

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMTÓRIO DE EXTRATOS
ISOLADOS DE MICRORGANISMOS MARINHOS**

Vivian Sakamoto Obara

ARARAQUARA

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMTÓRIO DE EXTRATOS
ISOLADOS DE MICRORGANISMOS MARINHOS**

Vivian Sakamoto Obara

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros

Araraquara

2014

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. DESENVOLVIMENTO.....	10
2.1. Metodologia.....	10
2.1.1. Isolamento e obtenção dos extratos	10
2.1.2. Cultura celular	10
2.1.3. Diluição dos extratos	10
2.1.4. Quantificação de nitrito	11
2.1.5. Atividade citotóxica.....	11
2.1.6. Quantificação de citocinas	12
2.2. Análise estatística.....	12
2.3. Resultados e discussão	12
3. CONCLUSÃO	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

O Brasil possui cerca de 8.000 quilômetros de costa litorânea, a segunda maior do mundo depois da Austrália. Apesar do território marítimo brasileiro apresentar 3,6 milhões de quilômetros quadrados de extensão, as pesquisas relacionadas ao levantamento de potenciais recursos brasileiros obtidos a partir de espécies marinhas ainda são incipientes. O interesse de empresas farmacêuticas por compostos isolados de microrganismos vem crescendo lentamente devido às dificuldades até então encontradas para o isolamento e cultivo dos mesmos. No entanto, com o avanço destas técnicas, recentes estudos demonstram que compostos isolados de microrganismos marinhos representam uma rica e ainda pouco explorada fonte de novos compostos bioativos (estima-se que apenas 1% dos microrganismos marinhos foram cultivados e identificados). Recentes estudos que apontam para o potencial farmacológico de compostos isolados de microrganismos nos instigaram à busca de novos fármacos com potencial imunostimulador não apenas a partir de invertebrados, mas também de microrganismos marinhos e seus metabólitos secundários bioativos.

Neste trabalho, após avaliação do potencial imunomodulador de extratos brutos derivados de microrganismos marinhos, obteve-se a substância pura Pirenocine A, isolada do fungo *Penicillium paxilli*, que mostrou-se promissora devido sua capacidade de diminuir a produção de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias em macrófagos estimulados com LPS tanto no protocolo profilático quanto terapêutico.

Palavras-chave: microrganismos marinhos, anti-inflamatório, macrófagos, óxido nítrico, citocinas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extratos isolados de organismos marinhos que apresentaram potencial anti-inflamatório.....	13
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Avaliação da produção de NO após protocolo profilático com extratos promissores.....	14
Figura 2 - Estrutura química da substância pura Pirenocine A isolada de <i>Penicillium paxilli</i>	15
Figura 3 - Avaliação da citotoxicidade da Pirenocine A - Protocolo profilático.....	16
Figura 4 - Avaliação da citotoxicidade da Pirenocine A - Protocolo terapêutico.....	17
Figura 5 - Avaliação da produção de NO após protocolo profilático com Pirenocine A.....	19
Figura 6 - Avaliação da produção de NO após protocolo terapêutico com Pirenocine A.....	20
Figura 7 - Avaliação da produção de TNF- α após protocolo profilático com Pirenocine A.....	22
Figura 8 - Avaliação da produção de TNF- α após protocolo terapêutico com Pirenocine A.....	23
Figura 9 - Avaliação da produção de IL-1 após protocolo profilático com Pirenocine A.....	24
Figura 10 - Avaliação da produção de IL-1 após protocolo terapêutico com Pirenocine A.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

COX - ciclooxigenase

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - dimetilsulfóxido

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IL-1 - interleucina 1

i-NOS - óxido nítrico sintase induzida

LPS - lipopolissacarídeo

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NO - óxido nítrico

SBF - Soro bovino fetal

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO

Muitos são os estímulos capazes de alterar o metabolismo e a homeostase imunológica do hospedeiro induzindo respostas imunes que promovem a inflamação e, portanto, resultam em sintomas como dor, calor, rubor e inchaço. Essa função protetora, quando em cascata, pode levar ao desenvolvimento de doenças como asma crônica, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença inflamatória do intestino, psoríase, entre outras. Além disso, estudos epidemiológicos identificaram a inflamação crônica como principal fator de risco para vários tipos de câncer. Medicamentos anti-inflamatórios utilizados na clínica apresentam muitos efeitos adversos e agentes biológicos são um tratamento de alto custo. Assim, a descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais representa uma alternativa bastante interessante (Gautam & Jachak, 2009).

Os avanços tecnológicos têm auxiliado a purificação, isolamento, caracterização química e patente de um número muito significativo de moléculas, objetos de ensaios clínicos com potencial a serem novos agentes terapêuticos (Newman & Cragg, 2004).

Programas de triagem de drogas contam com bioensaios que permitem identificar os extratos ou derivados sintéticos com propriedades farmacologicamente relevantes (Andersen & Williams, 2000).

O biótopo marinho, que ocupa cerca de três quartos da superfície da Terra, representa fonte extremamente rica e promissora de novos produtos naturais biologicamente ativos por consistir em um conjunto diversificado de formas de vida que ocorre em habitats de extrema variação de pressão, temperatura, salinidade e luminosidade. A capacidade metabólica e fisiológica desenvolvida para sobrevivência nesses ambientes resulta na formação de produtos

naturais fascinantes e estruturalmente complexos, não observados a partir de microrganismos terrestres, uma vez que esses habitats apresentam desafios fisiológicos e ecológicos distintos (Fenical, 1993; Whitehead, 1999).

A vulnerabilidade dos recursos biológicos, que muitas vezes são escassos ou de difícil obtenção a partir de fontes naturais, pode representar um fator limitante para o avanço das pesquisas. No entanto, a síntese química é um recurso que possibilita sua obtenção em maior quantidade, embora a complexidade estrutural de muitas moléculas dificulte sua síntese. Produtos naturais podem ser submetidos à modificação sintética servindo de modelo farmacofórico para orientar a síntese de análogos estruturais simplificados, otimizando o rendimento da sua síntese e suas propriedades farmacêuticas como diminuição da toxicidade sem comprometimento da potência (Wender *et al.*, 2008). A penicilina, metabólito fúngico produzido pelo *Penicillium notatum* é um exemplo. A partir de sua estrutura química, após reconhecimento de seu grupamento farmacofórico β -lactâmico (responsável pela atividade terapêutica), modificações estruturais potencializaram sua eficácia terapêutica, corrigindo sua limitação na fase farmacocinética e ampliando seu espectro de ação (Barreiro & Fraga, 2008).

Desde a descoberta da penicilina, milhares de isolados de *Penicillium sp* estão em programas de bioprospecção e novos metabólitos ativos continuam a ser descobertos a partir desses fungos. Dentre a gama de potenciais terapêuticos descobertos estão: atividade antibacteriana (Li *et al.*, 2003), antifúngica (Trisuwan *et al.*, 2009), quimiopreventiva (Gamal-Eldeen *et al.*, 2009), antidiabética e anti-inflamatória (Lee *et al.*, 2013).

O composto pirenocine A é um candidato terapêutico promissor encontrado em diversas espécies de fungos como *Alternaria sp.* (Tal & Robeson, 1986), *Penicillium*

waksmanii (Amagata *et al.*, 1998), *Curvularia inaequalis* (Kim *et al.*, 2000) e *Penicillium paxilli* (Rukachaisirikul *et al.*, 2007). Sparace *et al.* (1987) isolaram esse composto a partir de *Pyrenochaeta terrestris* e demonstraram sua atividade antibiótica, sendo um agente biostático mais efetivo em bactérias gram-positivas. Hashida *et al.* (2010) obtiveram pirenocine A de *Paecilomyces sp.* e demonstraram sua atividade *in vitro* anti-*Trypanosoma brucei*. Nilanonta *et al.* (2003) relataram atividade antimalárica da pirenocine A isolada de *Verticillium hemipterigenum*. Estudos também demonstraram sua atividade antifúngica (Krohn *et al.*, 2008).

Nesse trabalho, investigou-se o potencial anti-inflamatório da pirenocine A isolada do fungo *Penicillium paxilli*.

1. DESENVOLVIMENTO

2.1. Metodologia

2.1.1. Isolamento e obtenção de extratos

Os extratos isolados de microrganismos marinhos avaliados neste trabalho foram produzidos no Instituto de Química de São Carlos (IQSC), sob a coordenação do Prof. Dr. Roberto Berlinck e avaliados através de testes *in vitro* quanto ao potencial anti-inflamatório no Laboratório de Imunologia da FCFAr sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Alexandra Ivo de Medeiros.

2.1.2. Cultura celular

Em todos os experimentos *in vitro* foram utilizados macrófagos da linhagem RAW 264.7. As células foram cultivadas em garrafas de cultura, em meio DMEM contendo 10% de soro bovino fetal (SBF). Para a realização dos ensaios de avaliação da atividade citotóxica, quantificação de nitrito e para a obtenção do sobrenadante de cultura para posterior dosagem de citocinas, os macrófagos foram plaqueados, em placa de 96 cavidades, numa concentração de 5×10^4 células/poço em meio DMEM contendo 5% de SBF e mantidos em estufa umidificada, a 37°C, 5% CO₂, por 18 horas.

2.1.3. Diluição dos extratos

Tanto os extratos quanto a substância pura liofilizada foram ressuspensos em DMSO e diluídos em DMEM-I (meio de cultura sem adição de SBF). Com relação aos extratos, foram testadas concentrações entre 50µg/mL e 1,56µg/mL, com diluição em base dois. Já no que diz respeito à substância pura, foram avaliadas concentrações menores, entre 0,78µg/mL a 0,02µg/mL. Todos os extratos foram testados quanto ao potencial profilático na atividade

anti-inflamatória, enquanto a substância pura, pirenocine A, foi testada quanto ao potencial profilático e terapêutico.

Protocolo profilático: As células foram tratadas com os extratos/substância pura em diferentes concentrações e incubadas por 90 minutos em estufa, a 37°C, 5% CO₂. Após esse período foram estimuladas com LPS (1µg/mL) e novamente incubadas por um período de 18 horas.

Protocolo terapêutico: As células foram estimuladas com LPS (1µg/mL) e incubadas em estufa, a 37°C, 5% CO₂, por 90 minutos. Em seguida foram tratadas com a substância pura em diferentes concentrações e novamente incubadas por 18 horas.

2.1.4. Quantificação de Nitrito

O óxido nítrico (NO) é instável sendo rapidamente oxidado em nitrito e nitrato. Assim, sua quantificação foi determinada indiretamente através da dosagem de nitrito (NO₂⁻), um dos produtos de degradação primária estável e não volátil, pela reação de Griess. Para isso, a 100µL do sobrenadante de cultura foram adicionados 100µL do reagente de Griess (cloridrato de naftiletilenodiamino 0,1% e sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5%). Para análise quantitativa, adicionou-se à primeira linha da placa uma curva padrão. Através de um leitor de microplacas, foi determinada a densidade ótica (filtro de 540nm), sendo a quantidade de nitrito das amostras correlacionada aos valores de absorbância obtidos na curva padrão.

2.1.5. Atividade citotóxica

Para avaliação da atividade citotóxica dos compostos utilizou-se o método colorimétrico de citotoxicidade pelo brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol 2-il) -2,5-difeniltetrazólio]-MTT (Mosmann, 1983).

Após o período de incubação com os extratos/substância pura e remoção do sobrenadante de cultura para quantificação de nitrito, 160µL de DMEM sem vermelho de fenol e 10µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados aos poços e a placa foi incubada em estufa a 37°C, 5% CO₂, por 3 horas. Após esse período, foram acrescentados 50µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% - HCl 0,01 N por cavidade. A placa foi mantida por uma noite a temperatura ambiente, protegida da luz. A avaliação da citotoxicidade foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de 595 nm.

2.1.6. Quantificação de citocinas

As citocinas TNF- α e IL-1 foram avaliadas em sobrenadantes de cultura pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme instruções do fabricante. A densidade ótica das amostras foi avaliada em leitor de microplacas (filtro de 490 nm) e a concentração das citocinas foi calculada a partir de uma curva padrão feita com a respectiva citocina recombinante.

2.2 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm EPM de três ou mais diferentes experimentos. As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism - InStat 4 e as diferenças significativas foram determinadas pelo uso do teste ANOVA seguido de Bonferroni ($P < 0,05$).

2.3. Resultados e discussão

Macrófagos desempenham um papel importante na defesa do organismo contra infecções. A ativação dessas células apresentadoras de antígenos ocorre através da interação de seus receptores de reconhecimento padrão, como receptores Toll, com padrões moleculares

associados ao patógeno promovendo a produção de derivados reativos de oxigênio e intermediários reativos do nitrogênio, principalmente óxido nítrico (NO); microbicida que destrói patógenos. Macrófagos ativados liberam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento e ativação de células envolvidas na eliminação de patógenos (Chen *et al.*, 2009). A intensidade e duração da resposta imune variam de acordo com o agente patogênico infeccioso e quando excessiva pode ser prejudicial ao hospedeiro, induzindo ao aumento da regulação de enzimas pró-inflamatórias como iNOS e COX, responsáveis pelo aumento nos níveis de óxido nítrico e prostaglandinas; mediadores envolvidos na patogênese de muitas doenças crônicas como esclerose múltipla, Parkinson, Alzheimer e câncer de cólon (Medzhitov, 2007; Heiss *et al.*, 2001). Citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e óxido nítrico produzidos por macrófagos ativados desempenham papel crítico em doenças inflamatórias como sepse e artrite. Por isso, a inibição de citocinas pró-inflamatórias ou da expressão de iNOS e COX-2 em células inflamatórias oferece uma estratégia terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias (Kim *et al.*, 2007).

Para avaliar o potencial anti-inflamatório dos extratos derivados de microrganismos marinhos, utilizou-se como modelo experimental de inflamação o macrófago (RAW 264.7), cuja estimulação com LPS desencadeia a liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias. Inicialmente, foram retestados os 10 extratos mais promissores, previamente avaliados pelo grupo de pesquisa. Todos os extratos apresentados na Tabela 1 foram avaliados quanto à citotoxicidade nas concentrações entre 50µg/mL a 1,56µg/mL e nenhum deles foi considerado tóxico para as células RAW 264.7, uma vez que as mesmas apresentaram 100% de viabilidade celular em todas as condições (dados não mostrados).

Extratos promissores
DR(A) 6
MaAV-F
MaAV-G1
MaFU-1a
MaFU-2
Ma-5 (M3%) H ₂ O/MeOH
Ma-10 (M3%) H ₂ O/MeOH
Ma-T (M3%) H ₂ O/MeOH
Ma-G (M2%) ExOH
Ma-J (Tub) ExMeOH

Tabela 1: Extratos isolados de organismos marinhos que apresentaram potencial anti-inflamatório.

A estimulação dos macrófagos RAW 264.7 com LPS (1 µg/mL) resultou em aumento estatisticamente significativo nos níveis de nitrito quando comparado a células incubadas apenas com meio. O tratamento profilático dos macrófagos com o extrato DR(A)6 (50 a 1.56 µg/mL) inibiu a síntese de nitrito quando comparado com células apenas estimuladas com LPS (Figura 1).

Devido ao resultado promissor nas diferentes repetições desses experimentos (dados não mostrados), o extrato bruto foi fracionado e compostos ativos foram isolados como a substância pura Pirenocine A que foi avaliada através de novos bioensaios como quantificação de óxido nítrico após tratamento terapêutico e quantificação de citocinas pró-inflamatórias.

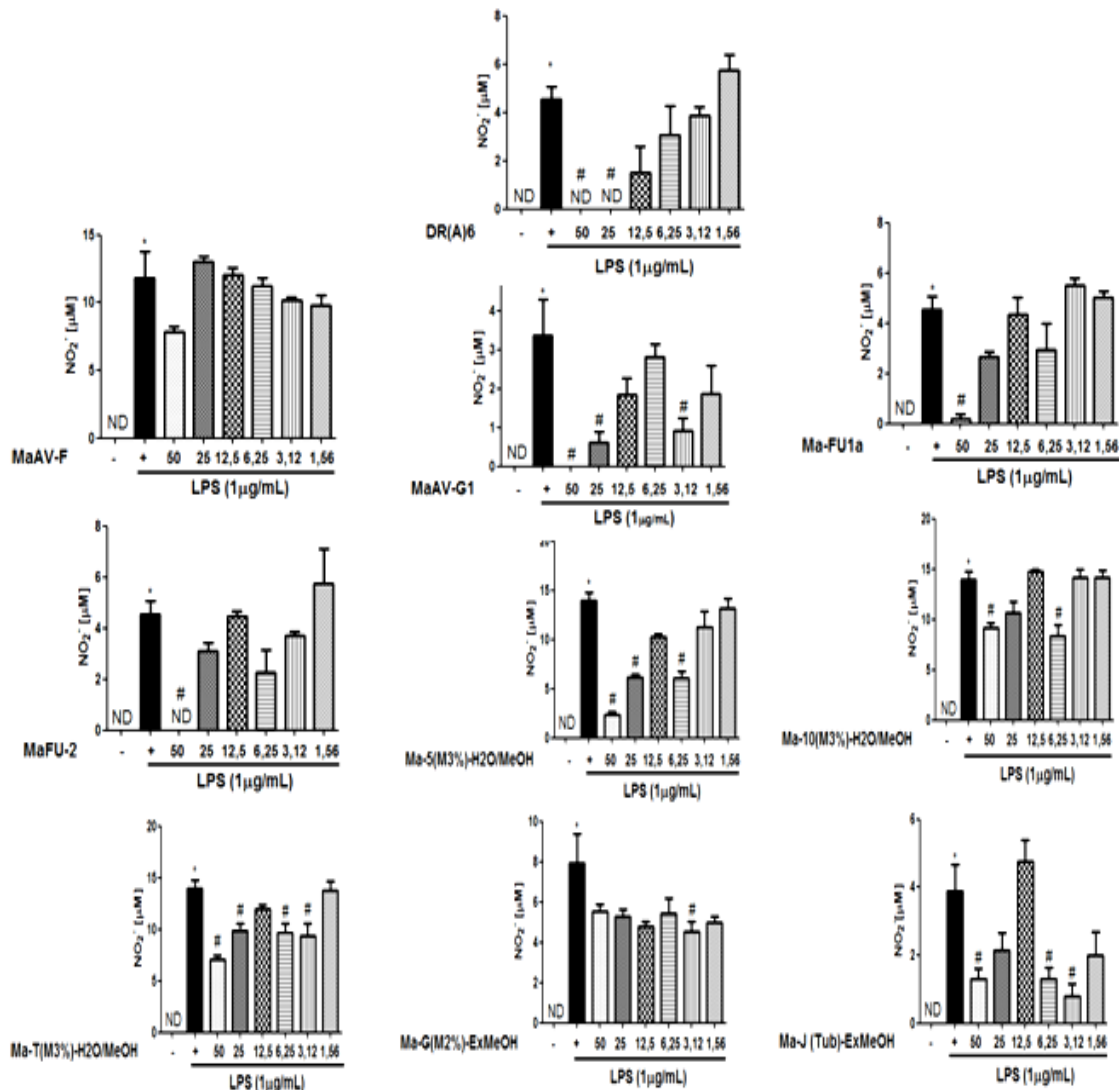


Figura 1: Avaliação da produção de NO após protocolo profilático com extratos promissores. Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com os extratos nas concentrações entre $50 \mu\text{g/mL}$ a $1,56 \mu\text{g/mL}$ por 90 minutos. Em seguida, foram estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) por 18 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado para determinação da concentração de nitrito pelo reagente de Griess. Os resultados correspondem à média \pm EPM de experimento realizado em quadruplicata para cada uma das condições. * $P < 0,05$ vs meio (controle) # $P < 0,05$ vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = não detectável.

A estrutura química da Pirenocine A (Figura 2) foi demonstrada pela primeira vez por Sato *et al.* em 1981 a partir de *Pyrenochaeta terrestris*. A estrutura da substância mostrou-se análoga a Citreopirona, metabólito isolado de *Penicillium citreo-viride biourge* (Niwa *et al.*, 1980).

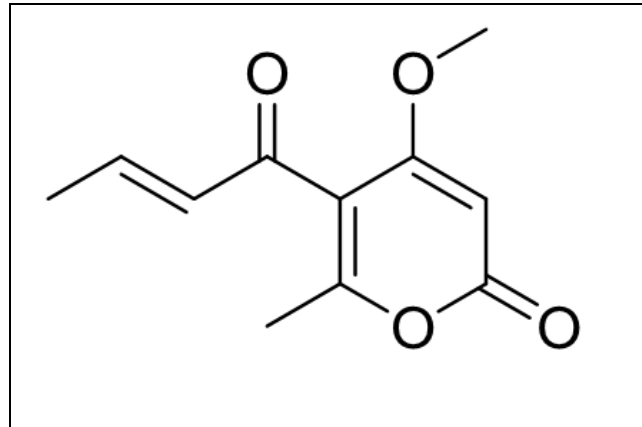


Figura 2: Estrutura química da substância pura Pirenocine A isolada de *Penicillium paxilli*.

A citotoxicidade da Pirenocine A foi avaliada nas concentrações entre 0,78 μ g/mL a 0,02 μ g/mL, na presença de LPS, utilizando tanto o protocolo profilático (Figura 3) quanto o terapêutico (Figura 4) e em nenhum deles foi considerada tóxica para células RAW 264.7, uma vez que as mesmas apresentaram 100% de viabilidade celular em todas as condições.

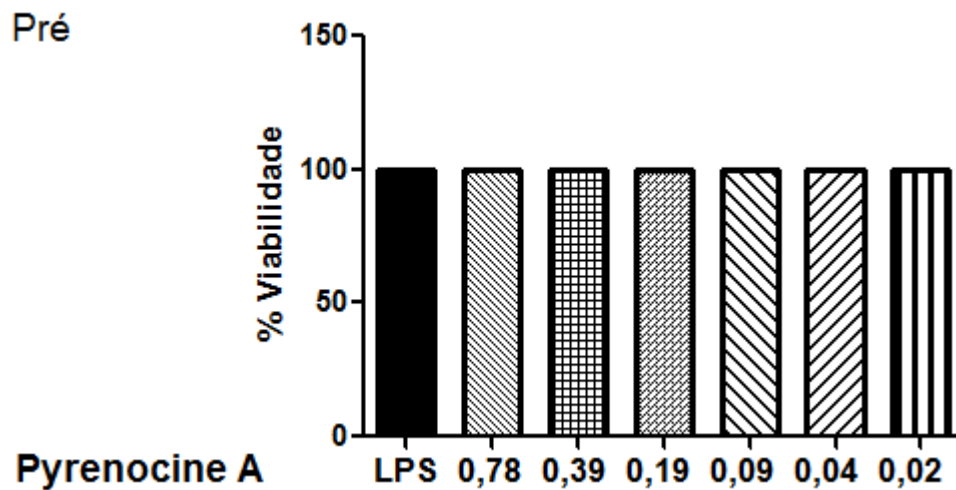


Figura 3: Avaliação da citotoxicidade da Pirenocine A - Protocolo profilático. Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com Pirenocine A nas concentrações entre 0,78µg/mL a 0,02µg/mL por 90 minutos. Em seguida, foram estimulados com LPS (1µg/mL) por 18 horas. Após o tratamento foram submetidos a teste de viabilidade celular por MTT. Os resultados correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições.

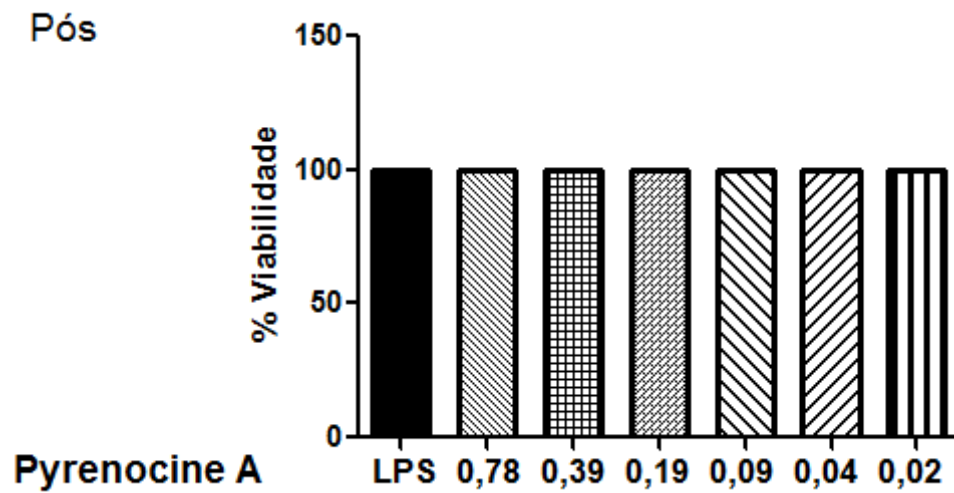


Figura 4: Avaliação da citotoxicidade da Pirenocine A - Protocolo terapêutico. Os macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 90 minutos. Em seguida, foram pós-tratados com Pirenocine A nas concentrações entre 0,78 μ g/mL a 0,02 μ g/mL por 18 horas. Após o tratamento foram submetidos a teste de viabilidade celular por MTT. Os resultados correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições.

A produção induzida de NO pode refletir o grau de inflamação e fornecer uma medida para avaliar o efeito de medicamentos sobre o processo inflamatório (Chen *et al.*, 2001). Como demonstrado nas figuras 5 e 6, a estimulação dos macrófagos com LPS resultou no aumento da síntese de NO quando comparado com células cultivadas apenas com meio (controle negativo). Tanto o pré quanto o pós-tratamento das células com Pirenocine A, promoveram redução na produção de nitrito quando comparadas com as células tratadas apenas com LPS. A substância mostrou-se efetiva no protocolo profilático e terapêutico.

O excesso de óxido nítrico gera desordens que levam à perda da homeostasia. O estresse oxidativo gerado pelo aumento da sua produção endógena pode levar a efeitos de toxicidade induzida que participam na patogênese de doenças. Compostos capazes de sequestrar o radical NO são alternativas preventivas e terapêuticas para essas desordens e podem diminuir a toxicidade induzida por espécies reativas de nitrogênio (RNS), atuando na modulação de processos inflamatórios (Maia *et al.*, 2010).

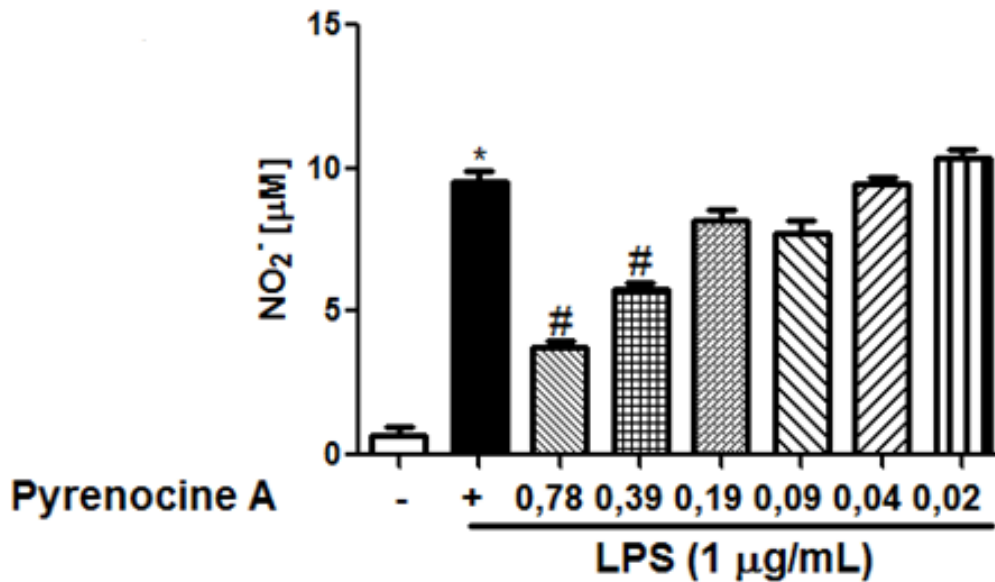


Figura 5: Avaliação da produção de NO após protocolo profilático com Pirenocine A. Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com pirenocine A nas concentrações entre 0,78µg/mL a 0,02µg/mL por 90 minutos. Em seguida, foram estimulados com LPS (1µg/mL) por 18 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado para determinação da concentração de nitrito pelo reagente de Griess. Os resultados correspondem à média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições. *P<0,05 vs meio (controle) #P<0,05 vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni).

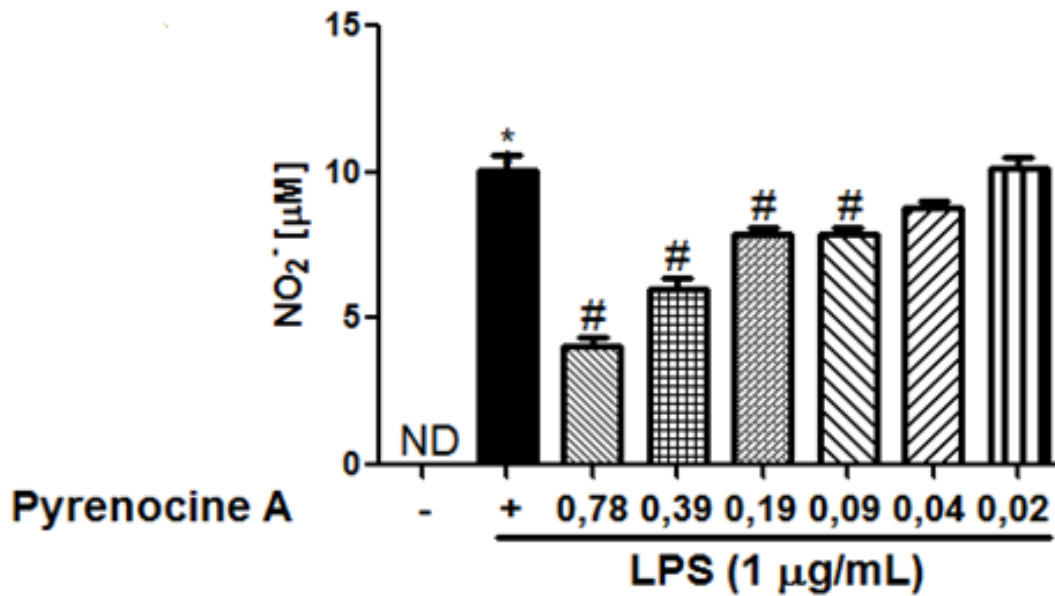


Figura 6: Avaliação da produção de NO após protocolo terapêutico com Pirenocine A. Os macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1µg/mL) por 90 minutos. Em seguida, foram pós-tratados com pirenocine A nas concentrações entre 0,78µg/mL a 0,02µg/mL por 18 horas. O sobrenadante das culturas foi coletado para determinação da concentração de nitrito pelo reagente de Griess. Os resultados correspondem à média ± EPM de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições. *P<0,05 vs meio (controle) #P<0,05 vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = Não detectável.

A constatação que a Pirenocine A diminuiu a produção de óxido nítrico após indução por LPS, conduziu a posterior investigação de seus efeitos na produção de outros mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1).

Citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos ativados exercem uma variedade de atividades biológicas ligadas à imunopatologia de doenças inflamatórias agudas e crônicas. O aumento da liberação de IL-1 durante a inflamação leva a dano celular enquanto o TNF- α desempenha papel na indução e perpetuação da inflamação em reações autoimunes, além de ser considerado promotor de tumor endógeno e mediador central no desenvolvimento do cancro (Yun *et al.*, 2007; Fujiki *et al.*, 2000). Uma lesão tecidual generalizada pode causar liberação maciça dessas citocinas, desencadeando uma série de reações que envolvem vários órgãos, culminando na síndrome séptica. Novas terapias para regular negativamente essa resposta exacerbada reduzindo a liberação dessas citocinas, constituem tratamentos promissores na doença inflamatória (Molloy *et al.*, 1993). Conforme demonstrado nas Figuras 7 a 10, a substância pura Pirenocine A foi capaz de modular a produção desses mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados com LPS, demonstrando potencial imunomodulador profilático e terapêutico.

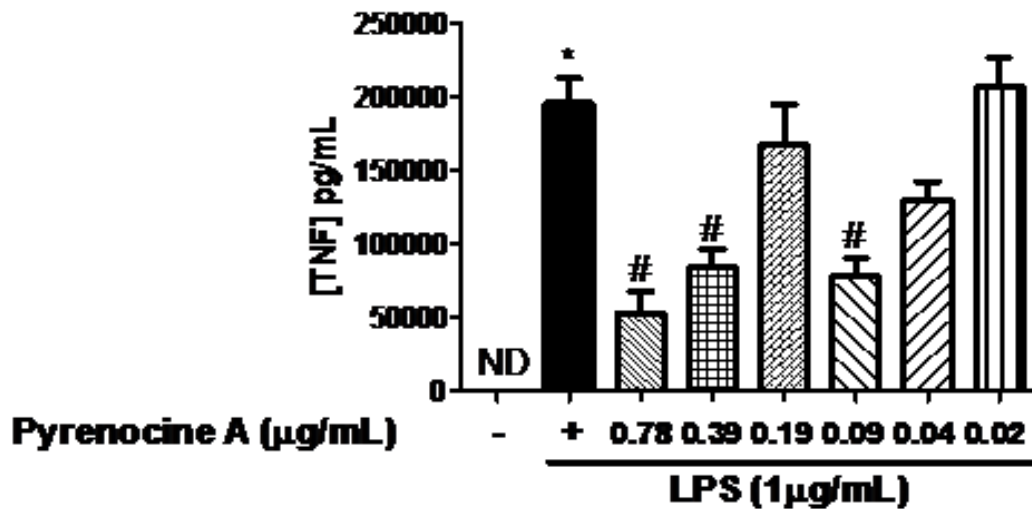


Figura 7: Avaliação da produção de TNF- α após protocolo profilático com Pirenocine A.

Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com pirenocine A nas concentrações entre 0,78 μ g/mL a 0,02 μ g/mL por 90 minutos. Em seguida, foram estimulados com LPS (1 μ g/mL) por 18 horas. O sobrenadante foi coletado para realizar o ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a quantificação de citocinas. Os resultados correspondem à média \pm EPM de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições. *P<0,05 vs meio (controle) #P<0,05 vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = Não detectável.

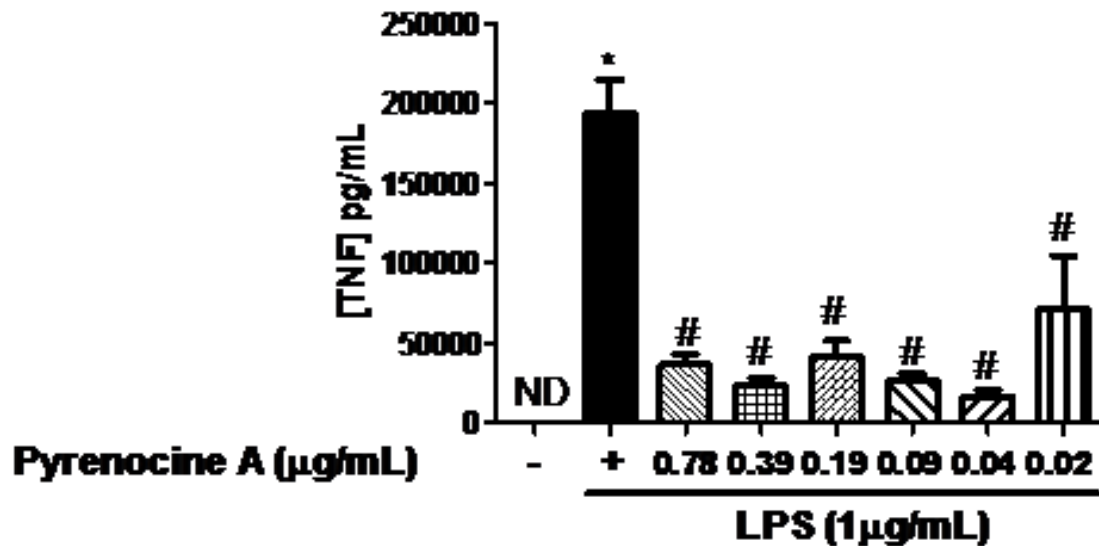


Figura 8: Avaliação da produção de TNF- α após tratamento terapêutico com Pirenocine A. Os macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) por 90 minutos. Em seguida, pós-tratados com pirenocine A nas concentrações entre 0,78 $\mu\text{g/mL}$ a 0,02 $\mu\text{g/mL}$ por 18 horas. O sobrenadante foi coletado para realização do ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a quantificação de citocinas. Os resultados correspondem à média \pm EPM de três experimentos, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições. * $P < 0,05$ vs meio (controle) # $P < 0,05$ vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = Não detectável

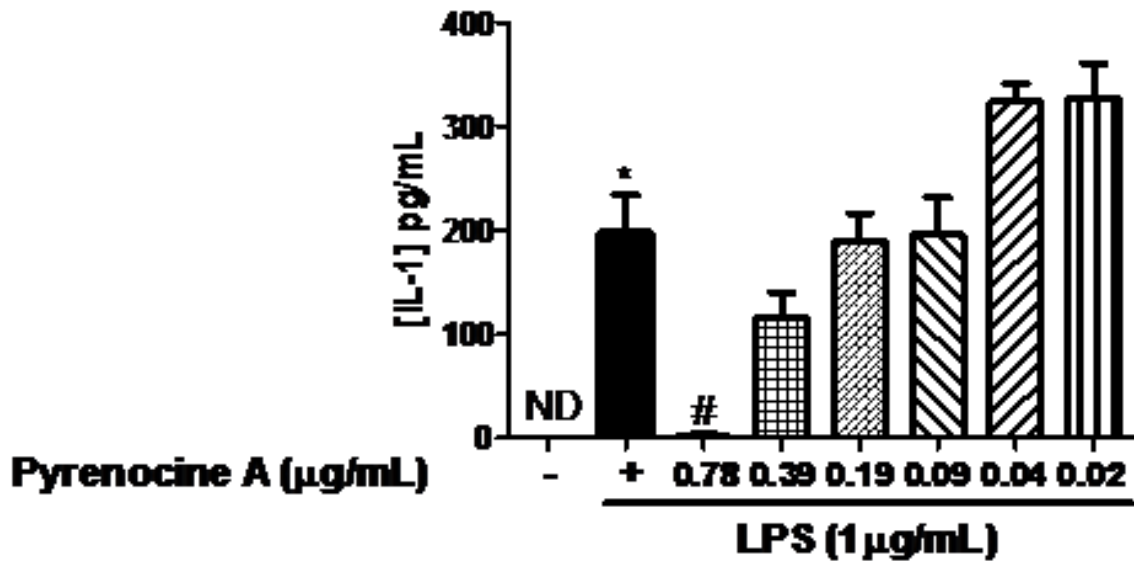


Figura 9: Avaliação da produção de IL-1 após protocolo profilático com Pirenocine A.

Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com pirenocine A nas concentrações entre 0,78μg/mL a 0,02μg/mL por 90 minutos. Em seguida, foram estimulados com LPS (1 μg/mL) por 18 horas. O sobrenadante foi coletado para realizar o ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a quantificação de citocinas. Os resultados correspondem à média ± EPM de três experimentos, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições. *P<0,05 vs meio (controle) #P<0,05 vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = Não detectável.

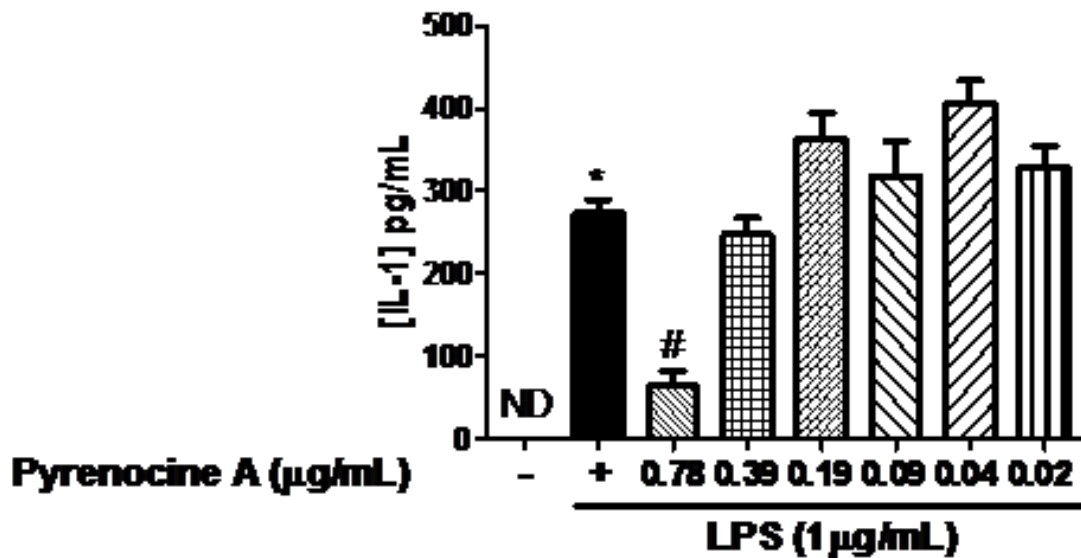


Figura 10: Avaliação da produção de IL-1 após protocolo terapêutico com Pirenocine A.

Os macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com LPS (1 µg/mL) por 90 minutos. Em seguida, foram pós-tratados com pirenocine A nas concentrações entre 0,78µg/mL a 0,02µg/mL por 18 horas. O sobrenadante foi coletado para realizar o ensaio imuno-enzimático (ELISA) para a quantificação de citocinas. Os resultados correspondem à média ± EPM de três experimentos, realizados em quadruplicata, para cada uma das condições. *P<0,05 vs meio (controle) #P<0,05 vs LPS. (ANOVA seguido de Bonferroni). ND = Não detectável

3. CONCLUSÃO

O gênero *Penicillium* é uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos com atividades terapêuticas diversas. Assim investigou-se se o extrato extraído do mesmo gênero de fungo, *Penicillium paxilli*, apresentava atividade imunomoduladora e observou-se que o pré-tratamento com o extrato foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados (Figura 1). O extrato foi então fracionado e isolou-se a substância pura Pirenocine A. Através do teste de viabilidade celular foi possível observar que a substância não foi citotóxica em nenhuma das concentrações testadas, o que excluiu a possibilidade de falsos positivos (Figuras 3 e 4).

Pirenocine A demonstrou seu potencial imunomodulador profilático (Figura 5) e terapêutico (Figura 6) ao diminuir a produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com LPS. A substância também foi capaz de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1, tanto no pré-tratamento (Figuras 7 e 9) quanto no pós-tratamento (Figuras 8 e 10) dos macrófagos ativados. Em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide, a destruição da cartilagem ocorre devido à atividade das metaloproteinases de matriz, enzimas produzidas por macrófagos ativados em resposta a citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α . A regulação da expressão dessas citocinas pode render alvos terapêuticos eficazes na doença inflamatória. (Feldmann *et al.*, 1996). Assim, a substância mostrou-se um potencial fármaco imunomodulador de inflamações agudas e crônicas, sendo um candidato a futuros testes clínicos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amagata, T.; Minoura, K.; Numata, A. Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a *Sargassum* alga. *Journal of Antibiotics*, 51: 432-434, 1998.

Andersen, R.J.; Williams, D.E. Pharmaceuticals from the sea. *In Chemistry in the Marine Environment*. Hester, R.E., and Harrison, R.M. (eds) Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, p. 55–79, 2000.

Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. 2ªed. Porto Alegre, Editora Art Med Ltda, p.108 a 111, 2008.

Chen, Y.C.; Shen, S.C.; Lee, W.R.; Hou, W.C.; Yang, L.L.; Lee, T.J. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem.* ;82(4):537-48, 2001.

Chen, Z.; Soo, M.Y.; Srinivasan, N.; Tan, B.K.; Chan, S.H. Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *Phytother Res.* ;23(8):1116-22, 2009.

Feldmann, M.; Brennan, F.M.; Maini, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 14, 397- 400, 1996.

Fenical, W. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem Rev* 93: 1673–1683, 1993.

Fujiki, H.; Suganuma, M.; Okabe, S.; Sueoka, E.; Suga, K.; Imai, K.; Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor-alpha, and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea--a review. *Cancer Detect Prev.*;24(1):91-9, 2000.

Gamal-Eldeen, A.M.; Abdel-Lateff, A.; Okinoc, T. Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A: a new chromone derivative from algicolous marine fungus *Penicillium* sp. *Environ Toxicol Pharmacol* 28: 317–322, 2009.

Gautam,R.; Jachak, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev.* 29:767-820, 2009.

Hashida, J.; Niitsuma, M.; Iwatsuki, M.; Mori, M.; Ishiyama, A.; Namatame, M.; Tsukashima, A. N.; Nonaka, K.; Ui, H.; Masuma, R.; Otaguro, K.; Yamada, H.; Shiomi, K.; Omura, S. Pyrenocine I, a new pyrenocine analog produced by *Paecilomyces* sp. FKI-3573 *The Journal of Antibiotics*,63, 559–561, 2010.

Heiss, E.; Herhaus, C.; Klimo, K.; Bartsch, H.; Gerhäuser, C. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem.* 276(34):32008-15, 2001.

Kim, J.B.; Han, A.R.; Park, E.Y.; Kim, J.Y.; Cho, W.; Lee, J.; Seo, E.K.; Lee, K.T. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull.* 2007 (12):2345-51, 2007.

Kim, J.-C.; Choi, G. J.; Kim, H. T.; Kim, H.-J.; Cho, K. Y. Pathogenicity and pyrenocine production of *Curvularia inaequalis* isolated from *zoysia grass*. *Plant Disease*, 84, p. 684-688, 2000.

Krohn, K.; Sohrab, M. H.; Draeger, S.; Schulz, B. New pyrenocines from an endophytic fungus. *Natural Product Communications*, 3(10), p.1689-1692, 2008.

Lee, D.S.; Jang, J.H; Ko, W.; Kim, K.S.; Sohn, J.H; Kang, M.S.; Ahn, J.S.; Kim, Y.C.; Oh, H. PTP1B inhibitory and anti-inflammatory effects of secondary metabolites isolated from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. JF-55. *Mar Drugs.*,11(4), p.1409-26, 2013.

Li, X.; Choi, H.D.; Kang, J.S.; Lee, C.O.; Son, B.W. New polyoxygenated farnesylcyclohexenones, deacetoxyyanuthone A and its hydro derivative from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. *J. Nat. Prod.*, 66, p.1499-1500, 2003.

Maia, R.M.; Moura, C.W.N.; Bispo, V.S.; Santos, L.A.; Santana, R.S.; Matos, H.R. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. *Rev. bras. farmacogn.*, 20(4): 489-493, 2010.

Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*.449(7164):819-26, 2007.

Molloy, R.G.; Mannick, J.A.; Rodrick, M.L. Cytokines, sepsis and immunomodulation. *Br J Surg.*;80(3):289-97,1993.

Mosmann,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*,65:55-63, 1983.

Newman, D.J.; Cragg, G.M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod* 67: 1216–1238, 2004.

Nilanonta, C.; Isaka, M.; Kittakoop, P.; Saenboonrueng, J.; Rukachaisirikul, V.; Kongsaree, P.; Thebtaranonth, Y. New diketopiperazines from the entomopathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. *Journal of Antibiotics*,56(7), p. 647-651, 2003.

Niwa, M.; Ogiso, S.; Endo, T.; Furukawa, H.; Yamamura, S. Isolation and structure of citreopyrone, a metabolite of *Penicillium citreo-viride* Biourge. *Tetrahedron Letters*, 21(46):4481-2,1980.

Rukachaisirikul,V.; Kaeobamrung, J.; Panwiriyarat,W.; Saitai, P.; Sukpondma,Y.; Phongpaichit,S.; Sakayaroj, J. A new pyrone derivative from the endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(9), p.1383-1384, 2007.

Sato, H.; Konoma, K.; Sakamura, S.; Furusaki, A.; Matsumoto, T.; Matsuzaki, T. X-ray crystal structure of pyrenocine A, a phytotoxin from *Pyrenochaeta terrestris*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(3):795-7, 1981.

Sparace, S. A.; Reeleder, R. D.; Khanizadeh, S. Antibiotic activity of the pyrenocines. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(4): 327-30, 1987.

Tal, B.; Robeson, D. J. The production of pyrenocine A and B by a novel *Alternaria species*. *Z. Naturforsch. C*, 41, p.1032-1036, 1986.

Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Preedanon, S., and Sakayaroj, J. Lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F44. *Chem Pharm Bull* 57: 1100–1102, 2009.

Yun, K.J.; Min, B.S.; Kim, J.Y.; Lee, K.T. Styraeoside A Isolated from the Stem Bark of *Styrax japonica* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 Cells by Suppressing Nuclear Factor-kappa B Activation *Biol. Pharm. Bull.*, 30(1): 139-144, 2007.

Wender, P. A.; Verma, V. A.; Paxton, T. J.; Pillow, T. H. Function-oriented synthesis, step economy, and drug design. *Acc. Chem. Res.* 41:40-49, 2008.

Whitehead, R. Natural product chemistry. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. B:Org. Chem.* 95: 183–205, 1999.

DADOS FINAIS:

De acordo,

Alexandra Ivo de Medeiros

(Orientadora)

Vivian Sakamoto Obara

(Aluna)