETERS LC, JENSEN JR, RIBEIRO OG, CABRERA WHK, STAROBINAS N, SEMAN M, IBAÑEZ OM, FRANCO M. Genetic determinants of acute inflammation regulate Salmonella infection and modulate Slc11a1 gene (formerly Nramp1) effects in selected mouse lines. **Microbes Infect**, 2006; 8(12-13):2766-71.

BOSISIO E, BENELLI C, PIROLA O. Effect of the flavonolignans of *Silybum marianum* on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. **Pharm Res**, 1992; 25:147-54.

BORREGAARD N, SORENSEN OE, THEILGAARD-MONCH K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol**, 2007; 8: 2766-71.

BUCLEY CD, FILER A, HAWORTH O, PARSONAGE G, SALMON M. Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. **Annu Rheum Dis**, 2004; 63:92-95.

BURKE JE, DENNIS EA. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, 2009; 50: 237-42.

CARINI R, COMOGLIO A, ALBANO E, POLI G. Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016. **Biochem Pharmacol**, 1992; 43:2111-5.

CARMAN CV. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. **J Cell Sci**, 2009; 122: 3025-3028.

CARNEIRO A, RIBEIRO OG, DE FRANCO M, CABRERA WH, VORRARO F, SIQUEIRA M, IBAÑEZ OM, STAROBINAS N. Local inflammatory reaction induced by *Botrophi jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, 2003; 40:1571-79.

-
- CHARO IF, RANSOHOFF RM. The many roles of chemokine receptor in inflammation. **N Engl J Med**, 2006; 354:610-621.
- DE FILLIPIS DD, D'AMICO A, IUVONE T. Cannabinomimetic control of mast cell mediator release: new perspective in chronic inflammation. **J Neuroendocrinol**, 2008; 20(1): 20-25.
- DE LA PUERTA R, MARTINEZ E, BRAVO L, AHUMADA MC. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. **J Pharm Pharmacol**, 1996; 48: 968-70.
- DEHMLow C, MURAWSKI N, GROOT H. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells. **Life Sci**, 1996; 58: 1591-600.
- DOSTERT C, PETRILLI V, BRUGGEN RV, STEELE C, MOSSMAN BT, TSCHOPP J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, 2008; 320: 674-677.
- FAUVE RM, JUSFORGUES H, HEVIN B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. **Immunol Methods**, 1983; 64: 345-351.
- FERENCI P, DRAGOSICS B, DITTRICH H, FRANK H, BENDA L, LOCHS H, MERYN S, BASE W, SCHNEIDER B. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. **J Hepatol** 1989; 9: 105-13.
- GHEBREHIWET B, RANDAZZO BP, DUNN JT, SILVERBERG M, KAPLAN AP. Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. **J Clin Invest**, 1983; 71:1450-1456.
- GUPTA OP, SING S, BANI S, SHARMA N, MALHOTRA S, GUPTA BD, BANERJEE SK, HANDA SS. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin acting through inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine** 2000; 7: 21-4.
- IBAÑEZ OM, STIFFEL C, RIBEIRO OG, CABRERA WK, MASSA S, FRANCO M, SANT'ANNA OA, DECREUSEFOND C, MOUTON D, SIQUEIRA M, BIOZZI G. Genetics of nonspecific immunity: Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur J Immunol**, v.22, p.2555-2563, 1992.
- JOHNSON VJ, HE Q, OSUCHOWSKI MF, SHARMA RP. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in Balb/c mice: Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. **Planta Med** 2003; 69: 44-9.
- KANG JS, JEON YJ, KIM HM, HAN SH, YANG KH. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **J Pharmacol Exp Ther**. 2002; 302:138-44.

KATIYAR SK. Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. **Int J Oncol**, 2002; 21: 1213-22.

KONGER RL, KOZMAN A, SAHU RP, TRAVERS JB. PAF receptor deficiency results in increased PAM-induced inflammation and augmented chemical carcinogenesis. **FASEB J**, 2010; 24: 421.8.

KRUPICZOJC MA, SCOTTON CJ, CHAMBERS RC. Coagulation signaling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. **Int J Biochem Cell Biol**, 2008; 40: 1228-37.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Robbins Basis Pathology**. 7. Ed. Philadelphia Saunders: Hardcover, 2003.

LAHIRI-CHATTERJEE M, KATIYAR SK, MOHAN RR, AGARWAL R. A flavonoid antioxidant silymarin affords exceptionally high protection against tumor promotion in the SENCAR mouse skin tumorigenesis model. **Cancer Res**, 1999; 59: 622-32.

LANTZ RC, CHEN GJ, SARIHAN M, SOLYOM AM. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. **Pythomed**, 2007; 14: 123-28.

LAWRENCE T, WILLOUGHBY DA, GILROY DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, 2002; 2(10): 787-95.

LAWRENCE, T; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v.88, n.2, p.85-94, 2007

LETTERON P, LABBE G, DEGOTT C, BERSON A, FROMENTY B, DELAFORGE M, LARREY D, PESSAYRE D. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. Evidence that silymarin acts both as an inhibitor of metabolic activation and as a chain-breaking antioxidant. **Biochem Pharmacol** 1990; 39:2027-34.

LIBBY, P. Inflammatory mechanisms: The molecular basis of inflammation and disease. **Nutr. Rev.**, v.65, n.12, p.140-146, 2007.

MAJNO G, JORIS I. Cells, tissues, and disease principles of general pathology. 2. Ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 2004.

MANNA SK, MUKHOPADHYA A, VAN NT, AGGARWAL BB. Silymarin suppress TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. **J Immunol**. 1999; 163:6800-9.

MANTOVANI A, BONECCHI R, LOCATI M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nat Rev Immunol**, 2006; 6: 907-918.

-
- MANTOVANI A, GARLANDA C, DONI A, BOTAZZI B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J Clin Immunol**, 2008; 28: 1-13.
- MARIATHASAN S, WEISS DS, NEWTON K, MC BRIDE J, O'ROUKE K, ROOSE-GIRMA M, LEE WP, WEINRAUCH Y, MONACK DM, DIXIT VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, 2006; 440: 228-32.
- MEDZHITOV, R Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, 2008; 454: 428-435.
- MEIRESH KA, BUNNER DL, RAGLAND DR, CREASIA DA. Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by silymarin: biochemistry, histopathology and lethality. **Pharm Res** 1991; 8: 273-7.
- MOORE KW, O'GARRA A, MALEFYT RW, VIEIRA P, MOSMANN TR. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, 2001; 19: 638-765.
- MOURELE M, MURIEL P, FAVARI L, FRANCO T. Prevention of CCl4-induced liver cirrhosis by silymarin. **Fundam Clin Pharmacol** 1989; 3: 183-91.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol**, 2006; 6: 173-771.
- PARKS WC, WILSON CL, LÓPEZ-BOADO YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 2004; 8: 617-629.
- PETERS LC. Slc11a1 (formerly Nramp1) gene modulates both acute inflammatory reaction and pristane-induced arthritis in mice. **Genes Immun**, 2007; 8: 51-56.
- PHAM, C. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat Rev Immunol**, 2006; 6: 541-50.
- POBER, J.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol**, 2007; 7:803-15.
- RAKOFF-NAHOUM S, PAGLINO J, ESLAMI-VARZANEH F, EDBERG S, MEDZHITOV R, Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell**, 2004; 188: 229-241.
- RAMESH G, REEVES WB. TNF- α mediates chemokines and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. **J Clin Invest**, 2002; 110: 835-842.
- RASO GM, MELI R, DI CARLO G, PACILIO M, DI CARLO R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci** 2001; 921-31.
- RIBEIRO OG, MARIA DA, ADRIOUCH S, PECHBERTY S, CABRERA WHK, MORISSETE J, IBAÑEZ OM, SEMAN M. Convergent alteration of granulopoiesis,

chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J Leukoc Biol**, 2003; 74: 497-506.

RIBEIRO, O. G. **Controle genético da inflamação**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu Rev Pathol**, v.3, p.99-126, 2008.

RUDDY MJ, SHEN F, SMITH JB, SHARMA A, GAFFEN SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. **J Leukoc Biol** 2004; 76: 135-44.

SCHMAIER AH. The elusive physiologic role of factor XII. **J Clin Invest**, 2008; 118: 3006-3009.

SERHAN CN, BRAIN SD, BUCKLEY CD, GILROY DW, HASLETT C, O'NEILL LAJ, PERRETTI M, ROSSI AG, WALLACE JL. Resolution of inflammation: state of art, definitions and terms. **FASEB J**, 2007a; 21: 325-32.

SERHAN CN, CHIANG N, VAN DYKE TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat Rev Immunol**, 2008; 8:349-61.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and pro-resolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, 2007b; 25:101-137.

SKOTTOVÁ N, KAZDOVÁ L, OLIYARNYK O, VECERA R, SOBOVÁ L, ULRICHOVÁ J. Phenolicsrich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats. **Pharmacol Res**. 2004; 50:123-30.

SOKOL CL, BARTON GM, FARR AG, MEDZHITOV R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. **Nat Immunol**, 2008; 9: 310-18.

STIFFEL C, IBAÑEZ OM, RIBEIRO OG, DECREUSEFOND C, MOUNTON D, SIQUEIRA M, BIOZZI G. Genetic of acute inflammation reactions in inbred lines of mice and in their interline crosses. **Exp Clin Immunogenet**, 1990; 7: 221-233.

STREETZ KL, WUSTEFELD T, KLEIN C, MANNS MP, TRAUTWEIN C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. **Cell Mol Biol**, 2001; 47: 661-73.

TSIROGIANNI AK, MOUTSPOULOS NM, MOUTSOULOS HM. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, 2006; 37: 5-12.

TURER EE, TAVAREZ RM, MORTIER E, HITOTSUMATSU O, ADVINCULA R, LEE B, SHIFRIN N, MALYNN BA, MA A. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. **J Exp Med**, 2008; 205:451-64.

VALENZUELA A, GARRIDO A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. **Biol Res.** 1994; 27:105-12.
WALLPORT MJ. Complement at the interface between innate and adaptative immunity. *N Engl J Med*, 2001; 344:1140-1144.

VIGAR ND, CABRERA WH, RIBEIRO OG, OGATA TRP, SIQUEIRA M, IBAÑEZ OM, DE FRANCO M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal and minimal acute inflammatory reaction. **Eur J Immunol**, 2000; 30: 431-37.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**, 2008; 214: 199-210.

Y LIN, YAO S, VEACH RA, TORGERSON TR, HAWIGER J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-KB by a synthetic peptide containing a cell-membrane permeable motif and nuclear localization sequence. **J Biol Chem**, 1995; 270: 14255: 58.

YAO-CHENG R. Advances in pharmacological studies of silymarin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1991; 86: 79-85.