



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Propriedades Antioxidantes, Anti-inflamatórias
e Antinociceptivas do Ácido Chiquímico**

Tese de doutorado

Thallita Kelly Rabelo

Porto Alegre, Julho de 2016

Thallita Kelly Rabelo

**Propriedades Antioxidantes, Anti-inflamatórias
e Antinociceptivas do Ácido Chiquímico**

Tese submetida ao programa de pós-graduação de Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas-Bioquímica.

Orientador:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Porto Alegre, Julho de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Rabelo, Thallita Kelly
Propriedades Antioxidantes, Anti-inflamatórias e
Antinociceptivas do Ácido Chiquímico / Thallita Kelly
Rabelo. -- 2016.
110 f.

Orientador: Daniel Pens Gelain.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Ácido chiquímico. 2. Antioxidante. 3.
Caracterização termoanalítica. 4. SH-SY5Y. 5. Raw
264.7. I. Pens Gelain, Daniel, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**Propriedades Antioxidantes, Anti-inflamatórias
e Antinociceptivas do Ácido Chiquímico**

elaborada por

Thallita Kelly Rabelo

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas-Bioquímica

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia

Esta tese foi realizada no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS), Brasil.

*“O desejo profundo da
humanidade pelo
conhecimento é justificativa
suficiente para nossa busca
contínua.”*

STEPHEN HAWKING.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** “Hoje eu não quero pedir nada, apenas agradecer.

Aos meus **familiares**, em especial meus pais Pitito e Cida, meus irmãos Melca, Manu e Rafael, sobrinhos Luizinho, Dudu, Henrique e Lorena, e meu esposo João Paulo Araújo Gois, que tornaram cada dia dessa jornada mais tranquila. Obrigada por vocês existirem.

A tia **Helena**, uma pessoa de grande coração. A sua ajuda foi fundamental para a realização desse trabalho.

Ao meu Orientador Prof. Dr. **Daniel Pens Gelain**. Pessoa que me deu oportunidade de realizar o meu mestrado e doutorado. Obrigada pela paciência, confiança e conhecimentos transmitidos durante esses seis anos. Principalmente por acreditar, sempre acreditar. Você é um grande exemplo de pesquisador.

Ao Prof. **Dr. José Cláudio**, pelo apoio constante e grandes contribuições neste trabalho.

Aos professores do PPG Bioquímica (UFRGS) e seus funcionários, **Cléia** e os meninos da secretaria, o trabalho de vocês foi essencial para o início e fim desse trabalho.

A minha amiga **Paula Augusti**. Obrigada por sempre estar presente em todos os momentos da minha vida. Foram muitos.

A **Mairim Serafini**, amiga que mesmo longe sempre esteve presente.

Aos Professores, **Adriano Antunes**, **Lucindo Quintans** e **Adriana Gibara**, por toda a dedicação e ajuda na realização deste trabalho.

A toda turma do laboratório 32. Em especial os meus colegas, Juciano Gasparotto, Carlos Eduardo Schnorr e Alfeu Zanotto pela amizade e apoio constante durante todo desenvolvimento da minha pesquisa. As amigas, **Carolzinha**, **Luana**, **Karla**, **Alice**, **Lyvia**, **Moara** e **Nani** pelo companheirismo e excelente ambiente de trabalho que proporcionaram.

Ao CNPq, CAPES, FAPERGS e FAPESSE, que financiaram esse trabalho.

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus
país, Manoel (Pitito) e
Maria Aparecida (Cida)
por toda força e
incentivo.*

*Ao meu esposo João
Paulo, pela paciência e
companheirismo.*

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	4
PARTE I	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Produtos naturais	7
1.2. Fosfato de oseltamivir (Tamiflu®)	11
1.3. Ácido Chiquímico	13
1.4. Propriedades biológicas do ácido chiquímico	16
1.5 Estado redox	17
1.6 Inflamação	22
1.7 Dor	25
1.8 Processamento Patológico da Dor	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
PARTE II	32
CAPÍTULO I	33
In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide- Induced Oxidative Stress	33
CAPÍTULO II	44
Shikimic Acid Inhibits LPS-induced Cellular Pro-inflammatory Cytokines and Attenuates Mechanical Hyperalgesia in Mice	44
PARTE III	83
3. DISCUSSÃO	84
4. CONCLUSÕES	96
5. REFERÊNCIAS	97

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado está organizada em três partes. A **Parte I** é composta por uma introdução e objetivos, retratando os principais assuntos abordados ao longo da elaboração do trabalho, dando ênfase na caracterização de produtos naturais e seus compostos isolados, no ambiente redox das células neuronais e nas condições dolorosas relacionadas a processos pró-inflamatórios. **A Parte II** apresenta dois capítulos na forma de artigos científicos. O primeiro capítulo traz a caracterização físico-química, as propriedades redox do ácido chiquímico, assim como o seu efeito antioxidante diante de um indutor de estresse oxidativo. O segundo capítulo demonstra a atividade anti-inflamatória do ácido chiquímico e o seu efeito antinociceptivo frente à nocicepção mediada por substâncias proinflamatórias. Por fim, a **Parte III** apresenta a discussão geral, de acordo com os resultados de cada artigo científico, conclusões e perspectivas.

RESUMO

A investigação do potencial terapêutico de compostos naturais não tóxicos capazes de prevenir ou reduzir o impacto do estresse oxidativo em doenças inflamatórias diretamente relacionadas a dor tem exercido um papel fundamental no desenvolvimento de novas medicamentos. O ácido chiquímico (ACH) é um composto natural originalmente extraído da *Illicium verum* Hook. f., uma planta medicinal usada no tratamento de doenças inflamatórias. Apesar do ACH ter sido usado como um precursor químico na síntese do antiviral Tamiflu®, o seu potencial como um composto anti-inflamatório e antioxidante, já enraizado pelo uso popular, ainda permanece desconhecido. Baseado nisso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva do ACH em modelos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente as propriedades físico-químicas do ACH foram avaliadas e a atividade antioxidante comprovada, bem como seu potencial de proteger a morte celular induzida por peróxido de hidrogênio em células de neuroblastoma SH-SY5Y. O ACH atenuou a inflamação induzida pelo LPS em macrófagos RAW 264.7, foi capaz de inibir a produção de citocinas (TNF- α e IL- β) e de NO, assim como a ativação das MAPKs (ERK1/2 e P38) induzida pelo LPS, sugerindo que o ACH pode exercer uma atividade anti-inflamatória. *In vivo*, o ACH bloqueou a hiperalgesia mediada pela carragenina (CG), TNF- α , prostaglandinas (PEG2) e dopamina (DA) em camundongos. Esses resultados sugerem que o efeito antinociceptivo do ACH pode ser atribuído, em parte, a sua ação antioxidante e anti-inflamatória, dois mecanismos que sustentam a transdução do sinal doloroso.

Palavras chaves: Ácido chiquímico; antioxidantes; inflamação; nocicepção, SH-SY5Y; RAW 264.7.

ABSTRACT

The investigation of the therapeutic potential of natural non-toxic compounds capable of counteracting oxidative stress associated with inflammatory disease and painful conditions, has been of key interest in drug development. Shiquimic acid (SA) is a nature-derived compound originally extracted from *Illicium verum* Hook. f., a chinese medicinal herb used to treat inflammatory diseases. Even though SA has currently been used as a chemical precursor for synthesis of the antiviral Tamiflu, its potential as an anti-inflammatory and antioxidant compound – already rooted by its popular use - remains unknown until now. Based on that, the aim of this study was to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of SA *in vitro* and *in vivo* models. Initially the physic-chemical properties of SA were evaluated and proven antioxidant activity, as well as its potential to protect hydrogen peroxide-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. SA attenuates LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages, SA was capable of inhibiting TNF- α and IL-1 β cytokines production, NO production as well as LPS-induced activation of MAPKs (p38 and ERK1/2), thus suggesting that SA may exert anti-inflammatory activity. *In vivo*, SA blocked carrageenan, TNF-alpha-, prostaglandin (PE2)-, and dopamine-induced hyperalgesia in mice. These results suggest that anti-nociceptive effect of SA could be attributed, at least in part, to their antioxidant and anti-inflammatory actions, two mechanisms underpinning painful signal transduction.

Keywords: Shikimic acid; antioxidants; inflammation; nociception; SH-SY5Y; RAW 264.7.

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1.	Morfologia do Anis Estrelado <i>Illicium verum</i> Hook. F.	10
Figura 2.	Estrutura química do Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®)	11
Figura 3.	Estrutura química do ácido 3,4,5 trihydroxy-1-ciclohexeno-1-carboxílico	14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP	2,2'-azobis-(2-amidinopropano)
ACH	Ácido chiquímico
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AIC	Ácido 3,4-di-o-isopropilideno-chiquímico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propionico
CAT	Catalase
CG	Carragenina
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Dopamina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERK 1/2	Cinases reguladas por sinais extracelulares
FRAP	Método de redução de ferro
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DCFH-DA	2'7'Diacetato de Diclorofluoresceína
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
ERs	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EMAs	Emergency use authorization
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IC ₅₀	Concentração máxima inibitória 50
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL	Interleucina
IgE	Imunoglobulina E
IVE	Extrato etanólico da I. verum Hook
iNOS	Isoenzima óxido nítrico sintase
FDA	Food and Drug Administration
GPx	Glutathiona peroxidase
GSG	Glutathiona reduzida
HO [•]	Radical hidroxila

KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
LBP	Proteína ligante
LPO	Lipoperoxidação
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
NMDA	N-metil-D-aspartato
NfκB	Fator nuclear kappa B
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitogénos
MAO	Monoamina oxidases
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PGE ₂	Prostaglandina
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
ROO•	Radical peroxila
SOD	Superóxido dismutase
SFB	Soro fetal bovino
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
TBARs	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG/DTG	Termogravimetria/termogravimetria derivada
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TRAP	Potencial antioxidante reativo total
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alpha

PARTE I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos naturais

As plantas medicinais são extensivamente estudadas por apresentarem um elevado valor terapêutico e por serem fontes de uma grande variedade de compostos bioativos, com ampla atividade biológica. Igualmente, representam uma importante fonte de reserva para a síntese de novos metabólitos (Kinghorn *et al.*, 2011). Durante um longo tempo, as plantas medicinais foram aplicadas apenas como uma base empírica, sem o conhecimento mecanicista de suas atividades farmacológicas ou constituintes ativos. Somente no século XVIII Anton von Störck, investigou a atividade farmacológica de ervas venenosas, tais como acônito e colchicum e William Withering mostrou que a *Digitalis purpúrea* (dedaleira) é bastante eficaz no tratamento do edema. De acordo com esses achados foram lançadas as bases para a investigação clínica das plantas medicinais (Atanasov *et al.*, 2015).

No século XIX, o assistente do farmacêutico alemão Friedrich Sertürner isolou uma substância do ópio, a *morphium* (morfina), extraída da papoula (*Papaver somniferum*), que além de apresentar atividade analgésica também atua como indutor do sono (Friedrich and Seidlein, 1984; Trang *et al.*, 2015). Nesse período, foram comercializados os primeiros medicamentos analgésicos obtidos a partir de ervas medicinais, à base do ácido acetilsalicílico (Aspirina®), sintetizado a partir do ácido salicílico extraído da casca de salgueiro (*Salix alba*) (Schmidt *et al.*, 2008).

No Brasil, o primeiro fitomedicamento genuinamente nacional lançado foi o Acheflan® (grupo Aché Laboratórios Farmacêuticos). Esse medicamento foi lançado em 2005 e é constituído por trans-cariofileno, α -humuleno e allo-aromadendreno, compostos isolados a partir do óleo essencial da *Cordia verbenácea*, apresentando propriedades anti-reumática, anti-inflamatória e analgésica (Fernandes *et al.*, 2007).

Segundo dados analisados por Mishra e Tiwari, 2011 entre os anos de 2005 a 2010, a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) aprovaram cerca de 20 medicamentos à base de produtos naturais, entre estes, o Dronabinol (Sativex[®]), Exenatide (Byetta[®]) e Romidepsin (Istodax[®]), prescritos, respectivamente, para o tratamento algico, diabético e oncológico. Dentre estes medicamentos, 7 foram produzidos a partir de produtos naturais, 10 são produtos naturais semissintéticos e 2 utilizam os produtos naturais como base para síntese de novos medicamentos (Mishra and Tiwari, 2011). Esses dados comprovam o aumento da popularidade e utilidade dos produtos naturais, já que eles são uma fonte de compostos bioativos usados no desenvolvimento de novos fármacos (Cragg and Newman, 2013; Newman and Cragg, 2016).

Nesse contexto se encontra a espécie *Illicium verum* Hook. f. (*I. verum* Hook), uma planta aromática perene, conhecida popularmente como anis estrelado - (Figura 1) (Wang *et al.*, 2011). Esta espécie é nativa do sudoeste da China e do Vietnã e distribuída principalmente nas áreas tropicais e subtropicais da Ásia (Chempakam e Balaji, 2008). Os frutos dessa espécie são utilizados na indústria de alimentos como especiarias e na preparação de bebidas (Wang *et al.*, 2011). Na tradicional medicina chinesa são utilizados principalmente no tratamento de processos inflamatórios e dores reumáticas (Editorial Committee of Chinese Pharmacopoeia, 2010; Chouksey *et al.*, 2010).

Os extratos e o óleo essencial da *I. verum* Hook são conhecidos por apresentar uma ampla gama de atividades farmacológicas, como antifúngica (Huang *et al.*, 2010); antibacteriana (Yang *et al.*, 2010); antioxidante (Guo *et al.*, 2008; Bi *et al.*, 2015); anti-inflamatória (Huang *et al.*, 2010; Sung, Kim, *et al.*, 2012; Sung, Yang, *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014) e analgésica (Nakamura *et al.*, 1996).

Guo e colaboradores (2008), avaliaram a atividade antioxidante, a partir de extratos liofilizado do fruto da *I. verum* Hook utilizando os métodos de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e método de redução de ferro (FRAP). Os resultados obtidos foram de DPPH (44.97 $\mu\text{g/mL}$) e FRAP (520.39 $\mu\text{mol/g}$). Esses resultados demonstram a capacidade desse extrato em sequestrar radicais livres e reduzir oxidantes, atuando assim como um antioxidante (Guo *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram observados por Bi e colaboradores (2015).

Sung, Yang e colaboradores (2012) avaliaram o efeito anti-inflamatório e antialérgico de extratos etanólico da *I. verum* Hook (IVE), em modelo *in vitro* e *in vivo*. O IVE (50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a secreção da histamina e de mediadores inflamatórios, tais como interleucina 1 (IL-4), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) em mastócitos MC/9 ativados pelo composto químico 48/80 (p-metoxi-N-metilfenetilamina), por forbol 12-miristato 13-acetato e ionóforo de cálcio A23187. Além disso, em modelo animal de dermatite atópica o IVE (1 mg/kg) reduziu significativamente a dermatite, a espessura da orelha, e os níveis séricos de imunoglobulina E (IgE), histamina, IL-6, e molécula de adesão intercelular (ICAM-1) (Sung, Yang, *et al.*, 2012).

Posteriormente, outro estudo do mesmo grupo avaliou a capacidade do IVE em atenuar a secreção do TNF- α e expressão de quimioquinas e citoquinas em queratinócitos humanos desafiados com interferon gama (IFN-g). O efeito anti-inflamatório do IVE (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) foi associado a capacidade do IVE em inibir o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1) e das proteínas cinases ativadas por mitogénos (MAPK). Estes resultados demonstram os potenciais efeitos terapêuticos do IVE em processos inflamatórios (Sung, Kim, *et al.*, 2012; Sung, Yang, *et al.*, 2012).

Adicionalmente, o potencial terapêutico da *I. verum* Hook foi associado aos seus constituintes químicos, tais como monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, lignanas, flavonóides e ácido chiquímico (ACH) (Liu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011).

As atividades farmacológicas apresentadas por esses compostos, principalmente o ACH, vem despertando o interesse de diferentes áreas do conhecimento científico (Liu *et al.*, 2016). Este composto é utilizado na síntese do medicamento antiviral fosfato de oseltamivir (Tamiflu[®]), lançado em 1999 pela empresa Hoffmann - La Roche (Roche).



Figura 1. Anis Estrelado *Illicium verum* Hook. F. (Wang *et al.*, 2011)

1.2. Fosfato de oseltamivir (Tamiflu®)

O Tamiflu® - (Figura 2), foi um dos primeiros antivirais desenvolvido por um processo de desenho racional de drogas. Além disso, é considerada uma pró-droga que será biotransformada dentro do organismo em carboxilato de oseltamivir (Kim *et al.*, 1997). Entre 1997 e 2002 a empresa Roche realizou um extenso estudo em relação à utilização do Tamiflu®, na profilaxia e tratamento da gripe (H1N1) dos tipos A e B (Moscona, 2005; Ghosh *et al.*, 2012; Clinch and Smith, 2015). Uma das estratégias usadas em pacientes acometidos com o vírus foi a utilização de duas classes de drogas antivirais: os bloqueadores de canais de íon M2 (amantadina e rimantadina) e inibidores de neuraminidase, como o fosfato de oseltamivir, sintetizado a partir do ACH (Bright *et al.*, 2006). Apesar da existência desses dois tratamentos, somente os inibidores de neuraminidase foram recomendados pelas autoridades de saúde, visto que pacientes portadores do vírus H1N1 apresentaram resistência frente à amantadina (Bright *et al.*, 2006; Schünemann *et al.*, 2007).

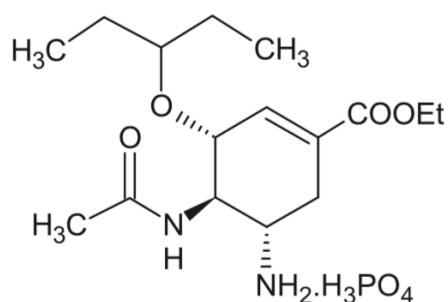


Figura 2. Estrutura química do Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®) (Ghosh *et al.*, 2012).

A neuraminidase, molécula alvo do Tamiflu®, auxilia no movimento das partículas virais através do trato respiratório superior (Kim *et al.*, 1997). Essa

glicoproteína de membrana cliva os resíduos dos receptores de ácido siálico e facilita respectivamente a liberação e invasão do vírus nas vias respiratórias superiores e em novas células (Von Itzstein, 2007). A inibição da neuraminidase limita o ciclo de replicação viral, impedindo assim a propagação da doença. É importante ressaltar que esse fármaco não impede a contaminação com o vírus e o tratamento deve ser iniciado logo após a infecção, já que a replicação viral atinge seu pico entre 24 e 72 horas após o início da doença (Moscona, 2005; Widmer *et al.*, 2010).

Em outubro de 1999, a FDA aprovou o uso desse medicamento antiviral por via oral na dosagem de 75 mg duas vezes ao dia por um período de 5 dias (Treanor *et al.*, 2000). O mesmo regime de tratamento foi aplicado durante a pandemia de 2009 a 2010 do vírus H1N1 (Kamal *et al.*, 2015). Entretanto, durante esse período a FDA emitiu a Emergency Use Authorization (EUAs), que autorizou o uso do Tamiflu® no tratamento e profilaxia desse vírus sem a otimização da dose, devido ao surgimento extremamente agressivo desse tipo de cepa viral durante essa pandemia (FDA, 2009). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008) o Tamiflu® na dosagem de 150 mg foi eficiente no tratamento da gripe humana, em particular das estirpes altamente agressivas, tais como a H5N1 (Update: WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, November 2003-May 2008, 2008).

Devido a grande importância do Tamiflu® na saúde humana e no controle de uma possível pandemia causada pelo vírus da gripe aviária, muitos países adotaram planos para estocar uma quantidade significativa deste composto em caso de um eventual surto de gripe (Farina and Brown, 2006). Como resultado, as preocupações têm sido levantadas sobre a capacidade do processo de produção existente para atender à demanda mundial (Laver and Garman, 2001).

Apesar da aprovação inicial, a Roche continuou a realizar todos os estudos

complementares, visando expandir o corpo de evidências que comprovam a segurança e a eficácia clínica desse medicamento (Clinch and Smith, 2015). Entretanto, estudos adicionais acerca dos efeitos do Tamiflu[®] (incluindo efeitos tóxicos) ainda precisam ser realizados.

1.3. Ácido Chiquímico

Isolado em 1885, o ácido chiquímico α -isômero (3R,4S,5R - ácido 3,4,5 trihydroxy-1-ciclohexeno-1-carboxílico - (-), ACH) é composto por um anel aromático com seis átomos de carbono, três carbonos quirais e um grupo funcional ácido carboxílico (Figura 3).

Originalmente extraído da *I. verum* Hook. F., o ACH caracteriza-se por ser uma substância cristalina branca com ponto de fusão de 187° C e altamente solúvel em água (180 g/L à 20 °C) (Bochkov *et al.*, 2012). O ACH é um composto levorrotatório com uma rotação específica $[\alpha] = -157^\circ \times \text{cm}^3/\text{g} \times \text{dm}^{-1}$, apresenta um grande número de isômeros descritos, porém apenas o α -isômero é a estrutura que apresenta as atividades farmacológicas (Mirza and Harvey, 1991; Reyes-Chilpa *et al.*, 2004; Brazdova *et al.*, 2009).

O ACH é um hidrocarboneto aromático, intermediário chave na biossíntese da via do chiquimato de aminoácidos aromáticos essenciais (L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano), lignina e a maioria dos alcalóides de plantas e microorganismos (Bochkov *et al.*, 2012). Além de ser encontrado nas folhas e frutos de grande variedade de plantas e em quantidade limitada em fungos e bactérias, o ACH atua como precursor do ácido cinâmico e de flavonoides, tais como: antocianinas, flavonas, flavonóis e taninos. É válido salientar que a presença do ACH em plantas e

microorganismos é necessária para assimilação de ácidos fólico, vitaminas e alcalóides (Wang *et al.*, 2011).

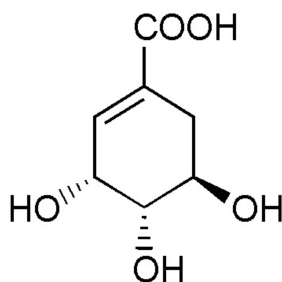


Figura 3. Estrutura química do ACH (Bochkov *et al.*, 2012).

A atividade antiviral do ACH é de grande importância socioeconômica, uma vez que esse é o principal composto utilizado na síntese do Tamiflu®. Em 2005, a ameaça de uma grande pandemia de gripe humana, extremamente agressiva causada pelo vírus da gripe H5N1, ocasionou uma considerável crise mundial (Moscona, 2005). Em virtude da elevada taxa de mortalidade, em torno de 60%, causada pelo vírus H5N1, as autoridades de saúde aumentaram à busca por novas estratégias utilizadas no tratamento e controle do vírus, em caso de uma nova pandemia (Gambotto *et al.*, 2008).

Atualmente, cerca de dois terços do ACH usados pelas indústrias farmacêuticas na produção do Tamiflu® ainda são provenientes de alguma espécie de planta, principalmente do gênero *Illicium* (Ghosh *et al.*, 2012). Entretanto, o isolamento desse composto a partir de plantas apresenta um baixo rendimento e, por se tratar de um produto natural, o mesmo sofre influência das condições climáticas (Bradley, 2005; Atanasov *et al.*, 2015).

Outro ponto que deve ser considerado diz respeito aos processos de extração e purificação a partir das sementes da *I. verum* Hook, os quais resultam em elevados custos de produção para as indústrias farmacêuticas (Bradley, 2005; Ghosh *et al.*,

2012). Dos três métodos de obtenção mais estudados na literatura (extração vegetal, síntese química e fermentação microbiana), o processo de fermentação utilizando microrganismos foi considerado o mais simples, eficiente e viável para aumentar a produção do ACH (Bochkov *et al.*, 2012; Estévez and Estévez, 2012; Martínez *et al.*, 2015). Sendo assim, diversas manipulações metabólicas e genéticas foram conduzidas principalmente em *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia coli* a fim de aumentar a produção de ACH nessas cepas (Liu *et al.*, 2014; Tripathi *et al.*, 2015).

1.4. Propriedades biológicas do ácido chiquímico

Por se tratar de um composto bioativo que apresenta diversas atividades farmacológicas, o ACH tem se tornado o foco de atenção de muitos pesquisadores. Estudos demonstraram que o efeito anti-inflamatório do ACH está associado à capacidade dessa substância em inibir a atividade das enzimas ciclooxigenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2) em modelo *in vitro* (El-Seedi *et al.*, 2003). Da mesma forma, Huang e colaboradores (2002) demonstraram que a administração oral de outro derivado do ACH, o (3R, 4S, 5R) -3,4,5-trimetoxi-1- ciclo-hexanocarboxílico (ATC) na concentração de 12.5 e 50 mg/Kg, diminui a agregação plaquetária e reduz a formação de coágulos sem alterar o equilíbrio homeostático sistêmico em modelo animal (Huang *et al.*, 2002).

Segundo Bertelli e colaboradores (2008), a combinação de ACH e quercetina regula a secreção de interleucinas IL-6 e IL-8, controlando assim, o recrutamento e ativação dos linfócitos e comprovando o efeito imunomodulatório desse composto (Bertelli *et al.*, 2008).

Adicionalmente, estudos *in vivo*, usando um modelo animal de colite, induzido por ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS), a administração do ácido 3,4-di-*o*-isopropilideno-chiquímico (AIC) um derivado do ACH apresentou um efeito clínico significativo sobre a colite experimental em ratos, provavelmente devido ao efeito antioxidante e anti-inflamatório apresentado por essa substância, já que a mesma inibiu o metabolismo do ácido araquidônico e modulou a expressão do NF- κ B (Xing *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado que o AIC diminui os níveis de peroxidação lipídica e de espécies reativas de oxigênio (EROs) em cérebro de ratos com lesão isquêmica, comprovando assim, o efeito antioxidante apresentado por esse

derivado do ACH (Ma *et al.*, 2003).

De acordo com Manna *et al.*, (2014), o concentrado de água de coco (200 a 400 µg/mL) bem como seu fitoconstituente ACH (40 µM) foram capazes de reverter danos oxidativos induzidos por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em hepatócitos isolados de camundongo, possivelmente através da inibição do fator nuclear kappa B (NF-κB) (Ma *et al.*, 2003). Essa atividade redox protetora provavelmente envolve a supressão de fatores de transcrição sensíveis ao balanço redox que estão diretamente relacionados à fosforilação de proteínas de sinalização, bem como as MAPKs (Manna *et al.*, 2014).

1.5 Estado redox

Os sentidos das reações redox que ocorrem no ambiente intracelular são determinados pelo estado de equilíbrio entre os oxidantes (espécies reativas- (ERs)- e radicais livres) e os antioxidantes (enzimáticos e não-enzimáticos). As células são continuamente ameaçadas por danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) que são produzidas durante o metabolismo oxidativo fisiológico (Espinosa-Diez *et al.*, 2015). Todavia, a produção excessiva das EROs e ERNs ou a sua eliminação ineficiente leva respectivamente ao estresse oxidativo e nitrosativo. Esta condição é potencialmente perigosa, pois pode alterar a resposta inflamatória e induzir modificações de lipídeos e proteínas, danos ao DNA, apoptose ou transformação de células cancerígenas (Valko *et al.*, 2001; Ridnour *et al.*, 2004). Entretanto, baixas concentrações dessas ERs atuam como moléculas sinalizadoras que estão envolvidas na resposta mitogênica ou na defesa contra agentes infecciosos (Valko *et al.*, 2007).

As funções apresentadas pelas ERs podem ser associadas à presença do oxigênio (O₂), essencial para diversos processos fisiológicos. O seu principal papel na sobrevivência celular está associado ao seu alto potencial redox, o que o torna um excelente agente oxidante capaz de receber facilmente elétrons a partir de substratos reduzidos (Halliwell, 2006b). Sendo assim, cada tecido apresenta uma diferente demanda de O₂ em função das necessidades metabólicas. Desta maneira, o sistema nervoso central (SNC) é responsável por mais de 20% do consumo total de O₂, o que o torna mais suscetível a danos oxidativos (Halliwell, 2006a; Sultana *et al.*, 2013). Entretanto, apesar do elevado consumo de O₂ estar associado a possíveis danos teciduais, o estado de hipóxia também pode induzir efeitos deletérios, incluindo a neurotoxicidade (Koch *et al.*, 2013).

Atualmente o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de diversas doenças, incluindo: câncer, processos autoimunes, inflamatórios e neurodegenerativos, como a doença de Parkinson (DP), a doença de Alzheimer, entre outras (Valko *et al.*, 2007; Piechota-Polanczyk and Fichna, 2014; Kamat *et al.*, 2016). A relação do estresse oxidativo com as doenças neurodegenerativas é um dos assuntos mais abordados pela comunidade científica.

O fato do cérebro ser um dos maiores alvos do estresse oxidativo, possivelmente está relacionado às características únicas apresentadas por este órgão, tais como consumo de O₂ cerca de 10 vezes maior que os outros tecidos e insuficiência das defesas antioxidantes (Halliwell, 2006a; Sultana *et al.*, 2013). Desta maneira, o sistema nervoso central (SNC) necessita de alternativas de defesa antioxidante principalmente de origem exógena. Outra razão que comprova a necessidade de uma maior proteção antioxidante para o cérebro é a elevada quantidade de mitocôndrias, que abrigam a maior parte das vias oxidativas e são

responsáveis pelo aumento da produção de radicais livres e EROs (Adam-Vizi, 2005; Kudin *et al.*, 2005). Durante a ativação da fosforilação oxidativa mitocondrial ocorre uma liberação aumentada do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que por sua vez sofre a ação da enzima superóxido dismutase (SOD) produzindo H_2O_2 e alterando o balanço redox das células neuronais (Malinska *et al.*, 2010).

Esse aumento das EROs na mitocôndria também pode ser gerado por diversas enzimas incluindo a aconitase e o complexo α -cetoglutarato desidrogenase. A presença das monoamina oxidases (MAO), como a flavoenzima monoamina oxidase A e a monoamina oxidase B desempenham um papel muito importante no catabolismo oxidativo dos neurotransmissores incluindo a serotonina, dopamina e epinefrina, resultando na produção aumentada de H_2O_2 (Hrometz *et al.*, 2004; Gal *et al.*, 2005; Edmondson *et al.*, 2009). A dopamina e seus precursor (L -DOPA), bem como a serotonina e norepinefrina, sofrem auto-oxidação, contribuindo assim com o aumento do $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , quinonas e semiquinonas que induzem a diminuição dos níveis de glutathione reduzida (GSH) (Shih *et al.*, 1999; Wang and Michaelis, 2010). Além do aumento do H_2O_2 decorrente da disfunção mitocondrial e do metabolismo de neurotransmissores, a presença de elevadas quantidades de ferro no tecido neuronal torna favorável a Reação de Fenton, onde o H_2O_2 é convertido em radical hidroxil ($HO\bullet$), uma das ERs mais deletérios aos sistemas biológicos (Zecca *et al.*, 2004; Halliwell, 2006a; Gutteridge and Halliwell, 2010).

É válido salientar que ferro e o cobre são cofatores essenciais para muitas proteínas que estão envolvidas na função normal do tecido neuronal. Entretanto, alterações no metabolismo desses metais de transição, contribuem para o aumento do dano oxidativo, agregação de proteínas, principalmente α -sinucleína, assim como a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) nas células neuronais

(Zecca *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2016). Esses metais de transição também aceleram a lipoperoxidação (LPO), através da reação de Fenton (Halliwell, 2006a). Sendo assim, o aumento da formação de radicais livres e ERs associado à excitotoxicidade e inflamação contribuem para a progressão das doenças neurodegenerativas (Valdiglesias *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

Todas as reações citadas anteriormente somadas aos altos níveis de ácido graxos poli-insaturados nas membranas neuronais contribuem para iniciação e propagação do processo de LPO. Esse processo facilita a formação de radicais livres que atacam diretamente as membranas neuronais e induzem a oxidação de produtos dos ácidos graxos poli-insaturados, especialmente o ácido araquidônico e o ácido docosaexaenóico (Halliwell, 2006a; Sultana *et al.*, 2013). A peroxidação desses compostos produz uma série de produtos secundários, como o malondialdeído, 4-hidroxinonenal e acroleína que afetam diretamente a homeostase neuronal contribuindo assim para a disfunção cerebral (Perluigi *et al.*, 2012; Spickett, 2013).

O óxido nítrico (NO^{*}) desempenha um papel crucial nos processos fisiológicos e patológicos do SNC (Bredt, 1999). Entretanto, a produção excessiva de NO^{*} está envolvida em processos de neuroinflamação e neurodegeneração (Agostinho *et al.*, 2010; Hsieh and Yang, 2013). Durante esses processos, a presença de células do sistema imune inato e de citocinas pro-inflamatórias, induz a ativação da micróglia e astroglia (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Benner *et al.*, 2008). Consequentemente, ocorre o aumento dos níveis de O₂^{-*}, H₂O₂ e citocinas, tais como interleucina 1 (IL-1 β), IL-6 e TNF- α (Halliwell, 2006a; Frank-Cannon *et al.*, 2009). Por um processo de retroalimentação, estas citocinas atuam na microglia induzindo a produção da isoenzima óxido nítrico sintase (iNOS), que por sua vez aumenta a produção de NO^{*} (Agostinho *et al.*, 2010). Ademais, esses efeitos associados a alterações na atividade

das mitocôndria neuronais induz uma produção excessiva de $O_2^{\cdot -}$ que reage com NO^{\cdot} presente no SNC levando a formação de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot -}$), uma molécula oxidante que pode agir sobre resíduos de tirosina, induzir a LPO e causar danos no DNA (Bolaños *et al.*, 2009; Yuste *et al.*, 2015).

A longa duração de vida e o fato dos neurônios não se dividirem, podem contribuir para a vulnerabilidade seletiva das diferentes populações neuronais (Gandhi and Abramov, 2012). Além disso, durante o envelhecimento ocorre um desequilíbrio das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, com decorrente aumento do dano oxidativo e nitrosativo neuronal (Camougrand and Rigoulet, 2001; Romano *et al.*, 2010). Outra hipótese interessante para a vulnerabilidade do cérebro, e que durante o processo de envelhecimento os neurônios dopaminérgicos da substância negra “*pars compacta*”, apresentam um mecanismo autônomo que utilizam canais de cálcio, resultando em oscilações intracelulares do cálcio (Wang and Michaelis, 2010). Essas alterações contribuem para o aumento da disfunção mitocondrial, acompanhada pela diminuição da taxa de transferência de elétrons e do potencial de membrana, resultando em um aumento de radicais livres e ERs (Navarro and Boveris, 2010; Hroudová *et al.*, 2014).

De acordo com os dados citados acima, as EROs e ERNs podem contribuir no processo de toxicidade neuronal e estão associadas as condições neuropatológicas agudas e crônicas. Além disso, o H_2O_2 produzido durante o processo redox, além de ser altamente solúvel, difusível e capaz de atravessar a membrana celular é utilizado como fonte exógena de EROs (Zhu *et al.*, 2005). Além desses efeitos, estudos indicam que o H_2O_2 induz alterações morfológicas com subsequente morte celular neuronal por apoptose no sistema nervoso central (SNC) (Whittemore *et al.*, 1995). Sendo assim, o modelo *in vitro* de lesão neuronal provocada pelo H_2O_2 é considerado

adequado para o estudo do processo de neurodegeneração associada ao estresse oxidativo, assim como, avaliar o potencial neuroprotetor de novas terapias farmacológicas.

Devido à grande dificuldade de encontrar um modelo adequado e acessível para análise das doenças neurodegenerativas associadas às alterações redox do SNC, diversos estudos vêm utilizando amplamente a linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) como modelo *in vitro* para as análises experimentais relacionadas a processos, como o de neurodegeneração, neuroadaptativo, neurotoxicidade e principalmente neuroproteção (Uberti *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Koppula *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2012; Bavari *et al.*, 2016).

1.6 Inflamação

A inflamação é uma resposta adaptativa que pode ser desencadeada por estímulos nocivos e pela presença de condições, tais como infecção e lesão tecidual. O processo de inflamação é um complexo mecanismo de defesa, onde os leucócitos presentes nos vasos migram para os tecidos danificados, visando eliminar ou controlar os agentes causadores da infecção ou lesão (Medzhitov, 2008).

A resposta inflamatória é geralmente iniciada através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), onde se ligam os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Uma das famílias de PRRs, expressa pelas células do sistema imune inato, como monócitos, macrófago residentes e células dendríticas, são os receptores *Toll-like* (TLR) (Thompson *et al.*, 2011). Esses receptores são estimulados principalmente por moléculas estruturais expressas por bactérias, vírus e fungos (Lu *et al.*, 2008).

Um dos TLRs, o receptor TLR4 representa um importante papel no processo inflamatório (Newton and Dixit, 2012). Evidências sugerem que este receptor pode ser estimulado diretamente ou indiretamente por uma ampla variedade de PAMPs e por moléculas endógenas, como a proteína HSP70, o ácido hialurônico e a β -defensina (Asea *et al.*, 2002; Biragyn *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008). Entre essas moléculas, o lipopolissacarídeo (LPS), um dos componentes imunomodulatórios provenientes da membrana de bactérias Gram-negativas, tem sua ação mediada através da interação com o receptor TLR4 (Lu *et al.*, 2008).

A interação indireta do LPS com o TLR4 ocorre através de proteínas, como a proteína ligante (LBP), CD14, proteína de diferenciação mielóide 2, entre outros (Lakhani and Bogue, 2003; Aziz *et al.*, 2013). Após esta interação, o LPS induz o aumento da expressão de genes envolvidos na produção de mediadores pró-inflamatórios primários, tais como as citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), EROs, ERNs e a enzima COX-2 (Mogensen, 2009; Joo *et al.*, 2014). Esta ação ocorre principalmente nos macrófagos, células que atuam na resposta imune inata e adaptativa. Sabe-se que essas células exibem diferentes respostas imunes frente ao patógeno, como fagocitose, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (Murray and Wynn, 2011).

As linhagens de macrófagos imortalizadas, por apresentarem um comportamento semelhante aos macrófagos primários, são amplamente empregadas na avaliação da resposta biológica e patológica do processo inflamatório (Blasi *et al.*, 1987). As células da linhagem RAW 264.7 são macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de Leucemia Abelson, obtidos a partir da ascite de ratos BALB/c (Abelson and Rabstein, 1970; Raschke *et al.*, 1978). Esta linhagem representa um dos modelos *in vitro* mais utilizados na análise da ação e do mecanismo molecular responsável pela atividade anti-inflamatória de diversos composto isolados

de plantas (Seo *et al.*, 2014; Chun *et al.*, 2016; Lampiasi and Montana, 2016). As RAW 264.7 apresentam uma atividade responsiva ao LPS e, por apresentar uma alta imunoatividade, o LPS tem sido utilizado em diversos modelos de inflamação *in vivo* e *in vitro* com o objetivo de compreender o seu papel na patofisiologia da inflamação (Beutler and Rietschel, 2003; Waseem *et al.*, 2008; Aziz *et al.*, 2013).

Por causa dessa ligação entre macrófagos, EROs, ERNs e inflamação, a ativação dos nociceptores responsáveis pela manutenção da dor, tem se tornado uma importante área de interesse.

1.7 Dor

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor foi definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos, a qual pode ser classificada em aguda e crônica (Mossey, 2011). Esta definição relaciona-se ao caráter multifatorial da dor, que envolve componentes sensoriais, cognitivos e emocionais (Julius and Basbaum, 2001). Baseado nestes aspectos o componente sensorial da dor é definido como nocicepção, isto é, a sensação determinada pela estimulação de receptores presentes nas fibras aferentes primárias (Millan, 1999). A dor envolve a percepção e a interpretação de estímulos nocivos, a nocicepção corresponde às manifestações neurofisiológicas e neuroquímicas geradas pelo estímulo nocivo. Os modelos de nocicepção são utilizados de forma inderita para avaliar a dor através da análise das respostas comportamentais (Millan, 1999).

O procedimento experimental pelo qual a dor é induzida ocorre em diversas fases distintas. Estudos iniciais da dor usam ensaios agudo, envolvendo a aplicação de dois grupos de estímulos: um *noxious* (que pode ser térmico, elétrico, mecânico ou químico) em uma parte acessível do corpo (patas, calda ou abdômen) e estímulos inflamatórios, que ativam diretamente os nociceptores como, por exemplo, os tratamentos com formalina ou capsaicina e os que ativam o sistema imune (adjuvante completo de Freund, ou carragenina) (Seltzer *et al.*, 1990; Grace *et al.*, 2014).

Estudos modernos de dor aguda e crônica utilizam ensaios específicos para quantificar a hipersensibilidade, que é o desfecho pré-clínico mais comum. Os ensaios de quantificação de dor mais utilizados são: os reflexos espinhais emitidos, como por exemplo, o teste de “von Frey ” para alodinia mecânica e o “Hargreaves” para hiperalgesia térmica; reflexo espino-bulbospinal (saltar ou estiramento abdominal) e

simples comportamento inato (lamber, vocalizar e guardar e/ou ficar atento). Estes ensaios foram submetidos a desenvolvimento contínuo, e foram adaptados para o estudo da dor orofacial e limiares de dor heterogêneos (“*pain thresholds*”) (Bennett and Xie, 1988; Grace *et al.*, 2014).

O reconhecimento de que os testes existentes podem mimetizar síndromes de dor extremamente raras, necessitam ser validados para síndromes de dor mais comuns. Esse fato conduziu a tentativas mais diretas para mimetizar a dor associada a estados de doenças mais específicas (Polomano *et al.*, 2001; Sloane *et al.*, 2009).

Os estímulos dolorosos mecânicos, térmicos e químicos são inicialmente traduzidos em atividade elétrica neuronal e conduzidos a partir do local de estímulos periféricos para o SNC, ao longo de uma série de neurônios sensoriais nociceptivos periféricos ou de primeira ordem (neurônios primários aferentes) (Zhang and Bao, 2006). O sinal nociceptivo é então transmitido para sinapses centrais através da liberação de uma variedade de neurotransmissores que tem o potencial de excitar os neurônios de projeções nociceptivos (fibras nociceptivas A δ e C (nociceptores)) ou de segunda ordem no corno dorsal da medula ou rombencéfalo (Ossipov *et al.*, 2010).

Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A δ (mielinizadas) e C (não mielinizadas), possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades e, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (Zhang and Bao, 2006)

O processo de nocicepção pode ocorrer através de vários mecanismos envolvendo glutamato e neuropeptídios (por exemplo, substancia P ou peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, CGRP). O glutamato ativa os receptores pós-sinápticos de glutamato AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol

propionico) e cainato nos neurônios de projeções nociceptivas. Entretanto, estes receptores diferem de forma responsiva a diferentes tipos de dor (Basbaum *et al.*, 2009). A modificação do sinal nociceptivo pode ocorrer ao nível da medula espinhal por meio da ativação GABAérgica local, (que produz o ácido γ -aminobutírico) e interneurônios inibitório glicinérgico. Os neurônios de segunda ordem - neurônios de projeções nociceptivas, envia para a supra-espinhal, que projeta para a cortical e subcortical através dos neurônios de terceira ordem, permitindo a codificação e a percepção multidimensional da experiência da dor. A ativação de projeções descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas para a medula espinhal modulam ainda mais os neurônios de projeções nociceptivas, e influenciam a resposta e a percepção da dor (Basbaum *et al.*, 2009; Ossipov *et al.*, 2010; Grace *et al.*, 2014).

1.8 Processamento Patológico da Dor

A dor pode se estender além de sua utilidade de proteção, com duração de um período de semanas a anos, bem além do estado da lesão inicial. Neste caso, a dor é mal adaptada e acredita-se resultar do funcionamento anormal do sistema nervoso (Millan, 1999). Essa atividade intensa, repetitiva e sustentada dos neurônios de primeira ordem induzem alterações bem caracterizadas no processamento neuronal e bioquímico nas sinapses centrais e projeções descendentes (Basbaum *et al.*, 2009; Ossipov *et al.*, 2010).

Os estímulos nocivos induzem alterações no sistema nervoso central, modificando os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes. A estimulação persistente de nociceptores provoca dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade, hiperalgesia e alodinia. A hiperalgesia pode ser classificada como primária e secundária. A hiperalgesia primária é conceituada como sendo o aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, enquanto a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes. A presença de todos esses elementos sugere que a sensibilização periférica não é o único fenômeno responsável por todas essas mudanças e que deve existir envolvimento do SNC neste processo (Zhuo, 2007). No corno dorsal da medula espinhal essas mudanças são coletivamente conhecidas como sensibilização central e *windup*, caracterizado como aumento cumulativo da despolarização da membrana induzida por estimulação repetida das fibras-C (Latremoliere and Woolf, 2009).

Esse processo envolve a fosforilação de uma gama de receptores, incluindo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA e cainato, o qual aumenta a eficácia sináptica por meio da alteração do tempo de abertura dos canais, removendo o bloqueio do receptor do NMDA mediado por Mg^{2+} promovendo assim o tráfico de receptores para

a membrana sináptica (Latremoliere and Woolf, 2009). Diversos estímulos inócuos ativam as fibras de baixo limiar (A β), que são responsáveis por estimular os neurônios nociceptivos de limiar elevado. Esse processo ocorre devido a uma entrada excitatória reforçada ou a uma redução do limiar de excitação dos neurônios de projeção nociceptivos (Latremoliere and Woolf, 2009). A sensibilização central é mantida via atividade espontânea resultante das fibras sensoriais ou através dos mediadores imunes liberados localmente, tais mediadores são responsáveis pela persistência e disseminação da dor neuropática para além do local da lesão inicial (Grace *et al.*, 2014).

Considerando a complexidade das vias nervosas envolvidas na transmissão da dor, é importante ressaltar o papel fundamental de mecanismos inibitórios endógenos presentes em nosso organismo. Além da existência de mediadores químicos endógenos de caráter antinociceptivo amplamente distribuídos em nosso organismo, diversas estruturas espinhais e supra espinhais descendentes modulam fortemente a resposta dolorosa (Zhang and Bao, 2006). Esta modulação ocorre através de vias descendentes provenientes de diversas estruturas do SNC (tálamo, tronco cerebral, hipotálamo, córtex, núcleo magno da rafe, substância cinzenta periaquedutal, entre outras estruturas superiores) (Yoshimura and Furue, 2006).

É válido salientar que nem todos os sintomas e mecanismos de dor estão associados unicamente à distúrbios neuronais. As alterações patofisiológicas neuronais estão também relacionadas à sinalização imune central, onde a dor pode decorrer a partir de distúrbios neuroimune (Scholz and Woolf, 2007). Além disso, a dor está relativamente relacionada a diversas síndromes mais amplas sendo identificada como uma variação de comportamentos adaptativos em resposta a várias doenças (Grace *et al.*, 2014).

Sendo assim, a identificação de novas moléculas bioativas com atividade antioxidante, anti-inflamatória e analgésica é uma importante ferramenta usada na seleção de novas formulações para o tratamento de doenças associadas a processos oxidativos e inflamatórios (Ren and Dubner, 2010; Niranjan, 2014; Lampiasi and Montana, 2016).

Tendo em vista o potencial terapêutico apresentado pelo ACH e o seu derivado AIC, o presente estudo buscou avaliar a potencialidade do ACH como nova proposta terapêutica usada para o tratamento da dor induzida por substâncias pró-inflamatórias em modelos *in vivo* e *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi analisar as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antinociceptivas do ácido chiquímico (ACH) utilizando técnicas farmacológicas e bioquímicas, em protocolos *in vivo* e *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização termoanalítica do ACH por termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Determinar o perfil redox-ativo do ACH frente a diferentes espécies reativas geradas *in vitro*;
- Verificar a capacidade do ACH em modular a produção de espécies reativas, assim como os parâmetros de estresse oxidativo mediado por H₂O₂ na linhagem celular derivada de neuroblastomas humanos (SH-SY5Y);
- Avaliar a capacidade do ACH em regular a liberação do NO estimuladas pelo LPS em RAW 264.7;
- Investigar o efeito do ACH na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) estimuladas pelo LPS em RAW 264.7;
- Analisar o efeito inibitório do ACH na fosforilação das MAPKs (ERK1/2 e p38) induzidos pelo LPS em RAW 264.7;
- Verificar o efeito do ACH sobre a hiperalgesia e nocicepção induzida pela formalina, carragenina (CG) e mediadores da cascata inflamatória (TNF- α , Dopamina (DA) e prostaglandina - PEG₂) em camundongos machos Swiss;
- Avaliar o efeito agudo do ACH na atividade locomotora em camundongos machos Swiss.

PARTE II

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

CAPÍTULO I

In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress

Thallita Kelly Rabelo¹ . Fares Zeidán-Chuliá¹ . Fernanda Freitas Caregnato¹ . Carlos Eduardo Schnorr¹ . Juciano Gasparotto¹ . Mairim Russo Serafini² . Adriano Antunes de Souza Araújo² . Lucindo José Quintans-Junior² . José Cláudio Fonseca Moreira¹ . Daniel Pens Gelain¹

¹Center of Oxidative Stress Research (CEEO), Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2600, Ramiro Barcelos Street - Annex, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratory of Pharmaceutical Assays and Toxicity, Federal University of Sergipe (LeFT/UFS), São Cristóvão, SE, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed. Address: Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo – CEP90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308-5577 Fax +55 51 3308-5535 e-mail: talitabioq@gmail.com

Submetido: Journal Molecular Neuroscience.
Aceito: 30 de Março de 2015.

In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress

Thallita Kelly Rabelo¹ · Fares Zeidán-Chulíá¹ · Fernanda Freitas Caregnato¹ · Carlos Eduardo Schnorr¹ · Juciano Gasparotto¹ · Mairim Russo Serafini² · Adriano Antunes de Souza Araújo² · Lucindo José Quintans-Junior² · José Cláudio Fonseca Moreira¹ · Daniel Pens Gelain¹

Received: 27 January 2015 / Accepted: 30 March 2015 / Published online: 11 April 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Shikimic acid (SA), originally extracted from *Illicium verum Hook. fil.*, is an indispensable starting material for the synthesis of the antiviral drug Oseltamivir (Tamiflu[®]) with very limited number of studies regarding its biological effects in vitro. Therefore, we here evaluated the thermoanalytical profile, redox properties, and in vitro effects of SA on human neuronal-like cells (SH-SY5Y). The thermoanalytical profile of SA was studied by using differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) characterization. Both antioxidant potential and in vitro lipoperoxidation levels were analyzed. Cell viability and intracellular reactive species (RS) production was determined by DCF and SRB assays, respectively. Our results show in vitro antioxidant activity of SA without exerting cytotoxic effects on SH-SY5Y cells at tested concentrations of 10 nM, 10 μM, and 10 mM. In addition, SA protected the cells against H₂O₂-induced toxicity; effect that could be related, at least in part, with decreased intracellular RS production and its antioxidant potential. The present study shows evidence for neuroprotective actions of SA against oxidative stress-induced toxicity on SH-SY5Y cells, inviting for further investigation about its potential use in the context of oxidative stress-associated neurodegenerative diseases.

Keywords *Illicium verum Hook. fil.* · Shikimic acid · Physicochemical analysis · Antioxidant · SH-SY5Y · Neuroprotection · Free radicals

Introduction

Shikimic acid (3R,4S,5R-(–)-3,4,5-trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid (Fig. 1) is a metabolic precursor for many aromatic compounds such as the amino acids phenylalanine and tyrosine, indole derivatives, many alkaloids, tannins, flavonoids, and lignin (Coleman 2005). As an important biochemical intermediate for a wide variety of secondary metabolites in plants and microorganisms, shikimic acid (SA) is present in most autotrophic organisms and may be found in fruits and other natural products derived from plants (Oliveira et al. 2009). Infusions of *Hypericum perforatum* and fruits of *Illicium verum* (known as Chinese star anise) are rich in SA and are traditionally used in folk medicine to treat depression, anxiety, neuralgic pains, and insomnia (Benmalek et al. 2013). The extracts were reported to promote wound healing of skin ulcers and burns and to exert antibacterial and antiviral activities (Pasqua et al. 2003; Itoigawa et al. 2004; Wojcik and Podstolski 2007).

Previous studies have found that SA and its derivative, triacetylshikimic acid, present anti-inflammatory activities as they inhibit COX-1 and COX-2 activities, and also decrease platelet aggregation and blood clot formation (Huang et al. 2002; El-Seedi et al. 2003). In an animal model of middle cerebral artery thrombosis, SA prevented focal cerebral ischemic injury (Ma et al. 1999). Altogether, these data suggest that SA is a potential therapeutic agent for cardiovascular, peripheral, and cerebral vascular diseases and for the treatment of acute coronary syndrome. Combination of SA and quercetin was observed to regulate the secretion of interleukin-6 and

✉ Thallita Kelly Rabelo
talitabioq@gmail.com

¹ Center of Oxidative Stress Research (CEE0), Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 2600, Ramiro Barcelos Street - Annex, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratory of Pharmaceutical Assays and Toxicity, Federal University of Sergipe (LeFT/UFS), São Cristóvão, SE, Brazil

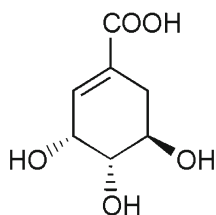


Fig. 1 Chemical structure of shikimic acid (SA)

interleukin-8, which mediate lymphocyte recruitment and activation (Bertelli et al. 2008). Besides, leukocyte activity was reported to be modulated by SA even at low doses, and together with other phenolic compounds present in some natural products, SA has been shown to be responsible for diverse antibacterial and antiviral activities (Barak et al. 2001; Kamara et al. 2004).

In recent years, the interest in natural sources able to potentially provide active components for preventing or reducing the impact of oxidative stress on cells has increased. Free radicals and related species are involved in the cause and/or progression of a variety of diseases, such as cancer, atherosclerosis, neurodegenerative disorders, and inflammation-related pathologies (Halliwell and Gutteridge 2007). Dietary antioxidants, which can inhibit or delay the oxidation of cellular essential components, seem to be very important in the prevention of several diseases. The number of antioxidant compounds synthesized by plants as secondary products, mainly phenolics, acting in plants as defense mechanisms to counteract reactive species (RS) for survival, is currently estimated in 4000 to 6000 (Tepe and Sokmen 2007; Halliwell 2008a, b).

More recently, attention from the pharmaceutical industry and biomedical research on unknown properties of SA has emerged since this compound is an indispensable starting material for the synthesis of the antiviral drug *Oseltamivir* (Tamiflu[®]) (Kramer et al. 2003; Bertelli et al. 2008). As a matter of fact, this interest on the mechanisms exerted by compounds related to this antiviral agent has increased due to the recent outbreaks of “avian flu” (influenza H5N1) and “swine flu” (influenza A H1N1). With all, very little is known about the effect and mechanisms of isolated SA as a therapeutic agent or food supplement. A better comprehension about the chemical, physical, and biological properties of SA, in addition to the potential cellular mechanisms affected by pharmacological concentrations of SA in mammalian cells, would significantly contribute towards the development of a safer therapeutic product.

Thus, the present study performed a thermoanalytical characterization of SA and investigated the effects of SA against free radical production and cellular oxidative stress in human SH-SY5Y cells, which is a cell line that is well-characterized

and accepted as a neuronal-like in vitro model because of their neuron-like properties, capability to undergo neurite outgrowth, as well as morphological changes when induced by oxidative stress (Rabelo et al. 2012; Zeidán-Chuliá et al. 2013).

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Shikimic acid, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol), 2-deoxyribose, glycine, Griess reagent, sodium nitroprusside (SNP), 2-thiobarbituric acid (TBA), 4,6-dihydroxypyrimidine-2-thiol, hydrogen peroxide (H₂O₂), adrenaline, catalase (CAT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), and 2',7'-dichlorodrofluorescein diacetate (DCFH-DA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). For each assay, SA (10 mM) was dissolved in phosphate-buffered saline.

Thermal Characterization

Differential scanning calorimetry (DSC) curve was obtained in a DSC-50 cell (Shimadzu) using aluminium crucibles with about 2 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min⁻¹) and heating rate of 10 °C min⁻¹ in temperature range from 25 to 500 °C. DSC cell was calibrated with indium (m.p. 156.6 °C; $\Delta H_{\text{fus}} = 28.54 \text{ J g}^{-1}$) and zinc (m.p. 419.6 °C). Thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) curve was obtained with a thermobalance model TGA 50 (Shimadzu) in temperature range 25–900 °C, using platinum crucibles with 3 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL min⁻¹) and heating rate of 10 °C min⁻¹. The TG/DTG was calibrated with calcium oxalate monohydrate, conforming to ASTM standard. Kinetic investigation of SA degradation was obtained from TG data by application of Ozawa's method in which plot slope of log heating rate vs. 1/T gives activation energy of process. In dynamic experiments, heating rates of 2.5, 5.0, 7.5, 10, and 20 °C min⁻¹ were used.

Total Reactive Antioxidant Potential and Total Antioxidant Reactivity

Total reactive antioxidant potential (TRAP)/total antioxidant reactivity (TAR) were used to determine the capacity of SA to trap a flow of water-soluble peroxy radical produced at a constant rate, through thermal decomposition of AAPH (Lissi et al. 1992). Briefly, TRAP represents the nonenzymatic antioxidant capacity of SA. This is determined by measuring

the luminol chemiluminescence intensity of emission induced by thermolysis of AAPH as free radical source. The system was left to stabilize for 2 h. Then, samples were added and the readings monitored for 2 h. Results were transformed into a percentile rank, and the area under the curve (AUC) was calculated by utilizing the Graph Pad software (SanDiego, CA, USA), as previously described. The smaller the AUC is (in comparison with the system), the higher the total reactive antioxidant potential of the sample is. The TAR was calculated as the ratio of light intensity in absence of samples (I_0)/light intensity right after SA addition (I).

Evaluation of In Vitro Lipoperoxidation—(TBARS) Assay

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay is widely adopted as a sensitive method for the measurement of lipid peroxidation, as previously described (Draper and Hadley 1990). Briefly, egg yolk (lipid-rich substrate) was homogenized in phosphate buffer (pH 7.4), and 1 mL of homogenate was then homogenized with 0.1 mL of SA at different concentrations. The samples were mixed with 1 mL of trichloroacetic acid (TCA) at 10 % and 1 mL of thiobarbituric acid (TBA) at 0.67 % and then heated in a boiling water bath for 15 min. 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) was used as a TBARS standard. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm and were expressed as percentage of AAPH-induced damage.

Hydroxyl Radical (HO·) Scavenging Activity

Hydroxyl radicals were generated by a Fenton system ($\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$). When exposed to hydroxyl radicals, the sugar deoxyribose (DR) is degraded to malonaldehyde, which is heating with TBA (Paya et al. 1992). The absorbance was measured at 532 nm, and results were expressed as percentage of hydroxyl-induced 2-deoxyribose degradation.

Nitric Oxide Scavenging Activity

Nitric oxide (NO·) scavenging was generated from spontaneous decompositions of sodium nitroprusside in (20 mM) phosphate buffer (pH 7.4). After incubation of the NO production system, Griess reagent was added and incubated for another 15 min. The absorbance at 540 nm was determined by spectrophotometer (Green et al. 1982).

Cell Culture, Samples Preparation, and Treatments

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil), were maintained in a mixture 1:1 of Ham's F12 and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with

10 % fetal bovine serum. The SH-SY5Y cells were treated with different concentrations of SA. For viability assay, cells were seeded in 96-well plate at a density of 2×10^4 cells/well for 1 and 24 h at 37 °C. For evaluation of the redox parameters, cells were seeded into flasks of 75 cm³ at a density of 3×10^6 cells/well and exposed to 10 mM SA and were maintained under these conditions for 1 h at 37 °C. All the results were normalized by the protein content using bovine albumin as standard. The protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford 1976).

SRB Incorporation-Based Assay

The sulforhodamine B (SRB) assay was used for cell density determination, based on the measurement of cellular protein content (Vichai and Kirtikara 2006). The absorbance was determined spectrophotometrically at 515 nm, and results were expressed as percentage of SRB incorporation.

Intracellular Reactive Species Production (DCFH-DA Assay)

Cells were incubated with different concentrations of SA for 1 or 24 h and then challenged with H_2O_2 at 350 μM . To evaluate the effect of SA on the production of reactive species in the absence and presence of H_2O_2 , we used the DCFH-DA oxidation assay (Wang and Joseph 1999). This technique is based on the ability of DCFH to be oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) in the presence of reactive species (RS). This can be used as an index to measure the level of free radical production in cells. Briefly, SH-SY5Y cells were seeded in 96-well plates; 100 μM DCFH-DA was then dissolved in a medium containing 1 % FBS and added to each well. Cells were incubated for 2 h in order to allow cellular incorporation. Thereafter, this medium was discarded, and cells were treated with different concentrations of SA (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM, and 10 mM). H_2O_2 at 350 μM was used as positive control for DCF fluorescence. Since significant changes were observed only at the highest concentration (10 mM), we only used representative concentrations for all the experiments of 10 nM, 10 μM , and 10 mM. DCF fluorescence was read at 37 °C in a fluorescence plate reader (Spectra Max M2, Molecular Devices, USA) with an emission wavelength of 535 nm and an excitation wavelength of 485 nm. The results were expressed as percentage of DCF fluorescence in relation to untreated control.

Cellular Oxidative Stress Parameters

In vitro experiments and DCFH oxidation assay were performed with a wide range of SA concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM, and 10 mM). Since we observed significant changes only with

the highest concentration tested (10 mM), we performed further experiments using only the representative concentrations of this wide range (10 nM, 10 μ M, and 10 mM). For the DCFH oxidation after the in vitro antioxidant characterization and assessment of cell viability of SA, we used the concentration that showed the highest antioxidant activity and exhibited a cytoprotective effect, when the cells were challenged with H₂O₂ (350 μ M). SH-SY5Y cells were treated with SA at 10 mM during 24 h alone or in the presence of H₂O₂ at 350 μ M. Cell extracts were centrifuged, and the supernatant was collected to evaluate parameters of oxidative stress. The cellular non-enzymatic antioxidant defenses in these samples were estimated by analysis of the TRAP and TAR parameters, as previously described by (Lissi et al. 1992). The results were expressed respectively as AUC and TAR (I_0/I) as described by (Dresch et al. 2009). The formation of TBARS was adopted as an index of oxidative damage to lipids (Draper and Hadley 1990). Results were expressed as nanomoles of TBARS per milligram of protein. The activities of two important antioxidant enzymes were analyzed: CAT and superoxide dismutase (SOD). CAT (EC 1.11.1.6) activity was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance in a spectrophotometer at 240 nm, and SOD (EC 1.15.1.1) activity was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm (Aebi 1984). The results were expressed as units of CAT and SOD per milligram of protein.

Statistical Analysis

The in vitro procedures were carried out with $n=3$ (i.e., three vials per group) while cell culture experiments were performed with $n=6$ (i.e., six wells per group). Experiments were repeated four different times, and the results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of four independent experiments. The differences among data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test, when necessary was used two-way. Data were analyzed by using GraphPad software[®] San Diego, CA; version 5.00). Differences were considered to be significant when $*p<0.05$, $**p<0.01$, or $***p<0.001$.

Results

Physicochemical Properties of SA

Thermal analysis is a routinely used methodology for the analysis of drugs and substances of pharmacological interest. TG and DSC curves of these substances allow the researcher to obtain information about the physical and chemical properties related to the thermal decomposition processes (Araújo et al. 2003). DSC curve of SA (Fig. 2) showed a sharp endothermic

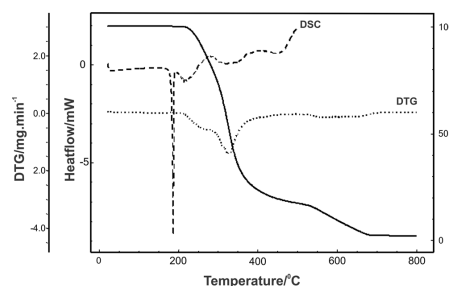


Fig. 2 Differential scanning calorimetry (DSC) curve of shikimic acid (SA)

peak that corresponds to melting in the range of 179 to 187 °C (melting onset $T_m=185$ °C; enthalpy change (ΔH)= 225 J g⁻¹). After melting, the decomposition was defined in two endothermic stages (216 and 324 °C) and one exothermic event (448 °C). This observation was confirmed by TG/DTG curves that indicated thermal decomposition in the following temperature range (mass loss): 214–296 °C ($\Delta m=24.5$ %), 296–440 °C ($\Delta m=56.0$ %), and carbonization initiating at about 440 °C ($\Delta m=17.8$ %) (Fig. 2).

The superposition of TG curves obtained for several heating rates in SA is shown in Fig. 3. This figure illustrates that TG curves were shifted for higher temperatures when heating rates increase. Ozawa's method was applied to data obtained from five TG curves in order to determine the activation energy (E_{act}) at the beginning of main thermal decomposition step at around 214 to 248 °C. The inserted figure presents obtained plots, which demonstrated a fairly good correlation at five heating rates. For non-isothermal method, activation energy (E_{act}) can be obtained from plot of logarithms of heating rates, as a function of inverse of temperature, resulting in a value of 125.8 kJ mol⁻¹ in N₂ atmosphere, from the first stage of thermal decomposition.

In Vitro Antioxidant Potential of SA

The general antioxidant activity of SA was first evaluated by the TRAP/TAR assays, which are widely adopted assays to assess the non-enzymatic antioxidant activity of a given sample. TRAP and TAR measurements showed significant ($***p<0.0001$) antioxidant capacity of SA at 10 mM (Fig. 4a, b). The ability of SA to prevent lipid peroxidation was measured by TBARS generated by AAPH in a lipid-rich incubation medium (egg yolk). Incubation medium without AAPH was used as control. As observed on Fig. 4c, SA at 10 mM was able to prevent lipoperoxidation induced by AAPH in vitro ($***p<0.0001$). To measure SA antioxidant activity against hydroxyl radical, different concentrations (10 nM, 10 μ M, and 10 mM) of SA were added to the system

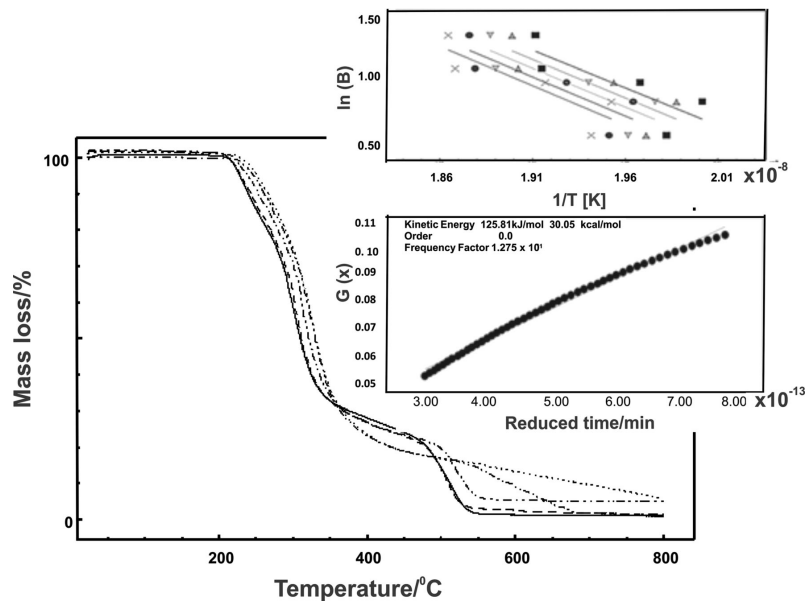


Fig. 3 Thermogravimetry/derivative thermogravimetry (TG/DTG) curve of shikimic acid (SA)

before Fe^{2+} addition. The effect of different concentrations of SA on potential scavenging activity of hydroxyl radicals is shown in Fig. 4d. At the concentration of 10 mM, SA inhibited hydroxyl radical production ($***p < 0.0001$). At this concentration, SA was also able to inhibit SNP-induced nitrite production. The NO^\cdot radical generated would interact with oxygen to produce nitrite ion (NO_2^-), which was assayed by mixing with an equal amount of Griess reagent. These results indicate that SA has a significant scavenger activity against NO (Fig. 4e; $***p < 0.0001$). We tested a wide range of SA concentrations (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM, and 10 mM). Significant changes were observed only at the highest concentration of 10 mM and thus, we here depict only the representative concentrations of 10 nM, 10 μM , and 10 mM.

Cellular Viability and RS Production of SH-SY5Y-Treated Cells with SA

Human neuroblastoma-derived SH-SY5Y cell line, a widely adopted model for neurotoxicity studies, was used to elucidate the effects of SA on cellular viability and how these effects may correlate with oxidative stress modulation (Cheung et al. 2009; da Frota Junior et al. 2011). The cell medium was replaced every 2 days, and the cells were sub-cultured when

they reached 70 % of confluence. Thereafter, SH-SY5Y cells were subjected to incubation with different concentrations of SA (10 nM, 10 μM , and 10 mM) during 1 and 24 h. Cell viability was assessed by SRB incorporation assay. As observed on Fig. 5a, b, SA was not cytotoxic at any SA-studied concentration when compared with control at all time points. We also challenged SH-SY5Y cells with H_2O_2 and evaluated the effect of SA on H_2O_2 -induced loss of viability. When cells are treated with H_2O_2 (350 μM) for 1 h, SA at 10 mM inhibited the decrease in SRB incorporation caused by H_2O_2 (Fig. 6a; $***p < 0.0001$). At 24 h of incubation, SA had no effect on the decrease of both SRB incorporation induced by H_2O_2 (Fig. 5b).

Next, we evaluated the effect of SA in SH-SY5Y intracellular RS production by the DCFH oxidation assay. As shown in Fig. 6a, 10 mM of SA induced a significant ($***p < 0.0001$) decrease in intracellular RS production by SH-SY5Y cells upon 1 h of incubation. In cells challenged with H_2O_2 , the same concentration also decreased the production of intracellular RS ($***p < 0.0001$). Besides, at 24 h of incubation, none of the tested concentrations of SA triggered any significant increase on SH-SY5Y intracellular RS production. However, at concentrations of 10 mM, SA was able to prevent H_2O_2 -induced RS production ($***p < 0.0001$) (Fig. 6b).

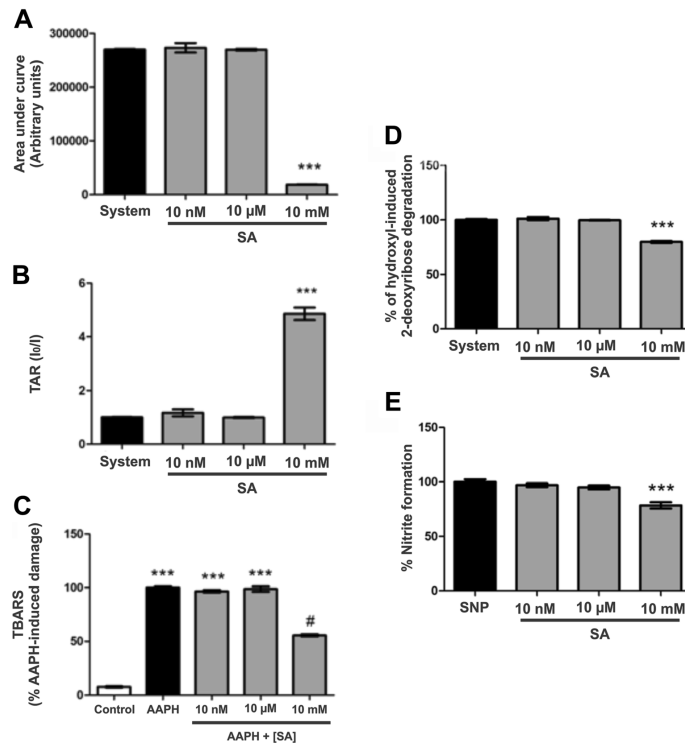


Fig. 4 In vitro redox profile of shikimic acid (SA). **a** TRAP total reactive antioxidant potential of different concentrations of SA on free radical-induced chemiluminescence is measured as area under a curve for 60 min. **b** TAR total antioxidant reactivity values are calculated as the ratio of light intensity in absence of samples (I_0)/light intensity right after UA addition (I). All groups denote samples in the presence of AAPH (system). **c** TBARS a lipid-rich system was incubated with a free radical source (AAPH), and the effect of different concentrations of SA on the lipoperoxidation was measured by quantifying TBARS. **d** HO-scavenging assay hydroxyl radical-scavenging activity was quantified by using hydroxyl-mediated 2-deoxyribose oxidative degradation in vitro, which produces malondialdehyde (MDA) by condensation with 2-thiobarbituric

acid (TBA). System is MDA production from 2-deoxyribose degradation with FeSO₄ and H₂O₂ alone (hydroxyl-generating system). Other groups denote MDA production by FeSO₄ and H₂O₂ in the presence of different concentrations of SA. **e** NO-scavenging assay nitric oxide was generated from spontaneous decomposition of sodium nitroprusside (SNP—system) in the presence of oxygen, producing nitrite ions, which were measured by the Griess reaction. Nitrite production by SNP alone was compared with nitrite production by SNP in the presence of different concentrations of SA. Bars represent mean±SEM. (Statistical difference compared with system was determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test)

In these assays, we tested the concentrations of 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, and 10 mM, but only representative concentrations of 10 nM, 10 μM, and 10 mM are depicted.

Oxidative Stress Parameters

Evaluation of the general status of oxidative stress parameters in SH-SY5Y cells incubated for 24 h with SA at 10 mM, with or without H₂O₂ at 350 μM, was first assessed by the TRAP

and TAR parameters in cell homogenate samples to measure the non-enzymatic antioxidant status of SH-SY5Y cells after treatments. As observed in Fig. 7a, b, SA alone did not exert any effect on the non-enzymatic antioxidant status of SH-SY5Y cells but rescued the TRAP and TAR values of H₂O₂-treated cells to control levels. Moreover, SA caused a significant (***) decrease in TBARS formation induced by H₂O₂ (Fig. 7c). For screening any potential variability in the antioxidant enzyme activity of SH-SY5Y cells after 24 h of treatment with SA (10 mM), the cellular activities CAT and

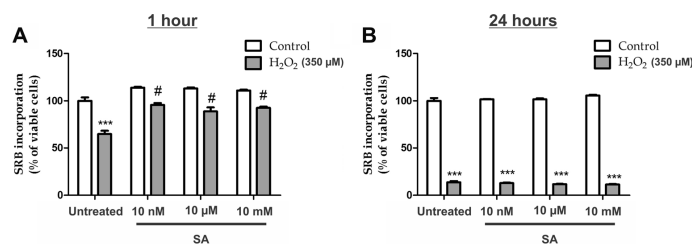


Fig. 5 Effects of shikimic acid (SA) SH-SY5Y cellular viability. Cells were incubated for 1 h (a) and 24 h (b) with SA at doses of 10 nM, 10 μ M, and 10 mM alone or together with H₂O₂ (350 μ M) in the incubation medium as described in “Materials and Methods.” Cellular viability

was assessed by analyzing SRB incorporation (a, b). H₂O₂ (350 μ M) was used as positive control for cell death. Bars represent mean \pm SEM, $n=6$, quadruplicate. *** $p<0.0001$ (two-way ANOVA)

SOD were analyzed. SA-treated cells did not show any effect in SOD activity (Fig. 7d). At this concentration, SA prevented the increase in CAT activity (** $p<0.001$) induced by addition of H₂O₂, suggesting that SA treatment decreases the levels of H₂O₂ inside cells (Fig. 7e).

Discussion

It is well known that SA presents interesting biological properties, such as anticoagulant, antithrombotic, antibacterial, and anti-inflammatory activities (Estevez and Estevez 2012). Besides being important from the pharmacological point of view, SA is also essential in the synthesis of relevant compounds in the pharmacological industry, and SA-based compounds are used in the synthesis of anticancer and antibacterial agents, hormones, or herbicides (Estevez and Estevez 2012). However, information concerning the antioxidant properties of isolated SA molecule is still scarce, and for this reason, we decided to perform an in vitro characterization of the redox properties of SA against different RS. Furthermore, we characterized the complete redox profile of SH-SY5Y cells after treatments with SA, in order to see how changes in RS production, non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities and oxidative alterations in proteins and/or lipids may correlate with potential changes in the cellular viability.

When the antioxidant potential of SA was analyzed, only high concentrations of SA displayed significant differences and the ability of SA to scavenge peroxy radicals or quenching hydroxyl radicals was therefore efficient only at doses of 10 mM (Fig. 4d). In addition, this concentration of SA was able to reduce nitrite production, evidencing a potential role of this molecule as a NO-scavenging agent which could limit the inflammatory actions (acute and chronic) of RS in biological systems (Fig. 4e). These results suggest that SA at the concentration of 10 mM may act as a scavenger molecule and prevent NO to interact with superoxide radicals which would generate peroxynitrite (ONOO⁻), a potent oxidizing molecule capable of eliciting damage to proteins, lipids, and DNA (Halliwell 2008a, b). The potential of phytohenols to interact with free radicals is considered to be dependent on the location of the functional groups on its structure, and both number and configuration of donating hydroxiles of H⁺ are of critical relevance for a molecule to act as an

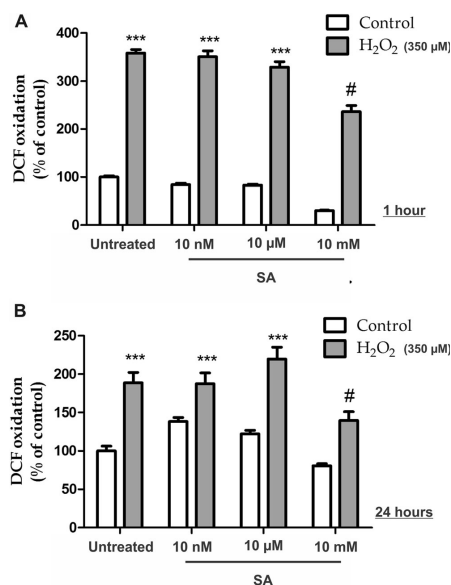


Fig. 6 Evaluation of intracellular reactive species (RS) production in shikimic acid (SA)-treated cells. Cells were treated with different concentrations of SA alone or in the presence of H₂O₂ (350 μ M), and DCF fluorescence was read at 37 $^{\circ}$ C during 1 h (a) and 24 h (b) (endpoint) in a fluorescence plate reader (Spectra Max M2, Molecular Devices, USA). Plotted values represent mean of 4 wells, $n=6$. *** $p<0.0001$; number sign different to positive control (protect effect). Two-way ANOVA was applied to all data

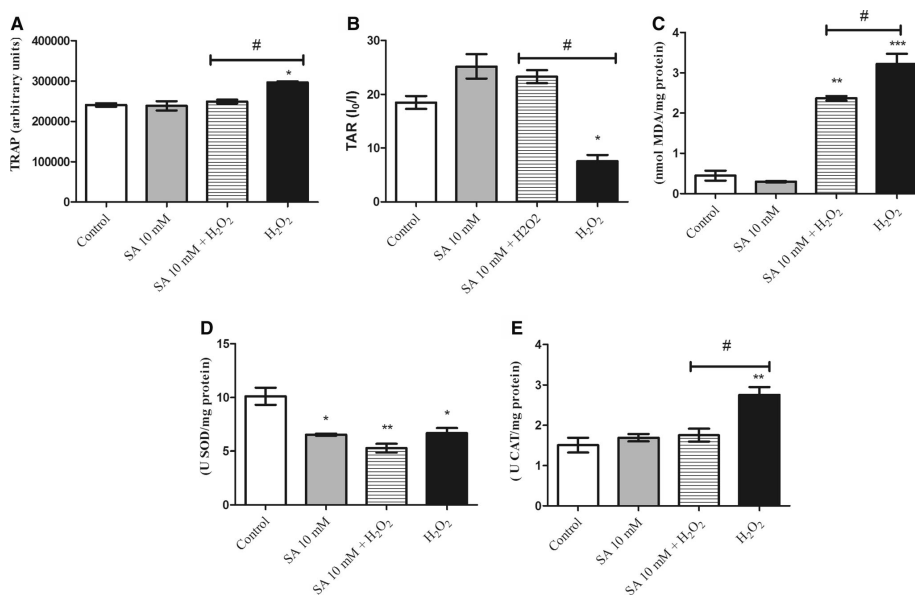


Fig. 7 General parameters of oxidative stress in SH-SY5Y cells. Cells were incubated for 24 h with SA (10 mM) with or without H₂O₂ (350 μM). **a** TRAP assessment of the non-enzymatic antioxidant status of SH-SY5Y cells after treatment with SA and H₂O₂. Results are expressed as arbitrary units. **b** TAR is calculated as the ratio of light in the absence of samples (*I*₀)/light intensity right after sample addition (*I*). **c**

Effect of SA (10 mM) in lipid peroxidation measured by TBARS quantification. **c** SOD and **d** CAT activities were assessed as described in “Materials and Methods.” Bars represent mean±SEM, *n*=6, **p*<0.05; ***p*<0.001; ****p*<0.0001—difference to control; #*p*<0.001 (protect effect), when the treatments with SA (10 mM) in the presence of H₂O₂ (350 μM)

antioxidant. Apparently, 10 mM of SA is able to stabilize RS, which is probably sustained by hydroxyl phenolic groups joining to the structural rings (Rice-Evans et al. 1996).

In order to elucidate the potential effects that SA may exert to mammalian cells, we evaluated cell viability and oxidative stress parameters on neuronal-like SH-SY5Y cells, a widely used in vitro model for neurotoxicological studies. Within 1 and 24 h of treatment, we observed that SA alone had no cytotoxic effect on SH-SY5Y cells. In the presence of a toxic concentration of H₂O₂, after 1 h of treatment, SA significantly inhibited the effect of H₂O₂ observed by the SRB-incorporation assay, which is an index of total cell protein that reflects changes in cellular biomass (Fig. 5a).

Production of RS in living cells was monitored by the DCFH oxidation assay, and our results showed that SA (10 mM) is able to reduce the basal rate of RS production (Fig. 6a). Also, the increase in DCFH oxidation induced by addition of H₂O₂ was significantly inhibited by the same concentration of SA (Fig. 6b). All these results together suggest that the cytoprotective effects of SA can be

due, at least in part, to its antioxidant action at cellular level.

TRAP and TAR analyses of cell lysates indicated that SA increased the non-enzymatic antioxidant potential of SH-SY5Y cells. The present data is in agreement with the TRAP analysis of isolated SA and suggest that the observed antioxidant actions on SH-SY5Y cells may result from a direct scavenging activity of RS such as H₂O₂ and related molecules. In addition, we also observed that SA (10 mM) is able to prevent TBARS formation by H₂O₂, suggesting a protective effect against lipoperoxidation (Fig. 7c). Furthermore, SA alone or in combination with H₂O₂ did not exert changes in SOD activity but prevented the increase of CAT activity induced by H₂O₂. CAT is strongly activated when concentrations of its substrate (H₂O₂) are increased in cells. Thus, CAT activity is widely assessed as an indirect index of endogenous levels or H₂O₂ production. The lack of effect of SA in CAT activity, in agreement with previous results, suggests that the antioxidant effect of this molecule is not mediated by antioxidant enzyme activation. The reduction of CAT activation by

H₂O₂ in the presence of SA further indicates that such effect does not depend on CAT modulation.

SA may be obtained from the diet; it is an intermediary metabolite in many edible plants since it is the starting compound in the synthesis pathway of many phenolic compounds (Ducati et al. 2007). To the best of our knowledge, there are no available data on the bioavailability of dietary SA. However, additional reports suggest that consumption of herbs or edible plants containing SA results in low levels of this substance in mammal cells (10 to 100 nM) (Bertelli et al. 1996). As reported by Bertelli et al. (2008), incubation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with SA, at concentrations of 10 and 100 nM for 24 h did not induce changes in interleukin (IL)-6 and IL-8 baseline levels, indicating that SA alone is not able to modulate innate immunity in antiviral terms by upregulating the secretion of cytokines IL-6 and IL-8. Our results indicate that SA exerts its biological effects at 10 mM, which may probably be reached in mammalian systems only with a pharmacological administration protocol (Bertelli et al. 2008). Nonetheless, a detailed pharmacological investigation is still missing in the literature.

In summary, we here presented a complete screening evaluation of physicochemical, antioxidant, and neuroprotective properties of SA. Furthermore, through non-isothermal conditions, the activation energy for the first-step decomposition reaction of SA was also determined. We found evidence that high concentrations of SA can act as a redox-active molecule in vitro and general antioxidant and can protect SH-SY5Y cells against H₂O₂-induced oxidative stress and loss of viability. These effects probably involve a non-enzymatic mechanism. Finally, our data invite for further investigation to elucidate the potential of SA as a therapeutic agent for oxidative stress-related neurodegenerative diseases.

Acknowledgments The Brazilian agencies FAPERGS (No. 0998120), CNPq (PVE, INCTEN, and IBN-Net programs), CAPES, and PROPESQ-UFRGS supported this work. Fares Zeidán-Chulíá holds a PNPd postdoctoral position (Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) funded by CAPES.

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Araújo AAS, Storpirtis S et al (2003) Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. *Int J Pharm* 260(2):303–314
- Barak V, Halperin T et al (2001) The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines. *Eur Cytokine Netw* 12(2):290–296
- Benmalek Y, Yahia OA et al (2013) Anti-microbial and anti-oxidant activities of *Illicium verum*, *Crataegus oxyacantha* ssp *monogyna* and *Allium cepa* red and white varieties. *Bioengineered* 4(4):244–248
- Bertelli AA, Giovannini L et al (1996) Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp Clin Res* 22(2):61–63
- Bertelli AA, Mannari C et al (2008) Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in an in vitro model. *J Med Virol* 80(4):741–745
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cheung Y-T, Lau WK-W et al (2009) Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *NeuroToxicology* 30(1):127–135
- Coleman WF (2005) Shikimic acid. *J Chem Educ* 82(4):656
- da Frota Junior ML, Pires AS et al (2011) In vitro optimization of retinoic acid-induced neurogenesis and TH endogenous expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by the antioxidant Trolox. *Mol Cell Biochem* 358(1–2):325–334
- Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186:421–431
- Dresch MT, Rossato SB et al (2009) Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. *Anal Biochem* 385(1):107–114
- Ducati RG, Basso LA et al (2007) Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design. *Curr Drug Targets* 8(3):423–435
- El-Seedi HR, Ringbom T et al (2003) Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. *Chem Pharmaceut Bull* 51(12):1439–1440
- Estevez AM, Estevez RJ (2012) A short overview on the medicinal chemistry of (–)-shikimic acid. *Mini Rev Med Chem* 12(14):1443–1454
- Green LC, Wagner DA et al (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1):131–138
- Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476(2):107–112
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford
- Huang FY, Xiu QP et al (2002) Anti-platelet and anti-thrombotic effects of triacetate shikimic acid in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 39(2):262–270
- Itoigawa M, Ito C et al (2004) Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoids and phytoquinoids from *Illicium* plants. *Cancer Lett* 214(2):165–169
- Kamara BI, Brand DJ et al (2004) Phenolic metabolites from honeybush tea (*Cyclopia subternata*). *J Agric Food Chem* 52(17):5391–5395
- Kramer M, Bongaerts J et al (2003) Metabolic engineering for microbial production of shikimic acid. *Metab Eng* 5(4):277–283
- Lissi E, Pascual C et al (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun* 17(5):299–311
- Ma Y, Xu QP et al (1999) Antagonistic effects of shikimic acid against focal cerebral ischemia injury in rats subjected to middle cerebral artery thrombosis. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20(8):701–704
- Oliveira AP, Valentao P et al (2009) *Ficus carica* L.: metabolic and biological screening. *Food Chem Toxicol* 47(11):2841–2846
- Pasqua G, Avato P et al (2003) Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Sci* 165(5):977–982
- Paya M, Halliwell B et al (1992) Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 44(2):205–214
- Rabelo TK, Zeidán-Chulíá F et al (2012) Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicol In Vitro* 26(2):304–314
- Rice-Evans CA, Miller NJ et al (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20(7):933–956

- Tepe B, Sokmen A (2007) Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. *Bioresour Technol* 98(16):3076–3079
- Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1(3):1112–1116
- Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 27(5-6):612–616
- Wojcik A, Podstolski A (2007) Leaf explant response in in vitro culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Acta Physiol Plant* 29(2):151–156
- Zeidán-Chuliá F, Gelain DP et al (2013) Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxid Med Cell Longev* 2013:791795

CAPÍTULO II

Shikimic Acid Inhibits LPS-induced Cellular Pro-inflammatory Cytokines and Attenuates Mechanical Hyperalgesia in Mice

Thallita Kelly Rabelo¹, Adriana Gibara Guimarães², Marlange Almeida Oliveira³, Juciano Gasparotto¹, Mairim Russo Serafini⁴, Adriano Antunes de Souza Araújo⁴, Lucindo José Quintans-Júnior³, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain^{1*}

¹Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;

² Departamento de Educação em Saúde, UFS, Lagarto, SE, Brazil;

³Laboratório de Neurociências e Ensaios Farmacêuticos (LANEF), Departamento de Fisiologia, UFS, São Cristóvão, SE, Brazil;

⁴Laboratorio de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade, Departamento de Farmácia, UFS, São Cristóvão, SE, Brazil.

Running title: Shikimic Acid & Inflammatory Hyperalgesia.

* To whom correspondence should be addressed. Address: Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo – CEP90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3308-5577 Fax +55 51 3308-5535 e-mail: talitabioq@gmail.com

Submetido: International Immunopharmacology.
Aceito: 16 de Julho de 2016.

Manuscript Number: INTIMP-D-16-00224R1

Title: Shikimic Acid Inhibits LPS-induced Cellular Pro-inflammatory Cytokines and Attenuates Mechanical Hyperalgesia in Mice

Article Type: Full length article

Keywords: shikimic acid; RAW 264.7; inflammation; cytokines; mechanical hyperalgesia; nociception.

Corresponding Author: Prof. Daniel Pens Gelain, PhD

Corresponding Author's Institution: UFRGS

First Author: Thallita K Rabelo

Order of Authors: Thallita K Rabelo; Adriana G Guimarães; Marlange A Oliveira; Juciano Gasparotto; Mairim R Serafini; Adriano Antunes S Araújo; Lucindo J Quintans-Junior; José Claudio F Moreira; Daniel Pens Gelain, PhD

Abstract: Background and aims: Shikimic acid (SA) is present in a wide variety of plants and microorganisms used in traditional and folk medicine and also is an essential starting material for the synthesis of the antiviral drug Oseltamivir (Tamiflu®). Some pharmacological actions observed in SA-enriched products include antioxidant and anti-inflammatory activities. Here, we investigated the anti-inflammatory and antinociceptive actions of isolated SA. Methods: RAW 264.7 macrophage cells were treated with bacterial LPS (1 µg/mL) and the effect of SA on the modulation of cell viability, nitric oxide (NO) production, TNF-α, and IL-1β content and MAPK (ERK1/2 and p38) activation was evaluated. Besides, the anti-hyperalgesic actions of SA on in vivo model of mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (CG), dopamine (DA), TNF-α and prostaglandin (PGE2) were assessed. Results: In RAW 264.7 cells, SA suppressed LPS-induced decrease in cell viability and nitrite accumulation to control values and inhibited up-regulation of TNF-α (65%) and IL-1β (39%). These effects may be mediated at least in part by inhibition of LPS-induced ERK 1/2 (22%) and p38 (17%) phosphorylation. In mice, SA at 50, 100, and 200 mg/kg decreased formalin-induced nociceptive behavior (around 50%) and inhibited the inflammatory nociception induced by TNF-α and PGE2 (50 to 75% each). Moreover, SA (100 and 200 mg/kg) significantly attenuated the mechanical hyperalgesia induced by CG and DA (25 to 40% each). Conclusions: These results indicate that SA presents anti-inflammatory actions with potential for development of drugs to treat pro-inflammatory and painful conditions.



Prof. Daniel Pens Gelain, PhD
Departamento de Bioquímica, ICBS,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Street address: Ramiro Barcelos, 2600 – anexo,
CEP90035003 Porto Alegre, RS, Brazil
Phone +55 51 3308-5577
Fax +55 51 3308-5535

Porto Alegre 28th June, 2016

To the editor of
International Immunopharmacology
Dr. Fuminori Abe

Dear Dr. Abe;

We are submitting the revised version of our manuscript “**Shikimic Acid Inhibits LPS-induced Cellular Pro-inflammatory Cytokines and Attenuates Mechanical Hyperalgesia in Mice**” for your appreciation. We considered all the reviewer’s comments and suggestions and took an effort to address all concerns raised by their evaluation. Our detailed answers are enclosed in the response letter attached to the submission. Again I declare, in behalf of all authors, that this work is original and is not under consideration for publication elsewhere. Besides, we declare that this work followed the international recommendations for ethics in research and has been approved by the local Ethics Committee for the Use of Animals in Research (Universidade Federal de Sergipe CEPA/UFS 42/11).

Best regards,

Professor Daniel Pens Gelain, PhD
Department of Biochemistry
Institute of Basic Health Sciences
Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Brazil

*Highlights

Research Highlights

1. Shikimic acid inhibits LPS-induced loss of cell viability
2. Shikimic acid inhibits LPS-induced TNF- α and IL1 β increase
3. Shikimic acid decreases LPS-induced ERK1/2 and p38 phosphorylation
4. Shikimic acid inhibits inflammatory nociception by TNF- α and PGE₂
5. Shikimic acid attenuated the mechanical hyperalgesia

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

Shikimic Acid Inhibits LPS-induced Cellular Pro-inflammatory Cytokines and Attenuates Mechanical Hyperalgesia in Mice

Thallita Kelly Rabelo¹, Adriana Gibara Guimarães², Marlange Almeida Oliveira³,
Juciano Gasparotto¹, Mairim Russo Serafini⁴, Adriano Antunes de Souza Araújo⁴,
Lucindo José Quintans-Júnior³, José Cláudio Fonseca Moreira¹, Daniel Pens Gelain^{1*}

¹ *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil;*

² *Departamento de Educação em Saúde, UFS, Lagarto, SE, Brazil;*

³ *Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacêuticos (LANEF), Departamento de Fisiologia, UFS, São Cristóvão, SE, Brazil;*

⁴ *Laboratório de Ensaio Farmacêuticos e Toxicidade, Departamento de Farmácia, UFS, São Cristóvão, SE, Brazil.*

Running title: Shikimic Acid & Inflammatory Hyperalgesia.

*Corresponding author: Professor Daniel Pens Gelain.; Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5577; fax: +55 51 3308 5535. E-mail address: daniel.gelain@ufrgs.br

ABSTRACT

Background and aims: Shikimic acid (SA) is present in a wide variety of plants and microorganisms used in traditional and folk medicine and also is an essential starting material for the synthesis of the antiviral drug Oseltamivir (Tamiflu®). Some pharmacological actions observed in SA-enriched products include antioxidant and anti-inflammatory activities. Here, we investigated the anti-inflammatory and antinociceptive actions of isolated SA. **Methods:** RAW 264.7 macrophage cells were treated with bacterial LPS (1 µg/mL) and the effect of SA on the modulation of cell viability, nitric oxide (NO) production, TNF-α, and IL-1β content and MAPK (ERK1/2 and p38) activation was evaluated. Besides, the anti-hyperalgesic actions of SA on *in vivo* model of mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (CG), dopamine (DA), TNF-α and prostaglandin (PGE₂) were assessed. **Results:** In RAW 264.7 cells, SA suppressed LPS-induced decrease in cell viability and nitrite accumulation to control values and inhibited up-regulation of TNF-α (65%) and IL-1β (39%). These effects may be mediated at least in part by inhibition of LPS-induced ERK 1/2 (22%) and p38 (17%) phosphorylation. In mice, SA at 50, 100, and 200 mg/kg decreased formalin-induced nociceptive behavior (around 50%) and inhibited the inflammatory nociception induced by TNF-α and PGE₂ (50 to 75% each). Moreover, SA (100 and 200 mg/kg) significantly attenuated the mechanical hyperalgesia induced by CG and DA (25 to 40% each). **Conclusions:** These results indicate that SA presents anti-inflammatory actions with potential for development of drugs to treat pro-inflammatory and painful conditions.

Keywords: shikimic acid; RAW 264.7; inflammation; cytokines; mechanical hyperalgesia; nociception.

1. Introduction

Shikimic acid (SA) is a hydroaromatic intermediate of the shikimate pathway, which is essential in the synthesis of aromatic metabolites in plants and microorganisms. It is also the main precursor of cinnamic acids and flavonoids, such as flavones, anthocyanins, flavonols, and tannins [1]. Originally extracted from *Illicium verum* Hook. f. (Chinese star anise), SA has traditionally been used in Chinese medicine as antiemetic, for treating stomach aches, insomnia, skin inflammation, and relieving pain [2]. The methanolic extract of star anise (rich in SA) exerts diverse pharmacological actions such as analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant effects [3-5]. Furthermore, SA plays a pivotal role in the synthesis of a number of compounds for the pharmaceutical industry and represents an essential starting material for the synthesis of the antiviral drug Oseltamivir (Tamiflu[®]) [6].

Our group recently showed evidence for protective actions of SA in a neuronal cell line (SH-SY5Y) subjected to oxidative stress, thus suggesting a potential new application for this substance in the development of new strategies to counteract oxidative damage associated to neurodegenerative processes [7]. Others have demonstrated that SA inhibited oxidative stress induced by H₂O₂ in hepatocytes, apparently through the inhibition of nuclear factor-kappa B (NF-κB) via phosphorylation of signaling proteins including members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family [8]. Oxidative stress and gene transcription mediated by NF-κB are key components in the activation of pro-inflammatory response [9]. Some of the pharmacological actions ascribed to natural products enriched in SA are anti-inflammatory activities [10, 11].

Hypersensitivity of the nociceptive pathways can contribute to the inflammatory hyperalgesia or allodynia through activation of cytokine cascade [12, 13]. Currently,

pharmacological therapies available aim at the normalization of the sensitivity to pain, but most of them present relevant side effects, little efficacy and low therapeutic adherence [14]. Therefore, new therapeutic options to treat inflammatory pain are constantly under investigation. In this context, new chemical entities derived from natural products presenting promising effects offer the possibility for the development of new drugs presenting better efficacy and performance on inflammatory pain [15].

Considering that pro-inflammatory responses and regulation of nociceptive sensitivity share common pathways, the aim of the present study was to analyze the effect of SA on the modulation of the cytokines TNF- α and IL-1 β by LPS and on modulation of hyperalgesia mediated by carrageenan, TNF- α , dopamine and prostaglandin E₂.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Shikimic acid (SA), Griess reagent, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), glycine, LPS, formalin, λ -Carrageenan (CG), purified recombinant TNF- α protein, prostaglandin E₂ (PGE₂), dopamine (DA) and materials used in cell culture were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Electrophoresis and western blot materials were obtained from Bio-Rad (Hercules, USA), GE Healthcare Brazilian Headquarter (São Paulo, Brazil), and Sigma-Aldrich. Antibodies against TNF- α (ab6671) and IL-1 β (ab9722) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti- β -actin rabbit polyclonal (#4967), phospho-ERK1/2 (#9101S), ERK1/2 (#9102S), phospho-p38 (#9211) and p38 (#9212) and anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin linked to peroxidase were from Cell Signaling (Beverly, USA). Indomethacin (INDO), dipyrone, diazepam (DZP),

dexamethasone were obtained from União Química (Brazil). Immunoblot chemiluminescence detection was carried out with the West Pico detection kit from Thermo Scientific (Rockford, USA). SA was dissolved directly in DMEM (1%) and serial dilutions were obtained from this stock solution.

2.2. RAW 264.7 cell culture and incubation

The murine macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ - Rio de Janeiro, Brazil). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic antimycotic solution (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 250 ng/mL) at 37 °C in 5% CO₂ humidified air. Cells were used in the passages 20-30. Macrophages were plated respectively at a density of 1 x 10⁶ cells/mL in 96- and 6-well plates for 24 hours. Then the cells were pretreated for 1 hour with different concentrations of SA (1 mM or 10 mM) and treated for 24 hours with LPS (1 µg/mL). The SA and LPS were dissolved in the DMEM 1% FBS. Supernatants were assayed for nitrite content and the cells were used for different assays. For detection of phosphorylated isoforms of protein kinases, cells were plated at a density of 1 x 10⁶ cells/mL in 6-well plates for 24 hours in DMEM 10% FBS. After that, the medium of incubation was replaced for DMEM 1% FBS and cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ humidified air for 3 hours. Incubation was started by adding SA (1 mM or 10 mM) and LPS (1 µg/mL). Treatment was stopped 15 minutes later as described below.

2.3. Cell viability and morphology

After treating with either different concentrations of SA alone or in the presence of LPS (1 µg/mL) for 24 hours RAW 264.7 cells viability was quantified by the MTT

reduction assay as previously described [16]. Optical density was measured at 550 nm and 630 nm. Qualitative morphology of the cell cultures was also analyzed by phase-contrast microscopy (TE 300 - Nikon Eclipse).

2.4. Nitrite measurement

The cells were plated at a density of 10^6 cells/mL in 96-well plates for 24 h and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) in the presence or absence of different concentrations of SA for 2 hours. The culture media were collected for the assays. Nitric oxide was measured by the detection of its stable oxidative metabolite, nitrite [17]. In brief, 100 μ L of the culture media were mixed with 100 μ L of Griess reagent and then shaken for 10 min at room temperature. Absorbance was assessed in a SpectraMAX i3 (Molecular Devices) spectrophotometer set at 540 nm.

2.5. Western blot

After incubations, cells were scraped and washed with ice-cold PBS. RIPA buffer (50 mM Tris – HCL at pH 8, 120 mM NaCL, 1% IGEPAL, 0.5% biliary salts, 0.1% SDS), containing protease inhibitors (1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate) was added to the cells. Lysed cells were centrifuged at 14,000 x g for 10 minutes at 4°C, and supernatant proteins were measured by Bradford method [18]. Samples were suspended in 2x Laemmli-sample buffer (62.5 mM Tris - HCL at pH 6.8, 1% (w/d), 10% (v/v) glycerol) and 10% of β -mercaptoethanol, and heated at 95 °C for 5 minutes. Proteins (30 μ g) were separated by SDS-PAGE (10% (w/v) acrylamide, 0.275% (w/v) bisacrylamide gels) and electrotransferred at 100 V onto nitrocellulose membranes using a Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, California, USA). Membranes were stained with Ponceau Red, washed with Tween-Tris buffered saline (TBS-T; Tris 100 mM, pH 7.5 0.9% NaCL and 0.1% Tween 20) and then

6

incubated for 30 minutes at room temperature with 5% Bovine Serum Albumin (BSA). Primary antibodies were used at 1:1000 dilutions and incubated overnight at 4°C. Then, membranes were washed with TBS-T, following incubation with species-specific HRP-conjugated secondary antibodies at 1:3000 in TBS-T with 5 % BSA for 2 hours at room temperature. Immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence using Supersignal West Pico Chemiluminescent kit from (Thermo Scientific) (Luminol/Enhancer and Stable Peroxide Buffer). The densitometry analyses were performed using Image-J® software.

2.6. Animals

Male swiss mice (20-30 g, 2-3 months of age) were used. Protocols were approved by the Animal Care and Use Committee (CEPA/UFS 42/11) at the Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Brazil. Animals were randomly housed in appropriate cages at $21 \pm 2^\circ\text{C}$ on a 12 h light/dark cycle (lights on 06:00-18:00 h) with free access to food chow (Purina®, Brazil) and water. Experiments were carried out between 09:00 AM and 14:00 PM in a quiet room. All testing was performed in compliance with the recommendations from the International Association for the Study of Pain (IASP) [19]. All efforts were made to minimize animal suffering and to decrease the number of animals used. The protocols were carried out in double-blind way and.

2.7. Formalin-induced pain

The formalin test was carried out as described by Hunskaar and colleagues [20]. After acclimatization in the box of observation during 5 min, the animals (n = 8, per group) were treated with the vehicle (saline + Tween 80 0.2%), SA (50, 100, and, 200 mg/kg, i.p.), or the reference drug indomethacin (10 mg/kg, i.p.) 30 min before the

7

formalin 1% administration (20 μ L/paw). Nociceptive response was evaluated through the amount of time that the animal spent licking the paw between 0-5 and 15-30 min after formalin injection [21].

2.8. Measurement of mechanical hyperalgesia induced by carrageenan (CG), TNF- α , dopamine (DA) and prostaglandin (PGE₂)

The mechanical hyperalgesia was similar to that described previously [12], with alterations. Initially, mice were acclimated in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm) with wire grid floors 15-30 min before the start of testing. Von Frey test causes hind paw flexion reflex (flinching movements) with a hand-held force transducer (electronic anesthesiometer, Insight[®], Brazil). After the paw withdrawal, the intensity of the pressure was automatically recorded. The sensitivity to mechanical stimulation was measured in grams and calculated by averaging four measurements. The animals were subjected to mechanical stimuli before and after treatments.

Animals were divided into five groups (n = 8, per group), which were treated with vehicle (saline + Tween 80 0.2%), SA (50, 100, or 200 mg/kg, i.p.) and indomethacin (INDO, 10 mg/kg; i.p.) or dipyron (60 mg/kg; i.p.). Thirty minutes after treatment, subcutaneous injection into the plantar region of the hind paws was applied using 20 μ L of CG (300 μ g/paw), PGE₂ (100 ng/paw), DA (30 μ g/paw) or TNF- α (100 pg/paw). The degree of hyperalgesia was evaluated 0.5, 1, 2, and 3 after the injection [12, 22, 23].

2.9. Evaluation of mouse motor activity

To verify any effect of SA on motor coordination, which could limit the interpretations of the results, mice were submitted to the rota-rod task (Rota-rod apparatus, AVS[®], Brazil) consisted of a bar with a diameter of 4 cm, subdivided into

five compartments, at 7 rpm. The animals were selected 24 hours previously by eliminating animals that did not remain on the bar for two consecutive periods of 180 seconds. Animals were treated with diazepam (DZP, 1.5 mg/kg, i.p.), SA (50, 100, or 200 mg/kg, i.p.), or vehicle (saline + Tween 80 0.2%) and after 30 min were placed on rotary bar. The latency to falling was measured up to 180 seconds. The results are expressed as the mean time(s) during which the animals remained on the bar [24, 25].

2.10. Data normalization and statistical analysis

The data obtained were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* test (for selected groups) or Dunnet (animal experiments). The cell culture and animals experiments were respectively performed with n=6 (i.e., six wells per group) and (n = 8, per group). The results were expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by using GraphPad software San Diego, CA; version 5.00). Differences were considered to be significant when *p < 0.05 and ***p < 0.001.

3. Results

3.1. Effect of SA on cell viability and morphology of LPS-treated RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were treated for 24 h with SA at 1 mM and 10 mM in the presence or absence of LPS (1 μ g/mL). While SA alone did not cause any effect on MTT reduction, both concentrations of SA blocked the decrease in cell viability induced by LPS (Fig. 1A). The protective effect of SA was also observed in the morphology changes induced by LPS. In cells co-treated with SA, the level of cell spreading and pseudopodia induced by LPS was reduced, indicating suppression of cell activation/differentiation.

3.2. Effect of SA on LPS-induced nitrite accumulation in RAW 264.7 cells

Next, RAW 264.7 cells were pre-treated with SA for 1 hour and then exposed to LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hours. The treatment with SA alone at 1 mM and 10 mM did not change the levels of nitrite in the culture medium (Fig. 2). As expected, LPS treatment increased the accumulation of nitrite, but SA caused a significant inhibition of this effect, indicating an inhibition in NO production.

3.3. Effect of SA on pro-inflammatory cytokines induced by LPS in RAW 264.7 cells

To evaluate whether SA is able to attenuate the induction of pro-inflammatory cytokines by LPS, we assessed the total levels TNF- α and IL-1 β in RAW 264.7 cells by western blot. As shown in Fig. 3A and 3B, cells treated with SA at 1 mM and 10 mM had no changes in TNF- α and IL-1 β levels. As expected, LPS induced a significant increase in the content of these cytokines. This effect was inhibited by SA at 10 mM, when TNF- α decreased by 65% and IL-1 β had an inhibition around 40% (Fig. 3A and B).

3.4. Effect of SA on LPS-induced ERK 1/2 and p38 phosphorylation in RAW 264.7 cells

The protein kinases ERK 1/2, p38 and JNK are involved in the modulation of pro-inflammatory responses elicited by LPS during macrophage activation. We thus investigated the effect of SA on LPS-induced ERK1/2, p38 and JNK phosphorylation. Pre-treatment with SA at 10 mM exerted a mild but significant inhibition of LPS-induced phosphorylation of ERK 1/2 (Fig. 4A) and p38 (Fig. 4B). ERK 1/2 also presented a significant inhibition by SA at 1 mM (Fig. 4A). We did not observe any effect of SA on JNK phosphorylation in either the presence or absence of LPS (data not

shown). In addition, cells treated only with SA did not present any changes in the phosphorylation levels of ERK 1/2 and p38 (Fig. 4A and 4B).

3.5. Effect of SA on formalin-induced nociception in mice

We also investigated whether SA could exert any effect on formalin-induced nociception *in vivo*. Briefly, 30 minutes after treatments with vehicle (control) and SA at 50, 100, and 200 mg/kg of mice weight, animals received an injection of 1.0 % formalin solution into the plantar surface of the hind paw. After injection, an acute nociceptive behavioral response consisting in licking and biting of the injected paw was observed. These behavioral alterations were analyzed in two periods: zero to 5 minutes (first phase, in which a neurogenic pain is elicited by direct stimulation of the nociceptors) and 15 to 30 minutes (second phase, in which the inflammatory pain results from release of inflammatory mediators). As shown in Fig. 5A, different doses of SA did not affect neurogenic pain (first phase). However, SA at 50, 100, and 200 mg/kg inhibited formalin-induced nociceptive behavior in the phase associated to inflammatory pain (second phase), as shown in Fig. 5B. These results indicate that SA has an antinociceptive effect through the inhibition of inflammatory mediators. In these experiments, indomethacin (10 mg/kg; i.p.) was used as a standard anti-inflammatory agent.

3.6. Effect of SA on CG, TNF- α , DA, and PGE₂-induced mouse paw mechanical hyperalgesia

We next analyzed whether SA was able to increase sensitivity threshold induced by mechanical stimuli after administration of CG and mediators of the inflammatory cascade, such as TNF- α , PGE₂ and DA. As show in Fig. 6A, after 60 minutes of

treatment, SA (100 and 200 mg/kg) significantly reduced the sensibility induced by CG. This effect was maintained for 180 minutes. These doses produced an effect similar to indomethacin (10 mg/kg). Data analysis indicated that SA exerted an anti-hyperalgesic action in this model.

The inhibitory effect of SA on mechanical hyperalgesia induced by TNF- α is shown in Fig. 6B. All doses reduced the effect of TNF- α . SA 50 and 100 mg/kg demonstrated effective responses 60 minutes after administration. In addition, SA at 200 mg/kg markedly increased the paw withdrawal threshold, at all times, similarly to indomethacin. We also studied the effect of SA on hyperalgesia induced by DA and PGE₂. All doses of SA reduced inflammatory hyperalgesia induced by PGE₂ (Fig. 6C). On the other hand, SA only at 100 and 200 mg/kg reduced mechanical hyperalgesia induced by DA (Fig. 6D).

3.7. SA does not affect motor activity

In the test to measure the impact of acute SA treatment on the locomotor spontaneous activity, SA did not alter the general locomotor activity at all doses studied (50-200 mg/kg) (Fig. 7).

4. Discussion

Previous studies have already reported pharmacological effects of SA and its derivative triacetylshikimic acid, including anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective actions [7, 10, 26]. Here we investigated anti-inflammatory and antinociceptive actions of SA in different models. We used RAW 264.7 cells to evaluate the effect of SA on nitrite accumulation, induction of TNF- α and IL-1 β , and MAPK activation induced by LPS. The antinociceptive action of SA was evaluated *in vivo*, using different inducers of nociceptive responses. LPS is a promoter of activation and

cell differentiation of the myeloid phenotype into macrophage phenotype [27-30]. Myeloid phenotype is proliferative and macrophage phenotype is non-proliferative. To assess the effect of SA on the pro-inflammatory actions of LPS, in our study RAW 264.7 cells were subjected to serum reduction to 1% FBS, in order to decrease the proliferative stimulation induced by 10% FBS. LPS incubation in serum-deprived medium leads to activated macrophage phenotype, and continuous exposure of LPS in these conditions results in progressive loss of cell viability with time, as cells are maintained in an activated state due to TLR4/MyD88 complex stimulation [27-30].

Earlier studies have shown a neuroprotective role of SA through reduction of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), which are crucial secondary messengers that trigger inflammatory responses [7, 31]. During oxidative stress, inflammatory mediators responsible for increasing hyperalgesia are induced [32, 33]. Additionally, some studies have demonstrated that 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid (ISA) reduces the inflammatory process induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rat models of acute colitis. In part, the anti-inflammatory effect of ISA has been associated to its antioxidant activity [26]. This potential multimodal action in the modulation of ROS, RNS and pro-inflammatory cytokines suggests that the anti-inflammatory effect of SA is multiple and can be related to a possible analgesic action [10]. During the course of inflammatory diseases and pain, several mediators, including ROS, RNS and cytokines, are excessively produced by immune system cells, such as macrophages and monocytes. Due to the complex pathophysiology of chronic inflammatory diseases, significant efforts have focused on identifying novel drugs that prevent the evolution of inflammation at earlier stages, when gene transcription of crucial pro-inflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, is activated [34, 35]. In particular, IL-1 β is an important component in the

initiation and amplification of the inflammatory response. TNF- α , regarded as a potent pro-inflammatory mediator, can increase the production of other cytokines [36].

SA significantly reduced nitrite production and inhibited LPS-stimulated TNF- α and IL-1 β expression. Possibly, these effects were, at least in part, mediated by the inhibition of ERK 1/2 and p38 phosphorylation, which are widely known to modulate intracellular cascades evoked by LPS. We did not observe any effect of SA on JNK, another protein kinase that is activated in response to LPS during RAW 264.7 activation. Nonetheless, other mediators of LPS-evoked signaling may also be involved in this effect. MAPKs are directly involved in the up-regulation of pro-inflammatory cytokines in cells of the immune system [37]. In RAW 264.7 cells, the up-regulation of NO, TNF- α and IL-1 β levels by LPS was extensively demonstrated to be dependent on MAPKs activation, and either specific or non-specific inhibitors of MAPKs were observed to exert anti-inflammatory actions on this cellular model [38-41]. Such investigations focused on the ability of compounds with potential anti-inflammatory action to inhibit MAPKs, as this effect is directly associated to decrease LPS-triggered cytokine and NO production associated to macrophage activation [40, 42, 43]. As modulators of cytokine production and release, MAPKs also emerge as important modulators of neural plasticity and inflammatory responses; therefore studies on MAPKs regulation of pain have dramatically increased in the last decade [44, 45]. MAPKs inhibitors have been shown to alleviate hyperalgesia and allodynia in inflammatory and neuropathic pain models, although these inhibitors have little or no effect on early physiological pain perception [46].

The formalin test is an animal model of inflammatory pain that generates biphasic behavioral responses and persistent nociception [47]. Furthermore, this model involves activation of spinal glia and behavioral hyperalgesia [48, 49]. The early phase

(neurogenic pain) results from acute activation of nociceptive primary afferent fibers, followed by C-fiber stimulation. This may be selectively blocked by analgesics with a central action, such as morphine. The late phase (inflammatory pain) has been recognized by the central sensitization of spinal cord circuits associated with inflammatory reactions in the peripheral tissue. Moreover, the C-fiber activity during the early phase is responsible for sustaining the sensitization of dorsal horn neurons, therefore contributing to the late phase nociceptive behavior [20, 50, 51].

In this study we have shown that SA inhibits the late phase, thus confirming a peripheral mechanism of action while also suggesting the involvement of a central mechanism of analgesic effect. Furthermore, the inflammatory pain is very sensitive to the action of NSAIDs and corticosteroids [52]. The inhibition of nociception in the late phase suggests a probable anti-inflammatory action of SA, which presents the effective partition of pro-inflammatory mediators, such as TNF- α and IL-1 β , indicating that SA acts in a peripheral way, similar to the NSAIDs that are effective against mild and moderate pain.

The mechanical hyperalgesia induced by CG, TNF- α , PGE₂ and DA in mice is responsible by spinal microglia activation, which can contribute to increased production of glial mediators [53]. It has been recognized that glial mediators, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) can modulate both excitatory and inhibitory synaptic transmission [54]. Our studies show that the acute pretreatment with SA increased threshold sensitivity towards mechanical stimuli in CG, TNF- α , PGE₂ or DA-induced mechanical hyperalgesia, which indicates that this compound inhibits the inflammatory cascade by the reduction in ERK 1/2 and p38 phosphorylation, at least partially. Besides, these results indicate that SA has significant anti-hyperalgesic and anti-inflammatory properties. The antinociceptive activity of a

subextract of joso berries (*Juniperus oxycedrus*), which contains high levels of SA, has been reported on peripheral models of pain and seems to involve the inhibition of inflammatory mediators [55].

TNF- α is a potent inflammatory cytokine, which can act as neuromodulator in the spinal cord dorsal horn after peripheral injury, thus enhancing inflammatory and neuropathic pain [56-58]. This cytokine exhibits a crucial role in the hyperalgesia through increased glutamate release from the terminals of C-fibers, leading to enhanced excitatory synaptic transmission; this, in turn, results in a potent induction of pain circuit [57]. We demonstrated that SA was able to decrease the hyperalgesic response induced by TNF- α , which further indicates the importance of SA in modulating inflammatory cascade, as observed with the treatment with indomethacin.

Hyperalgesia evoked by PGE₂ and DA may further enhance inflammatory mediators and phosphorylation of MAPKs, which has been implicated in signaling pathways involved in neural plasticity, peripheral sensitization and pain processing [23, 59]. This nociceptive model has been used to understand pain mechanisms and identify new molecular targets for pharmacological intervention, and also for the identification of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and new opioids development. In this study, PGE₂ and DA-induced hypernociception is reduced by pre-treatment with SA. Taken together, these data suggest that antinociceptive activity of SA is due to cytokines inhibition and decreased ERK 1/2 and p38, thus suggesting a possible blockade of sensitization or activation of the nociceptor.

According to Bertelli et al. [11], SA is able to modulate IL-8 and IL-6 expression at baseline. Furthermore, SA and its chemical analog, 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid, are potent inhibitors of cytokines and other pro-inflammatory factors, such as TNF- α , NF- κ B, PGE₂ and malondialdehyde (MDA),

which contribute to the analgesic and anti-inflammatory profiles suggested to SA [60-62]. Moreover, LPS can produce changes in inflammatory markers, pain sensitivity (such as hyperalgesia) and negative affection, such as negative mood, which can be associated with peak IL-6 increases [63]. Here, we demonstrated that SA inhibits LPS-induced inflammatory response, so it is possible that the anti-hyperalgesic effect produced by SA is related with inhibition of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α and IL-1 β .

IL-1 β and TNF- α are essential cytokines in several signaling events of the inflammatory response. The release of IL-1 β is mediated by p38 MAPK. TNF- α is up-regulated in pain pathways after injury and secreted by immune and glial cells. TNF- α induces MAPKs phosphorylation and activates NF- κ B [48]. Up-regulation of MAPKs may lead to uncontrolled stimulation of microglia and, therefore, to the exaggerated and continued production of pro-inflammatory mediators, leading to excitotoxicity and nociceptive hypersensitivity [35]. These reports further strengthen our findings and demonstrate a significant role of SA in the regulation of pain by decreasing pro-inflammatory cytokines production through an inhibitory effect on ERK 1/2 and p38 phosphorylation.

In conclusion, our findings indicate that SA suppresses inflammatory events including NO production and the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β in RAW264.7 cells stimulated with LPS. These effects might be mediated, at least in part, through inhibition of ERK 1/2 and p38 MAPKs. This study also demonstrated the analgesic profile of SA in a mice model. This was the first study that identified the antinociceptive and anti-inflammatory effects of SA. In addition, these results encourage effort to better understand the mechanism of SA action in inflammatory and pain processes. This extends previous findings to the potential

therapeutic value of SA on inflammatory pain and further suggests in-depth assessment of the therapeutic value of SA as a novel analgesic for a broad spectrum of inflammatory painful conditions.

5. Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest.

6. Acknowledgements

The Brazilian agencies FAPERGS (#0998120), CNPq, CAPES, FAPITEC-SE and PROPESQ-UFRGS supported this work.

7. References

- [1] Estévez AM, Estévez RJ. A short overview on the medicinal chemistry of (-)-shikimic acid. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12:1443-54.
- [2] Wang GW, Hu WT, Huang BK, Qin LP. *Illicium verum*: a review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2011;136:10-20.
- [3] Nakamura T, Okuyama E, Yamazaki M. Neurotropic components from star anise (*Illicium verum* Hook. fil.). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1996;44:1908-14.
- [4] Thring TS, Hili P, Naughton DP. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement Altern Med*. 2009;9:27.
- [5] Benmalek Y, Yahia OA, Belkebir A, Fardeau ML. Anti-microbial and anti-oxidant activities of *Illicium verum*, *Crataegus oxyacantha* ssp *monogyna* and *Allium cepa* red and white varieties. *Bioengineered*. 2013;4:244-8.
- [6] Bradley D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4:945-6.
- [7] Rabelo TK, Zeidán-Chuliá F, Caregnato FF, Schnorr CE, Gasparotto J, Serafini MR, et al. In Vitro Neuroprotective Effect of Shikimic Acid Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress. *J Mol Neurosci*. 2015.
- [8] Manna K, Khan A, Kr Das D, Bandhu Kesh S, Das U, Ghosh S, et al. Protective effect of coconut water concentrate and its active component shikimic acid against hydroperoxide mediated oxidative stress through suppression of NF- κ B and activation of Nrf2 pathway. *J Ethnopharmacol*. 2014;155:132-46.
- [9] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.

- [10] Xing J, Sun J, You H, Lv J, Dong Y. Anti-inflammatory effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on acetic acid-induced colitis in rats. *Inflammation*. 2012;35:1872-9.
- [11] Bertelli AA, Mannari C, Santi S, Filippi C, Migliori M, Giovannini L. Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in an in vitro model. *J Med Virol*. 2008;80:741-5.
- [12] Cunha TM, Verri WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1755-60.
- [13] Guimaraes AG, Xavier MA, de Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012;385:253-63.
- [14] Nagakura Y. Challenges in drug discovery for overcoming 'dysfunctional pain': an emerging category of chronic pain. *Expert opinion on drug discovery*. 2015;10:1043-5.
- [15] McCurdy CR, Scully SS. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life sciences*. 2005;78:476-84.
- [16] Gelain DP, Moreira JCF. Evidence of increased reactive species formation by retinol, but not retinoic acid, in PC12 cells. *Toxicology in Vitro*. 2008;22.
- [17] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:131-8.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

- [19] Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;554:221-33.
- [20] Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987;30:103-14.
- [21] Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001;53:597-652.
- [22] Cunha TM, Verri WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:401-7.
- [23] Villarreal CF, Funez MI, Figueiredo F, Cunha FQ, Parada CA, Ferreira SH. Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: the involvement of distinct signalling pathways. *Life Sci.* 2009;85:822-9.
- [24] DUNHAM NW, MIYA TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc.* 1957;46:208-9.
- [25] Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, Cavalcanti SC, Antonioli AR, Bonjardim LR, et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107:949-57.
- [26] Xing JF, Sun JN, Sun JY, You CY, Dong K, Lv J, et al. Protective effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid in rats. *Dig Dis Sci.* 2012;57:2045-54.
- [27] Gammelsrud A, Solhaug A, Dendele B, Sandberg WJ, Ivanova L, Kocbach Bolling A, et al. Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicology and applied pharmacology.* 2012;261:74-87.

- [28] Choi YH, Kim GY, Lee HH. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through Toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB signaling pathways. *Drug design, development and therapy*. 2014;8:1941-53.
- [29] Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, et al. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF-kappaB-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology*. 2013;218:1452-67.
- [30] Rhee JW, Lee KW, Kim D, Lee Y, Jeon OH, Kwon HJ, et al. NF-kappaB-dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression by lipopolysaccharide in a macrophage cell line RAW 264.7. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2007;40:88-94.
- [31] Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wodarski R, Davies M, Fernandes ES, et al. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain*. 2009;141:135-42.
- [32] Ndengele MM, Cuzzocrea S, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Matuschak GM, et al. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB J*. 2008;22:3154-64.
- [33] Navarro SA, Serafim KG, Mizokami SS, Hohmann MS, Casagrande R, Verri WA. Analgesic activity of piracetam: effect on cytokine production and oxidative stress. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013;105:183-92.
- [34] Hong GE, Kim JA, Nagappan A, Yumnam S, Lee HJ, Kim EH, et al. Flavonoids Identified from Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi Inhibit Inflammatory Signaling

by Suppressing Activation of NF- κ B and MAPK in RAW 264.7 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:912031.

[35] Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:217-31.

[36] Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185.

[37] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1754:253-62.

[38] Kang HJ, Hong SH, Kang KH, Park C, Choi YH. Anti-inflammatory effects of Hwang-Heuk-San, a traditional Korean herbal formulation, on lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *BMC complementary and alternative medicine.* 2015;15:447.

[39] Kang EH, Gebru E, Kim MH, Cheng H, Park SC. EstA protein, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in RAW 264.7 macrophages through NF-kappaB/MAPK. *Microb Pathog.* 2009;47:196-201.

[40] Feng D, Ling WH, Duan RD. Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-kappaB in macrophages. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al].* 2010;59:115-21.

[41] Kim KN, Ko YJ, Yang HM, Ham YM, Roh SW, Jeon YJ, et al. Anti-inflammatory effect of essential oil and its constituents from fingered citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*) through blocking JNK, ERK and NF-kappaB signaling pathways in LPS-

- activated RAW 264.7 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013;57:126-31.
- [42] Choi YH, Kang HJ. Fructus sophorae attenuates secretion of proinflammatory mediators and cytokines through the modulation of NF-kappaB and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *General physiology and biophysics*. 2016.
- [43] Jin X, Wang J, Xia ZM, Shang CH, Chao QL, Liu YR, et al. Anti-inflammatory and Anti-oxidative Activities of Paeonol and Its Metabolites Through Blocking MAPK/ERK/p38 Signaling Pathway. *Inflammation*. 2016;39:434-46.
- [44] Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*. 2009;60:135-48.
- [45] Cheng JK, Ji RR. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*. 2008;33:1970-8.
- [46] Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, Wen YR, Zhang YQ. Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2007:359-89.
- [47] Fu KY, Light AR, Maixner W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. *Neuroscience*. 2000;101:1127-35.
- [48] Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med*. 2010;16:1267-76.
- [49] Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of neuroscience methods*. 1985;14:69-76.
- [50] Shields SD, Cavanaugh DJ, Lee H, Anderson DJ, Basbaum AI. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. *Pain*. 2010;151:422-9.

- [51] McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett*. 1996;208:45-8.
- [52] Dai Y, Ye WC, Wang ZT, Matsuda H, Kubo M, But PP. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L in mice. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:245-50.
- [53] Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:429-39.
- [54] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng JK, Ji RR. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *J Neurosci*. 2008;28:5189-94.
- [55] Orhan N, Aslan M, Pekcan M, Orhan DD, Bedir E, Ergun F. Identification of hypoglycaemic compounds from berries of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* through bioactivity guided isolation technique. *J Ethnopharmacol*. 2012;139:110-8.
- [56] Liu YL, Zhou LJ, Hu NW, Xu JT, Wu CY, Zhang T, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF-kappa B, JNK and p38 MAPK. *Neuropharmacology*. 2007;52:708-15.
- [57] Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:533-48.
- [58] Park CK, Lü N, Xu ZZ, Liu T, Serhan CN, Ji RR. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci*. 2011;31:15072-85.

- [59] O'Brien DE, Alter BJ, Satomoto M, Morgan CD, Davidson S, Vogt SK, et al. ERK2 Alone Drives Inflammatory Pain But Cooperates with ERK1 in Sensory Neuron Survival. *J Neurosci.* 2015;35:9491-507.
- [60] Sun J, Zhang S, Wu J, Jia Z, Wu T, Dong S. 3, 4-Oxo-Isopropylidene-Shikimic Acid Ameliorated Gait Behavioral Dysfunction in App/Ps1 Double Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Basic & clinical pharmacology & toxicology.* 2014;115:173-.
- [61] Xing JF, You CY, Dong K, Sun JY, You HS, Dong YL, et al. Ameliorative effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis and their mechanisms in rats. *Int Immunopharmacol.* 2013;15:524-31.
- [62] Xing JF, Sun JY, You HS, Lv J, Sun JN, Dong YL. Anti-Inflammatory Effect of 3,4-Oxo-isopropylidene-shikimic Acid on Acetic Acid-Induced Colitis in Rats. *Inflammation.* 2012;35:1872-9.
- [63] Wegner A, Elsenbruch S, Maluck J, Grigoleit JS, Engler H, Jäger M, et al. Inflammation-induced hyperalgesia: effects of timing, dosage, and negative affect on somatic pain sensitivity in human experimental endotoxemia. *Brain Behav Immun.* 2014;41:46-54.

Figure Legends

Fig. 1. Effects of SA on cellular viability and morphology of RAW 264.7 cells. **(A)**

Viability of RAW 264.7 cells after LPS and/or SA treatments. Cells were pre-incubated with 1 mM or 10 mM of SA for 1 hour and then stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for additional 24 hours as described in “material and methods” section. Cellular viability was assessed by analyzing MTT assay. Bars represent mean \pm SEM, n=6, quadruplicate. ***p<0.001 versus control group; (#) p<0.001 versus LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni selected groups comparison *post hoc* test). **(B)** Phase contrast micrographs show morphological changes of RAW 264.7 cells after 24 hours of treatments with SA (1 mM or 10 mM) in the presence or absence of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Fig. 2. Effects of SA on LPS-induced nitrite levels in RAW 264.7 cells. Nitrite

production by cells incubated for 24 h in the presence of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with or without SA 1 and 10 mM was quantified in the incubation medium by the Griess method. Bars represent mean \pm SEM, n=6, quadruplicate. ***p<0.001 versus control group; (#) p<0.001 versus LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni selected groups comparison *post hoc* test).

Fig. 3. Effect of SA on the LPS-induced TNF- α and IL-1 β immunocontent in RAW

264.7 cells. Cells were pre-incubated with 1 mM or 10 mM of SA for 1 hour and then stimulated with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for additional 24 hours as described in “material and methods” section. Graphs show the relative quantification of TNF- α **(A)** and IL-1 β **(B)** in relation to β -actin levels. Representative images (western blots) are shown. Bars represent mean \pm SEM, n=6, quadruplicate. ***p<0.001

27

versus control group; (#) $p < 0.001$ versus LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni selected groups comparison *post hoc* test).

Fig. 4. Effect of SA on the LPS-induced phosphorylation of ERK 1/2 and p38 in RAW 264.7 cells. Cells were pre-incubated with 1 mM or 10 mM of SA for 1 hour and then stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for additional 24 hours as described in “material and methods” section. Graphs show the relative quantification of p-ERK 1/2 (**A**) and p-P38 (**B**), in relation to its total content. Representative images (western blots) are shown. Bars represent mean \pm SEM, $n=6$, quadruplicate. *** $p < 0.001$ versus control group; (#) $p < 0.001$ versus LPS (one-way ANOVA followed by Bonferroni selected groups comparison *post hoc* test).

Fig 5. Effects of SA on formalin-induced mice nociception. Vehicle (control), SA (50, 100, and 200 mg/kg), indomethacin were administered i.p. 0.5 hour before formalin injection. (**A**) Represents the first phase and (**B**) represents second phase of formalin-induced nociception. Each column represents mean \pm S.E.M. ($n=8$). * $p < 0.01$ or ** $p < 0.001$ versus control (one-way ANOVA followed by Dunnet *post hoc* test).

Fig 6. Effects of the acute administration of vehicle, SA (50, 100, or 200 mg/kg; i.p.), and indomethacin on (**A**) carrageenan, (**B**) TNF- α , (**C**) dopamine, and (**D**), PGE₂-induced mechanical hyperalgesia. Each point represents the mean \pm SEM of the paw withdrawal threshold (in grams) to tactile stimulation of the ipsilateral hind paw. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ versus control group (one-way ANOVA followed by Dunnet *post-hoc* test).

28

Fig. 7. Time (s) on the Rota-rod observed in mice after i.p. treatment with vehicle (control), SA (50, 100, and 200 mg/kg) or diazepam (DZP, 1.5 mg/kg). The motor response was recorded for the following 180 s. after drug treatment. Statistical differences versus control group were calculated using one-way ANOVA, followed by Dunnet *post-hoc* test (n=8). *p< 0.001.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

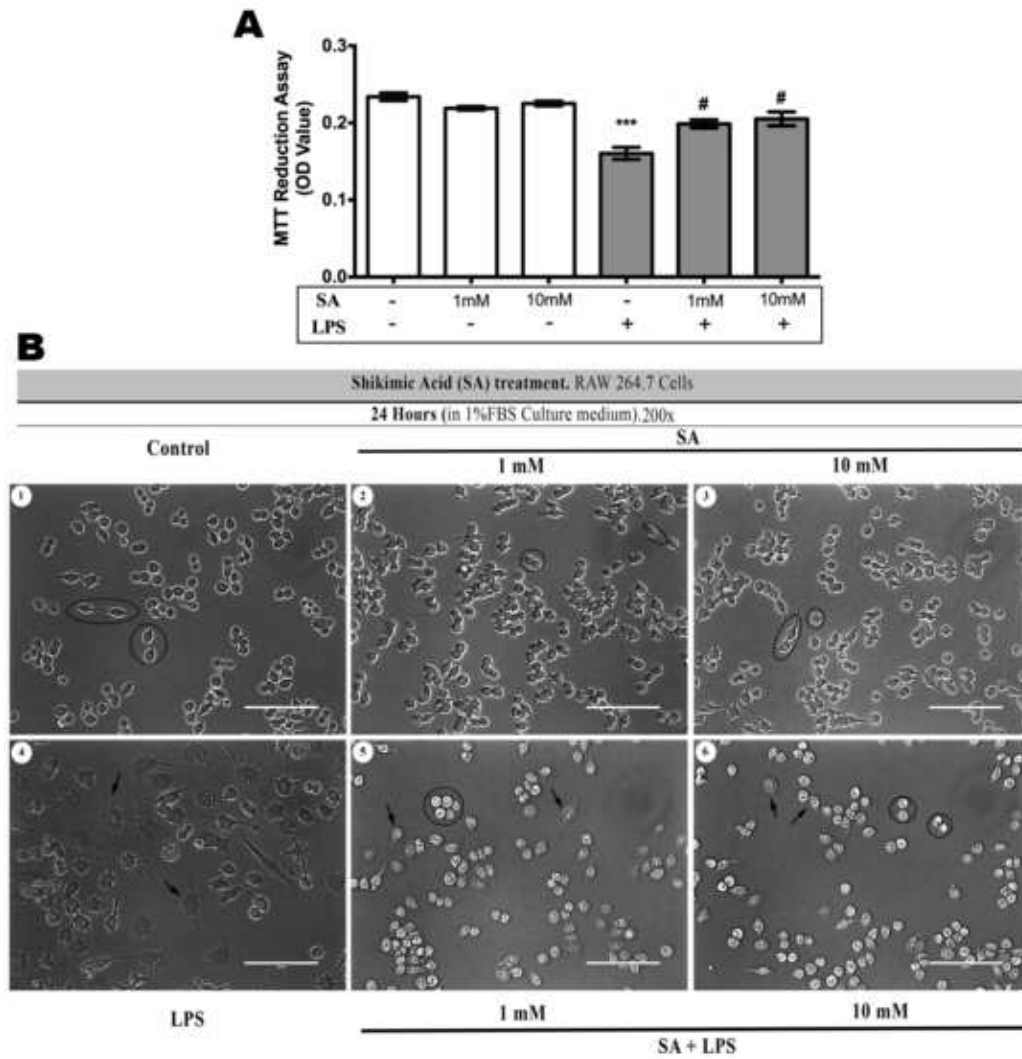


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

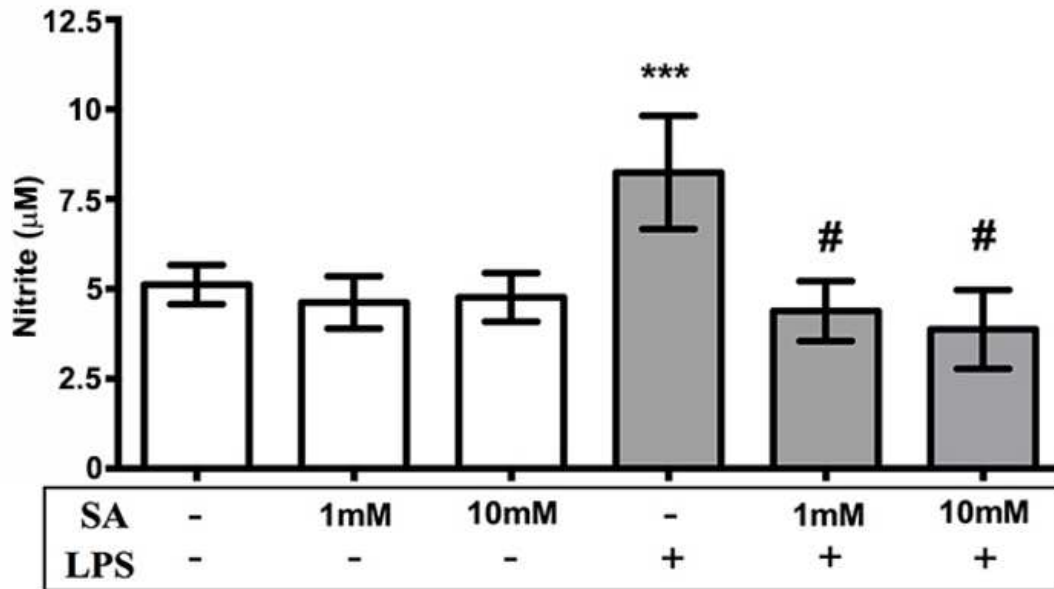


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

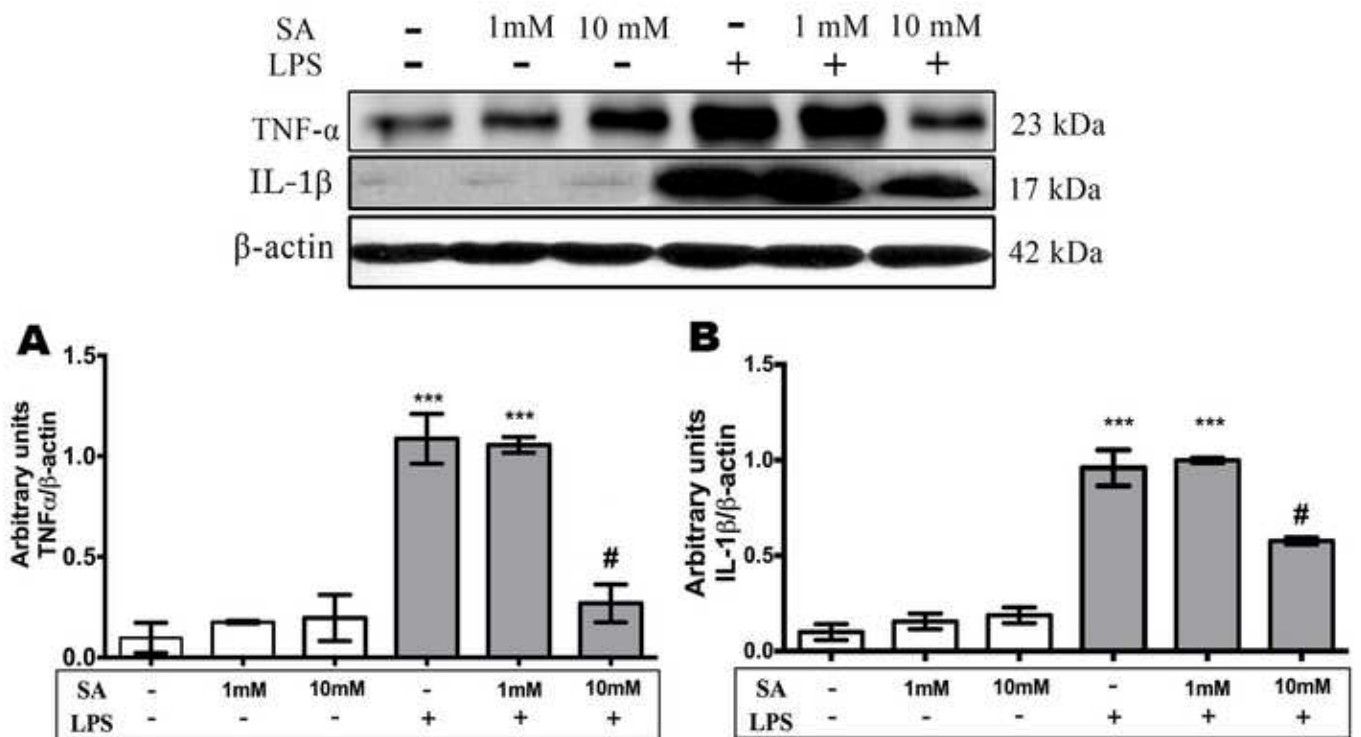


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

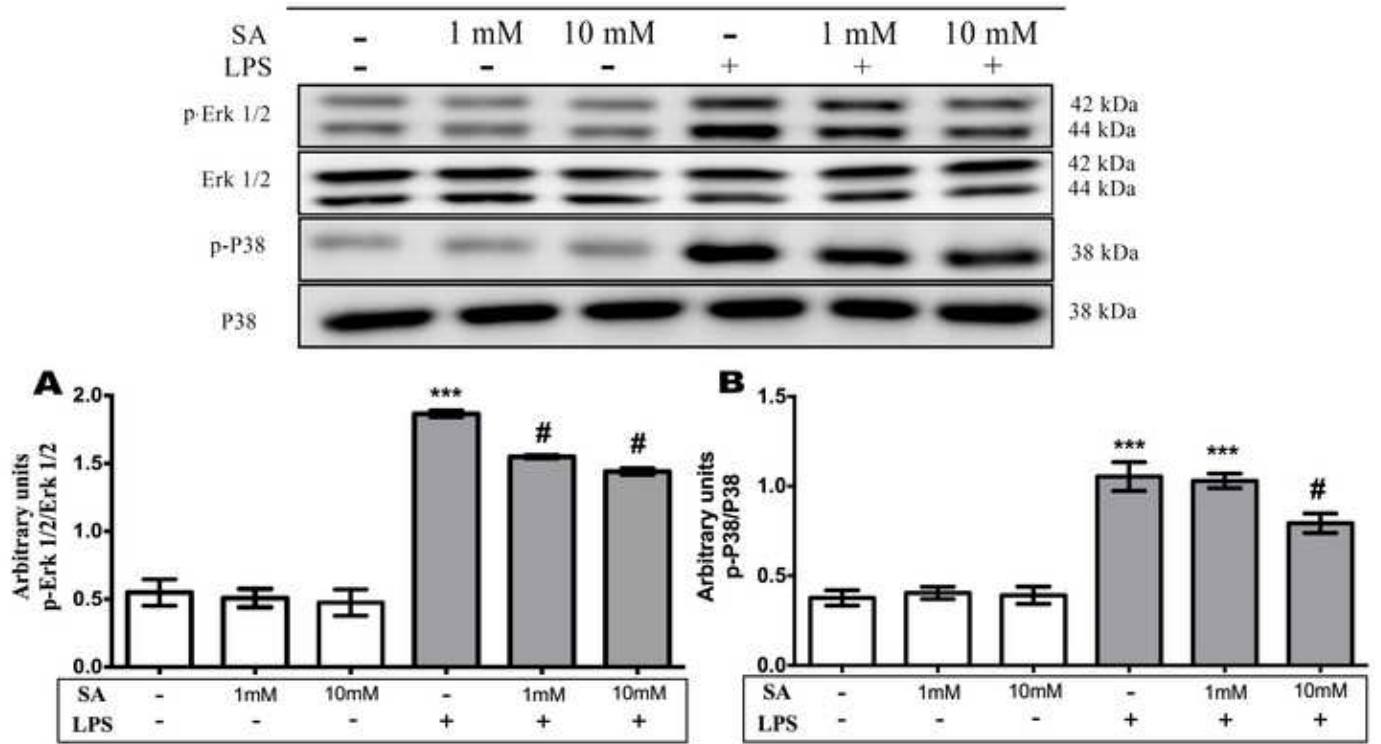


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

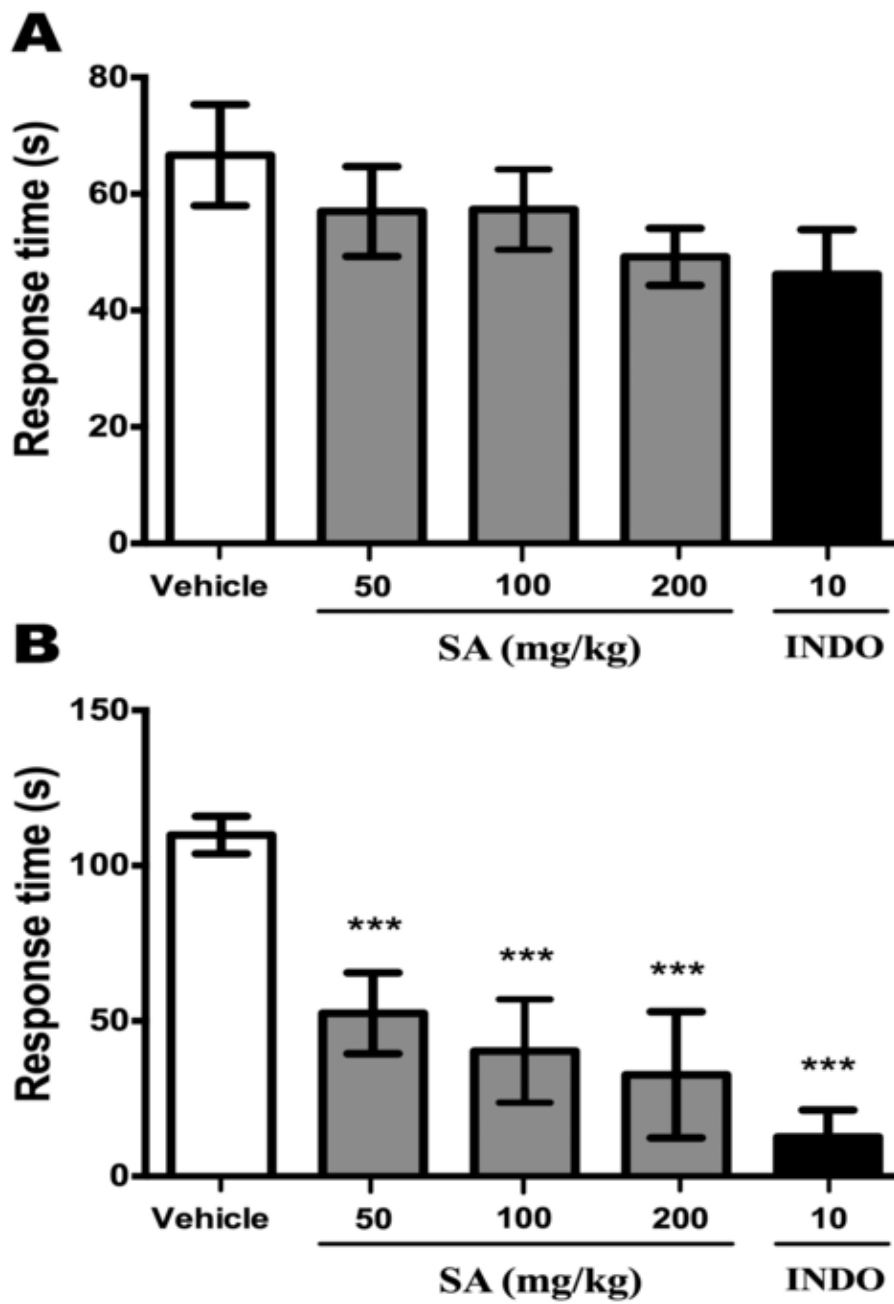


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

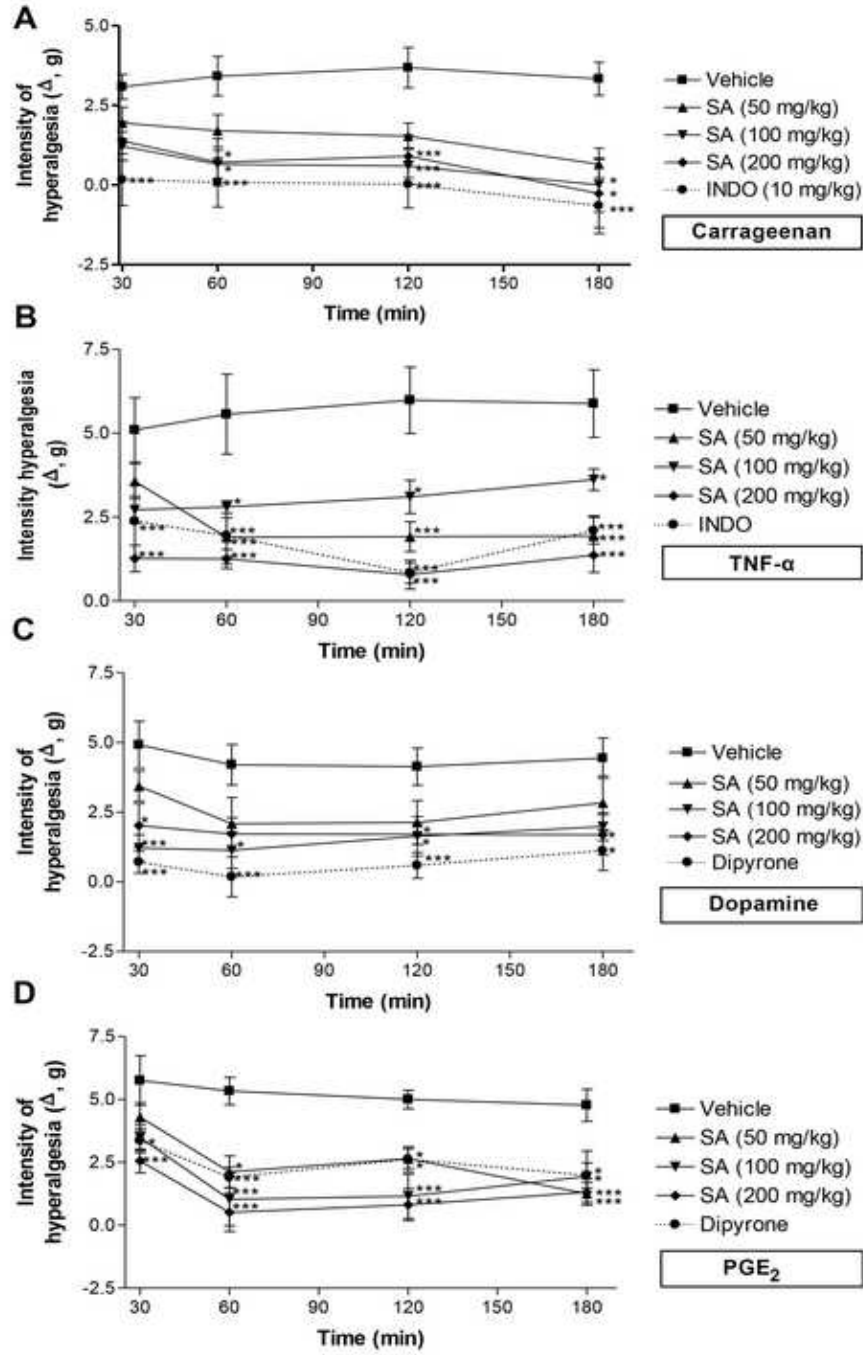
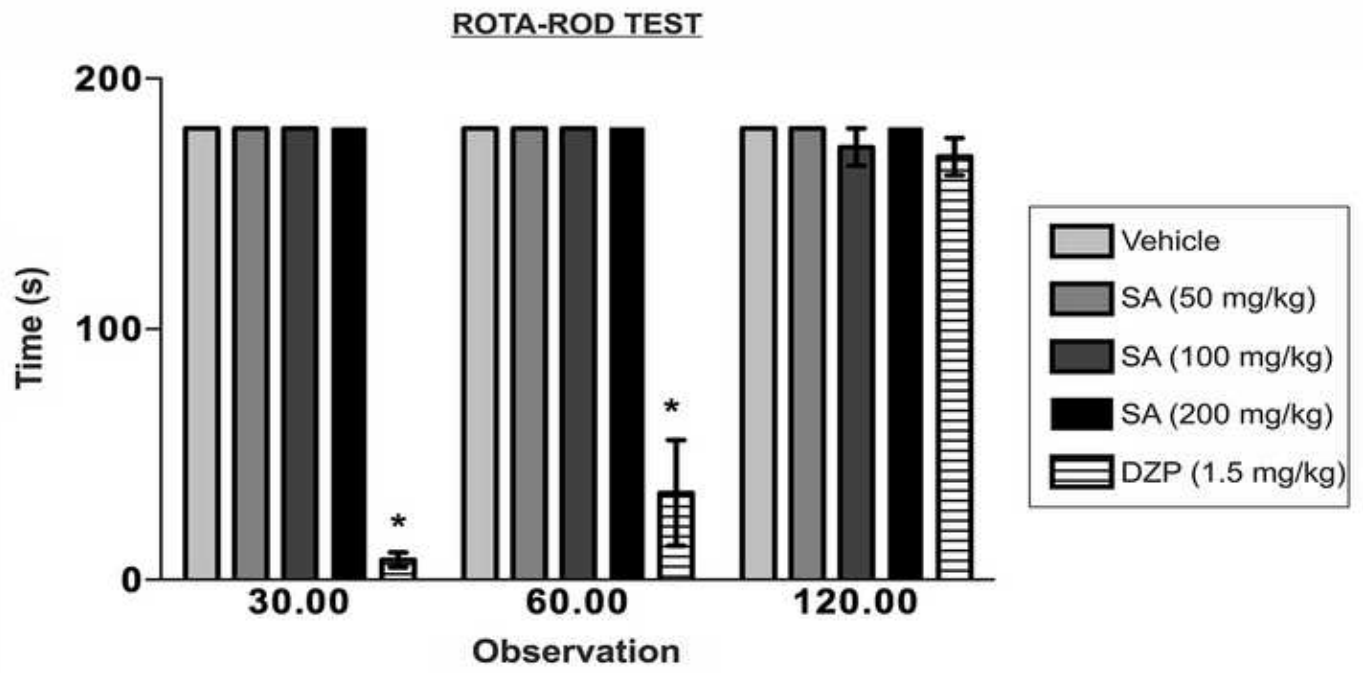


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)



PARTE III
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

3. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm investigado o potencial terapêutico dos compostos naturais que apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas. Estas atividades estão relacionadas com a ação de prevenir ou reduzir o impacto do stress oxidativo em doenças inflamatórias diretamente relacionadas a dor (Sánchez *et al.*, 2015).

O ACH apresenta evidente relevância farmacêutica por atuar como precursor na síntese de compostos com significativos efeitos antioxidantes, analgésicos e anti-inflamatórios (Wang *et al.*, 2011; Estévez and Estévez, 2012; Xing *et al.*, 2012). Sendo assim, o presente estudo caracterizou as propriedades redox-ativas do ACH frente a diferentes EROs e ERNs. Além disso, para avaliar o possível potencial neuroprotetor desse composto, utilizamos a linhagem SH-SY5Y, como um modelo *in vitro* de lesão neuronal provocada pelo H₂O₂. Todavia, também é considerado de grande interesse o conhecimento das propriedades físico-químicas do ACH através das técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG). De acordo com Ionashiro (2004), estas técnicas de análises térmicas fornecem informações da variação de massa, estabilidade térmica, ponto de fusão e pureza das amostras, entre outras, sendo frequentemente empregadas na avaliação do estado físico e químico de fármacos livres (Araújo *et al.*, 2003).

O presente estudo descreve pela primeira vez a caracterização térmica do ACH. Este processo permitiu a avaliação das propriedades físicas do ACH enquanto o mesmo foi submetido a uma programação controlada de temperatura. Através da análise da curva de DSC do ACH podemos verificar um pico endotérmico intenso com intervalo de 179 a 187 °C e com as seguintes características: Melting onset ($T_m = 185$ °C; Energia de entalpia – ($\Delta H = 225$ J g⁻¹). Após a fusão, a decomposição do composto foi demonstrada em dois eventos endotérmicas (216 e 324 °C) e um exotérmica (448 °C). Estes resultados além de

fornecerem evidências à cerca da energia necessária para elevar o estado de agitação molecular do ACH, onde o composto no estado sólido passa para o estado líquido também demonstra as fases do processo de decomposição (Menezes *et al.*, 2015). Além disso, a DSC mede as variações de energia térmica a fim de manter em equilíbrio as temperaturas da amostra durante o evento térmico (Yoshida *et al.*, 2010). Esses resultados foram confirmados pela técnica de TG/DTG, onde a decomposição do composto foi medida em cada evento térmico e os resultados foram representados em forma de curvas (Moreira *et al.*, 2016). É importante ressaltar que em cada evento térmico ocorreram as percentagens de perda de massa (Δm). Desta maneira a DTG transforma os eventos de perda de massa em picos para facilitar a visualização destes eventos. Sendo assim, nos intervalos de temperatura entre: 214 - 296 °C ($\Delta m = 24.5\%$), 296 - 440 °C ($\Delta m = 56.0\%$) em torno de 440 °C ($\Delta m = 17.8\%$), essa diminuição de percentagem de perda de massa possivelmente pode estar relacionado ao do processo de carbonização do composto. Outro dado importante obtido através da aplicação da análise da curva TG foi a cinética de decomposição do ACH. Após a determinação da faixa de temperatura de decomposição do ACH, foram traçadas cinco curvas TG que foram submetidas ao método de Ozawa, com a finalidade de se obter os parâmetros cinéticos da reação. Com esse método, calculamos a energia de ativação no início da decomposição entre as temperaturas (214 - 248°) (OZAWA, 2000). Para complementar os resultados também aplicamos o método não isotérmico, onde a energia de ativação foi medida a partir do primeiro estágio de decomposição térmica e resultou em um valor de 125.8KJ mol^{-1} . A partir da análise desses resultados, podemos mensurar a energia necessária que o ACH apresenta para iniciar uma reação (Georgieva *et al.*, 2012). A análise dos dados apresentou uma boa correlação nas cinco taxas de aquecimento. Esses resultados são de suma importância para a realização dos estudos farmacológicos relacionados a caracterização de novos fármacos, pois ajuda na

determinação do grau de pureza, análise da estabilidade e principalmente na avaliação da decomposição térmica dos fármacos.

O estudo do envolvimento do estresse oxidativo e nitrosativo na patologia das doenças neurodegenerativas e inflamatórias ainda é um dos assuntos mais abordados pela comunidade científica (Sultana *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015). Para compreender essa relação é preciso entender que as EROs e ERNs apresenta um duplo comportamento atuando na regulação do sistema imune e como moléculas sinalizadoras no processo de diferenciação celular (Hultqvist *et al.*, 2009). Contudo um desequilíbrio entre a produção de ERs e a atuação das defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas), possivelmente está relacionado a incapacidade dos antioxidantes endógenos em controlar o dano oxidativo/nitrosativo nos alvos biológicos (Cuzzocrea *et al.*, 2001; López-Alarcón and Denicola, 2013). Adicionalmente, o envolvimento do estresse oxidativo com as doenças neurodegenerativas se deve em parte ao fato do SNC ser um dos órgãos mais sensíveis ao estresse oxidativo principalmente devido, aos altos níveis de lipídios peroxidáveis e as defesas antioxidantes endógenas relativamente baixas (Halliwell, 2006a; Sultana *et al.*, 2013). Dentro desse contexto, a ingestão de uma dieta rica em antioxidantes possivelmente, pode diminuir o risco de desenvolver patologias como algumas doenças neurológicas (Pandey and Rizvi, 2009; López-Alarcón and Denicola, 2013; Vepsäläinen *et al.*, 2013). Sendo assim, a caracterização redox de compostos bioativos que estão presentes em alimentos funcionais e são utilizados frequentemente pela população no tratamento de diversas patologias, se faz necessária.

Adicionalmente, além de analisarmos a caracterização físico-química do ACH, também avaliamos o perfil redox *in vitro* do composto frente à diferentes EROs/ERNs. A análise do perfil redox é geralmente utilizada para verificar se o composto vai atuar como uma molécula antioxidante ou pró-oxidante frente a diferentes reações. Isso sugere que

potentes antioxidantes em uma determinada reação podem sofrer auto-oxidação e gerar substâncias reativas e assim, também atuar como pró-oxidantes, dependendo da composição do sistema (Gelain *et al.*, 2006; Halliwell, 2008). No presente estudo, nós observamos que o ACH na concentração de 10 mM apresentou uma alta capacidade e reatividade antioxidante total, atuando principalmente na captura dos radicais peroxila (ROO•) gerados a partir da decomposição térmica de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP). Além de atuar como um excelente antioxidante o ACH também diminuiu os níveis de peroxidação lipídica. Dessa maneira, é possível que a diminuição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) estejam relacionadas a capacidade do ACH em remover o OH•, gerado através da reação de Fenton e responsável pela iniciação da LPO (Halliwell, 2006b). Adicionalmente, o ACH nessa mesma concentração reduziu a produção de nitrito, evidenciando um possível papel no controle de processos inflamatórios. Esses resultados sugerem que o ACH pode estar atuando na remoção do NO impedindo assim a interação dessa ER com o O₂^{•-} e evitando a formação do ONOO⁻, uma molécula oxidante que pode agir sobre resíduos de tirosina, induzir a LPO e causar danos no DNA (Bolaños *et al.*, 2009; Yuste *et al.*, 2015). Além disso, o ACH possivelmente pode modular processos inflamatórios através da redução do NO. Essa hipótese é sustentada pela redução dos níveis de NO e melhora no quadro de pacientes com doenças inflamatórias (Barrachina *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2007). Por outro lado, o AIC, um derivado do ACH, foi capaz de atenuar a elevação dos níveis de peroxidação lipídica, de OH• e O₂^{•-} em cérebro de ratos com lesão isquêmica (Ma *et al.*, 2004). O efeito antioxidante do ACH contra diferentes ERs em modelo *in vitro*, possivelmente pode ser explicado pela estrutura química desse hidrocarboneto aromático. Compostos naturais com evidente ação antioxidante possuem anéis aromáticos com substituintes hidroxílicos, que atuam principalmente como doadores de hidrogênio ou elétrons, desempenhando um importante

papel na captação e neutralização de radicais livres (Rice-Evans *et al.*, 1996; Rösch *et al.*, 2003).

Embora esteja bem estabelecida a importância da caracterização redox *in vitro* de compostos naturais, a sua ação à nível celular também deve ser analisada. Um bom antioxidante não é apenas um composto redutor e neutralizador de ERs, mas sim uma molécula capaz de exercer sua ação antioxidante através da modulação da capacidade antioxidante não enzimática, dos níveis de lipídios peroxidáveis e da expressão das atividades enzimáticas em um ambiente celular frente a um indutor de dano oxidativo. É válido salientar que a participação de diferentes componentes da célula representam um importante papel no desenvolvimento da resposta antioxidante (Jones, 2006; López-Alarcón and Denicola, 2013).

No presente estudo, nós avaliamos o efeito do ACH na viabilidade celular, no controle dos níveis intracelular de EROs, assim como na modulação dos parâmetros de estresse oxidativo em células SH-SY5Y expostas ao H₂O₂. É válido salientar que a concentração do H₂O₂ que inibe 50% do efeito (viabilidade celular, IC₅₀) foi calculada por análise de regressão não-linear. Adicionalmente, em todos os tratamentos as células foram incubadas com meio de cultura contendo apenas 1% de soro fetal bovino (SFB) a fim de evitar resultados falso-positivos, uma vez que o SFB reduz a sensibilidade dos métodos (Von Asmuth *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2015).

No presente estudo, nós observamos que diferentes concentrações (10 nM, 10 µM e 10 mM) de ACH não diminuiu a viabilidade celular, ou seja, não foram citotóxicas. Além disso, as células expostas ao H₂O₂ (350 µM) durante 1 e 24 horas apresentaram uma diminuição significativa da viabilidade celular. Nas células que foram pré-tratadas com ACH e que receberam o insulto pró-oxidante, não ocorreu diminuição significativa da viabilidade. Esse efeito citotóxico foi, em parte, inibido pelo ACH somente nas células que

receberam o insulto durante 1 hora. Possivelmente esse efeito protetor pode estar relacionado à capacidade do ACH em atenuar o aumento dos níveis intracelular de EROs induzidos pelo H₂O₂. Essa hipótese foi confirmada através da avaliação do efeito de diferentes concentrações do ACH na ausência e na presença do H₂O₂ durante o ensaio de oxidação da diclofluorosceína (DCFH-DA). Todas as concentrações de ACH controlaram os níveis de ERs, em um ambiente celular altamente oxidante, apresentando assim um efeito antioxidante frente a um insulto oxidativo causado pelo H₂O₂. O H₂O₂ é utilizado como fonte exógena de EROs, por apresentar uma vida longa estável, ser altamente solúvel, difusível e capaz de atravessar a membrana celular e alterar morfológicamente as células neuronais com subsequente morte celular por apoptose (Whittemore *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2005). (Zhu *et al.*, 2005). Além desses efeitos, estudos indicam que o H₂O₂ atua diretamente na oxidação de lipídios, proteínas e DNA, assim como na alteração das defesas antioxidantes enzimáticas (Halliwell, 1999; Zhu *et al.*, 2005; Bavari *et al.*, 2016).

De acordo com as diversas atividades biológicas do ACH e seu efeito antioxidante frente a diferentes ERs, a análise da ação desse composto sobre parâmetros oxidativos em células SH-SY5Y expostas ao H₂O₂ se faz necessária. No presente estudo, houve um aumento do potencial antioxidante não enzimático nas células SH-SY5Y pré-tratadas com ACH e expostas ao H₂O₂. Tal resultado indica que esse aumento do potencial antioxidante no ambiente celular provavelmente resulte da alta capacidade do ACH em quelar o ROO•. Provavelmente a ação antioxidante do ACH possa decorrer da inibição ou retardo na formação de ERs impedindo assim os danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂. Adicionalmente, o ACH também controlou o aumento da TBARs. Provavelmente esse efeito protetor contra a LPO se deve ao fato do ACH prevenir ou inibir a oxidação lipídica induzida pelas ERs. A redução do estresse oxidativo correlacionado ao aumento do potencial antioxidante redutor total e a diminuição da LPO observado nas células pré-

tratadas com ACH e desafiadas com H₂O₂, confirmam a hipótese de que o ACH protege as células SH-SY5Y através da inibição da morte celular induzida pelo H₂O₂ e manutenção do ambiente redox celular. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos *in vitro* e *in vivo* que comprovaram o efeito antioxidante do ACH e AIC (Manna *et al.*, 2014).

O aumento da disponibilidade do H₂O₂ pode alterar seriamente os processos de sinalização celular e diminuir as defesas antioxidantes enzimáticas (Matés, 2000; Veal *et al.*, 2007). A modulação dos níveis das enzimas antioxidantes, tais como SOD, catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), estão diretamente relacionadas a alteração da resposta celular frente ao estresse oxidativo (Michiels *et al.*, 1994). Assim, pode-se sugerir que a diminuição na atividade da SOD exercida pelo ACH pode estar relacionado a capacidade desse composto em controlar os níveis de ERs uma vez que, a diminuição nos níveis de O₂•⁻ pode diminuir a atividade dessa enzima (Halliwell e Gutteridge, 2006(Halliwell, 1999)). Além disso, o ACH não alterou a atividade *in vitro* da CAT, mas preveniu o aumento dessa enzima induzido pelo H₂O₂. Entretanto, a diminuição da atividade da CAT, pode estar relacionada aos elevados níveis do substrato (H₂O₂) que pode alterar a atividade dessa enzima (Halliwell e Gutteridge, 2006). Sendo assim, a atividade antioxidante do ACH provavelmente não estar relacionada a modulação das enzimas antioxidantes.

Nos últimos anos, uma grande variedade de estudos tem investigado o efeito de compostos naturais com relevantes atividades biológicas, associadas a prevenção e redução do stress oxidativo em doenças inflamatórias diretamente relacionadas a dor (Quintans *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015; Araújo-Filho *et al.*, 2016). Esse espectro de modulação antioxidante e anti-inflamatória gerou a hipótese de que o ACH poderia modular a expressão aumentada de citocinas (TNF- α e IL- β), do NO e das MAPKs (ERK1/2 e P38) em um modelo clássico de inflamação induzido pelo LPS. Adicionalmente, o ACH poderia

também inibir a hiperalgesia mediada pela CG, TNF- α , PEG₂ e DA em modelo animal.

Para confirmar essa hipótese nós analisamos o comportamento do ACH em macrófagos RAW 264.7 ativados pelo LPS. Essa linhagem é altamente responsiva e imunoativa á essa molécula. Este indutor de inflamação atua principalmente nas vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica, induzindo o aumento da expressão de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), NO e a ativação das MAPKs (Mogensen, 2009; Joo *et al.*, 2014). Sendo assim, substâncias capazes de modular a resposta imunológica através do controle da expressão aumentada de mediadores pró-inflamatórios, podem atuar como um excelente composto anti-inflamatório usado no tratamento de diversas doenças inflamatórias (Hsing *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2012).

De acordo com os nossos resultados, o ACH reduziu significativamente a produção de NO, a expressão do TNF- α e IL- β e das MAPKs (ERK 1/2 e P38) estimuladas pelo LPS na concentração de 1 μ g/mL. A concentração do LPS foi escolhida baseada nos estudos de Gasparotto *et al.*, (2013). Esses resultados associados ao efeito antioxidante dessa molécula em um ambiente altamente oxidativo, sugere que o ACH possa estar controlando o processo inflamatório através da modulação de ERs. Em concordância com essa hipótese, em estudos realizados por Manna *et al.*, (2014), o ACH reduziu os danos oxidativos produzidos pelo H₂O₂, através da modulação das ERs e do NF- κ B. Adicionalmente, em um modelo inflamatório de colite, os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios apresentados por um derivado do ACH foram decorrentes da redução dos níveis plasmáticos de NO e PGE₂, assim como a diminuição da expressão da iNOS e COX-2. Esses resultados foram associados a capacidade do AIC modular da expressão do NF- κ B (Xing *et al.*, 2013).

Atualmente, a compreensão do papel do sistema imunológico na modulação e processamento da dor pode ajudar na identificação de novos alvos terapêuticos usados no

controle da dor (Grace *et al.*, 2014). A relação entre dor e sistema imune cresceu bastante desde as observações clínicas realizadas na década de 70 onde pacientes com dor crônica apresentaram, além da hiperalgesia, que é uma resposta sistêmica clássica em condições de dor crônica, outros sintomas, como: letargia, depressão e ansiedade. A concomitância do comportamento da doença com a dor crônica é, portanto, sugestivo de uma atividade imunológica subjacente (Grace *et al.*, 2014). Adicionalmente, a dor inflamatória está relacionada à sensibilização de nociceptores que compõem a via nociceptiva, levando assim a sensação dolorosa em resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) e aos não nocivos (alodinia) (Cunha *et al.*, 2005). Em concordância com esses dados, podemos sugerir que compostos com atividade anti-inflamatória associada principalmente ao controle dos mediadores de inflamação poderiam também atuar na modulação da dor. Sendo assim, para determinar se o ACH possui atividade antinociceptiva *in vivo*, nós analisamos a ação desse composto na nocicepção induzida pela formalina, na hiperalgesia mecânica mediada por CG, TNF- α , PGE₂ e DA e por fim, avaliamos o seu efeito sobre o desempenho motor.

No presente trabalho observou-se que o ACH no teste da formalina inibiu a nocicepção na segunda fase, atuando assim de uma maneira periférica no controle da dor leve e moderada. O teste da formalina é um modelo animal de dor inflamatória que gera respostas comportamentais bifásica e a nocicepção persistente (Fu *et al.*, 2000). A primeira fase (dor de origem neurogênica), caracteriza-se pelo estímulo direto da formalina no nociceptor. A segunda fase (dor inflamatória) resulta da sensibilização central dos circuitos da medula espinhal associados as reações inflamatórias no tecido periférico (Hunskar and Hole, 1987; Mccall *et al.*, 1996). Baseados nesses dados podemos sugerir que o efeito antinociceptivo apresentado pelo ACH nesse modelo de dor inflamatória pode estar relacionado a uma possível atividade anti-inflamatória apresentada por esse composto.

Na análise da hiperalgesia mecânica induzida por CG, o TNF- α , PGE₂ e DA em camundongos machos Swiss, o pré-tratamento agudo com ACH aumentou a sensibilidade do limiar nociceptivo mediado por esses estímulos mecânicos. É válido salientar que na hiperalgesia induzida por carragenina ocorre o aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α , e a quimiocina derivada de queratinócitos (KC). A KC atua na hipernocicepção inflamatória através da liberação de aminas simpatomiméticas, como a DA. Adicionalmente, o efeito hipernociceptivo induzido pelo TNF- α é responsável pela ativação do receptor TNF-R1 com consequente liberação da IL-1 β (Cunha *et al.*, 2005). Esta interleucina, além de promover a liberação de prostanóides, também induz o aumento da expressão da COX-2 e da iNOS, responsáveis pela biossíntese de PGE₂ e produção aumentada de NO, respectivamente (Cunha *et al.*, 1992; Molina-Holgado *et al.*, 2000).

O TNF- α e IL-1 β além de atuarem diretamente na sensibilização dos nociceptores também são responsáveis pela ativação das MAPKs (Wajant *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2014). As MAPKs estão diretamente envolvidas na modulação de respostas inflamatórias e na plasticidade neural (Ji *et al.*, 2009). As cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) são responsáveis por ativar fatores de transcrição, induzir a liberação de mediadores pró-inflamatórios e nociceptivos representando assim o seu papel no desenvolvimento e manutenção da dor (Cruz *et al.*, 2005). A p38 regula a sensibilização periférica e espinal, através da expressão de mediadores pró-inflamatórios intensificando assim o processamento da dor (Kumar *et al.*, 2003). É importante ressaltar que todos esses mediadores estão diretamente associados a exacerbação dos processos de dor (Ellis and Bennett, 2013; Ji *et al.*, 2014).

De acordo com todos esses dados podemos sugerir que ação antinociceptiva do ACH possa decorrer da sua atividade antioxidante, assim como da capacidade desse composto em controlar os níveis de NO, TNF- α e IL-1 β e inibir a ativação das MAPKs

(ERK 1/2 e p38) mediada pelo LPS. Diversos estudos utilizam o LPS como um indutor de inflamação e hipernocicepção, visto que essa endotoxina pode produzir alterações nos marcadores inflamatórios, sensibilidade à dor (tal como hiperalgesia) e induzir o aumento da IL-6, TNF- α e IL-1 β (Wegner *et al.*, 2014). Todos esses mediadores inflamatórios atuam diretamente na sensibilização dos nociceptores (George *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2014). Em concordância com esses resultados em estudos realizados por Bertelli *et al.* (2008), o ACH modulou a expressão da IL-8 e IL-6, essas citocinas estão envolvidas na hiperalgesia induzida por agentes inflamatórios. Além disso, o ACH e o seu derivado AIC atuaram como potentes inibidores de citocinas e de outros fatores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , NF-kB, prostaglandina E2 (PGE₂) e malondialdeído (MDA), o que contribui para o perfil analgésico e anti-inflamatórias apresentado por esse composto (Sun *et al.*, 2016).

Baseado na análise dos nossos resultados o ACH atuou como uma molécula antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva. Entretanto para validar a atividade antinociceptiva do ACH, a avaliação do efeito desse composto sobre a coordenação motora, se faz necessário. Desta forma, os nossos resultados mostraram que o ACH não alterou o desempenho motor dos animais nas doses avaliadas. Estes resultados comprovam que a atividade antinociceptiva do ACH é decorrente do seu efeito analgésico e não de uma possível ação depressora dos centros que coordenam a atividade motora a nível do SNC (Millan, 2002).

Embora as diversas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva, tenham sido investigadas nesse estudo, a ação do ACH como um composto neuroprotetor ainda necessita ter a validade e mais esclarecida, o que poderá ser verificado em testes de neuroproteção utilizando modelos de neurotoxicidade induzida em animais. Além disso, para validar a eficácia farmacológica desse composto, são

necessários estudos adicionais *in vivo*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente Tese permitem concluir que:

- ACH necessita de uma temperatura elevada para iniciar o processo de decomposição;
- O ACH é um composto antioxidante capaz de atenuar a morte celular induzida pelo H_2O_2 em células de neuroblastoma SH-SY5Y;
- O ACH apresentou atividade anti-inflamatória, através da inibição da produção de NO e citocinas pró-inflamatórias, tais como $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$ e inibição da ativação das MAPKs (ERK1/2 e p38 MAPK) em um modelo de inflamação induzido pelo LPS em células RAW 264.7;
- O ACH bloqueou a hiperalgesia mediada pela formalina, CG, $TNF-\alpha$, PEG_2 e DA em camundongos;
- O ACH não alterou a coordenação motora dos animais, comprovando assim o seu efeito antinociceptivo.

5. REFERÊNCIAS

ABELSON, H. T.; RABSTEIN, L. S. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. **Cancer Res**, v. 30, n. 8, p. 2213-22, Aug 1970.

ADAM-VIZI, V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 9-10, p. 1140-9, 2005 Sep-Oct 2005.

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 25, p. 2766-78, 2010.

ARAÚJO, A. A. et al. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **Int J Pharm**, v. 260, n. 2, p. 303-14, Jul 2003.

ARAÚJO-FILHO, H. G. et al. Neuroprotective Effect of Natural Products on Peripheral Nerve Degeneration: A Systematic Review. **Neurochem Res**, v. 41, n. 4, p. 647-58, Apr 2016.

ASEA, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 15028-34, Apr 2002.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnol Adv**, v. 33, n. 8, p. 1582-614, Dec 2015.

AZIZ, M. et al. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 93, n. 3, p. 329-42, Mar 2013.

BARRACHINA, M. D.; PANÉS, J.; ESPLUGUES, J. V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Curr Pharm Des**, v. 7, n. 1, p. 31-48, Jan 2001.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 2009.

BAVARI, M. et al. Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of l-carnitine against caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. **Drug Chem Toxicol**, v. 39, n. 2, p. 157-66, Apr 2016.

BENNER, E. J. et al. Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. **PLoS One**, v. 3, n. 1, p. e1376, 2008.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988.

BERTELLI, A. A. et al. Immunomodulatory activity of shikimic acid and quercetin in comparison with oseltamivir (Tamiflu) in an in vitro model. **J Med Virol**, v. 80, n. 4, p. 741-5, Apr 2008.

BEUTLER, B.; RIETSCHER, E. T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 2, p. 169-76, Feb 2003.

BI, X. et al. Evaluation of antioxidant capacity of Chinese five-spice ingredients. **Int J Food Sci Nutr**, v. 66, n. 3, p. 289-92, May 2015.

BIRAGYN, A. et al. Murine beta-defensin 2 promotes TLR-4/MyD88-mediated and NF-kappaB-dependent atypical death of APCs via activation of TNFR2. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 998-1008, Apr 2008.

BLASI, E. et al. A murine macrophage cell line, immortalized by v-raf and v-myc oncogenes, exhibits normal macrophage functions. **Eur J Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1491-8, Oct 1987.

BOCHKOV, D. V. et al. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. **J Chem Biol**, v. 5, n. 1, p. 5-17, Jan 2012. ISSN 1864-6166.

BOLAÑOS, J. P. et al. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 14, p. 1299-315, Nov 2009.

BRADLEY, D. Star role for bacteria in controlling flu pandemic? **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 12, p. 945-6, Dec 2005.

BRAZDOVA, B. et al. Novel easily accessible glucosidase inhibitors: 4-hydroxy-5-alkoxy-1,2-cyclohexanedicarboxylic acids. **Carbohydr Res**, v. 344, n. 3, p. 311-21, Feb 2009.

BRETT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 577-96, Dec 1999.

BRIGHT, R. A. et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. **JAMA**, v. 295, n. 8, p. 891-4, Feb 2006.

CAMOUGRAND, N.; RIGOLET, M. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. **Respir Physiol**, v. 128, n. 3, p. 393-401, Nov 2001.

CHEMPAKAM, B., BALAJI, S., 2008. Chemistry of Spices. CABI publishing, London, UK, pp. 319-330.

CHOUKSEY, D., SHARMA, P., PAWAR, R.S. Biological activities and chemical constituents of *Illicium verum* hook fruits (Chinese star anise). **Der Pharmacia Sinica**, n. 1, p. 1-10.

CHUN, J.; TOSUN, A.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory effect of corymbocoumarin from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* through suppression of NF- κ B signaling pathway and induction of HO-1 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **Int Immunopharmacol**, v. 31, p. 207-15, Feb 2016.

CLINCH, B.; SMITH, J. Roche perspectives on Tamiflu. **Clin Microbiol Infect**, v. 21, n. 3, p. 226-9, Mar 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, Jun 2013.

CRUZ, C. D. et al. Inhibition of ERK phosphorylation decreases nociceptive behaviour in monoarthritic rats. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 411-9, Aug 2005.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660-4, Nov 1992.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-60, Feb 2005.

CUZZOCREA, S. et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 1, p. 135-59, Mar 2001.

Editorial Committee of Chinese Pharmacopoeia (2010). **Chinese Pharmacopoeia**. China Medical Science and Technology Press, Beijing 4-5.

EDMONDSON, D. E. et al. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. **Biochemistry**, v. 48, n. 20, p. 4220-30, May 2009.

EL-SEEDI, H. R. et al. Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 51, n. 12, p. 1439-40, Dec 2003.

ELLIS, A.; BENNETT, D. L. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. **Br J Anaesth**, v. 111, n. 1, p. 26-37, Jul 2013.

ESPINOSA-DIEZ, C. et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biol**, v. 6, p. 183-97, Dec 2015.

ESTÉVEZ, A. M.; ESTÉVEZ, R. J. A short overview on the medicinal chemistry of (-)-shikimic acid. **Mini Rev Med Chem**, v. 12, n. 14, p. 1443-54, Dec 2012.

FARINA, V.; BROWN, J. D. Tamiflu: the supply problem. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 45, n. 44, p. 7330-4, Nov 2006.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur J Pharmacol**, v. 569, n. 3, p. 228-36, Aug 2007.

FRANK-CANNON, T. C. et al. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? **Mol Neurodegener**, v. 4, p. 47, 2009.

FRIEDRICH, C.; SEIDLEIN, H. J. The history of pharmaceutical science. The importance of the discovery of morphine in the development of pharmaceutical science. **Pharmazie**, v. 39, n. 5, p. 340-5, May 1984.

FU, K. Y.; LIGHT, A. R.; MAIXNER, W. Relationship between nociceptor activity, peripheral edema, spinal microglial activation and long-term hyperalgesia induced by formalin. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, p. 1127-35, 2000.

GAL, S. et al. Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. **J Neurochem**, v. 95, n. 1, p. 79-88, Oct 2005.

GAMBOTTO, A. et al. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. **Lancet**, v. 371, n. 9622, p. 1464-75, Apr 2008.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 428010, 2012.

GASPAROTTO, J. et al. Coal and tire burning mixtures containing ultrafine and nanoparticulate materials induce oxidative stress and inflammatory activation in macrophages. **Sci Total Environ**, v. 463-464, p. 743-53, Oct 2013.

GELAIN, D. P. et al. Retinol induces the ERK1/2-dependent phosphorylation of CREB through a pathway involving the generation of reactive oxygen species in cultured Sertoli cells. **Cell Signal**, v. 18, n. 10, p. 1685-94, Oct 2006.

GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. **Exp Neurol**, v. 192, n. 1, p. 163-6, Mar 2005.

GEORGIEVA, V.; ZVEZDOVA, D.; VLAEV, L. Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitosan. **Chem Cent J**, v. 6, n. 1, p. 81, 2012.

GHOSH, S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production of shikimic acid. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 6, p. 1425-31, 2012 Nov-Dec 2012.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 4, p. 217-31, Apr 2014. ISSN 1474-1741.

GUIMARÃES, A. G. et al. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 385, n. 3, p. 253-63, Mar 2012.

GUO, D. J. et al. Antioxidative activities and the total phenolic contents of tonic Chinese medicinal herbs. **Inflammopharmacology**, v. 16, n. 5, p. 201-7, Oct 2008.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 561-4, Mar 2010.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radic Res**, v. 31, n. 4, p. 261-72, Oct 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006a.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006b.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Arch Biochem Biophys**, v. 476, n. 2, p. 107-12, Aug 2008.

HROMETZ, S. L. et al. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-mediated production of hydrogen peroxide in an in vitro model: the role of dopamine, the serotonin-reuptake transporter, and monoamine oxidase-B. **Neurosci Lett**, v. 367, n. 1, p. 56-9, Aug 2004.

HROUDOVÁ, J.; SINGH, N.; FIŠAR, Z. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 175062, 2014.

HSIEH, H. L.; YANG, C. M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 484613, 2013.

HSING, C. H. et al. Anesthetic propofol reduces endotoxic inflammation by inhibiting reactive oxygen species-regulated Akt/IKK β /NF- κ B signaling. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17598, 2011.

HUANG, F. et al. Anti-platelet and anti-thrombotic effects of triacetylshikimic acid in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 39, n. 2, p. 262-70, Feb 2002.

HUANG, Y. et al. Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. **Molecules**, v. 15, n. 11, p. 7558-69, Nov 2010.

HULTQVIST, M. et al. The protective role of ROS in autoimmune disease. **Trends Immunol**, v. 30, n. 5, p. 201-8, May 2009.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, Jul 1987.

JI, R. R. et al. MAP kinase and pain. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 135-48, Apr 2009.

JI, R. R.; XU, Z. Z.; GAO, Y. J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 7, p. 533-48, Jul 2014.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-79, 2006 Sep-Oct 2006.

JOO, T. et al. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. **Saudi J Biol Sci**, v. 21, n. 5, p. 427-35, Nov 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 2001.

KAMAL, M. A. et al. A drug-disease model describing the effect of oseltamivir neuraminidase inhibition on influenza virus progression. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5388-95, Sep 2015.

KAMAT, P. K. et al. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 1, p. 648-61, Jan 2016.

KIM, C. U. et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. **J Am Chem Soc**, v. 119, n. 4, p. 681-90, Jan 1997.

KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **J Nat Prod**, v. 74, n. 6, p. 1539-55, Jun 2011.

KOCH, A. E. et al. Physical exercise might influence the risk of oxygen-induced acute neurotoxicity. **Undersea Hyperb Med**, v. 40, n. 2, p. 155-63, 2013 Mar-Apr 2013.

KOPPULA, S. et al. Recent advances on the neuroprotective potential of antioxidants in experimental models of Parkinson's disease. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 10608-29, 2012.

KUDIN, A. P.; DEBSKA-VIELHABER, G.; KUNZ, W. S. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. **Biomed Pharmacother**, v. 59, n. 4, p. 163-8, May 2005.

KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J. C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 9, p. 717-26, Sep 2003.

LAKHANI, S. A.; BOGUE, C. W. Toll-like receptor signaling in sepsis. **Curr Opin Pediatr**, v. 15, n. 3, p. 278-82, Jun 2003.

LAMPIASI, N.; MONTANA, G. The molecular events behind ferulic acid mediated modulation of IL-6 expression in LPS-activated Raw 264.7 cells. **Immunobiology**, v. 221, n. 3, p. 486-93, Mar 2016.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009.

LAVER, G.; GARMAN, E. Virology. The origin and control of pandemic influenza. **Science**, v. 293, n. 5536, p. 1776-7, Sep 2001.

LIU, D. F. et al. Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains. **Microb Cell Fact**, v. 13, n. 1, p. 40, 2014.

LIU, X. L. et al. Enhanced production of shikimic acid using a multi-gene co-expression system in *Escherichia coli*. **Chin J Nat Med**, v. 14, n. 4, p. 286-93, Apr 2016.

LIU, Y. N. et al. Chemical constituents of plants from the genus *Illicium*. **Chem Biodivers**, v. 6, n. 7, p. 963-89, Jul 2009.

LOPES, F. M. et al. Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotox Res**, v. 22, n. 2, p. 138-49, Aug 2012.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-51, May 2008.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. **Anal Chim Acta**, v. 763, p. 1-10, Feb 2013.

MA, Y. et al. Protective effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on vascular endothelial cell injured by hydrogen peroxide]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 38, n. 12, p. 897-9, Dec 2003.

MA, Y. et al. 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid inhibits adhesion of polymorphonuclear leukocyte to TNF-alpha-induced endothelial cells in vitro. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 2, p. 246-50, Feb 2004.

MALINSKA, D. et al. Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 1163-70, 2010 Jun-Jul 2010.

MANNA, K. et al. Protective effect of coconut water concentrate and its active component shikimic acid against hydroperoxide mediated oxidative stress through suppression of NF- κ B and activation of Nrf2 pathway. **J Ethnopharmacol**, v. 155, n. 1, p. 132-46, Aug 2014.

MARTÍNEZ, J. A.; BOLÍVAR, F.; ESCALANTE, A. Shikimic Acid Production in *Escherichia coli*: From Classical Metabolic Engineering Strategies to Omics Applied to Improve Its Production. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 3, p. 145, 2015.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, Nov 2000.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D.; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**, v. 208, n. 1, p. 45-8, Apr 1996.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, Jul 2008.

MENEZES, P. O. P. et al. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with β -cyclodextrin. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 16, n. 5, p. 440-50, 2015.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 17, n. 3, p. 235-48, Sep 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, Apr 2002.

MIRZA, S.; HARVEY, J. Synthesis of shikimic acid and its phosphonate analogue via Knoevenagel condensation. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 33, p. 4111 - 4114, 1991.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 10, p. 4769-807, Oct 2011.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 240-73, Table of Contents, Apr 2009.

MOLINA-HOLGADO, E. et al. Induction of COX-2 and PGE(2) biosynthesis by IL-1 β is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. **Br J Pharmacol**, v. 131, n. 1, p. 152-9, Sep 2000.

MOREIRA, Í. et al. Characterization and Antihypertensive Effect of the Complex of (-)- β -pinene in β -cyclodextrin. **Curr Pharm Biotechnol**, Apr 2016.

MOSCONA, A. Neuraminidase inhibitors for influenza. **N Engl J Med**, v. 353, n. 13, p. 1363-73, Sep 2005.

MOSSEY, J. M. Defining racial and ethnic disparities in pain management. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 7, p. 1859-70, Jul 2011.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723-37, Nov 2011.

NAKAMURA, T.; OKUYAMA, E.; YAMAZAKI, M. Neurotropic components from star anise (*Illicium verum* Hook. fil.). **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 44, n. 10, p. 1908-14, Oct 1996.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. **Front Aging Neurosci**, v. 2, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-61, Mar 2016.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 3, Mar 2012.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, May 2005.

NIRANJAN, R. The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes. **Mol Neurobiol**, v. 49, n. 1, p. 28-38, Feb 2014.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010.

OZAWA T. Thermal analysis - review and prospect. **Thermochimica Acta**, v. 355, p.35-42, 2000.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, n. 5, p. 270-8, 2009 Nov-Dec 2009.

PERLUIGI, M.; COCCIA, R.; BUTTERFIELD, D. A. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 11, p. 1590-609, Dec 2012.

PIECHOTA-POLANCZYK, A.; FICHNA, J. Review article: the role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 7, p. 605-20, Jul 2014.

POLOMANO, R. C. et al. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. **Pain**, v. 94, n. 3, p. 293-304, Dec 2001.

QUINTANS, J. S. et al. Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 114, n. 6, p. 442-50, Jun 2014.

- RASCHKE, W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, v. 15, n. 1, p. 261-7, Sep 1978.
- REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1267-76, Nov 2010.
- REYES-CHILPA, R. et al. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Sci**, v. 75, n. 13, p. 1635-47, Aug 2004.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 7, p. 933-56, 1996.
- RIDNOUR, L. A. et al. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biol Chem**, v. 385, n. 1, p. 1-10, Jan 2004.
- ROMANO, A. D. et al. Oxidative stress and aging. **J Nephrol**, v. 23 Suppl 15, p. S29-36, 2010 Sep-Oct 2010.
- RÖSCH, D. et al. Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 15, p. 4233-9, Jul 2003.
- SCHMIDT, B. et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, n. 7 Suppl 1, p. S3-9, Jul 2008.
- SCHNEIDER, L. et al. Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 11, p. 2007-17, Dec 2011.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1361-8, Nov 2007.
- SCHÜNEMANN, H. J. et al. WHO Rapid Advice Guidelines for pharmacological management of sporadic human infection with avian influenza A (H5N1) virus. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 21-31, Jan 2007.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-18, Nov 1990.
- SEO, K. H. et al. Saponarin from barley sprouts inhibits NF- κ B and MAPK on LPS-induced RAW 264.7 cells. **Food Funct**, v. 5, n. 11, p. 3005-13, Nov 2014.
- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252-9, Dec 2007.
- SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. Monoamine oxidase: from genes to behavior. **Annu Rev Neurosci**, v. 22, p. 197-217, 1999.

SILVA, J. C. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) in rodents. **BMC Complement Altern Med**, v. 15, p. 197, 2015.

SLOANE, E. et al. Anti-inflammatory cytokine gene therapy decreases sensory and motor dysfunction in experimental Multiple Sclerosis: MOG-EAE behavioral and anatomical symptom treatment with cytokine gene therapy. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 1, p. 92-100, Jan 2009.

SPICKETT, C. M. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. **Redox Biol**, v. 1, p. 145-52, 2013.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; ALLAN BUTTERFIELD, D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 157-69, Sep 2013.

SUNG, Y. Y.; KIM, Y. S.; KIM, H. K. Illicium verum extract inhibits TNF- α - and IFN- γ -induced expression of chemokines and cytokines in human keratinocytes. **J Ethnopharmacol**, v. 144, n. 1, p. 182-9, Oct 2012.

SUNG, Y. Y. et al. Topical application of an ethanol extract prepared from *Illicium verum* suppresses atopic dermatitis in NC/Nga mice. **J Ethnopharmacol**, v. 144, n. 1, p. 151-9, Oct 2012.

SÁNCHEZ, A.; CALPENA, A. C.; CLARES, B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 8, p. 16981-7004, 2015.

THOMAS, M. G. et al. The effect of foetal bovine serum supplementation upon the lactate dehydrogenase cytotoxicity assay: Important considerations for in vitro toxicity analysis. **Toxicol In Vitro**, v. 30, n. 1 Pt B, p. 300-8, Dec 2015.

THOMPSON, M. R. et al. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 920-40, Jun 2011.

TRANG, T. et al. Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. **J Neurosci**, v. 35, n. 41, p. 13879-88, Oct 2015.

TREANOR, J. J. et al. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US Oral Neuraminidase Study Group. **JAMA**, v. 283, n. 8, p. 1016-24, Feb 2000.

TRIPATHI, P. et al. Shikimic acid, a base compound for the formulation of swine/avian flu drug: statistical optimization, fed-batch and scale up studies along with its application as an antibacterial agent. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 2, p. 419-31, Feb 2015.

UBERTI, D. et al. Pergolide protects SH-SY5Y cells against neurodegeneration induced by H₂O₂. **Eur J Pharmacol**, v. 434, n. 1-2, p. 17-20, Jan 2002.

Update: WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, November 2003-May 2008. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 83, n. 46, p. 415-20, Nov 2008.

VALDIGLESIAS, V. et al. Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. **Environ Mol Mutagen**, v. 56, n. 2, p. 125-48, Mar 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M. et al. Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? **Biochim Biophys Acta**, v. 1527, n. 3, p. 161-6, Aug 2001.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Mol Cell**, v. 26, n. 1, p. 1-14, Apr 2007.

VEPSÄLÄINEN, S. et al. Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 1, p. 360-70, Jan 2013.

VON ASMUTH, E. J. et al. LPS and cytokine-induced endothelial cell IL-6 release and ELAM-1 expression; involvement of serum. **Eur Cytokine Netw**, v. 2, n. 4, p. 291-7, 1991 Aug-Sep 1991.

VON ITZSTEIN, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 12, p. 967-74, Dec 2007.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 1, p. 45-65, Jan 2003.

WANG, G. W. et al. Illicium verum: a review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **J Ethnopharmacol**, v. 136, n. 1, p. 10-20, Jun 2011.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci**, v. 2, p. 12, 2010.

WASEEM, T. et al. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. **Surgery**, v. 143, n. 3, p. 334-42, Mar 2008.

WEGNER, A. et al. Inflammation-induced hyperalgesia: effects of timing, dosage, and negative affect on somatic pain sensitivity in human experimental endotoxemia. **Brain Behav Immun**, v. 41, p. 46-54, Oct 2014.

WEI, L. et al. Chemical composition and biological activity of star anise *Illicium verum* extracts against maize weevil, *Sitophilus zeamais* adults. **J Insect Sci**, v. 14, p. 80, 2014.

WHITTEMORE, E. R. et al. A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. **Neuroscience**, v. 67, n. 4, p. 921-32, Aug 1995.

WIDMER, N. et al. Oseltamivir in seasonal, avian H5N1 and pandemic 2009 A/H1N1 influenza: pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics. **Clin Pharmacokinet**, v. 49, n. 11, p. 741-65, Nov 2010. ISSN 0312-5963.

XIE, H. R.; HU, L. S.; LI, G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chin Med J (Engl)**, v. 123, n. 8, p. 1086-92, Apr 2010.

XING, J. et al. Anti-inflammatory effect of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on acetic acid-induced colitis in rats. **Inflammation**, v. 35, n. 6, p. 1872-9, Dec 2012.

XING, J. et al. Ameliorative effects of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid on experimental colitis and their mechanisms in rats. **Int Immunopharmacol**, v. 15, n. 3, p. 524-31, Mar 2013.

XU, Z. Z.; BERTA, T.; JI, R. R. Resolvin E1 inhibits neuropathic pain and spinal cord microglial activation following peripheral nerve injury. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 37-41, Mar 2013.

YANG, J. F. et al. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. **J Med Food**, v. 13, n. 5, p. 1254-62, Oct 2010.

YOSHIDA, M. I. et al. Thermal analysis applied to verapamil hydrochloride characterization in pharmaceutical formulations. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2439-52, Apr 2010.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **J Pharmacol Sci**, v. 101, n. 2, p. 107-17, Jun 2006.

YU, J. et al. Protective effect of L-carnitine against H₂O₂-induced neurotoxicity in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. **Neurol Res**, v. 33, n. 7, p. 708-16, Sep 2011.

YUSTE, J. E. et al. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 322, 2015.

ZECCA, L. et al. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 11, p. 863-73, Nov 2004.

ZHANG, X.; BAO, L. The development and modulation of nociceptive circuitry. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 4, p. 460-6, Aug 2006.

ZHANG, Z. et al. Autophagy in Neurodegenerative Diseases and Metal Neurotoxicity. **Neurochem Res**, v. 41, n. 1-2, p. 409-22, Feb 2016.

ZHU, D. et al. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 16, p. 3695-703, Aug 2005.

ZHUO, M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. **Mol Pain**, v. 3, p. 14, 2007.