

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LARISSA CARDOSO CORRÊA DE ARAÚJO

Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Anti-inflamatória de Extratos e Lectinas Isoladas de
Sementes de *Moringa oleifera*

Recife
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação da Citotoxicidade e Atividade Anti-inflamatória de Extratos e Lectinas Isoladas de Sementes de *Moringa oleifera*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biotecnologia

Aluna: Larissa Cardoso Corrêa de Araújo
Orientadora: Prof^a Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife, Fevereiro de 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araújo, Larissa Cardoso Corrêa de
Avaliação da citotoxicidade e atividade anti-inflamatória de extratos e lectinas isoladas de sementes de *Moringa oleifera* Larissa Cardoso Corrêa de Araújo– Recife: O Autor, 2013.

108 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes

Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Moringaceae 2. Lectinas 3. Células I. Guedes, Patrícia Maria (orientadora) II. Silva, Teresinha Gonçalves da (coorientadora) III. Título**

583.64

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 138

**AVALIAÇÃO DE CITOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
EXTRATOS E LECTINAS ISOLADAS DE SEMENTES DE *MORINGA OLEIFERA***

LARISSA CARDOSO CORRÊA DE ARAÚJO

Banca examinadora

Titulares:

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria Guedes Paiva - UFPE
Orientadora - Membro interno

Prof^ª. Dr^ª. Vláudia Maria Assis Costa - UFPE
Membro externo

Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Barroso Breitenbach Barroso Coelho – UFPE
Membro interno

Suplentes:

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão - UFPE
Membro externo

Prof^ª. Dr^ª. Vera Lúcia De Menezes Lima - UFPE
Membro interno

Dedicatória

Aos meus pais,

Pelo amor, dedicação e apoio incondicionais e por sempre terem acreditado em mim.

Agradecimentos

A Deus, por sempre guiar minha vida.

Aos meus pais, pelo carinho e por me incentivar a buscar meus objetivos.

A Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Guedes Paiva, pela oportunidade, pelo exemplo de competência, dedicação e amor à docência e à pesquisa, pelas orientações, valiosos ensinamentos e incentivos.

A Prof.^a Dr.^a Teresinha Gonçalves da Silva, por sua preciosa ajuda, disponibilidade e por ser sempre uma grande mestra na minha formação profissional e pessoal.

A todos que fazem parte do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos colegas do laboratório de Glicoproteínas, pela eterna disponibilidade em ajudar.

A Adenilda Eugênia de Lima, secretária da Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e dedicação.

A técnica do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos Suzete Mendonça, pela disponibilidade e apoio.

A técnica do Laboratório de Glicoproteínas Maria Reis, por toda a ajuda e ensinamentos.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Tudo é constante transformação e tudo deveria caminhar para o aperfeiçoamento.

(L. Boff)

Resumo

Moringa oleifera é amplamente utilizada na medicina popular e no tratamento de água para consumo humano. As sementes desta planta contêm as lectinas (proteínas que ligam a carboidratos) cMoL (do inglês *coagulant M. oleifera lectin*) e WSMoL (do inglês *water-soluble M. oleifera lectin*). O presente estudo investigou extratos (aquoso e aquoso diluído) e as lectinas cMoL e WSMoL quanto à citotoxicidade sobre células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) e células cancerígenas (NCI-H292, HT-29 e HEP-2), atividade hemolítica e atividade anti-inflamatória em macrófagos estimulados com LPS. O extrato aquoso também foi avaliado quanto à toxicidade aguda em camundongos (2.000 mg/kg) e atividade anti-inflamatória utilizando modelo murino de pleurisia induzida por carragenina. cMoL e o extrato aquoso foram potencialmente citotóxicos para PBMCs (IC_{50} : $11,72 \pm 1,51 \mu\text{g/mL}$ e $34,3 \pm 2,31 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), enquanto WSMoL e o extrato aquoso diluído foram atóxicos para estas células (IC_{50} : $>100 \mu\text{g/mL}$ e $144,8 \pm 1,56 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). No ensaio de toxicidade aguda do extrato aquoso concentrado em camundongos, não houve diferença em relação ao grupo controle, nos seguintes parâmetros: peso dos animais, peso dos órgãos, consumo de água e ração. No entanto, houve redução do número de hemácias, leucócitos, plaquetas, hematócrito e hemoglobina corpuscular média. As preparações avaliadas não apresentaram atividade hemolítica e não interferiram na sobrevivência das células cancerígenas avaliadas. Baixas concentrações do extrato aquoso e lectinas ($6,25 \mu\text{g/mL}$) bem como do extrato aquoso diluído ($50 \mu\text{g/mL}$) promoveram significativa atividade anti-inflamatória sobre macrófagos murinos estimulados com LPS através da regulação de óxido nítrico, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, mas não de IL-6 . No teste da pleurisia, o extrato aquoso reduziu a migração leucocitária de forma dose dependente (inibição de 45,4, 56,1 e 71,2% para as doses de 125, 250 e 500 mg/kg, respectivamente), promoveu a redução dos níveis de óxido nítrico, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e MPO e não atuou sobre IL-6 . Em conclusão, o extrato aquoso e cMoL são potencialmente tóxicos para PBMCs, enquanto WSMoL e o extrato aquoso diluído não são citotóxicos. Adicionalmente, o extrato aquoso não causou toxicidade a nível sistêmico em camundongos após exposição única à dose elevada (2.000 mg/kg v.o.). As preparações avaliadas não causam danos à membrana celular e são potenciais ferramentas farmacológicas por sua atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: Moringaceae. Lectinas. Células.

Abstract

Moringa oleifera is widely used in folk medicine and in treatment of water for human consumption. The seeds of this plant contain the lectins (proteins that bind to carbohydrates) cmol (coagulant *M. oleifera* lectin) and WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin). The present study investigated extracts (aqueous and diluted aqueous) and lectins cmol and WSMoL as for cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and cancer cell lines (NCI-H292, HT-29 and HEp-2), hemolytic activity and anti-inflammatory activity in LPS- stimulated macrophages. The aqueous extract was also evaluated as for acute toxicity in mice (2000 mg /kg) and anti-inflammatory activity using a murine model of carrageenan-induced pleurisy. cmol and the aqueous extract were potentially cytotoxic to PBMCs (IC₅₀: 11.72 ± 1.51 mg/mL and 34.3 ± 2.31 mg/mL, respectively), while WSMoL and the diluted aqueous extract were non-toxic for these cells (IC₅₀ > 100 mg/mL and 144.8 ± 1.56 mg/mL, respectively). In the acute toxicity test of the aqueous extract in mice, there was no difference between the weight of the animals, organ weight, feed and water consumption, compared to the control group. However, there was reduction in the values of erythrocytes, leukocytes, platelets, hematocrit and mean corpuscular hemoglobin concentration. Preparations evaluated showed no hemolytic activity and did not interfere in the survival of cancer cells evaluated. Low concentrations of aqueous extract and lectin (6.25 mg/mL) and dilute aqueous extract (50 mg/mL) promoted significant anti-inflammatory activity on LPS-stimulated murine macrophages by regulating nitric oxide, TNF- α and IL-1 β , but not IL-6. In the test of pleurisy, the aqueous extract reduced the leukocyte migration in a dose dependent manner (inhibition of 45.4, 56.1 and 71.2% for doses of 125, 250 and 500 mg/kg, respectively) caused a reduction levels of nitric oxide, TNF- α , IL-1 β and MPO and not acted on IL-6. In conclusion, the aqueous extract and cmol are potentially toxic to PBMCs, while WSMoL and the diluted aqueous extract are no cytotoxic. Additionally, the aqueous extract did not cause systemic toxicity level in mice after single exposure to a high dose (2000 mg / kg p.o.). Preparations evaluated not cause damage to the cell membrane and are potential pharmacological tools for its anti-inflammatory activity.

Keywords: Moringacea. Lectins. Cells.

Lista de figuras do referencial teórico

Figura 1 Aspectos de <i>Moringa oleifera</i> . (a) Árvore, (b) Folha (c) Inflorescência (d) Fruto e (e) Sementes	18
Figura 2 Migração leucocitária controlada por moléculas de adesão e estímulos quimiotáticos	26
Figura 3 Perfil celular característico da inflamação aguda ao longo do tempo	28
Figura 4 Vias de produção de metabólitos do ácido araquidônico	29
Figura 5 Formação de óxido nítrico a partir do metabolismo do aminoácido L- arginina	33
Figura 6 Esquema da reação catalisada pela enzima mieloperoxidase	35

Lista de figuras do artigo

Figure 1 Effect of the concentrate extract from *M. oleifera* seeds on the activity of myeloperoxidase in the lungs of mice subjected to carrageenan-induced pleurisy after treatment with the extract at doses of 125, 250 or 500 mg/kg. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of groups with 6 animals. * $p < 0.05$ in comparison with control by ANOVA followed by Newman-Keuls test 94

Figure 2 Effect of the concentrate extract from *M. oleifera* seeds on the infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the lungs of mice subjected to carrageenan-induced pleurisy assay (x 400). The fragments were stained with hematoxylin-eosin. (A) Inflammation in mice treated with carrageenan. (B) Reduction of the presence of PLMN in mice that were previously treated with the extract at 500 mg/kg. (C) Reduction of the presence of PLMN in mice that were previously treated with the extract at 250 mg/kg. (D) Extensive infiltration of PLMN in mice that were previously treated with the extract at 125 mg/kg. 95

Lista de tabelas do artigo

Table 1. Cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells and hemolytic activity of <i>M. oleifera</i> seed extracts and lectins	89
Table 2. Effect of <i>M. oleifera</i> seed extracts and lectins on the viability of LPS-stimulated peritoneal macrophages	89
Table 3. Effect of <i>M. oleifera</i> seed extracts and lectins (cMoL and WSMoL) on nitric oxide production by murine macrophages stimulated with LPS	90
Table 4. Effect of <i>M. oleifera</i> seed extracts and lectins (cMoL and WSMoL) on TNF- α , IL-1 β and IL-6 production by murine macrophages stimulated with LPS	90
Table 5. Effect of <i>M. oleifera</i> aqueous extract (2000 mg/kg) on physiological parameters of mice 14 days after administration	91
Table 6. Effect of aqueous extract (2000 mg/kg) on hematological parameters of mice 14 days after administration	91
Table 7. Number of polymorphonuclear leukocytes ($\times 10^3$) in exudate of the pleural cavity after 4 h of pleurisy induction by carrageenan in mice previously treated with aqueous extract	92
Table 8. Effect of aqueous extract on nitric oxide production (μ M) in the assay of carrageenan-induced pleurisy	92
Table 9. TNF- α , IL-1 β and IL-6 (pg/mL) levels after the end of carrageenan-induced pleurisy assay in exudate of the pleural cavity of mice previously treated with aqueous extract	93

Lista de siglas e abreviações

Cox-2	Cicloxygenase 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon γ
IgE	Imunoglobulina E
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LBP	Proteína de ligação ao LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
MMP-9	Metaloproteinase de matriz-9
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão Salina Fosfato pH 7,2
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária do tipo 1
pg	Picograma
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina

PMNL	Leucócitos polimorfonucleares
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TLR4	Receptor <i>Toll like</i> do tipo 4
TXA2	Tromboxano A2
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular do tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 <i>Moringa oleifera</i>	18
3.1.1 Benefícios econômicos do uso de <i>Moringa oleifera</i>	19
3.1.2 Propriedades farmacológicas	19
3.2 Lectinas	21
3.3 Citotoxicidade	24
3.4 Inflamação	25
3.4.1 O processo inflamatório	25
3.4.2 Mediadores da inflamação	28
3.4.2.1 Metabólitos do ácido araquidônico	28
3.4.2.2 Prostaglandinas	30
3.4.2.3 Leucotrienos	31
3.4.2.4 Bradicinina	32
3.4.2.5 Aminas vasoativas	32
3.4.2.6 Óxido nítrico	33
3.4.2.7 Mieloperoxidase	34
3.4.2.8 Citocinas	35
3.4.3 Células do sistema imune envolvidas no processo inflamatório	38

3.4.3.1 Macrófagos	38
3.4.3.2 Linfócitos	40
3.4.3.3 Neutrófilos	41
Referências	42
Artigo	67
4 CONCLUSÕES	96
Anexo A - Normas do periódico Plos One	97

1 INTRODUÇÃO

O avanço da terapêutica está atrelado ao progresso do conhecimento nas mais diversas áreas e a busca por meios capazes de atenuar sintomas ou curar doenças é uma característica marcante da humanidade (KORNBERG et al., 1997).

Diversas doenças como asma, doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide, que acometem parcela considerável da população, estão relacionadas a processos inflamatórios. Estas desordens provocam profundos impactos negativos que vão desde danos individuais a sociais e econômicos, tornando imprescindível a utilização de fármacos para controlar os sintomas da inflamação (GELFAND, 2008; SCOTT; STEER, 2007; SINGH et al., 2003).

No entanto, uma gama de efeitos adversos tem sido atribuída às drogas anti-inflamatórias disponíveis no mercado. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) estão amplamente relacionados a efeitos gastrointestinais (GONZÁLEZ et al., 2010), enquanto os inibidores seletivos da enzima cicloxigenase 2 podem ser associados a efeitos cardiovasculares (FRIES; GROSSER, 2005). Adicionalmente, os anti-inflamatórios esteroidais podem ocasionar uma série de efeitos adversos, como ganho de peso e hiperglicemia (POETKER; REH, 2002). Uma alternativa seriam os fármacos anticitocinas, porém, este tipo de tratamento possui alto custo, além de poder aumentar a susceptibilidade a infecções (RAYCHAUDHURI et al., 2009; VENSON et al., 2011). Desta forma, torna-se evidente a necessidade de buscar novos produtos ativos que causem danos mínimos ao organismo.

A forte dependência de multinacionais para a produção de fármacos observada no Brasil e em outros países também indica a necessidade de intensificação dos esforços para obtenção de maior autonomia. Neste contexto, a química medicinal tem buscado incessantemente desenvolver novas moléculas bioativas (GUERRA et al., 2011; KHAN et al., 2010). Por outro lado, a realização de pesquisas utilizando produtos naturais mostra-se crucial, uma vez que além de proporcionar agregação de valor à biodiversidade, pode possibilitar a obtenção de potenciais fontes para a geração de novos fármacos, a fim de suprir demandas de saúde a nível local e global (JIN et al., 2013). Neste contexto, vale ressaltar que testes de avaliação de citotoxicidade utilizando células tem sido amplamente utilizados como *screening* na avaliação de possíveis efeitos danosos de um produto (DEB et al., 2011).

O elevado número de plantas empregadas na medicina popular, cujas propriedades farmacológicas tem sido avaliadas e comprovadas, bem como a ampla gama de substâncias obtidas de vegetais, indicam o imenso potencial das plantas na obtenção de fitoterápicos, fitofármacos ou como fontes de moléculas protótipo para a geração de novos fármacos (TAUR; PATIL, 2011; WANG et al., 2012). Este potencial é comprovado por meio do elevado número de fármacos obtidos a partir de produtos naturais, como digoxina, morfina, codeína, bem como várias drogas empregadas na terapia contra o câncer como vimblastina, taxol e etoposídeo (CRAGG; NEWMAN, 1999; PHILLIPSON, 2001).

Neste cenário, insere-se a *Moringa oleifera*, planta amplamente empregada para diversos fins, sendo a utilização das sementes altamente recomendada no tratamento de água, sobretudo pela população de países em desenvolvimento (LEA, 2010; MAROYI, 2006). Estudos tem demonstrado a presença de uma série de substâncias bioativas nas sementes de *M. oleifera*, que podem conferir a preparações resultantes deste tecido diversas propriedades farmacológicas (HAMZA, 2010; KAWO et al., 2010; MEHTA; AGRAWAL, 2008). Entre as moléculas isoladas das sementes de *M. oleifera*, estão as lectinas cMoL e WSMoL (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2009).

Vários estudos acerca da toxicidade de preparações de sementes de *M. oleifera* vêm sendo realizados com diversas espécies. Kavitha et al. (2012) demonstraram a toxicidade do extrato aquoso das sementes de *M. oleifera* para uma espécie de peixes de água doce (CL₅₀ = 124 mg/L), acompanhada pela redução dos valores de diversos parâmetros hematológicos, tais como hemoglobina (hb), hematócrito (hct), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), bem como do número de hemácias. Adicionalmente, também foi relatada a toxicidade de preparação aquosa do pó das sementes desta planta sobre o peixe *Poecilia reticulata*, o protozoário *Tetrahymena pyriformis* e a bactéria *E. coli* (GRABOW et al., 1995). Atividades antitumoral e anti-inflamatória também foram descritas para tecidos de *M. oleifera* (KHALAFALLA et al., 2010; MUANGNOI et al., 2012).

Embora a atividade anti-inflamatória tenha sido demonstrada para lectinas (LEITE et al., 2012; SILVA et al., 2010), estudos acerca das ações farmacológicas de cMoL e WSMoL ainda são incipientes. Deste modo, a necessidade de estudos com produtos naturais visando à obtenção de metabólitos bioativos que apresentem efeito terapêutico promissor com reduzidos efeitos colaterais, aliada ao imenso potencial de *M. oleifera* e suas lectinas como ferramentas farmacológicas, justificam a investigação do potencial anti-inflamatório e citotóxico de extratos e das lectinas cMoL e WSMoL isoladas das sementes desta planta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico e anti-inflamatório de extratos e lectinas cMoL e WSMoL isoladas de sementes de *Moringa oleifera*.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a citotoxicidade do extrato aquoso e das lectinas sobre linhagens cancerígenas e células mononucleares de sangue periférico de humanos;
- Investigar a atividade hemolítica do extrato aquoso e das lectinas sobre eritrócitos murinos;
- Verificar a toxicidade aguda do extrato aquoso de *M. oleifera* em camundongos;
- Investigar a ação do extrato aquoso e das lectinas sobre a viabilidade de macrófagos murinos;
- Determinar os níveis de NO, TNF- α , IL-1 β e IL-6 a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos;
- Investigar a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos, através da avaliação da migração celular e níveis de NO, TNF- α , IL-1 β , e IL-6 do exsudato da cavidade pleural;
- Realizar dosagem dos níveis da enzima mieloperoxidase e análise histopatológica nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio de pleurisia induzida por carragenina;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lamarack (fig. 1), também conhecida como Lírio Branco, Quiabo de Quina, Acácia-branca, árvore-rabanete-de-cavalo, cedro e moringueiro, é uma das catorze espécies pertencentes ao gênero *Moringa*, único da família Moringaceae. Trata-se de uma árvore perene, decídua e de crescimento rápido que pode exibir até 10 metros de altura, apresentando numerosos ramos com folhas compostas bi ou tripinadas. Suas flores branco-amareladas são dispostas em inflorescências e os frutos assemelham-se a vagens, possuindo três faces, cada um com cerca de 20

sementes aladas, sendo estimada uma produção anual em torno de 15.000 a 25.000 sementes por árvore (DUKE, 1983; MORTON, 1991; PALADA; CHANG, 2003; PALIWAL; SHARMA; PRACHETA, 2011).



Figura 1 *Moringa oleifera*. (a) árvore, (b) folha (c) inflorescência (d) fruto e (e) sementes (SANTOS, 2009).

Esta planta pode ser encontrada na Índia, Paquistão, Afeganistão e Bangladesh, sendo cultivada também na África e América Latina (OLIVEIRA et al., 1999). A ampla faixa de cultivo deve-se à capacidade de resistir à baixa pluviosidade e tolerar solos ácidos ou alcalinos, bem como solos pouco férteis. Esta espécie apresenta excelente desenvolvimento em regiões tropicais, podendo exibir crescimento satisfatório em climas sub-tropicais com invernos menos rigorosos (MORTON, 1991; MUHL; TOIT; ROBBERTSE, 2011).

Vários estudos têm demonstrado a presença dos mais diversos constituintes químicos em *M. oleifera*, principalmente uma gama de compostos fenólicos associados à atividade antioxidante, flavonóides e glucosinolatos encontrados nas raízes, caules, folhas, flores, frutos e sementes (AMAGLO et al., 2009; SHIH et al., 2011). Além disso, foram encontrados alcaloides, taninos, saponinas e antraquinonas nas sementes (KASOLO et al., 2011; KAWO et al., 2009). Também foi demonstrado que raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes são ricas fontes de proteínas, minerais como cálcio, sódio, potássio e magnésio, bem como ácidos graxos. Vale salientar a presença das vitaminas A, B, C e E, assim como riboflavina, ácido ascórbico, ácido linolênico e ácido fólico nas folhas (AMAGLO et al., 2009; ANWAR et al., 2007; SHIH et al., 2011).

Desta forma, *M. oleifera* constitui importante fonte de nutrientes e compostos bioativos, sendo utilizada, sobretudo em países em desenvolvimento, onde várias partes do vegetal estão inclusas na dieta humana e animal (KASOLO et al., 2010). Assim, a adaptabilidade da planta às

mais diversas condições aliada à presença de variados constituintes químicos e nutrientes lhe confere imensa importância econômica e medicinal (FAHEY, 2005; MANGALE; CHONDE; RAUT, 2012).

3.1.1 Benefícios econômicos do uso de *Moringa oleifera*

A capacidade de coagulação apresentada pelo extrato obtido a partir das sementes secas de *M. oleifera* permite sua utilização no processo de tratamento de água e águas residuais. Esta aplicação se caracteriza como um método alternativo de baixo custo que garante resultados compatíveis ou superiores aos obtidos por meio do uso de coagulantes químicos como o sulfato de alumínio (AMAGLOH; BENANG, 2009; BELTRÁN-HEREDIA; SÁNCHEZ-MARTÍN; BARRADO-MORENO, 2012; NDABIGENGESERE; NARASIAH, 1998).

O tratamento da água com o pó das sementes de *M. oleifera* torna possível a utilização deste recurso para o consumo humano, animal e irrigação. De modo que além de relacionar-se com a redução da turbidez, o tratamento com *M. oleifera* proporciona a melhora da qualidade da água em outros aspectos, ocasionando, por exemplo, a redução do número de ovos de helmintos. Adicionalmente, esta espécie pode representar potencial fonte de combate a vetores de doenças prevalentes em climas tropicais como *Anopheles stephensi* Liston e *Aedes aegypti* (FERREIRA et al., 2009; PRABHU et al., 2011; SENGUPTA et al., 2012). Merece destaque ainda o potencial do óleo das sementes como fonte de biodiesel e a boa atuação como planta forrageira, cujas folhas, ricas em proteínas, apresentam boa digestibilidade, podendo, inclusive, aumentar produção de leite por bovinos em comparação a outras fontes de alimento como a gramínea *Brachiaria brizantha*, sem alterar as características do produto final (RASHID et al., 2008; SÁNCHEZ; SPÖRNDLY; LEDIN, 2006; SILVA et al., 2010).

3.1.2 Propriedades farmacológicas

Vários estudos têm indicado as mais diversas atividades farmacológicas para preparações de diferentes partes da planta. Khalafalla et al. (2010) demonstraram que extratos das folhas de *M. oleifera* possuem a capacidade de reduzir a viabilidade de células leucêmicas e de hepatocarcinoma. Em trabalhos com coelhos, Mehta et al. (2003) e Chumark et al. (2008) observaram, respectivamente, que os frutos e o extrato aquoso das folhas exibem atividade hipolipidêmica.

Muangnoi et al. (2012) investigaram a ação anti-inflamatória *in vitro* do extrato dos frutos de *M. oleifera* em macrófagos Raw 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo e observaram a redução dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios IL-6, TNF- α e NO. A ação anti-inflamatória vem sendo relatada para outras partes da planta como folhas e raiz. Rakesh e Singh, (2011) investigaram a ação dos extratos etanólico e aquoso das folhas de *M. oleifera* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, obtendo como resultado a redução do edema nos tempos de 1, 3 e 5 horas após a indução da inflamação. Além disso, Georgewill et al. (2010) observaram a redução do volume de fluido e do número de células em ratos tratados com o extrato metanólico das raízes no modelo do bolsão de ar induzido por carragenina.

Diversos estudos relataram efeitos protetores de preparações das sementes de *M. oleifera* contra danos promovidos por produtos químicos. Hamza (2010) demonstrou que o extrato etanólico possui atividade hepatoprotetora em ratos tratados com tetracloreto de carbono. Também observou-se a capacidade das sementes desta planta de reduzir a toxicidade induzida por fluoreto, bem como a toxicidade induzida por arsênico (GUPTA et al., 2007; RANJAN et al., 2009). De modo similar, o extrato hidro-etanólico do caule e das folhas de *M. oleifera* possui efeito nefroprotetor contra o carcinógeno 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e o antibiótico gentamicina, respectivamente (OUÉDRAOGO et al., 2011; PALIWAL et al., 2011).

Em concordância com a medicina tradicional indiana, que emprega *Moringa oleifera* no tratamento de diabetes mellitus, o extrato aquoso das folhas reduziu os níveis de glicose no sangue, bem como a perda de proteínas e os níveis de açúcar na urina em ratos hiperglicêmicos (JAISWAL et al., 2009). Adicionalmente, Vijay e kumar (2012) demonstraram que a aplicação tópica do extrato aquoso da casca de *M. oleifera* ocasionou melhor cicatrização de feridas em ratos Wistar normais ou imunossuprimidos com dexametasona. Além disso, o extrato etanólico das folhas foi capaz de estimular tanto a imunidade humoral como a celular, de modo a reduzir a imunossupressão ocasionada por ciclofosfamida (GUPTA et al., 2010).

Com a finalidade de obter maiores esclarecimentos acerca da toxicidade das preparações de *M. oleifera*, vale ressaltar, por exemplo, que o extrato aquoso das folhas na dose de 3.000 mg/kg ocasionou genotoxicidade e, apesar de a preparação aquosa das folhas não acarretar alterações graves em diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como na qualidade do esperma em ratos, pode ocasionar ligeiro aumento de creatinina e ureia evidenciando, desta forma, a necessidade de cautela no uso prolongado desta preparação (ASARE et al., 2012; AWODELE et al., 2012;). Além disso, devido à ampla utilização das sementes para tratamento de água, bem como para fins medicinais, diversos estudos acerca da sua toxicidade vem sendo realizados (FERREIRA et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; KAVITHA et al., 2012).

3.2 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem sítios de ligação a carboidratos, sendo esta interação proteína-açúcar caracterizada por elevada especificidade, reversibilidade e constituída por meio de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações de Van der Waals. Estas proteínas também se destacam pela capacidade de aglutinar eritrócitos, promovendo a formação de uma malha (ELGAVISH; SHAANAN, 1997; KENNEDY et al., 1995; RAJA et al., 2011; WEIS; DRICKAMER, 1996). Estas moléculas de origem não imunológica são encontradas em uma imensa variedade de seres vivos, estando presentes em membros dos reinos animal e vegetal, bem como em fungos e bactérias (LAKHTIN et al., 2007; NAPOLEÃO et al., 2011; NG; LAM; WOO, 2003; WANG; NG; LIU, 2002).

A variedade deste grupo permite que as lectinas sejam categorizadas de acordo com diferentes critérios, podendo ser classificadas pelo monossacarídeo ao qual se ligam preferencialmente em grupo fucose, grupo galactose/N-acetilgalactosamina, grupo N-acetilglucosamina, grupo glicose/manose, grupo ácido siálico (PEUMANS; VAN DAMME, 1998), podendo também ser agrupadas de acordo com a origem, como a favina purificada a partir de *Vicia faba* (KENNEDY et al., 1995).

Outra classificação leva em consideração a estrutura-função, permitindo classificar as lectinas em merolectinas, que apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos, implicando, portanto, na ausência de capacidade de aglutinar células; em hololectinas, que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos, porém apresentam outros sítios de ligação, sendo capazes de aglutinar células; em quimerolectinas, que possuem no mínimo um domínio ligante de carboidrato e além deste domínio, outro sítio que atua de forma independente ao sítio de ligação a carboidratos, dotado de atividade enzimática ou outra atividade biológica. Ainda de acordo com estrutura-função, podem ser classificadas em superlectinas, as quais possuem no mínimo dois sítios de ligação a carboidratos, que além de apresentarem estrutura diferente ligam-se a carboidratos distintos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; PEUMANS et al., 2001).

Outra característica interessante deste grupo é a existência de lectinas isoladas da mesma espécie com estruturas similares e múltiplas formas moleculares, com perfis eletroforéticos distintos, que são denominadas isolectinas. Dentro desta classificação, existem as isoformas, caracterizadas pela ausência de compreensão da sua origem genética, como ocorre com lectina de

sementes de *Cratylia mollis*, que possui as isoformas Cra Iso 1, Cra Iso 2 e Cra Iso 3 com especificidade para diferentes carboidratos (CORREIA; COELHO, 1995; KILPATRICK; WESTON; URBANIAK, 1983; PAIVA; COELHO, 1992).

Vale ressaltar que algumas destas moléculas possuem excelente termoestabilidade, como a lectina de *Ganoderma capense*, as lectinas cMoL e WSMoL de sementes de *M. oleifera* e a lectina BfL de *Bauhinia forficata*, sendo capazes de reter sua atividade mesmo após aquecimento à temperatura de 100 °C (NGAI; NG, 2004; ROLIM et al., 2011; SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2012;). Estas proteínas desempenham papel crucial na proteção dos seres vivos contra patógenos, sendo a capacidade de reconhecimento e interação específica com carboidratos característicos da parede celular de bactérias e fungos de fundamental importância para a fagocitose e eliminação do patógeno em questão (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2011). Em mamíferos a lectina ligadora de manose (MBL) é um claro exemplo da ação destas proteínas em infecções. Esta molécula, ao interagir com patógenos, proporciona a ativação do sistema complemento, promovendo a fagocitose dos patógenos opsonizados (TURNER, 2003).

Embora estejam presentes em vários tipos de seres vivos, as lectinas de plantas tem sido por muitos anos as mais amplamente estudadas, podendo ser encontradas em várias partes do vegetal, como sementes (OLIVEIRA et al., 2002), folhas (NAPOLEÃO et al., 2012), raízes (AGRAWAL et al., 2011), casca (ARAÚJO et al., 2012) e flores (ITO, 1986). A presença significativa de proteínas nos tecidos vegetais está relacionada à sua função como mecanismo de defesa da planta contra agentes danosos como insetos fitófagos ou fungos (CHRISPEELS; RAIKHELB, 1991; FREIRE et al., 2002). De fato, a expressão de genes para estas moléculas pode ser induzida por hormônios associados à resposta do vegetal ao ataque de insetos (CHEN et al., 2002; DE VOS et al., 2005). Adicionalmente, a diferença observada na quantidade de lectinas para diferentes tecidos vegetais está associada à vulnerabilidade ao ataque de patógenos, de modo que sementes estão entre os tecidos com maiores níveis destas moléculas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Diversos trabalhos tem demonstrado a ação das lectinas contra pragas de relevância econômica. Oliveira et al. (2011) demonstraram que a lectina cMoL possui atividade inseticida contra a traça da farinha (*Anagasta kuehniella*). Paiva et al. (2011) demonstraram que a lectina OfiL obtida dos cladódios de *Opuntia ficus* apresenta atividade termiticida contra *Nasutitermes corniger*.

Entre as atividades biológicas encontradas para estas proteínas está a capacidade de modular a atividade de células do sistema imune através da produção de mediadores como o óxido nítrico ou as citocinas IL-10, IFN- γ e TNF- α (MELO et al., 2010; PARK et al., 2010). Vários trabalhos

reforçam o papel das lectinas como agentes imunomoduladores. Nair et al. (2001) demonstraram que uma lectina isolada do tunicado *Styela plicata* possui a capacidade de estimular a produção da citocina IL-2 em células de mamíferos. Também tem sido evidenciada para lectinas a atividade antiproliferativa sobre linhagens cancerígenas como células de leucemia, mama e células HeLa, bem como a capacidade de indução da apoptose (LIU et al., 2008; PATRICK; NGAI; NG, 2004; ZHAO; WANG; NG, 2009).

Diversos trabalhos tem indicado a atividade anti-inflamatória como uma das propriedades farmacológicas das lectinas. De acordo com Nunes et al. (2009), a lectina isolada das sementes de *Canavalia grandiflora* (ConGF) possui a capacidade de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos, em associação à redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Além disso, esta lectina também promove a redução dos níveis da enzima mieloperoxidase, que está associada ao processo inflamatório. Outra lectina obtida das sementes de *Luetzelburgia auriculata* também possui pronunciada atividade anti-inflamatória, sendo capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos em ensaio de inflamação induzida pelo agente flogístico carragenina, estando este efeito relacionado à inibição do rolamento e adesão destas células. Além disso, esta lectina também atua promovendo a redução de edema, característica marcante do processo inflamatório, induzido por histamina e PGE₂ (ALENCAR et al., 2010). Rogerio et al. (2007), correlacionaram a ação da lectina ScLL isolada de *Synadenium carinatum* com os efeitos obtidos pela utilização do extrato desta planta na medicina popular. A ação desta lectina foi demonstrada por meio de pronunciada redução do número de células relacionadas ao processo inflamatório em modelo murino de asma, assim como pela capacidade de atuar sobre elementos chave da inflamação, como o fator de transcrição NF- κ B.

Além da atividade anti-inflamatória, tem sido descrita a atividade antinociceptiva para estas moléculas, como é o caso da lectina CcL isolada da alga marinha *Caulerpa cupressoides* que além de reduzir a migração leucocitária, possui atividade antinociceptiva atuando a nível periférico. Além disso, também foi demonstrada a ausência de danos aos órgãos dos animais tratados com esta lectina, indicando o elevado potencial como ferramenta terapêutica desta classe de moléculas (VANDERLEI et al., 2010).

Desta forma, a imensa quantidade de lectinas, com variadas atividades biológicas, isoladas de uma miríade de organismos, evidencia esta classe de biomoléculas como ferramentas biotecnológicas promissoras (LAM; NG, 2011).

3.3 Citotoxicidade

O desenvolvimento de estudos que visem investigar a capacidade de potenciais ferramentas farmacológicas de causar danos a células e ao organismo é de suma importância, uma vez que permitem estabelecer possíveis efeitos tóxicos das substâncias testadas (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

De acordo com a literatura, uma ampla gama de produtos de origem natural pode apresentar toxicidade a nível genético e celular (LEE et al, 2007; BOEIRA et al., 2010) ou sistêmico (ARBO et al., 2008). Entre os inúmeros exemplos, pode-se citar *Symphytum officinale*, popularmente conhecida como confrei, que apesar de ser empregado na medicina popular possui alcaloides com ação hepatotóxica (OBERLIES et al., 2004).

Neste contexto, a utilização de ensaios preliminares com células que permitam a avaliação inicial acerca da toxicidade de um produto é amplamente recomendada devido ao baixo custo, rápida obtenção de resultados, visando também evitar o uso desnecessário de animais. Entre estes está o teste do MTT. Através deste método é possível verificar, por espectrofotometria, o efeito de produtos sobre a viabilidade celular (DEB et al., 2011; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Neste ensaio, a atividade da enzima succinil-desidrogenase, presente na mitocôndria das células viáveis catalisará a formação de cristais de formazan, um produto de coloração roxa, a partir do MTT (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988).

Em adição, a investigação dos potenciais danos a células são de fundamental importância. A avaliação da atividade hemolítica de um extrato ou produto isolado é um dos ensaios amplamente empregados. De acordo com Costa-Lotufo et al. (2005) esta metodologia permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, sendo a realização destes testes de suma importância na busca por novas substâncias bioativas.

Vale ressaltar que diversos produtos obtidos de vegetais podem apresentar citotoxicidade frente a células cancerígenas, como o β -cariofileno isolados de das folhas de *Psidium cattleianum* (JUN et al., 2012) ou diterpenos obtidos de *Scoparia dulcis*, citotóxicos contra linhagens cancerígenas de estômago (AHSAN et al., 2003).

Entre estes produtos, as lectinas de plantas tem demonstrado grande relevância como moléculas eficientes no combate à células cancerígenas, uma vez que a transformação maligna é associada com uma variedade de padrões de glicosilação celular alterada, fornecendo a oportunidade de uma lectina interagir apenas com a célula tumoral, dada sua especificidade de ligação (SHIDA et al., 2009; PATSOS et al., 2009). Deste modo, diversos trabalhos evidenciam a

atividade anticâncer de lectinas sobre uma ampla gama de células malignas. Karasaki et al. (2001) observaram os efeitos citotóxicos de uma lectina isolada de *Allium sativum* sobre as linhagens cancerígenas humanas de linfoma histiocítico (U937) e HL60 (leucemia promielocítica). Liu et al. (2009) demonstraram que uma lectina isolada de *Polygonatum cyrtonema* apresenta elevada toxicidade sobre células de melanoma, não sendo citotóxica para melanócitos normais. Já Zhang et al., (2010) evidenciaram a atividade citotóxica de uma lectina isolada de *Ophiopogon japonicus* e da lectina isolada de *Polygonatum cyrtonema* sobre a linhagem de fibrosarcoma murino.

3.4 Inflamação

3.4.1 O processo inflamatório

O processo inflamatório compreende um conjunto salutar de respostas moleculares e fisiológicas que tem como finalidade primordial livrar o organismo de agentes causadores de injúrias e promover reparo tecidual, permitindo ainda o desenvolvimento de uma resposta mais eficiente caso haja novamente o contato com o causador da agressão (STABLES; GILROY, 2011). Os diversos fatores que desencadeiam esta complexa resposta podem ser classificados em agentes químicos, como as substâncias irritantes, agentes físicos, como traumas mecânicos, radiação ou calor, bem como em agentes biológicos, no caso de um processo inflamatório ocasionado por microrganismos (fungos, protozoários, bactérias ou vírus) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A resposta inflamatória pode ser dividida em fases que são caracterizadas pela produção de diferentes mediadores e pelo envolvimento de tipos celulares distintos, podendo ser diferenciada em fase aguda, sub-aguda e crônica. A resposta inicial, comum para os mais diversos estímulos caracteriza a inflamação aguda e consiste em um conjunto de reações em cadeia. Inicialmente ocorre a liberação, a partir de grânulos citoplasmáticos de mastócitos, basófilos e plaquetas, das aminas vasoativas serotonina e histamina, havendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Em seguida, ocorre a produção de prostaglandinas, bradicinina e diversas citocinas, permitindo que leucócitos e fagócitos cheguem à área lesada. A inflamação crônica, por sua vez, é marcada pela degeneração tecidual, fibrose e proliferação de vasos sanguíneos (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996; ROTELLI et al., 2003).

Neste processo, a liberação sequencial dos inúmeros mediadores envolvidos em cada fase, promove as alterações observadas na resposta inflamatória. Estas alterações compreendem migração leucocitária para o tecido injuriado e aumento da permeabilidade vascular, associada ao extravasamento de proteínas plasmáticas e são responsáveis pela observação dos amplamente

conhecidos sinais cardinais da inflamação: rubor/vermelhidão (aumento do fluxo sanguíneo), edema/tumor (aumento da permeabilidade vascular), calor (vasodilatação) e dor (ativação e sensibilização de fibras nervosas aferentes primárias) que podem levar à perda de função (ALENCAR; ROCHA; PINHEIRO, 2005; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

Os leucócitos presentes no interior dos vasos são as primeiras células de defesa a alcançar o sítio da inflamação. Além dos estímulos quimiotáticos, as moléculas de adesão, cuja expressão está aumentada no processo inflamatório, são de fundamental importância para a ocorrência desta etapa. Presentes tanto na superfície dos leucócitos como na parede dos vasos, elas permitem o rolamento e adesão firme destas células ao endotélio, o que representa fator crucial para que os leucócitos cheguem à área lesada. Estas moléculas são as imunoglobulinas, integrinas, caderinas e selectinas (PHILLIPSON; KUBES, 2011). As selectinas estão envolvidas com a interação de pequena intensidade e rolamento inicial dos leucócitos pelo endotélio. Após o rolamento, ocorre a ativação, adesão firme ao endotélio, culminando com a migração transendotelial. Estas etapas, por sua vez, são governadas pelas integrinas e imunoglobulinas (Fig. 2).

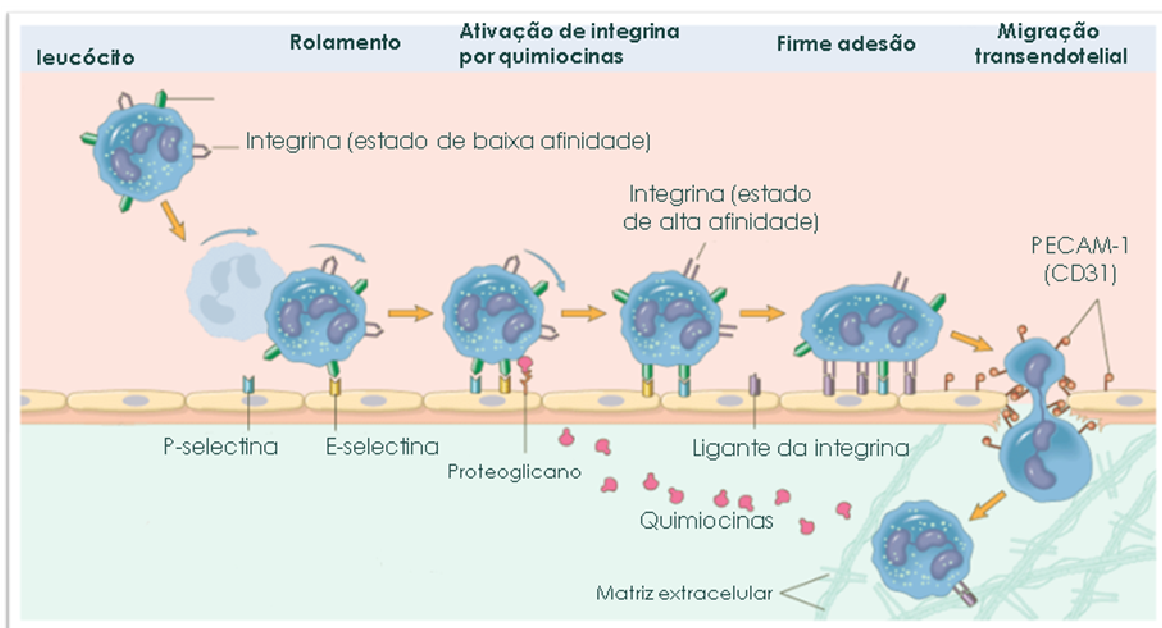


Figura 2 Migração leucocitária controlada por moléculas de adesão e estímulos quimiotáticos (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 2009).

A captura e rolamento dos leucócitos são mediados principalmente pela família das selectinas, que inclui a P-selectina, E-selectina e a L-selectina. Enquanto a L-selectina é expressa nos leucócitos, as outras duas são expressas nas células endoteliais, sendo a P-selectina encontrada também em plaquetas (GOLIAS et al., 2007; LEY et al., 2007). Posteriormente, ocorre a firme adesão dos leucócitos ao endotélio. Isso se dá por meio da ligação das integrinas presentes nestas células sanguíneas às imunoglobulinas das células endoteliais (VCAM1, ICAM 1). Outras imunoglobulinas como a PECAM-1 estão envolvidas com a migração dos leucócitos através das junções entre as células endoteliais (LINDBOM, 2003; ULBRICH; ERIKSSON).

Uma vez no local da inflamação, os leucócitos atuam como ferramentas essenciais para a eliminação da causa da injúria. Estas células produzem e liberam moléculas tóxicas como espécies reativas de oxigênio (EROs), que auxiliam na morte dos patógenos causadores de danos (ALVES et al., 2012). A síntese e a liberação de enzimas por estas células também estão associadas ao processo inflamatório. Entre estas enzimas, destaca-se a mieloperoxidase, que catalisa a formação de produtos tóxicos ao agente causador da injúria a partir da reação com o peróxido de hidrogênio (ANAND; ANAND, 2012; KLEBANOFF; ROSEN, 1978). Além disso, leucócitos são capazes de produzir vários mediadores relacionados ao processo inflamatório como as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-8 e MCP-1 (MATSUKAWA; YOSHYNAGA, 1999). Outro ponto essencial ao seu papel na inflamação é a capacidade de fagocitar o agente causador da injúria (PISANI et al., 2009). Este processo pode ser mediado por opsoninas como proteínas do sistema complemento, tal como iC3b (PLIYEV; AREFIEVA; MENSHIKOV, 2010) ou pelo reconhecimento, através de receptores, de moléculas presentes em patógenos causadores da agressão (KIM et al., 2011).

Para que haja a finalização adequada da inflamação, bem como a promoção da homeostase, é necessária a apoptose das células inflamatórias e sua remoção. Nesta etapa ocorre, portanto, aumento do número de células mononucleares (linfócitos e monócitos) que irão fagocitar estas células, restabelecendo o equilíbrio. Além disso, ao longo do processo, a cinética de liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, permite caracterizar cada estágio do processo inflamatório sendo, portanto, sua produção e liberação coordenadas essenciais à resolução da inflamação (Fig. 3) (HACKETT et al., 2008; KOBAYASHI, VOYICH, DELEO, 2003; LAWRENCE; WILLOUGHBY, GILROY, 2002; SERHAN, 2011). No entanto, a perda de controle da produção dos mediadores químicos relacionados a este processo, bem como o término inadequado podem levar à persistência da resposta, caracterizando a inflamação crônica, que por sua vez está associada ao desenvolvimento de doenças degenerativas como artrite, doenças

cardiovasculares e câncer. (KUNDUR; SURH, 2012; MÄKI-PETÄJÄ; WILKINSON, 2012; MASKREY et al., 2011).

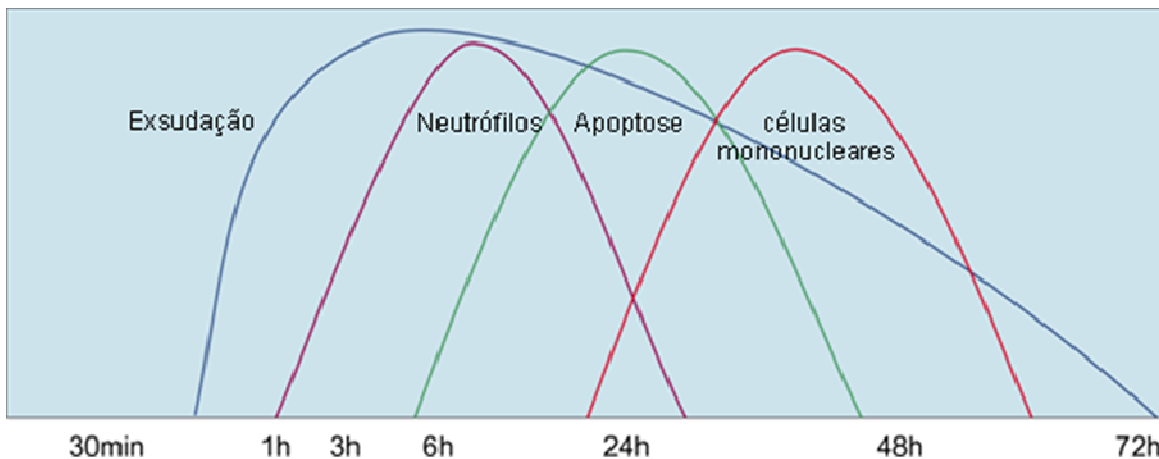


Figura 3 Perfil celular característico da inflamação aguda ao longo do tempo (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

3.4.2 Mediadores da inflamação

Os mediadores envolvidos no processo inflamatório podem ser de origem plasmática como os componentes do sistema complemento e sistema das cininas ou tissular, como leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, serotonina, histamina, óxido nítrico e citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IFN- α .

3.4.2.1 Metabólitos do ácido araquidônico

Dentre os vários mediadores da inflamação, destacam-se alguns produtos do metabolismo do ácido araquidônico. A formação de seus metabólitos é dependente da hidrólise de lipídeos de membrana como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina pela enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), permitindo a liberação do ácido araquidônico, uma vez que ele se encontra esterificado nestes fosfolipídeos (IRVINE, 1982). Após ser liberado da membrana, o ácido araquidônico pode seguir duas rotas distintas. Por um lado, servirá como substrato para a enzima lipoxigenase, pela qual serão obtidos os leucotrienos e lipoxinas. Por outro lado, a enzima cicloxigenase levará à formação de prostaglandinas e tromboxano (Fig. 4) (KIM; KIM; KIM, 2008).

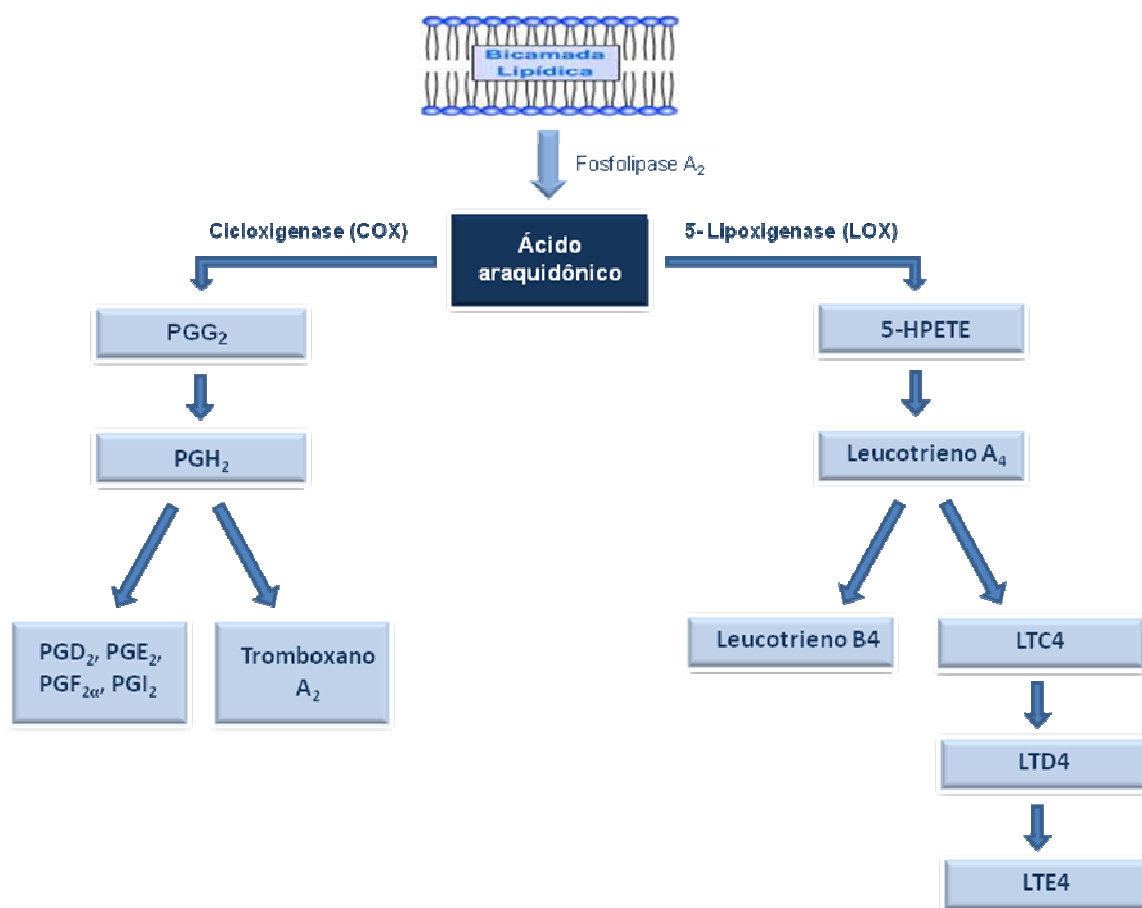


Figura 4 Vias de produção de metabólitos do ácido araquidônico (adaptado de KIM; KIM; KIM, 2008).

Há duas isoformas da enzima ciclooxygenase, COX 1 e COX 2. A primeira é expressa de forma constitutiva em diversos tecidos, estando relacionada com a homeostase, enquanto a segunda é induzível e está amplamente associada ao processo inflamatório. No entanto, a constatação de que a COX 2 também está envolvida em alguns processos fisiológicos serve como subsídio para explicar efeitos adversos de fármacos que atuam como inibidores seletivos desta enzima (KIRKBY et al., 2012; SAQIB; KARIGAR, 2009; SOSTRES et al., 2010; WALLACE; DEVCHAND, 2005). Em animais, há as lipoxigenases 5-LOX, 8-LOX, 11-LOX 12-LOX e 15-LOX, que atuam sobre o ácido araquidônico através da inserção de oxigênio nas posições 5, 8, 11, 12 e 15 deste ácido graxo (IVANOV et al., 2010). A expressão das enzimas 12 e 15-LOX está relacionada a uma série de doenças como diabetes, desordens renais, bem como doenças no sistema nervoso (DOBRIAN et al., 2011).

3.4.2.2 Prostaglandinas

Além das funções fisiológicas, este grupo de mediadores está intimamente relacionado ao processo inflamatório no qual podem atuar como agentes pró ou anti-inflamatórios (SCHER; PILLINGER, 2009). Após a geração de PGG₂ pela ação oxidativa das cicloxigenases sobre o ácido araquidônico, seguida por redução desta molécula à PGH₂, enzimas denominadas prostaglandinas sintase catalisarão a formação de PGE₂, PGF₂α, PGD₂, PGI₂ (prostaciclina) e TXA₂ (tromboxano). Estas moléculas, por sua vez, exercem seus efeitos através da ligação a receptores transmembrana acoplados a proteína G (HATA; BREYER, 2004; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

A PGE₂ pode atuar sobre o sistema imunológico, inibindo a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e estimulando a produção de IL-17 por linfócitos (BONIFACE et al., 2009). PGE₂ também estimula o crescimento de tumores (RASMUSON et al., 2012) e está associada à inibição da produção de quimiocinas como CCL3 e CCL4 por células dendríticas (JING; VASSILIOU; GANEA, 2003). Além disso, Altas concentrações de PGE₂ inibem a produção de TNF-α, ao passo que baixas concentrações estimulam a produção deste mediador (ROLA-PLESZCZYNSKI; STANKOVA, 1992). Adicionalmente, no processo inflamatório, a expressão da PGE₂ está relacionada ao aumento da permeabilidade vascular e edema (DAI et al., 2011).

A prostaciclina, PGI₂, é produzida em condições fisiológicas pela ação da enzima cicloxigenase 1, podendo atuar como vasodilatador e desempenhar importante papel na proteção da mucosa gástrica (KIRKBY et al., 2012; LAINE; KOJI; TAKEUCHI, 2008). Esta molécula possui importante função como regulador das respostas Th1 e Th2, além de estimular a produção de IL-17 e IL-22 e IL-6 (BOSWELL et al., 2011; HONDA et al., 2008; ZHOU et al., 2012).

Entre as funções fisiológicas da prostaglandina D₂ (PGD₂), está a participação na promoção do sono e manutenção da função dos ovários (FARHAT et al., 2011; URADE; HAYAISHI, 2011). Além disso, a PGD₂ produzida por mastócitos atua na inibição da angiogênese tumoral, contribuindo para a redução da expansão do tumor (MURATA et al., 2011). Em processos inflamatórios como colite, esta molécula pode exercer efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a infiltração de granulócitos, bem como os níveis da enzima mieloperoxidase (JUEBOR; SINGH; WALLACE, 2000).

3.4.2.3 Leucotrienos

Os leucotrienos são mediadores pró-inflamatórios amplamente presentes em desordens como asma e rinite alérgica, sendo produzidos por células como mastócitos, macrófagos eosinófilos, basófilos, linfócitos e neutrófilos (KIMOTO-NIRA et al., 2009; RABINOVITCH, 2012; TANTISIRA; DRAZEN, 2009). Na inflamação ocorre inicialmente a formação do leucotrieno A₄ (LTA₄), que se trata de uma forma instável. A partir desta molécula, o processo de produção dos demais leucotrienos envolve duas rotas: na primeira rota há a formação do leucotrieno B₄ (LTB₄), enquanto que pela outra formam-se os cistenil leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) (BOYER, 1983). A ação dos cistenil leucotrienos é dependente da presença dos receptores acoplados à proteína G: cis-LT tipo 1 e cis-LT tipo 2 (HEISE et al., 2000; LYNCH et al., 2001). Ao contrário dos cistenil leucotrienos, o LTB₄ exerce seus efeitos por meio dos receptores BLT1 e BLT2. Este mediador possui importante função como agente quimioatrativo para macrófagos e neutrófilos (AIELLO et al., 2002; LUNDEEN et al., 2006; LUSTER, 2001), exerce efeitos sobre eosinófilos, promovendo a produção de moléculas como superóxido, bem como sobre neutrófilos auxiliando no processo de transmigração, ao estimular a produção e expressão de elastase na superfície destas células (LYNCH et al., 2001; YOUNG et al., 2007). Além disso, juntamente com os leucotrienos C₄ e D₄, o LTB₄ promove a redução do efeito alérgico causado pela bradicinina (SCHWEIZER et al., 1984).

O leucotrieno C₄, em concentrações elevadas, estimula a produção de PGE₂ por macrófagos elicitados com adjuvante incompleto de Freund (SCHENKELAARS; BONTA, 1983). Esta molécula possui ainda a capacidade de estimular a produção da quimiocina MCP-1 por células monocíticas humanas (THP1) expostas a interleucina 4 (WOSZCZEK et al., 2005).

O leucotrieno D₄ ativa a expressão de genes relacionados à diferenciação e ativação de monócitos, ativando a via p38 MAPK (WOSZCZEK et al., 2008). Adicionalmente, o LTD₄ ativa a expressão das enzimas COX-2, e 5-lipoxigenase, bem como do LTC₄ (YUDINA et al., 2008).

Apesar de se ligar mais fracamente aos receptores cis-LT 1 e cis-LT 2 do que os demais cistenil leucotrienos, o leucotrieno E₄ promove o recrutamento de eosinófilos, bem como o aumento do número de neutrófilos e linfócitos, estando relacionado ainda com a promoção da vasodilatação (AUSTEN et al., 2009; LAITINEN et al., 2005; EVANS, 2003).

3.4.2.4 Bradicinina

A bradicinina é um mediador peptídico, de origem plasmática, pertencente ao grupo das cininas, cuja formação se dá por meio da clivagem do cininogênio pela enzima calicreína. Sua ação é exercida através dos receptores B1 e B2 localizados na superfície da membrana celular e acoplados à proteína G. Enquanto a expressão do receptor B2 ocorre de forma constitutiva, o receptor B1 tem sua expressão aumentada na ocorrência de injúria tecidual (HALL, 1992; MARCEAU; HESS; BACHVAROV, 1998). Embora seja encontrado constitutivamente, o receptor B2 também mantém intensa participação no processo inflamatório. A interação da bradicinina com este receptor provoca a produção de citocinas como IL-8, broncoconstrição, extravasamento de proteínas plasmáticas além de contribuir para o início do rolamento de leucócitos na parede de vasos sanguíneos, estando, inclusive, relacionado à nocicepção provocada pela bradicinina (HIRATE et al., 2006; RICCIARDOLO et al., 2012; VALENTI et al., 2008; WALDNER et al., 2012).

O receptor B1, por sua vez, pode ter sua expressão aumentada pela presença de agentes como o lipopolissacarídeo e citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (CAMPANHOLLE et al., 2010; KOUMBADINGA et al., 2010; MURAKAMI; OHTA; ITO, 2008) promovendo também o aumento da permeabilidade vascular (LAWSON et al., 2005). Adicionalmente, a bradicinina aumenta a expressão do receptor nuclear TLR4 e da enzima cicloxigenase-2, promovendo também o aumento da síntese de PGE₂ (GUTIÉRREZ-VENEGAS; ARREGUÍN-CANO; HERNÁNDEZ-BERMÚDEZ, 2012).

3.4.2.5 Aminas vasoativas

Estes mediadores compreendem a histamina e a serotonina, caracterizadas como moléculas pré-formadas armazenadas dentro das células, cuja atuação ocorre nas fases iniciais da inflamação envolvendo-se com a promoção do aumento da permeabilidade vascular (CRUNKHORN; MEACOCK, 1971).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é produzida por plaquetas e mastócitos. Há uma imensa gama de receptores para esta molécula, porém, as três maiores classes são 5-HT1A, 5-HT2, e 5-HT7 (NICHOLS; NICHOLS, 2008). Adicionalmente, esta molécula estimula a vasodilatação e extravasamento plasmático promovidos pela substância P, bem como indução de hiperalgesia (KHALIL; HELME, 1990; LIN et al., 2011). A mediação das atividades da histamina é exercida por quatro receptores, denominados receptores histamínicos, a saber: H1, H2, H3 e H4. Vale

ressaltar que a ligação desta molécula ao receptor H1, presente em células endoteliais, está relacionada à ocorrência de vasodilatação. O receptor H1 é o principal tipo relacionado à permeabilidade vascular (XAVIER; RIGHI; BERNARDI, 2007).

A variedade de células que expressa receptores para esta molécula indica a importância deste mediador no processo inflamatório, de modo que mastócitos, basófilos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e células endoteliais expressam receptores histamínicos (MAHDY; WEBSTER, 2008; SHAHID et al., 2009).

Vale salientar que histamina é produzida principalmente por mastócitos. Desta forma, após a ligação do antígeno aos receptores IgE localizados na superfície dos mastócitos, há o início de uma série de eventos moleculares que permitem a liberação de diversos mediadores contidos nos grânulos destas células, dentre os quais inclui-se a histamina (NIGROVIC; LEE, 2005).

3.4.2.6 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é formado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina a L-citrulina pela enzima óxido-nítrico sintase, na presença de diversos co-fatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH4). A óxido-nítrico sintase possui três isoformas, sendo duas constitutivas e uma que não é expressa em condições normais, a saber: NOS endotelial (eNOS, NOS₃), NOS neuronal (nNOS, NOS₁) e NOS induzível (iNOS, NOS₂), sendo esta última amplamente expressa durante processos inflamatórios (VALLANCE, CHAN, 2001).

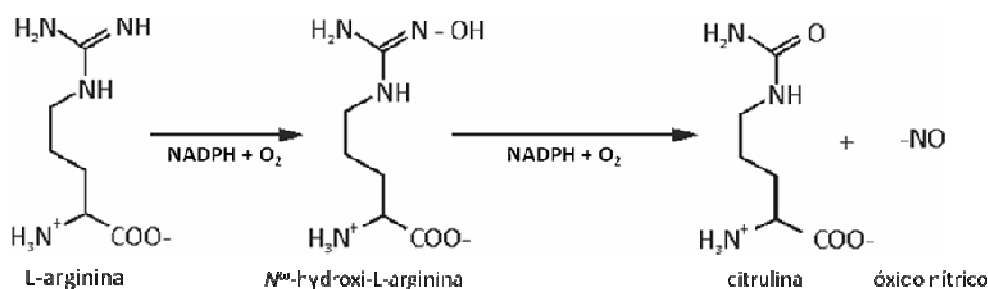


Figura 5 Formação de óxido nítrico a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina (CLEMENT, KUNZE; HERBELING, 2006).

Uma vez produzido, o óxido nítrico é rapidamente convertido a nitrato, possuindo, desta maneira, uma meia vida curta, o que torna preferível a utilização desta última forma na mensuração da produção de NO (JUNGERSTEN et al., 1996; LUNDBERG; GOVONI, 2004). O NO está envolvido em uma imensa gama de processos fisiológicos e patológicos. Fisiologicamente, no trato

gastrointestinal promove proteção da mucosa gástrica pela estimulação da produção de muco, bem como redução da liberação de ácido gástrico (LANAS, 2008). Outra importante função deste mediador é sua capacidade de modulação da contratilidade do miocárdio dependente da concentração, de modo a provocar redução da contratilidade quando presente em altas concentrações, enquanto que baixas concentrações proporciona o aumento da contratilidade dos miócitos cardíacos (VILA-PETROFF et al., 1999). Adicionalmente, o óxido nítrico atua como vasodilatador, reduzindo a pressão sanguínea (FACEMIRE et al., 2009; REES; PALMER; MONCADA, 1989).

Em desordens inflamatórias como lupus eritematoso, o óxido nítrico possui importante papel na ativação de linfócitos T, promovendo hiperpolarização mitocondrial e liberação de citocinas como IL-2 e IFN- γ (NAGY et al., 2010). Também em processos inflamatórios, o óxido nítrico pode se relacionar à formação de edema pelo aumento da permeabilidade vascular (TAKÁCS et al., 2002). Além disso, este mediador possui a capacidade de estimular a apoptose em células Jurkat através da alteração o potencial transmembrana mitocondrial (BELTRÁN et al., 2000). O NO pode ser produzido, juntamente com outras moléculas como espécies reativas de oxigênio e citocinas, por macrófagos ativados por endotoxinas, como o LPS (TIWARI; DWIVEDI; KAKKAR, 2010). Sua produção pode também ser estimulada por citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . Além dos macrófagos e condrócitos, miócitos cardíacos, neutrófilos, hepatócitos e fibroblastos também podem produzir este mediador sob o estímulo adequado (FURUYA et al., 2010; GOODSTONE; HARDINGHAM, 2002; MARIANO et al., 2012; PRIEGO et al., 2006; VUOLTEENAHO et al., 2005). Vale ressaltar que o óxido nítrico promove o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e encontra-se intimamente relacionado com a via da cicloxigenase (SAUTEBIN et al., 1998; WANG et al., 1997). Adicionalmente, este mediador possui a capacidade de atuar como agente pró ou anti-apoptótico, dependendo da concentração em que é encontrado. Deste modo, a indução de apoptose é observada quando o óxido nítrico está presente em concentrações elevadas, o que representa um fator crucial para a finalização da resposta inflamatória, permitindo a resolução do processo (NICOTERA; BRUNE; BAGETTA, 1997).

3.4.2.7 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que se encontra armazenada em grandes quantidades nos grânulos azurófilos de neutrófilos e em menor quantidade em monócitos, de modo que a avaliação da sua atividade representa uma medida indireta da migração destas células para a área inflamada. Esta enzima caracteriza-se por sua potente atividade microbicida, de modo que para

exercê-la, a mieloperoxidase catalisa a formação do ácido hipocloroso (HOCl). Para que isto ocorra, a enzima reage com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formando um intermediário que, por sua vez, oxidará o cloreto (Cl⁻) formando o HOCl, que se caracteriza como um potente oxidante microbicida (BRALLEY et al., 2008; KLEBANOFF, 2005).

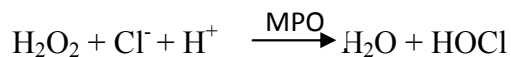


Figura 6 Esquema da reação catalisada pela enzima mieloperoxidase.

Grattendick et al. (2002) observaram que esta enzima possui a capacidade de estimular macrófagos alveolares, estimulando a secreção de TNF- α por estas células, a expressão do mRNA para as citocinas IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , bem como induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a MPO pode modular a biodisponibilidade de NO, agindo de forma indireta na vasodilatação (EISERICH et al., 2002). Outra importante função da mieloperoxidase é a participação na citotoxicidade frente a células cancerígenas (DALLEGRI; FRUMENTO; PATRONE 1982). A relevância desta enzima abrange ainda o fato de que sua ausência está relacionada à maior susceptibilidade a infecções fúngicas como foi observado por Aratani et al. (1999) ao expor camundongos nocaute para o gene da MPO ao fungo *Candida albicans*.

3.4.2.8 Citocinas

Além de participar de inúmeros processos fisiológicos, este grupo de proteínas possui papel crucial em desordens inflamatórias, onde podem atuar como agentes pró ou anti-inflamatórios. As quimiocinas e interleucinas pertencentes a este grupo de moléculas caracterizam-se por sua capacidade de modulação do sistema imune, atuando majoritariamente em conjunto. Estas moléculas podem ser produzidas por diversas células, como macrófagos, neutrófilos e células mononucleares de modo que cada citocina pode atuar, inclusive, na regulação da produção de outras moléculas pertencentes à mesma classe. Entre estes mediadores, estão TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, IL-8 e TGF- β (LI et al., 2010; ROMAGNANI, 2001; STØLEVIK et al., 2011).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral (TNF- α), primeiramente caracterizado por sua capacidade de causar necrose hemorrágica em tumores, merece destaque por seu papel crucial no processo inflamatório, sendo uma das principais citocinas estimuladas por endotoxinas bacterianas, como o LPS (CARSWELL et al., 1975; VERMA et al., 2009). O TNF- α possui a capacidade de estimular a produção de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-8, espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como ativar o NF κ B (HOUSER; JOHNSON; ISHMAEL, 2012). Esta citocina aumenta a expressão de COX-2, 5-LOX, regula a expressão do

receptor cis-LT 1, podendo ainda levar a célula à apoptose (KAWASAKI et al., 2002; YUDINA et al., 2008). A atividade desta molécula é mediada por dois receptores localizados na superfície celular, o TNFR1 e o TNFR2 (WAJANT; SCHEURICH, 2001). Adicionalmente, o TNF- α tem participação no processo inflamatório como agente quimiotático para neutrófilos, monócitos e macrófagos (NILSSON; FOWLER; JACOBSSON, 2000; SHIM et al., 2012; WANG; WALTER; MANTOVANI, 1990). Com relação a outros processos, vale ressaltar que assim como a IL-1 β , TNF- α proporciona a regulação negativa da expressão da apolipoproteína AI (apoAI), relacionando-se, portanto, com a elevação da resistência a insulina (HAAS et. al., 2003).

Em macrófagos, a expressão de TNF- α pode ser regulada diretamente pela proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) ou de forma indireta, através da regulação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) por p38MAPK (CAMPBELL et al., 2004). O NF- κ B e a p38 MAPK também são cruciais para a expressão desta citocina em adipócitos (HOAREAU et al., 2010). A participação do NF- κ B na produção de TNF- α , promovida por lipopolissacarídeo em macrófagos, tem sido amplamente estudada e ocorre em devido a presença de sítios de ligação (κ B1 e κ B3) a este fator de transcrição na região promotora do gene de TNF- α , que também apresenta sítio de ligação para o fator de transcrição c-Jun. No entanto, vale ressaltar que não há ação sinérgica entre estes dois fatores de transcrição (LIU et al., 2000). Em adição, o efeito de determinados mediadores da inflamação sobre a produção de TNF- α pode variar conforme o tipo celular em questão. Desta forma, a histamina pode suprimir a produção de TNF- α em monócitos, embora não atue sobre macrófagos alveolares. Por outro lado, mediadores como a PGE2 e a IL-10 inibem a produção de TNF- α em ambos os tipos celulares citados (ROWE et al., 1997). Embora a citocina anti-inflamatória IL-10 esteja envolvida coma a inibição da expressão de TNF- α , o próprio TNF- α estimula a síntese de IL-10, promovendo um feedback negativo (WANISWORANUN, STROBER, 1993).

A IL-1 β pode ser produzida por diversas células como monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, mastócitos e neutrófilos em resposta diversos fatores, como o pH ácido característico de processos patológicos como desordens inflamatórias, bem como por exposição à endotoxina bacteriana LPS (DINARELLO, 2009; JANCIC et al., 2012; KIM et al., 2004; KO et al., 2011; LU; PAN; SHIVELY, 2012). Entre as propriedades pró-inflamatórias da IL-1 β está a capacidade de estimular a ativação do NF- κ B, promovendo a transcrição da molécula de adesão VCAM-1; estimular a produção de espécies reativas de oxigênio; promover a expressão de E-selectina em células endoteliais (YU et al., 2007) e promover o aumento da produção das citocinas

pró-inflamatórias TNF- α e IL-8 por condrócitos, células essenciais para a correta manutenção do tecido cartilaginoso, o que indica o papel crucial desta citocina em doenças como a artrite (AIDA et al., 2006). Além disso, de acordo com Tsuzaki et al. (2002), IL-1 β atua como potente agente pró-inflamatório, estimulando a produção não só de TNF- α , como também da PGE₂ por meio da indução da expressão da enzima ciclooxigenase em células do tendão. Sob a ação do TNF- α , esta interleucina proporciona o aumento da expressão dos receptores de bradicinina B1 e B2 (ZHANG; ADNER; CARDELL, 2007). Adicionalmente, assim como TNF- α e a IL-6, a IL-1 β estimula a expressão da enzima iNOS, com a consequente produção de óxido nítrico (KLEINERT et al., 2004).

Assim como pode ser observado para o TNF- α , a produção de IL-1 β pode ser regulada de modo diferenciado por um mesmo estímulo, dependendo do tipo de célula em questão. Enquanto o IFN γ estimula a produção desta citocina em células humanas, em camundongos promove a redução da produção (MASTERS et al., 2010). Adicionalmente, a produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais também pode ser regulada pela histamina (OKAMOTO, NAKANO, 1990). O NF- κ B também estimula a produção de IL-1 β , que por sua vez, pode aumentar a ativação deste fator, de modo a amplificar a resposta (BLACKWELL; CHRISTMAN, 1997).

A interleucina 6 possui um duplo perfil de atuação, podendo agir como citocina pró ou anti-inflamatória, tendo sido observado seu papel anti-inflamatório na inflamação aguda e pró-inflamatório na crônica, sendo encontrada em desordens como artrite reumatoide, psoríase e lúpus eritematoso. Este mediador está relacionado tanto com as fases iniciais da inflamação aguda, como com a transição para a inflamação crônica, na qual relaciona-se com a apoptose de neutrófilos e com o recrutamento de monócitos (GABAY, 2006). Utilizando camundongos nocaute para o gene da IL-6, Xing et al. (1998) demonstraram a importância desta citocina na regulação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , MIP-2 e IFN- γ , ao demonstrar que os animais IL-6^{-/-} apresentaram maior produção destas citocinas, bem como maior migração de neutrófilos. Gabay et al. (1997) demonstraram que esta citocina pode atuar estimulando a produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL1-Ra), uma proteína característica da fase aguda da inflamação com ação anti-inflamatória, em cultura primária de hepatócitos e na linhagem HepG2. Os efeitos protetores da IL-6 foram reforçados por Choi et al. (2004), que demonstraram que esta citocina protege células das ilhotas de Langerhans da apoptose promovida por citocinas pró-inflamatórias. A produção desta citocina pode ser estimulada por outras citocinas, como IL-1 β , que regula a produção de IL-6 através da via p38 MAPK, bem com da ativação de NF- κ B (LUO et al., 2003). Em mastócitos, neurotransmissores

como a substância P podem estimular a produção de IL-6 através de MAP quinases como PI-3K, p42/44 e p38, bem como por ativação do NF- κ B e translocação para o núcleo da célula (AZZOLINA; BONGIOVANNI; LAMPIASI, 2003). Adicionalmente, o NF-L6, fator de transcrição para a expressão de IL-6 possui a capacidade de atuar sobre a produção de outras citocinas, como TNF- α (AKIRA et al., 1990; HENSEL et al., 1989).

Várias outras citocinas também desempenham importantes papéis. A citocina anti-inflamatória IL-10 inibe a expressão das moléculas co-estimulatórias de linfócitos T necessárias para a ativação destas células, além de inibir a migração de mastócitos em resposta à citocina pró-inflamatória TNF- α (PIETRZAK; MISIAK-TŁOCZEK; BRZEZINSKA-BLASZCZYK, 2009; TAYLOR et al., 2007). A IL-12 por outro lado, caracteriza-se como uma citocina pró-inflamatória que pode ser produzida por macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas levando a produção de outra citocina pró-inflamatória, o IFN- γ (WATFORD et al, 2003).

3.4.3 Células do sistema imune envolvidas no processo inflamatório

Importantes células do sistema imune desempenham papel crucial no desenvolvimento das reações inflamatórias. Desta forma, células como neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, basófilos, mastócitos e eosinófilos são responsáveis pelos processos de fagocitose, reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, bem como pela produção de mediadores cruciais para o desenvolvimento e término adequado do processo em resposta a danos teciduais ou infecções. Há, portanto, a participação do sistema imune inato e adaptativo na inflamação (NATHAN, 2002; MEDZHITOV, 2007).

3.4.1 Macrófagos

Os monócitos circulantes do sangue periférico dão origem, nos tecidos, aos macrófagos, que se caracterizam como células mononucleares com elevada capacidade fagocítica (HUME et al., 2002). Estas células são essenciais tanto na resposta imune inata, como na imunidade adaptativa, podendo ser encontradas em diferentes locais do organismo, de modo que de acordo com sua localização, recebem denominações características, como células de Kupffer no caso dos macrófagos encontrados no fígado, macrófagos alveolares quando localizados nos pulmões ou histiócitos, quando encontrados nos linfonodos (ABBAS; LICHTMAN, 2008; JASPARS et al., 2001). Os macrófagos podem ser classificados em três tipos: macrófagos residentes, encontrados normalmente, sem que seja necessário qualquer estímulo; macrófagos elicitados, que são apenas recrutados para um determinado sítio através da utilização de alguma substância pró-inflamatória de

baixa especificidade, como o tioglicolato de sódio; e macrófagos ativados, que são recrutados para um sítio por agentes que provocam uma resposta por parte da célula, indicada por várias alterações, como por exemplo, a intensa produção de citocinas. Deste modo, os macrófagos ativados possuem particularidades funcionais, bioquímicas e morfológicas que claramente os distinguem dos demais (KO et al., 2011; LEE et al., 2003; TIWARI; DWIVEDI; KAKKAR, 2010).

Os macrófagos desempenham papel crucial na defesa contra infecções, produzindo uma variedade de substâncias cujo objetivo final consiste em levar o patógeno à morte. Desta forma, os macrófagos respondem à endotoxinas presentes na parede celular de bactérias secretando mediadores como TNF- α e óxido nítrico (SHAPIRA et al., 1998). Esta resposta ocorre devido à atuação dos receptores de reconhecimento de patógenos localizados na superfície celular que reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno, como os receptores *Toll like*, dentre os quais está o receptor TLR4 que reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas (WALSH et al., 2012). Para que ocorra esta resposta, a proteína de ligação ao LPS (LBP) se liga ao lipopolissacarídeo. Em seguida, a molécula de LPS se liga a CD14 na membrana da célula, favorecendo a transferência do LPS para MD-2, encontrada na forma solúvel ou em associação ao receptor TLR4. Finalmente, após a associação do complexo MD-2:LPS ao receptor TLR-4, há a transdução do sinal e desencadeamento da cascata de sinalização (OHTO et al., 2007; SAUTER et al., 2007). Desta forma, a expressão de elevada quantidade de genes em macrófagos pode ser alterada pelo LPS. As funções destes genes podem estar relacionadas à produção de citocinas e quimiocinas, vias metabólicas induzíveis, produção de radicais livres, apresentação de antígenos, havendo ainda vários genes relacionados a diversas funções (HUME et al., 2002). De fato, após esta interação, ocorre a ativação do fator de transcrição NF- κ B, com a consequente ativação da produção de moléculas envolvidas no processo inflamatório como o TNF- α , e interleucinas como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Estas células caracterizam-se, ainda como importantes produtores de outras citocinas, como IL-12, bem como de intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (ASHALATHA et al., 2010; CHONG; BOST; CLEMENTS, 1996; FANG; VAZQUEZ-TORRES, 2002). Além dos papéis citados, os macrófagos podem atuar como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos, por meio da expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD-40, CD-80 e CD-86, estimulando a ação destas células (BARKER et al., 2002; ZWAM et al., 2011).

3.4.2 Linfócitos

Os linfócitos são cruciais para a resposta imune adaptativa e representam cerca de 20% do total de leucócitos circulantes no indivíduo adulto. Estas células se originam na medula óssea, sendo posteriormente diferenciadas em linfócitos B e T, de modo que a maturação dos primeiros ocorre ainda na medula, enquanto a dos últimos ocorre no timo (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). As células T podem exibir distintas funções relacionadas à presença, de determinadas glicoproteínas em sua superfície. Deste modo, as células que apresentam a molécula CD4⁺ são também denominadas linfócitos T auxiliar e atuam estimulando a ação dos linfócitos B, bem como produzindo citocinas. Por outro lado, as células que apresentam em sua membrana a molécula CD8⁺ são os linfócitos T citotóxicos, cruciais para a defesa contra infecções causadas por diversos patógenos, como vírus, bactéria e protozoários, exercendo sua atividade, predominantemente citotóxica, a partir do reconhecimento de antígenos. Além disso, os linfócitos T CD8⁺ também produzem citocinas como IFN- γ e IL-12 (JEFF; GROTZKE; LEWINSOHN, 2005; LITTMAN, 1987; ROSA et al., 2006; WONG; PAMER, 2003).

De acordo com o padrão de citocinas que expressam, os linfócitos T auxiliar podem ser divididos em Th1 e Th2. Os primeiros produzem as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-2, enquanto os Th2 caracterizam-se pela produção de IL-4, IL-10, IL-6, IL-5 e IL-13 (MOSMANN; COFFMAN, 1989; ODBILEG et al., 2005). Com relação ao processo inflamatório, vale salientar ainda o papel fundamental desempenhado pelas citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, que estão intimamente associadas à inflamação alérgica, contribuindo para o acúmulo de eosinófilos observado nesta patologia (BROWN et al., 2003; ROBINSON, et al., 1993).

Os linfócitos B por sua vez, estão amplamente associados à imunidade humoral, exercendo papel crucial na proteção do organismo às infecções por meio da produção de anticorpos (KALIA et al., 2006). Para isso, os linfócitos B, que se caracterizam como CD27⁺ se diferenciam em plasmócitos CD138⁺, capazes de secretar imunoglobulinas, sendo esta diferenciação estimulada pelos linfócitos T auxiliar (BISHOP; HOSTAG, 2001; CAYER et al., 2010).

Os linfócitos B exercem outros papéis além da produção de anticorpos. Em conjunto com as células dendríticas, estas células são essenciais para a ativação das células T (BOUAZIZ et al, 2007), além de possuir a capacidade de produzir citocinas, tais como IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-12 (HARRIS et al., 2000).

3.4.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são células essenciais no combate às infecções, além de contribuir amplamente para a resolução adequada da inflamação. Estas células são atraídas aos sítios onde atuarão por fatores quimiotáticos como LTB₄, IL-8 e componentes do sistema complemento, a fim de auxiliar no desenvolvimento adequado da resposta. Porém, apesar de seu papel crucial na defesa do organismo, estas células podem estar relacionadas à ocorrência de danos (RANG; RITTER; DALE, 2001).

Alguns estudos tem relatado sua capacidade de potencializar injúrias causadas por agentes lesivos, através da produção de diversas moléculas como a enzima mieloperoxidase e o nitrito, além de causar danos ao material genético pela produção de espécies reativas de oxigênio (BERLO et al., 2010; HAMDY et al., 2012). Neste contexto, substâncias como dióxido de titânio (TiO₂), por exemplo, podem inibir a apoptose destas células além de estimular a produção de um importante agente quimiotático, a IL-8, levando à perda de homeostasia (GONÇALVES; GIRARD, 2010).

Além da produção das moléculas já citadas, os neutrófilos ativados também se caracterizam pela produção de citocinas como IL-4, TNF- α , IL-1 β e IL-12 e pela secreção de proteases como a elastase, que está intimamente associada a processos de inflamação crônica, além de contribuir para a atividade bactericida das destas células (BRANDT et al., 2000; HIRCHE et al., 2008; PAPAYANNOPOULOS; STAAB; ZYCHLINSKY, 2011; SOHN et al., 2007). Boots et al. (2012) investigaram a influência destas células nas respostas promovidas por um agente pró-inflamatório de origem bacteriana, o LPS, por meio de co-incubação destas células com uma linhagem de células epiteliais (BEAS-2B). Neste estudo ficou evidente que os neutrófilos são capazes de amplificar a resposta observada através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e da quimiocina IL-8 bem como pela ativação do fator de transcrição NF- κ B nas células BEAS-2B.

Notadamente, uma das formas pelas quais neutrófilos contribuem para o desenvolvimento adequado da resposta inflamatória é através do recrutamento de outras células relacionadas ao processo inflamatório. Deste modo, secretam agentes quimiotáticos para macrófagos como MIP-1 α e MIP-1 β (SCHRÖDER et al., 2006). Os neutrófilos podem ser ativados por uma variedade de estímulos dentre os quais se encontram citocinas como TNF- α , proteínas como o inibidor de ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) e o peptídeo f-MLP (N-metionil-leucil-fenilalanina) (CORTELING; WYSS; TRIFILIEFF, 2002; ZOU et al., 2011). Vale ressaltar ainda, o importante papel das citocinas IL-23 e IL-17 ao estimular a migração destas células na inflamação crônica (LEMOIS et al., 2008).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. —Citocinas. In: *Imunologia Celular e Molecular*, 6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 12, p. 267-302.
- AGRAWAL, P.; KUMAR, S.; JAISWAL, Y. K.; DAS, H. R.; DAS, R. H.; A Mesorhizobium lipopolysaccharide (LPS) specific lectin (CRL) from the roots of nodulating host plant, *Cicer arietinum*. *Biochimie*, v. 93, n. 3, p. 440-449, 2011.
- AHSAN, M.; ISLAM, N.S.K.; GRAY, A.I.; STIMSON, W.H. Cytotoxic Diterpenes from *Scoparia dulcis*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n.7, p. 958-961, 2003.
- AIDA, Y.; MAENO, M.; SUZUKI, N.; NAMBA, A.; MOTOHASHI, M.; MATSUMOTO, M.; MAKIMURA, M.; MATSUMURA, H. The effect of IL-1 β on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes. *Life Sciences*, v. 79, n.8, p. 764–771, 2006.
- AIELLO, R. J.; BOURASSA, P.-A.; LINDSEY, S.; WENG, W.; FREEMAN, A.; SHOWELL, H. J. Leukotriene B4 antagonism Reduces Monocytic Foam Cells in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.22, n. 3, p. 443-449, 2002.
- AJUEBOR, M. N.; SINGH, A.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D2 is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 279, n. 1, p. g238-g244, 2000.
- AKIRA, S.; ISSHIKI, H.; SUGITA, T.; TANABE, O.; KINOSHITA, S.; NISHIO, Y.; NAKAJIMA, T.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *The EMBO Journal*, v.9, n.6, p. 1897 - 1906, 1990.
- ALENCAR, M. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PINHEIRO, D. C. S. N. Inflamação e sua modulação por antiinflamatórios não esteróides: riscos e benefícios. *Ciência Animal*, v.15, n.1, p. 33-41, 2005.
- ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, R. S. B.; FIGUEIREDO, J. G.; CAVALCANTE, I. J. M.; MATOS, M. P. V.; CUNHA, F. Q.; NUNES, J. V. S.; BOMFIM, L. R.; RAMOS, M. V. An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflammation Research*, v. 59, n. 4, p. 245-254, 2010.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, n.48, p.589-601, 1988.
- ALVES, C. M.; SILVA, D. A.; AZZOLINI, A. E.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MINEO, J. R. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, v. 14, p. 1-10, 2012.
- AMAGLOH, F. K.; BENANG A. Effectiveness of *Moringa oleifera* seed as coagulant for water purification. *African Journal of Agricultural Research*, v. 4, n. 1 p. 119-123, 2009.

- ANAND, U.; ANAND, C.V. Myeloperoxidase: A New Twist to an Old Tale. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 27, n.2, p. 107-109, 2012.
- ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 1, p. 17–25, 2007.
- ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.-I.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe Impairment in Early Host Defense against *Candida albicans* in Mice Deficient in Myeloperoxidase. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 4, p. 1828–1836, 1999.
- ARAÚJO, R. M. S.; FERREIRA, R. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CUNHA, M. G. C.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L. V.; PAIVA, P. M. G. *Crataeva tapia* bark lectin is an affinity adsorbent and insecticidal agent. *Plant Science*, v. 183, p. 20–26, 2012.
- ARBO, M.D.; LARENTIS, E.R.; LINCK, V.M.; ABOY, A.L.; PIMENTEL, A.L.; HENRIQUES, A.T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S.C.; LEAL, M.B.; LIMBERGER, R.P. Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of *Citrus* species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and p-synephrine. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 8, p. 2770-2775, 2008.
- ASARE, G. A.; GYAN, B.; BUGYEI, K.; ADJEI, S.; MAHAMA, R.; ADDO, P.; OTU-NYARKO, L.; WIREDU, E. K.; NYARKO, A. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, n. 1, p. 265-272, 2012.
- ASHALATHA, K.; VENKATESWARLU, Y.; PRIYA, A. M.; LALITHA, P.; KRISHNAVENI, M.; JAYACHANDRAN, S. Antiinflammatory potential of *Decalepis hamiltonii* (Wight and Arn) as evidenced by down regulation of pro inflammatory cytokines -TNF- α and IL-2. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 130, n. 1, p. 167–170, 2010.
- AUSTEN, K. F.; MAEKAWA, A.; KANAOKA, Y.; BOYCE, J. A. The leukotriene E4 puzzle: Finding the missing pieces and revealing the pathobiologic implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 124, n. 3, p. 406-414, 2009.
- AWODELE, O.; OREAGBA, I. A.; ODOMA, S.; SILVA, J. A. T.; OSUNKALU, V. O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.139, n. 2, p. 330-336, 2012.
- AZZOLINA, A.; BONGIOVANNI, A.; LAMPIASI, N.; Substance P induces TNF- α and IL-6 production through NF Kappa B in peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1643, n. 1-3, p. 75– 83, 2003.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BARKER, R. N.; ERWIG, L.-P.; HILL, K. S. K.; DEVINE, A.; PEARCE, W. P.; REES A. J. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 127, n. 2, p. 220–225, 2002.
- BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. The role of nuclear factor-kB in cytokine gene regulation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 17, n. 1, p. 3–9, 1997.

- BELTRÁN, B.; MATHUR, A.; DUCHEN, M. R.; ERUSALIMSKY, J. D.; MONCADA, S. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 26, p. 14602-7, 2000.
- BELTRÁN-HEREDIA, j.; SÁNCHEZ-MARTÍN, j.; BARRADO-MORENO, M. Long-chain anionic surfactants in aqueous solution. Removal by *Moringa oleifera* coagulant. *Chemical Engineering Journal*, v. 180, n. 1, p. 128-136, 2012.
- BERLO, D. V.; WESSELS, A.; BOOTS, A. W.; WILHELMI, V.; SCHERBART, A. M.; GERLOFF, K.; SCHOOTEN, F. J. V.; ALBRECHT, C.; SCHINS, R. P. F. Neutrophil-derived ROS contribute to oxidative DNA damage induction by quartz particles. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, n. 11, p. 1685-1693, 2010.
- BISHOP, G. A.; HOSTAGER, B. S. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, v. 13, n. 3, p. 278-285, 2001.
- BOEIRA, J. M.; FENNER, R.; BETTI, A. H.; PROVENSÍ, G.; LACERDA, L. A.; BARBOSA, P. R.; GONZALEZ, F.H.D.; CORREA, A. M. R.; DRIEMEIER, D.; DALL'ALBA, M. P.; PEDROSO, A. P.; GOSMANN, G.; SILVA, J.; RATES, S. M. K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). v. 128, n. 2, p. 526-532, 2009.
- BRALLEY, E. E.; GREENSPAN, P.; HARGROVE, J. L.; WICKER, L.; HARTLE, D. K. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. *Journal of Inflammation*, v. 5, n. 1, doi:10.1186/1476-9255-5-1, 2008.
- BONIFACE, K.; BAK-JENSEN, K. S.; LI, Y.; BLUMENSCHN, W. M.; MCGEACHY, M. J.; MCCLANAHAN, T. K.; MCKENZIE, B. S.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J.; MALEFYT, R. W. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 3, p. 535-548, 2009.
- BOOTS, A. W.; GERLOFF, K.; BARTHOLOMÉ, R.; BERLO, D. V.; LEDERMANN, K.; HAENEN, G. R.M.M.; BAST, A.; SCHOOTEN, F.-J. V.; ALBRECHT, C.; SCHINS, R. P.F. Neutrophils augment LPS-mediated pro-inflammatory signaling in human lung epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1823, n. 7, p. 1151-1162, 2012.
- BOSWELL, M. G.; ZHOU, W.; NEWCOMB, D. C.; PEEBLES JR., R. S. PGI2 as a regulator of CD4+ subset differentiation and function. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 96, n. 1-4, p. 21-26, 2011.
- BOUAZIZ, J. D.; YANABA, K.; VENTURI, G. M.; WANG, Y.; TISCH, R. M.,; POE, J. C.; TEDDER, T. F. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 52, p. 20878-83, 2007.
- BRANDT, E.; WOERLY, G.T; YOUNES, A. B.; LOISEAU, S.; CAPRON, M. IL-4 production by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, v.68, n. 1, p. 125-130, 2000.
- BROWN, V.; WARKE, T. J.; SHIELDS, M. D.; ENNIS, M. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax*, v.58, n. 4, p. 311-316, 2003.

- CAMPANHOLLE, G.; LANDGRAF, R. G.; BORDUCCHI, E.; SEMEDO, P.; WANG, P. H. M.; AMANO, M. T.; RUSSO, M.; PACHECO-SILVA, A.; JANCAR, S.; CAMARA, N. O. S. Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *European Journal of Pharmacology*, v. 634, n. 1-3, p. 132-137, 2010.
- CAMPBELL, J.; CIESIELSKI, C. J.; HUNT, A. E.; HORWOOD, N. J.; BEECH, J. T.; HAYES, L. A.; DENYS, A.; FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; FOXWELL, B. M. J. A Novel Mechanism for TNF- α Regulation by p38 MAPK: Involvement of NF- κ B with Implications for Therapy in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 11, p. 6928–6937, 2004.
- CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Immunology*, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.
- CAYER, M.-P.; DROUIN, M.; PROULX, M.; JUNG, D. 2-Methoxyestradiol induce the conversion of human peripheral blood memory B lymphocytes into plasma cells. *Journal of Immunological Methods*, v. 355, n. 2, p. 29–39, 2010.
- CHEN, Y.; PEUMANS, W. J.; HAUSE, B.; BRAS, J.; KUMAR, M.; PROOST, P.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E.J.M.; Jasmonic acid methyl ester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chito-oligosaccharide binding lectin in tobacco leaves. *The FASEB Journal*, v. 16, n. 8, p. 905–907, 2002.
- CHOI, S.-E.; CHOIA, K.-M.; YOON, I.-H.; SHIN, J.-Y.; KIM, J.-S.; PARK, W.-Y.; HAN, D.-J.; KIM, S.-C.; AHN, C.; KIM, J.-Y.; HWANG, E.-S.; CHA, C.-Y.; SZOT, G. L.; YOON, K.-H.; PARK, C.-G. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transplant Immunology*, v. 13, n. 1, p. 43–53, 2004.
- CHONG, C.; BOST, K. L.; CLEMENTS, J. D. Differential Production of Interleukin-12 mRNA by Murine Macrophages in Response to Viable or Killed Salmonella spp. *Infection and Immunity*, v. 64, n. 4, p. 1154–1160, 1996.
- CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. *The Plant Cell*, v. 3, n. 1, p. 1-9, 1991.
- CHUMARK, P.; KHUNAWAT, P.; SANVARINDA, Y.; PHORNCHIRASILP, S.; MORALES, N. P.; PHIVTHONG-NGAM, L.; RATANACHAMNONG, P.; SRISAWAT, S.; PONGRAPEEPORN, K.S. The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of Moringa oleifera Lam. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 3, p. 439-446, 2008.
- CLEMENT, B.; KUNZE, T.; HERBELING, S. Reduction of N ω -hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 349, n. 2, p. 869-873, 2006.
- COELHO, J. S.; SANTOS, N. D.L.; NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; FERREIRA, R. S.; ZINGALI, R. B.; COELHO, L. C.B.B.; LEITE, S. P.; NAVARRO, D. M.A.F. ; PAIVA, P. M. G. Effect of Moringa oleifera lectin on development and mortality of Aedes aegypti larvae. *Chemosphere*, v. 77, n. 7, p. 934-938, 2009.

- CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 55, n. 3, p.261–73, 1995.
- CORTELING, R.; WYSS, D.; TRIFILIEFF, A. In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters. *BMC Pharmacology*, v. 2, n. 1, 2002.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; WILKE, A. A. D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 1, p. 21-30, 2005.
- CRAGG, GM; NEWMAN, DJ. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*, v. 17, n. 2, p. 153-163, 1999.
- DAI, G.-F.; ZHAO, J.; JIANG, Z.-W.; ZHU, L.-P.; XU, H.-W.; MA, W.-Y.; CHEN, X.-R.; DONG, R.-J.; LI, W.-Y.; LIU, H.-M. Anti-inflammatory effect of novel andrographolide derivatives through inhibition of NO and PGE2 production. *International Immunopharmacology*, v. 11, n. 12, p. 2144, 2149, 2011.
- DALLEGRI, F.; FRUMENTO, G.; PATRONE, F. Mechanisms of tumour cell destruction by PMA-activated human neutrophils. *Immunology*, v. 48, n. 2, p. 273-279, 1983.
- DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V. R.; VAN POECKE, R. M. P.; VAN PELT, J. A.; POZO, M. J.; MUELLER, M. J.; BUCHALA, A. J.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C.; DICKE, M.; PIETERSE, C. M. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 18, n. 9, p. 923–937, 2005.
- DEB, D. D.; PARIMALA, G.; DEVI, S. S.; CHAKRABORTY, T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chemico-Biological Interactions*, v. 193, n. 1, p. 97-106, 2011.
- DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*, v.27, n.1, p. 519–50, 2009.
- DOBRIAN, A. D.; LIEB, D. C.; COLE, B. K.; TAYLOR-FISHWICK, D. A.; CHAKRABARTI, S. K.; NADLER, J. L. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Progress in Lipid Research*, v. 50, n. 1, p. 115-131, 2011.
- DUKE, J., Handbook of energy crops (*Moringa oleifera*), (Center for new crop and plant products, Purdue University, Indiana) 1983.
- EISERICH, J. P.; BALDUS, S.; BRENNAN, M. L.; MA, W.; ZHANG, C.; TOUSSON, A.; CASTRO, L.; LUSIS, A. J.; NAUSEEF, W. M.; WHITE, C. R.; FREEMAN, B. A. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*, v. 296, n. 5577, p. 2391–2394, 2002.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 22, n. 12, p. 462-467, 1997.
- ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 43, n. 5, p. 705–712, 2011.

- EVANS, J. F. The cysteinyl leukotriene receptors. Prostaglandins, *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 69, n. 2-3, p. 117–122, 2003.
- FACEMIRE, C. S.; NIXON, A. B.; GRIFFITHS, R.; HURWITZ, H.; COFFMAN, T. M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Controls Blood Pressure by Regulating Nitric Oxide Synthase Expression. *Hypertension*, v. 54, n. 3, p. 652-658, 2009.
- FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for Life Journal*, v. 1, n. 5, 2005.
- FANG, F. C.; VAZQUEZ-TORRES A. Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 282, n. 5, p. L941–L943, 2002.
- FARHAT, A.; PHILIBERT, P.; SULTAN, C.; POULAT, F.; BOIZET-BONHOURE, B. Hematopoietic-prostaglandin D2 synthase through PGD2 production is involved in the adult ovarian physiology. *Journal of Ovarian Research*, v. 4, n. 3, p. 2-13, 2011.
- FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; FARIAS, D. F.; CARIOLANO, N. G.; MELO, V. M. M.; QUEIROZ, M. G. R.; MARTINS, A. M. C.; MACHADO-NETO, J. G. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedeaegypti* and its toxicity upon laboratory animals, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, n.2, p. 207-216, 2009.
- FERREIRA, P. M. P.; CARVALHO, A. F. U.; SOUSA, D. F.; FERREIRA, J. M.; MARTINS, A. R.; QUEIROZ, M. G. R. Water extract of *Moringa oleifera* seeds: a toxicological approach. *Pesquisa Médica*, v.1, n.4, p. 45-53, 2007.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.
- FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; DE SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 61–68, 2002.
- FRIES, S.; GROSSER, T. The Cardiovascular Pharmacology of COX-2 Inhibition. *Hematology*, v. 1, n. 1, p. 445-451, 2005.
- FURUYA, A.; ASANO, K.; SHOJI, N.; HIRANO, K.; HAMASAKI, T.; SUZAKI, H. Suppression of nitric oxide production from nasal fibroblasts by metabolized clarithromycin in vitro. *Journal of Inflammation*, v. 7, n. 56, p. 2- 12, 2010.
- GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, v. 8, Suppl. 2, S3, 2006.
- GABAY, C.; SMITH, M. F.; EIDLEN, D.; AREND, W. P. Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL-1Ra) Is an Acute-Phase Protein. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 99, n. 12, p. 2930–2940, 1997.
- GELFAND, E. W. The impact of asthma on the patient, the family and society. *Advanced Studies in Medicine*, v. 8, n.3, p. 57-63, 2008.

- GEORGEWILL, O. A.; GEORGEWILL, U. O. NWANKWOALA, R. N. P. A Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* Lam extract in rats. *Asian Pacific Journal of tropical medicine*, v. 3, n. 2, p. 133-135, 2010.
- GRABOW, W.; SLABERT, J.L.; MORGAN, W.S.G.; JAHN, S.A.A. Toxicity and mutagenicity evaluation of water coagulated with *Moringa oleifera* seed preparations using fish, protozoan, bacterial, coliphage, enzyme, and Ames Salmonella assays. *Water SA*, v. 11, n.1, pp. 9–14, 1985.
- LEITE, J. F. M.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. R. L.; BRINGEL, P. H. S. F.; LACERDA, R. R.; GOMES, V. M.; CAJAZEIRAS, J. B.; NASCIMENTO, K. S.; PESSÔA, H. L. F.; GADELHA, C. A. A.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S.; SANTI-GADELHA, T. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. *Molecules*, v. 17, n. 3 3277-3290, 2012.
- GOLIAS, C. H.; TSOUTSI, E.; MATZIRIDIS, A.; MAKRIDIS, P.; BATISTATOU, A.; CHARALABOPOULOS, K. Leukocyte and Endothelial Cell Adhesion Molecules in Inflammation Focusing on Inflammatory Heart Disease. *In vivo*, v. 21, n. 5, p. 757-769, 2007.
- GONÇALVES, D.M.; CHIASSEN, S.; GIRARD, D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 3, p. 1002–1008, 2010.
- GONZÁLEZ, E. L. M.; PATRIGNANI, P.; TACCONELLI, S.; RODRÍGUEZ, L. A. G. Variability Among Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Risk of Upper Gastrointestinal Bleeding. *Arthritis & Rheumatism*, v.62, n.6, p. 1592-1601, 2010.
- GOODSTONE, N. J.; HARDINGHAM, T. E. Tumour necrosis factor alfa stimulates nitric oxide production more potentially than interleukin-1 β in porcine articular chondrocytes. *Rheumatology*, v. 41, n. 8, p. 883-891, 2002.
- GRATTENDICK, K.; STUART, R.; ROBERTS, E.; LINCOLN, J.; LEFKOWITZ, S. S.; BOLLEN, A.; MOGUILEVSKY, N.; FRIEDMAN, H.; LEFKOWITZ, D. L. Alveolar macrophage activation by myeloperoxidase. A model for exacerbation of lung inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 26, n. 6, p. 716-22, 2002.
- GROTZKE, J., E.; LEWINSOHN, D. M. Role of CD8+ T lymphocytes in control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbes and Infection*, v. 7, n.4, p. 776–788, 2005.
- GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J. N.; LARANJEIRA, L. P. M.; MAIA, M. B. S.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; SILVA, T. G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole–imidazolidine derivatives. *International Immunopharmacology*, v.11, n. 11, p. 1816–1822, 2011.
- GUPTA, A.; GAUTAM, M. K.; SINGH, R. K.; KUMAR, M. V.; RAO, C. V.; GOEL, R. K.; ANUPURBA, S. Immunomodulatory effect of *Moringa oleifera* Lam. Extract on cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 48, n. 11, p. 1157-1160, 2010.
- GUTIÉRREZ-VENEGAS, G.; ARREGUÍN-CANO, J. A.; HERNÁNDEZ-BERMÚDEZ, C. Bradykinin promotes Toll like receptor-4 expression in human gingival fibroblasts. *International Immunopharmacology*, v. 14, n. 4, p. 538-545, 2012.

- HAAS, M. J.; HORANIA, M.; MREYOUA, A.; PLUMMERA, B.; WONG, N. C. W.; MOORADIAN, A. D. Suppression of apolipoprotein AI gene expression in HepG2 cells by TNF- α and IL-1 beta. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1623, n. 2-3, p. 120–128, 2003.
- HACKETT, T.-L.; HOLLOWAY, R.; HOLGATE, S. T.; WARNER, J. A. Dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine release during acute inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo study. *Respiratory Research*, v. 9, n. 47, doi: 10.1186/1465-9921-9-47, 2008.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors: Pharmacological properties and biological roles. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 56, n. 2, p. 131-190, 1992.
- HAMDY, N. M.; AL-ABBASI, F. A.; ALGHAMDI, H. A.; ESMAT, M. F. T.; ABDEL-NAIM, A. B.; FRIES, S.; GROSSER, T. Role of neutrophils in acrylonitrile-induced gastric mucosal damage. *Toxicology Letters*, v. 208, n. 2, p. 108–114, 2012.
- HAMZA, A. A. Ameliorative effects of Moringa oleifera Lam seed extract on liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 1, p. 345-355, 2010.
- HARRIS, D. P.; HAYNES, L.; SAYLES, P. C.; DUSO, D. K.; EATON, S. M.; LEPAK, N. M.; JOHNSON, L. L.; SWAIN, S. L.; LUND, F. E. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*, v. 1, n. 6, p. 475-482, 2000.
- HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 103, n. 2, p. 147-166, 2004.
- HEISE, C. E.; O'DOWD, B. F.; FIGUEROA, D. J.; SAWYER, N.; NGUYEN, T.; IM, D.-S.; STOCCO, R.; BELLEFEUILLE, J. N.; ABRAMOVITZ, M.; CHENG, R.; WILLIAMS JR., D. L.; ZENG, Z.; LIU, Q.; MA, L.; CLEMENTS, M. K.; COULOMBE, N.; LIU, Y.; AUSTIN, C. P.; GEORGE, S. R.; O'NEILL, G. P.; METTERS, K. M.; LYNCH, K. R.; EVANS, J. F. Characterization of the Human Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor. *The journal of biological chemistry*, v. 275, n. 39, p. 30531-30536, 2000.
- HENSEL, G.; MEICHLE, A.; PFIZENMAIER, K.; KRÖNKE, M. PMA-responsive 5' flanking sequences of the human TNF gene. *Lymphokine Research*, v. 8, n. 3, p. 347–351, 1989.
- HIRATE, K.; UCHIDA, A.; OGAWA, Y.; ARAI, T.; YODA, K. Zaltoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, inhibits bradykinin-induced pain responses without blocking bradykinin receptors. *Neuroscience Research*, v. 54, n. 4, p. 288-294, 2006.
- HIRCHE, T. O.; BENABID, R.; DESLEE, G.; GANGLOFF, S.; ACHILEFU, S.; GUENOUNOU, M.; LEBARGY, F.; HANCOCK, R. E.; BELAAOUAJ, A. Neutrophil Elastase Mediates Innate Host Protection against Pseudomonas aeruginosa. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 7, p. 4945-4954, 2008.
- HONDA, T.; SEGI-NISHIDA, E.; MIYACHI, Y.; NARUMIYA, S. Prostacyclin-IP signaling and prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling both mediate joint inflammation in mouse collagen-induced arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 2, p. 325-335, 2006.

- HOUSER, K. R.; JOHNSON, D. K.; ISHMAEL, F. T. Anti-inflammatory effects of ethoxyphenolic compounds on human airway cells. *Journal of inflammation*, v. 9, n. 6, p. 1-12, 2012.
- HUME, D. A.; ROSS, I. L.; HIMES, S. R.; SASMONO, R. T.; WELLS, C. A.; RAVASI, T. The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 72, n. 4 p. 621-627, 2002.
- IRVINE, R. F. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochemistry Journal*. v. 204, n.1, p. 3-16, 1982.
- ITO, Y. OCCURRENCE OF LECTINS IN LEAVES AND FLOWERS OF SOPHORA JAPONICA. *Plant Science*, v. 47, n.2, p. 77-82, 1986.
- IVANOV, I.; Heydeck, D.; Hofheinz, K.; Roffeis, J.; O'Donnell, V. B.; Kuhn, H.; Walther, M. Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 503, n. 2, p. 161-174, 2010.
- JAISWAL, D.; RAI, P. K.; KUMAR, A.; MEHTA, S.; WATAL, G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 123, n. 3, p. 392-396, 2009.
- JANCIC, C. C.; CABRINI, M.; GABELLONI, M. L.; RODRIGUES, C. R.; SALAMONE, G.; TREVANI, A. S.; GEFFNER, J. Low extracellular pH stimulates the production of IL-1b by human monocytes. *Cytokine*, v. 57, n. 2, p. 258-268, 2012.
- JASPARS, L. H.; VOS, W.; AUST, G.; VAN LIER, R. A.; HAMANN, J. Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor. *Tissue Antigens*, v. 57, n. 4, p. 325-331, 2001.
- JIN, J.; TENG, P.; LIU, H.-L.; WU, J.; LIU, Y.-M.; XU, Q.; LI, J.-X. Microfluidics assisted synthesis and bioevaluation of sinomenine derivatives as anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, doi: 10.1016/j.ejmech.2012.12.051, 2013.
- JING, H.; VASSILIOU, E.; GANEA, D. Prostaglandin E2 inhibits production of the inflammatory chemokines CCL3 and CCL4 in dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, n. 5, p. 868-879, 2003.
- JUN, N. J.; MOSADDIK, A.; MOON, J. Y.; JANG, K.-C.; LEE, D.-S.; AHN, K. S.; CHO, S. K. Cytotoxic Activity of β -Caryophyllene Oxide Isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf. *Records of Natural Products*, v. 5, n. 3, p. 242-246, 2011.
- JUNGERSTEN, L.; EDLUND, A.; PETERSSON, A.-S.; WENNMALM, Å. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. *Clinical Physiology*, v. 16, n. 4, p.369-379, 1996.
- KALIA, V.; SARKAR, S.; GOURLEY, T. S.; ROUSE, B.T.; Ahmed, R. Differentiation of memory B and T cells. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, n. 3, p. 255-264, 2006.
- KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MIZUSAKI, K.; SUGIURA, T.; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Research International*, v. 34, p. 7-13, 2001.

- KASOLO, J. N.; BIMENYA, G. S.; OJOK, L.; OGWAL-OKENG, J. W. Phytochemicals and acute toxicity of *Moringa oleifera* roots in mice. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, v. 3, n.3, p. 38-42, 2011.
- KASOLO, J. N.; BIMENYA, G. S.; OJOK, L.; OCHIENG, J.; OGWAL-OKENG, J. W. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 4, n. 9, p.753-757, 2010.
- KAVITHA, C.; RAMESH, M.; KUMARAN, S. S.; LAKSHMI, S. A. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 64, n. 7-8, p. 681-687, 2012.
- KAWASAKI, H.; ONUKI, R.; SUYAMA, E.; TAIRA, K. Identification of genes that function in the TNF- α - mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries. *Nature Biotechnology*. v. 20, n. 4, p. 376 – 380, 2002.
- KAWO, A. H.; ABDULLAHI, B.A.; GAIYA, Z.A.; HALILU, A.; DABAI, M.; DAKARE, M. A. Preliminary phytochemical screening, proximate and elemental composition of *Moringa oleifera* lam seed powder. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, v. 2, n. 1, p. 96-100, 2010.
- KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219–230, 1995.
- KHALAFALLA, M. M.; ABDELLATEF, E.; DAFALLA, H. M.; NASSRALLAH, A.; ABOUL-ENEIN, K. M.; LIGHTFOOT, D. A.;EL-DEEB, F. E.; EL-SHEMY, H. A. Active principle from *Moringaoleifera* Lam leaveseffective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 49, p. 8467-8471, 2010.
- KHALIL, Z.; HELME, R. D. Serotonin modulates substance P-induced plasma extravasation and vasodilatation in rat skin by an action through capsaicin-sensitive primary afferent nerves. *Brain Research*, v. 527, n. 2, p. 292–298, 1990.
- KHAN, K. M.; AMBREEN, N.; MUGHAL, U. R.; JALIL, S.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY,M. I. 3-Formylchromones: Potential antiinflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 4058-4064, 2010.
- KILPATRICK, D. C.; WESTON, J.; URBANIAK, S. J. Purification and Separation of Tomato Isolectins by Chromatofocusing. *Analytical Biochemistry*, v. 134, n.1, p. 205-209, 1983.
- KIM, C.; KIM, J.-Y.; KIM, J.-H. Cytosolic phospholipase A2, lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Reports*, v. 41, n. 8, p. 555-559, 2008.
- KIM, M-S.; YI, J.-M.; KIM, S. H.; HONG,S.-H.; MADIMADI, H. M. K. Korean folk medicine, blocks TNF-a, IL-1b, and IL-8 production by activated human immune cells. *Cytokine*, v. 25, n. 4, p. 179-186, 2004.
- KIM, Y. C.; SHIN, J. E.; LEE, S. H.; CHUNG, W.-J.; LEE,Y.-S.; CHOI, B. K.; CHOI, Y. Membrane-bound proteinase 3 and PAR2 mediate phagocytosis of non-opsonized bacteria in human neutrophils. *Molecular Immunology*, v. 48, n. 15-16, p. 1966-1974, 2011.

- KIMOTO-NIRA, H.; SUZUKI, C.; KOBAYASHI, M.; SASAKI, K.; MIZUMACHI, K.; Inhibition of leukotriene B₄ production in murine macrophages by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 129, n. 3, p. 321-324, 2009.
- KIRKBY, N. S.; LUNDBERG, M. H.; HARRINGTON, L. S.; LEADBEATER, P. D.; MILNE, G. L.; POTTER, C. M.; AL-YAMANI, M.; ADEYEMI, O.; WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 43, p. 17597-17600, 2012.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.
- KLEBANOFF, S. J.; ROSEN, H. Ethylene formation by polymorphonuclear leukocytes Role of Myeloperoxidase. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 148, n. 2, p. 490-506, 1978.
- KLEINERT, H.; PAUTZ, A.; LINKER, K.; SCHWARZ, P. M. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, n. 1-3, p. 255– 266, 2004.
- KO, H.-J.; SONG, A.; LAI, M.-N.; NG, L.-T. Immunomodulatory properties of *Xylaria nigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 138, n. 3, p. 762-768, 2011.
- KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, 2003.
- KORNBERG, A. Science and medicine at the Millennium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, n. 12, p. 1379-1386, 1997.
- KOUMBADINGA, G. A.; DÉSORMEAUX, A.; ADAM, A.; MARCEAU, F. Effect of interferon- γ on inflammatory cytokine-induced bradykinin B₁ receptor expression in human vascular cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 647, n. 1-3, p. 127-125, 2010.
- KUNDUR, J. K. SURH, Y.-J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. *Free radical Biology & Medicine*, v. 52, n. 9, p. 2013-2037, 2012.
- LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. *Reviews in basic and clinical gastroenterology*, v. 135, n. 1, p. 41-60, 2008.
- LAITINEN, A.; LINDQVIST, A.; HALME, M.; ALTRAJA, A.; LAITINEN, L. A. Leukotriene E₄-induced persistent eosinophilia and airway obstruction are reversed by zafirlukast in patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 115, n. 2, p. 259-265, 2005.
- LAKHTIN, V. M.; LAKHTIN, M. V.; POSPELOVA, V. V.; SHENDEROV, B. A. Lectins of lactobacilli and bifidobacteria. II. Probiotic lectins of lactobacilli and bifidobacteria as possible signal molecules regulating inter- and intrapopulation relationships between bacteria and between bacteria and the host. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v. 19, n. 3, p. 153-157, 2007.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011.

- LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Research & Therapy*, v. 10, Suppl 2, S4, 2008.
- HOAREAU, L.; BENCHARIF, K.; RONDEAU, P.; MURUMALLA, R.; RAVANAN, P.; TALLET, F.; DELARUE, P.; CESARI, M.; ROCHE, R.; FESTY, F. Signaling pathways involved in LPS induced TNF α production in human adipocytes. *Journal of Inflammation*, v. 7, n. 1, 2010.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.
- LAWSON, S. R.; GABRA, B. H.; NANTEL, F.; BATTISTINI, B.; SIROIS, P. Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: Distinct vasculopathic profile of major key organs. *European Journal of Pharmacology*, v. 514, n. 1, p. 69 – 78, 2005.
- LEA, M. Bioremediation of Turbid Surface Water Using Seed Extract from *Moringa oleifera* Lam. (Drumstick) Tree. *Current Protocols in Microbiology* [Online] 2010, <http://www.currentprotocols.com/protocol/mc01g02> (acesso em 15 de novembro de 2011).
- LEE, C.; LIU, Q. H.; TOMKOWICZ, B.; YI, Y.; FREEDMAN, B. D.; COLLMAN, R. G. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 74, n.5, p. 676-82, 2003.
- LEE, Y. J.; KANG, S. J.; KIM, B. M.; KIM, Y. J.; WOO, H. D.; CHUNG, H. W. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 169, n. 3, p. 189-197, 2007.
- LEMOES, H. P.; GRESPAN, R.; VIEIRA, S.M.; CUNHA, T. M.; VERRI, JR., W. A.; FERNANDES, K. S. S.; SOUTO, F. O.; MCINNES, I. B.; FERREIRA, S. H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 14, p. 5594-5599, 2009.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.
- LI, L.; HUANG, L.; VERGIS, A. L.; YE, H.; BAJWA, A.; NARAYAN, V.; STRIETER, R. M.; ROSIN, D. L.; OKUSA, M. D. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- γ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 1, p. 331–342, 2010.
- LIN, S.-Y.; CHANG, W.-J.; LIN, C.-S.; HUANG, C.-Y.; WANG, H.-F.; SUN, W.-H. Serotonin Receptor 5-HT_{2B} Mediates Serotonin-Induced Mechanical Hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 4, p. 1410 –1418, 2011.
- LITTMAN, D. R. The Structure of the CD4 And CD8 Genes. *Annual Review of Immunology*, v. 5, p. 561-584, 1987.

- LIU, H.; SIDIROPOULOS, P.; SONG, G.; PAGLIARI, L. J.; BIRRER, M. J.; STEIN, B.; ANRATHER, J.; POPE, R. M. Regulation by NF- κ B Is Independent of TNF- α Gene Expression in Macrophages: c-Jun or C/EBP β . *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 8, p. 4277-4285, 2000.
- LIU, Z.; LIUA, B.; ZHANG, Z.-T.; ZHOUB, T.-T.; BIANA, H.-J.; MINA, M.-W.; LIUA, Y.-H.; CHENA, J.; BAO, J.-K. A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. *Phytomedicine*, v. 15, n. 10, p. 867–875, 2008.
- LIU, B.; CHENG, Y.; ZHANG, B.; BIAN, H.; BAO, J. Polygonatum cyrtonema lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS–p38–p53 pathway. *Cancer Letters*, v. 275, p. 54-60, 2009.
- LU, R.; PAN, H.; SHIVELY, J. E. CEACAM1 negatively regulates IL-1b production in LPS activated neutrophils by recruiting SHP-1 to a SYKTLR4- CEACAM1 complex. *Plos Pathogens*, v. 8, n.4, e1002597, 2012.
- LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 3, p. 395-400, 2004.
- LUNDEEN, K. A.; SUN, B.; KARLSSON, L.; FOURIE, A. M. Leukotriene B4 Receptors BLT1 and BLT2: Expression and Function in Human and Murine Mast Cells. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 5, p. 3439-3447, 2006.
- LUO, G.; HERSHKO, D. D.; ROBB, B. W.; WRAY, C. J.; HASSELGREN, P.-O. IL-1 β stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF- κ B. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 284, n. 5, p. R1249-R1254, 2003.
- LUSTER, A. D. Chemotaxis: Role in Immune Response. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001.
- LYNCH, O. T.; GIEMBYCZ, M. A.; BARNES, P. J.; LINDSAY, M. A.; Pharmacological comparison of LTB4-induced NADPH oxidase activation in adherent and non-adherent guinea-pig eosinophils. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, n. 4, 797-806, 2001.
- MAHDY, A. M.; WEBSTER, N.R. Histamine and antihistamines. *Pharmacology*, v. 9, n. 7, p. 324-328, 2008.
- MÄKI-PETÄJÄ, K. M.; WILKINSON, I. B. Inflammation and large arteries: Potential mechanisms for inflammation-induced arterial stiffness. *Artery Research*, v. 6, n. 2, p. 59-64, 2012.
- MANGALE, S. M.; CHONDE, S. G.; RAUT, P. D. Use of *Moringa oleifera* (Drumstick) seed as Natural Absorbent and an Antimicrobial agent for Ground water Treatment. *Research Journal of Recent Sciences*, v. 1, n. 3, p. 31-40, 2012.
- MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHVAROV, D. R. The B1 Receptors for Kinins. *Pharmacological Reviews*, v. 50, n. 3, p. 357-386, 1998.
- MARIANO, F. S.; CAMPANELLI, A. P.; NOCITI JR., F. H.; MATTOS-GRANERAND, R. O.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial peptides and nitric oxide production by neutrophils from

- periodontitis subjects. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 45, n. 11, p. 1017-1024, 2012.
- MAROYI, A. The utilization of *Moringa oleifera* in Zimbabwe: A sustainable livelihood approach. *Journal of Sustainable Development in Africa*, v. 8, n. 2 p. 161-169, 2006.
- MASKREY, B. H.; MEGSON, I. L.; WHITFIELD, P. D.; ROSSI, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, n. 5, p. 1001–1006, 2011.
- MASTERS, S. L.; MIELKE, L. A.; CORNISH, A. L.; SUTTON, C. E.; O'DONNELL, J.; CENGIA, L. H.; ROBERTS, A. W.; WICKS, I. P.; MILLS, K. H.G.; CROKER, B. A. Regulation of interleukin-1b by interferon-g is species-specific, limited by suppressor of cytokine signalling 1 and influences interleukin-17 production. *EMBO reports*, v. 11, n. 8, p. 640–646, 2010.
- MATSUKAWA, A.; YOSHINAGA, M. Neutrophils as a source of cytokines in inflammation. *Histology and Histopathology*, v. 14, n. 2, p. 511-516, 1999.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, v. 173, n. 1, p. 89-97, 2000.
- MEHTA, A.; AGRAWAL, B. Investigation into the mechanism of action of *Moringaoleifera* for its anti-asthmatic activity. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2008.
- MEHTA, L. K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A.H.;BAFNA, P.A.; GULATI, O.D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 86, n. 2-3, p.191-195, 2003.
- MELO, C.M.; CASTRO, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; GOMES, F.O.; PEREIRA, V.R.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; PAIVA, P.M. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 11, p. 1631–1636, 2010.
- MORTON, J. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae) – a boon to arid lands? *Economy Botany*, v.45, n.3, p.318-333, 1991.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSNANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, v.7, p. 145 73, 1989.
- MUANGNOI, C.; CHINGSUWANROTE, P.; PRAENGAMTHANACHOTI, P.; SVASTI, S.; TUNTIPOPIPAT, S. *Moringa oleifera* Pod Inhibits Inflammatory Mediator Production by Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Murine Macrophage Cell Lines. *Inflammation*, v. 35, n. 2, p. 445-455, 2012.

- MUHL, Q. E.; TOIT, E. S.; ROBBERTSE, P.J. Adaptability of *Moringa oleifera* Lam. (Horseradish) Tree Seedlings to Three Temperature Regimes. *American Journal of Plant Sciences*, v. 2, p. 776-780, 2011.
- MURAKAMI, M.; OHTA, T.; ITO, S. Interleukin-1 β enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial b1 receptor expression. *Neuroscience*, v. 151, n. 1, p. 222–231, 2008.
- MURATA, T.; ARITAKE, K.; MATSUMOTO, S.; KAMAUCHI, S.; NAKAGAWA, T.; HORIA, M.; MOMOTANI, E.; URADE, Y.; OZAKI, H. Prostaglandin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proceedings of National American Society*, v. 108, n. 49, p. 19802-7, 2011.
- NAGY, G.; KONCZ, A.; TELARICO, T.; FERNANDEZ, D.; ÉRSEK, B.; BUZÁS, E.; PERL, A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research & Therapy*, v. 12, n. 3, p. 210-216, 2010.
- NAIR, S. V.; BURANDT, M.; HUTCHINSON, A.; RAISON, R. L.; RAFTOS, D. A. A c-type lectin from the Tunicate, *Styela plicata*, that modulates cellular activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 129, n. 1, p. 11-24, 2001.
- NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 1 p. 52-59, 2011.
- NAPOLEÃO, T. H.; PONTUAL, E. V.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitology Research*, v. 110, n. 2, p. 609–616, 2012.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.
- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Water Research*, v. 32, n. 3, p. 781-791, 1998.
- NÉMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S. T.; MAYER, B.; PARMELEE, A.; DOI, K.; ROBEY, P. G.; LEELAHAVANICHKUL, K.; KOLLER, B. H.; BROWN, J. M.; HU, X.; JELINEK, I.; STAR, R. A.; MEZEY, É. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂—dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*, v. 15, n. 1, p. 42-49, 2009.
- NG, T. B.; LAM, Y. W.; WOO, N. Y. S. The immunostimulatory activity and stability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) roe lectin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 94, n. 3–4, p. 105–112, 2003.
- NGAI, P. H. K.; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 314, n. 4, p. 988-993, 2004.

- NICHOLS, D. E.; NICHOLS, C. D. Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 5, p. 1614–1641, 2008.
- NICOTERA, P.; BRUNE, B.; BAGETTA, G. Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 18, n. 6, p. 189–190, 1997.
- NIGROVIC, P. A.; LEE, D. M. Mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n. 1, p.1-11, 2005.
- NILSSON, O.; FOWLER, C. J.; S. JACOBSSON, O. P. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 inhibits TNF- α -induced neutrophil transmigration across ECV304 cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 547, n. 1-3, p. 165–173, 2006.
- NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, C. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects Naunyn-Schmied. *Archives of Pharmacology*, v. 379, n. 6, p. 379:609–616, 2009.
- OBERLIES, N. H.; Kim, N.-C.; Brine, D. R.; Collins, B. J.; Handy, R. W.; Sparacino, C. M.; Wani, M. C. Wal, M. E. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. *Public Health Nutrition*, v. 7, n. 7, p. 919-924, 2004.
- ODBILEG, R.; LEE, S.-I.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Cloning and sequence analysis of llama (lama glama) Th2 (IL-4, IL-10 and IL-13) cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 104, n.3-4, p. 145–153, 2005.
- OHTO, FUKASE, K. MIYAKE, K.; SATOW, Y. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid Iva. *Science*, v. 316, n. 5831, p. 1632-1634, 2007.
- OKAMOTO, H.; NAKANO, K. Regulation of interleukin-1 synthesis by histamine produced by mouse peritoneal macrophages per se. *Immunology*, v. 69, n. 1, p. 162-165, 1990.
- OLIVEIRA, J. T. A.; MELO, V. M. M.; CÂMARA, M. F. L.; VASCONCELOS, I. M.; BELTRAMINIC, L. M.; MACHADO, O. L. T.; GOMESE, V. M.; PEREIRA, S. P.; FERNANDES, C. F.; NUNES, E. P.; CAPISTRANO, G. G. G.; ANA C. O. MONTEIRO-MOREIRA Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. *Phytochemistry*, v. 61, n. 3, p. 301–310, 2002.
- OLIVEIRA, J. T. A.; SILVEIRA, S. B.; VASCONCELOS, K. M.; CAVADA, B. S. MOREIRA, R. A. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. *Journal of the Science of Food and agriculture*, v. 79, n. 6, p. 815-820, 1999.
- OLIVEIRA, C.F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

- OUÉDRAOGO, M.; LAMIEN-SANOU, A.; RAMDÉ, N.; OUÉDRAOGO, A.S.; OUÉDRAOGO, M.; ZONGO, S. P.; GOUMBRI, O.; DUEZ, P.; GUISSOU, P. I. Protective effect of *Moringa oleifera* leaves against gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 65, n. 3, p. 335-339, 2011.
- PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRANETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.
- PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, n. 2, p. 113–118, 1992.
- PALADA, M. C.; CHANG, L. C. Suggested cultural practices for Moringa. International Cooperators' Guide AVRDC. *AVRDC*, v. 545, n. 03, p. 1-5, 2003.
- PALIWAL R.; SHARMA, V.; PRACHETA; SHARMA, S.; YADAV, S.; SHARMA, S. Anti-nephrotoxic effect of administration of *Moringa oleifera* Lam in amelioration of DMBA-induced renal carcinogenesis in Swiss albino mice. *Biology and Medicine*, v. 3, n.2, p.27-35, 2011.
- PALIWAL R.; SHARMA, V.; PRECHETA A review on horse-radish tree (*moringa oleifera*): a multipurpose tree with high economic and commercial importance, *Asian Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 4, p. 317-328, 2011.
- PAPAYANNOPOULOS, V.; STAAB, D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Elastase Enhances Sputum Solubilization in Cystic Fibrosis Patients Receiving DNase Therapy. *Plos One*, v. 6, n. 12, p. e28526, 2011.
- PARK, H.-J.; HONG, J.-H.; KWONB, H.-J.; KIM, Y.; LEE, K.-H.; KIM, J.-B.; SONG, S. K. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 396, n. 3, p. 721-725, 2010.
- PATSOS, G.; HEBBE-VITON, V.; ROBBE-MASSELOT, C.; MASSELOT, D.; MARTIN, S.; GREENWOOD, R., et al. O-Glycan inhibitors generate aryl-glycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines. *Glycobiology*, v. 19, p. 382-398, 2009.
- CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *British Journal of Pharmacology*, v. 42, n. 3, p. 392-402, 1971.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiology*, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 33, n. 3, p. 209-258, 1998.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 491, p. 27- 54, 2001.

- PHILLIPSON, JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.
- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, v. 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.
- PIETRZAK, A.; MISIAK-TŁOCZEK, A.; BRZEZINSKA-BLASZCZYK, E. Interleukin (IL)-10 inhibits RANTES-, tumour necrosis factor (TNF) - and nerve growth factor (NGF)-induced mast cell migratory response but is not a mast cell chemoattractant. *Immunology Letters*, v.123, n.1, p.46-51, 2009.
- PISANI, L. F.; LECCHI, C.; INVERNIZZI, G.; SARTORELLI, P.; SAVOINI, G.; CECILIANI, F. *In vitro* modulatory effect of v-3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 131, n. 1-2, p. 79-85, 2009.
- PLIYEV, B. K.; AREFIEVA, T. I.; MENSNIKOV, M. Y. Urokinase receptor (uPAR) regulates complement receptor 3 (CR3)-mediated neutrophil phagocytosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 397, n. 2, p. 277-282, 2010.
- POETKER, D. M.; MA, M. D.; REH, D. D. A Comprehensive Review of the Adverse Effects of Systemic Corticosteroids. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v. 43, n. 4 p. 753–768, 2010.
- PRABHU, R.; MURUGAN, K.; NARESHKUMAR, A.; RAMASUBRAMANIAN, N.; BRAGADEESWARAN, S. Larvicidal and repellent potential of *Moringa oleifera* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 2, p. 124-129, 2011.
- PRIEGO, T.; GRANADO, M.; CASTILLERO, E.; MARTÍN, A. I.; VILLANÚA, M. A.; LÓPEZ-CALDERÓN, A. Nitric oxide production by hepatocytes contributes to the inhibitory effect of endotoxin on insulin-like growth factor I gene expression. *Journal of Endocrinology*, v. 190, n. 3, p. 847–856, 2006.
- RABINOVITCH, N. Urinary leukotriene E4 as a Biomarker of Exposure, Susceptibility and Risk in Asthma. *Immunology and Allergy Clinical of North America*, v. 32, n. 3, p. 433–445, 2012.
- RAJA, S. B.; MURALI, M. R.; KUMAR, N. K.; DEVARAJ, S. N. Isolation and partial characterisation of a novel lectin from aegle marmelos fruit and its effect on adherence and invasion of *Shigellae* to HT29 cells. *PLoS One*, v. 6, n. 1, e16231, 2011.
- RAKESH, S.; SINGH, V. J. Anti-inflammatory activity of *Moringa oleifera* leaf and pod extracts against carrageenin induced paw edema in albino mice. *Pharmacology online*, v. 1, p. 140- 144, 2011.
- RANG HP, RITTER JM, DALE MM. Inflamação e Antiinflamatórios. In: *Farmacologia*, 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.189-202.
- RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. C.; CHANDRA, V. *Tamarindus indica* L. and *Moringa oleifera* M extract administration ameliorates fluoride toxicity in rabbits. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 47, n. 11, p. 900-905, 2009.

- RASHID, U.; ANWAR, F.; MOSER, B. R.; KNOTHE, G. Moringa oleifera oil: A possible source of biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 99, n.17, p. 8175-8179, 2008.
- RASMUSON, A.; KOCK, A.; FUSKEVAG, O. M.; KRUSPIG, B.; SIMÓN-SANTAMARÍA, J.; GOGVADZE, V.; JOHNSEN, J. I.; KOGNER, P.; SVEINBJÖRNSSON, B. Autocrine Prostaglandin E2 Signaling Promotes Tumor Cell Survival and Proliferation in Childhood Neuroblastoma. *Plos one*, v. 7, n. 1, p. e29331, 2012.
- RAYCHAUDHURI, S. P.; NGUYEN, C. T.; RAYCHAUDHURI, S. K.; GERSHWIN, E. M. Incidence and nature of infectious disease in patients treated with anti-TNF agents. *Autoimmunity Reviews*, v. 9, n. 2, p. 67–81, 2009.
- REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proceedings of the National Academy of sciences*, v. 86, n. 3, p. 3375-3378, 1989.
- RICCIARDOLO, F. L.M.; SORBELLO, V.; BENEDETTO, S.; DEFILIPPI, I.; SABATINI, F.; ROBOTTI, A.; RENSWOUW, D. C.V.; BUCCA, C.; FOLKERTS, G.; DE ROSE, V. Bradykinin and lipopolysaccharide-induced bradykinin B2 receptor expression, interleukin 8 release and “nitrosative stress” in bronchial epithelial cells BEAS 2B: Role for neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, v. 694, n. 1-3, p. 30-38, 2012.
- RICCIOTTI, E.; FITZ GERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Inflamação e Reparo In: *Patologia Estrutural e Funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.45-83.
- ROBINSON, D.; HAMID, Q.; BENTLEY, A.; YING, S.; KAY, A. B.; DURHAM, S. R. Activation of CD4+ T cells, increased T-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 92, n. 2, p. 313-324, 1993.
- ROGERIO, A.P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, E.V. G.; KOYAMA, N. S.; BASEL, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. *Glycobiology*, v. 17, n. 8, p. 795–804, 2007.
- ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Migração Celular e Inflamação. In: *Imunologia*. 5. ed. São Paulo: Manole Ltda., 2003. p. 61-69.
- ROLA-PLESZCZYNSKIC, M.; STANKOVA, J. Cytokine gene regulation by PGE2, LTB4 and PAF. *Mediators of Inflammation*, v. 1, n. 1, p. 5-8, 1992.
- ROLIM, L. A. D. M. M.; Macêdo, M. F. S.; Sisenando, H. A.; Napoleão, T. H.; Felzenszwalb, I.; Aiub, C. A. F.; Coelho, L. C. B. B.; Medeiros, S. R. B.; Paiva, P. M. G. Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. *Journal of Food Science*, v. 76, n.2, p. 53-58, 2011.

- ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology*, v.38, n. 12-13, p. 881–885, 2002.
- ROSA, R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O. R.; SANTOS-GOMES, G. M. Leishmania infantum released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4+ and CD8+ T cells. *Acta Tropica*, v. 97, n. 3, p. 309–317, 2006.
- ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.
- ROWE, J.; FINLAY- JONES, J. J.; NICHOLAS, T. E.; BOWDEN, J.; MORTON, S.; HART, P. H. Inability of histamine to regulate TNF α production by human alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 17, n. 2, p. 218–226, 1997.
- SÁNCHEZ, N. R.; SPÖRNDLY, E.; Ledin, I. Effect of feeding different levels of foliage of Moringa oleifera to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Science*, v. 101, n. 1, p. 24-31, 2006.
- SANTOS, A. F. S. *Moléculas Bioativas de Moringa oleifera: Detecção, Isolamento e Caracterização*. 2009. 112f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2009.
- SANTOS, A. F. S.; LUZ, L. A.; ARGOLO, A. C. C.; TEIXEIRA, J. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. Isolation of a seed coagulant Moringa oleifera lectin. *Process Biochemistry*, v.44, n.4, p. 504-508, 2009.
- SAQIB, A.; KARIGAR, C. S. Cyclooxygenase isoforms in health and disease. *The Internet Journal of Pharmacology*. v. 7, n. 1, DOI: 10.5580/21fc, 2009.
- SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Relationship between nitric oxide and prostaglandins in carrageenin pleurisy. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, n. 7, p. 1113-1117, 1998.
- SAUTER, K.-S.; BRCIC, M.; FRANCHINI, M.; JUNGI, T. W. Stable transduction of bovine TLR4 and bovine MD-2 into LPS-nonresponsive cells and soluble CD14 promote the ability to respond to LPS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 118, n. 1-2, p. 92–104, 2007.
- SCHENKELAARS, E.-J.; BONTA, I. L. Effect of leukotriene c 4 on the release of secretory products by elicited populations of rat peritoneal macrophages. *European Journal of Pharmacology*, v. 86, n. 3-4, p. 477-480, 1983.
- SCHER, J. U.; PILLINGER, M. H. The Anti-Inflammatory Effects of Prostaglandins. *Journal of Investigative Medicine*, v. 57, n. 6, p. 703-708, 2009.
- SCHRÖDER, A. K.; OHE, M. V.; KOLLING, U.; ALTSTAEDT, J.; UCIECHOWSKI, P.; FLEISCHER, D.; DALHOFF, K.; JU, X. S.; ZENKE, M.; HEUSSEN, N.; RINK, L. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology*, v. 119, n. 3, p. 317–327, 2006.

- SCHWEIZER, A.; BROM, R.; GLATT, M.; BRAY, M. A. Leukotrienes reduce nociceptive responses to bradykinin. *European Journal of Pharmacology*, v. 105, n. 1-2, p. 105-112, 1984.
- SCOTT, D. L.; STEER, S. The course of established rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 21, n. 5, p. 943–967, 2007.
- SENGUPTA, M. E.; KERAITA, B.; OLSEN, A.; BOATENG, O. K.; THAMSBORG, S. M.; PÁLSDÓTTIR, G. R.; DALSGAARD, A. Use of *Moringa oleifera* seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. *Water Research*, v. 46, n. 11, p. 3646-3656, 2012.
- SERHAN, C. N. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 5, p. 1441–1448, 2011.
- SHAHID, M.; TRIPATHI, T.; SOBIA, F.; MOIN, S.; SIDDIQUI, M.; KHAN, R. A. Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review. *The Open Immunology Journal*, v. 2, p. 9-41, 2009.
- SHAPIRA, L.; CHAMPAGNE, C.; DYKE, T. E. V.; AMAR, S. Strain-Dependent Activation of Monocytes and Inflammatory Macrophages by Lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 6, p. 2736–2742, 1998.
- SHIDA, K.; MISONOU, Y.; KOREKANE, H.; SEKI, Y.; NOURA, S.; OHUE, M., et al. Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells. *Glycobiology*, v. 19, p. 1018-1033, 2009.
- SHIH, M.-C.; CHANG, C.-M.; KANG, S.-M.; TSAI, M.-L. Effect of Different Parts (Leaf, Stem and Stalk) and Seasons (Summer and Winter) on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of *Moringa oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 9, p. 6077-65088, 2011.
- SHIM, Y.-J.; KANG, B.-H.; CHOI, B.-K.; PARK, I.-S.; MIN, B.-H. Clusterin induces the secretion of TNF- α and the chemotactic migration of macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 422, n. 1, p. 200–205, 2012.
- SILVA, J. P. V.; SERRA, T. M.; GOSSMANN, M.; WOLF, C. R.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P. *Moringa oleifera* oil: Studies of characterization and biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, n. 10, p. 1527-1530, 2010.
- SILVA, L. M. C. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P. G.; RODRIGUES, J. A. G.; LIMA, M. E. P.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.
- SILVA, M. C. C.; SANTANA, L. A.; MENTELEE, R.; FERREIRA, R. S.; MIRANDA, A.; SILVA-LUCCA, R. A.; SAMPAIO, M. U.; CORREIA, M. T. S.; OLIVA, M. L. V. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1049–1059, 2012.
- SINGH, V. P.; PATIL, C. S.; JAIN, N. K.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Effect of nimesulide on acetic acid- and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 71, n. 3-4, p. 163-175, 2003.

- SOHN, E. J.; PAAPEB, M. J.; CONNORB, E. E.; BANNERMANB, D. D.; FETTERERC, R. H.; PETERS, R. R. Bacterial lipopolysaccharide stimulates bovine neutrophil production of TNF- α , IL-1 β , IL-12 and IFN- γ . *Veterinary Research*, v. 38, n. 6, p. 809–818, 2007.
- SOSTRES, C.; FELLOWA, R.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; A. LANAS, Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 24, n. 2, p. 121-132, 2010.
- STABLES, M. J.; GILROY, D. W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*, v. 50, n. 1, p. 35-51, 2011.
- STØLEVIK, S. B.; NYGAARD, U. C.; NAMORK, E.; GRANUM, B.; PELLERUD, A.; VAN LEEUWEN, D. M.; GMUENDER, H.; VAN DELFT, J. H.; VAN LOVEREN, H.; LØVIK, M.. In vitro cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells in the assessment of the immunotoxic potential of chemicals. *Toxicology In Vitro*, v. 55, n. 2, p. 555-562, 2011.
- TAKÁCS, T.; CZAKÓ, L.; MORSCHL, E.; LÁSZLÓ, F.; TISZLAVICZ, L.; RAKONCZAY, Z. JR.; LONOVICS, J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas*, v. 25, n. 3, p. 277-282, 2002.
- TANTISIRA, K. G.; DRAZEN, M. Genetics and pharmacogenetics of the leukotriene pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 124, n. 3, p. 422-427, 2009.
- TAUR, D. J.; PATIL, R. Y. Some medicinal plants with antiasthmatic potential: a current status. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 5, p. 413-418, 2011.
- TAYLOR, A.; AKDIS, M.; JOSS, A.; AKKOCX, T.; WENIG, R.; COLONNA, M.; DAIGLE, I.; FLORY, E.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain- containing protein tyrosine phosphatase 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 120, n. 1, p.76–83, 2007.
- TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by Cymbopogon citratus D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 10, p. 2913–2919, 2010.
- TSUZAKI, M.; GUYTON, G.; GARRETT, W.; ARCHAMBAULT, J. M.; HERZOG, W.; ALMEKINDERS, L.; BYNUM, D.; YANG, X.; BANES, A. J. IL-1 β induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 β and IL-6 in human tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 21, n.2, p. 256–264, 2003.
- TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology*, v. 40, n. 7, p. 423–429, 2003.
- URADE, Y.; HAYAISHI, O. Prostaglandin D₂ and sleep/wake regulation. *Sleep Medicine Reviews*, v. 15, n. 6, p. 411–418, 2011
- ULBRICH, H.; ERIKSSON, E. E., LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 12, p. 640-647, 2003.

- VALENTI, C.; CIALDAI, C.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; QUARTARA, L.; MAGGI, C. A. MEN16132, a kinin B2 receptor antagonist, prevents the endogenous bradykinin effects in guinea-pig airways. *European Journal of Pharmacology*, v. 579, n. 1-3, p. 350–356, 2008.
- VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, v. 85, n. 3, p. 342–350, 2001.
- VANDERLEI, E. S. O.; PATOILLO, K. K. N. R.; LIMA, N. A.; LIMA, A. P. S.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, L. M. C. M.; LIMA, M. E. P.; LIMA, V.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International Immunopharmacology*, v. 10, n. 9, p.1113–1118, 2010.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VENSON, R.; WIENS, A.; CORRER, C. J.; OTUKI, M. F.; GROCHOCKI, M. C.; PONTAROLLI, D. R. S.; PONTAROLO, R. Avaliação econômica das anticitocinas adalimumabe, etanercepte e infliximabe no tratamento da artrite reumatoide no Estado do Paraná. *Physis*, v. 21, n.2, p. 359-376, 2011.
- VERMA, N.; CHAUDHURY, I.; KUMAR, D.; DAS, R. H. Silencing of TNF- α receptors coordinately suppresses TNF- α expression through NF- κ B activation blockade in THP-1 macrophage. *FEBS Letters*, v. 583, n. 17, p. 2968–2974, 2009.
- VIJAY, L.; KUMAR, U. Effect of *Moringa oleifera* Lam. on normal and dexamethasone suppressed wound healing. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 1, p. s219-s223, 2012.
- VILA-PETROFF, M. G.; YOUNES, A.; EGAN, J.; LAKATTA, E. G.; SOLLOTT, S. J. Activation of Distinct cAMP-Dependent and cGMP-Dependent Pathways by Nitric Oxide in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, v. 84, n. 9, p. 1020-1031, 1999.
- VUOLTEENAHON, K.; KUJALA, P.; MOILANEN, T.; MOILANEN, E. Aurothiomalate and hydroxychloroquine inhibit nitric oxide production in chondrocytes and in human osteoarthritic cartilage. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v. 34, n. 6, p. 475-479, 2005.
- WAJANT, H.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 33, n. 1, p. 19–32, 2001.
- WALDNER, M. J.; BAETHMANN, A.; UHL, E.; LEHMBERG, J. Bradykinin-induced leukocyte– and platelet–endothelium interactions in the cerebral microcirculation. *Brain Research*, v. 1448, p. 163–169, 2012.
- WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P. R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense, *British Journal of Pharmacology*, v. 145, n. 3, p. 275-282, 2005.
- WALSH, D.; MCCARTHY, J.; O'DRISCOLL, C.; MELGAR, S. Pattern recognition receptors—Molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.09.003, 2012.

- WANG, J. M.; WALTER, S.; MANTOVANI, A. Re-evaluation of the chemotactic activity of tumour necrosis factor for monocytes. *Immunology*, v. 71, n. 3, p. 364-367, 1990.
- WANG, Q.; KUANG, H.; SU, Y.; SUN, Y.; FENG, J.; GUO, R.; CHAN, K. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, doi: 10.1016/j.jep.2012.12.013., 2012.
- WANG, S.; YAN, L.; WESLEY, R. A.; DANNER, R. L. Nitric Oxide Increases Tumor Necrosis Factor Production in Differentiated U937 Cells by Decreasing Cyclic AMP. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 9, p. 5959-5965, 1997.
- WANG, A. H.; NG, T.B.; LIU, Q. Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Sciences*, v. 70, n. 8, p. 877-885, 2002.
- Wanidworanun, C.; Strober, W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 12, p. 6853-61, 1993.
- WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 14, n. 5, p. 361-368, 2003.
- WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of recognition lectin-carbohydrate. *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, p. 441-73, 1996.
- WONG, P.; PAMER, E. G. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual Review of Immunology*, v. 21, p. 29-70, 2003.
- WOSZCZEK, G.; CHEN, L. Y.; NAGINENI, S.; KERN, S.; BARB, J.; MUNSON, P. J.; LOGUN, C.; DANNER, R. L.; SHELHAMER, J. H. Leukotriene D4 induces gene expression in human monocytes through cysteinyl leukotriene type 1 receptor. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 121, n. 1, p. 215-221, 2008.
- WOSZCZEK, G.; PAWLICZAK, R.; QI, H.-Y.; NAGINENI, S.; ALSAATY, S.; LOGUN, C.; SHELHAMER, J. H. Functional Characterization of Human Cysteinyl Leukotriene 1 Receptor Gene Structure. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 8, p. 5152-5159, 2005.
- XAVIER, F. G.; RIGHI, D.; BERNARDI, M. M. Histamina, serotonina e seus antagonistas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinaria*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 2007, p. 215-224.
- XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X.-F.; ACHONG, M. K. IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses, *The Journal of Clinical Investigation*, v. 101, n. 2, p. 311-320, 1998.
- YOUNG, R. E.; VOISIN, M.-B.; WANG, S.; DANGERFIELD J.; NOURSHARGH, S. Role of neutrophil elastase in LTB4-induced neutrophil transmigration in vivo assessed with a specific inhibitor and neutrophil elastase deficient mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 151, n. 5, p. 628-637, 2007.

YU, Y.-M.; WANG, Z.-H.; LIU, C.-H.; CHEN, C.-S. Ellagic acid inhibits IL-1b-induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *British Journal of Nutrition*, v. 97, n. 4, p. 692–698, 2007.

YUDINA, Y.; PARHAMIFAR, L.; BENGTSSON, A. M.-L.; JUHAS, M.; SJÖLANDER, A. Regulation of the eicosanoid pathway by tumour necrosis factor alpha and leukotrieneD4 in intestinal epithelial cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 79, n. 6, p. 223-231, 2008.

ZHANG, Z.; PENG, H.; LI, C.; LIU, J.; ZHOU, T.; YAN, Y.; LI, Y.; BAO, J. Polygonatum cyrtonema lectin induces murine .bro sarcoma L929 cell apoptosis via a caspase-dependent pathway as compared to Ophiopogon japonicus lectin. *Phytomedicine*, v. 18, p. 25-31, 2010.

ZHANG, Y.; ADNER, M.; CARDELL, L.-O. IL-1 β Induced Transcriptional Up-Regulation of Bradykinin B1 and B2 Receptors in Murine Airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2007.

ZHAO, J. K.; WANG, H. X.; NG, T. B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon*, v. 53, n. 3, p. 360–366, 2009.

ZHOU, W.; DOWELL, D. R.; HUCKABEE, M. M.; NEWCOMB, D. C.; BOSWELL, M. G.; GOLENIEWSKA, K.; LOTZ, M. T.; TOKI, S.; YIN, H.; YAO, S.; NATARAJAN, C.; WU, P.; SRIRAM, S.; BREYER, R. M.; FITZGERALD, G. A.; R. S. PEEBLES JR., Prostaglandin i2 signaling drives th17 differentiation and exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Plos one*, v. 7, n. 5, p. e33518, 2012.

ZOU, W.; ROTHB, R. A.; YOUNISD, H. S.; MALLEE, E.; GANEY, P. E. Neutrophil–cytokine interactions in a rat model of sulindac-induced idiosyncratic liver injury. *Toxicology*, v. 290, n. 2-3, p. 278–285, 2011.

ZWAM, M. V.; SAMSOM, J. N.; NIEUWENHUIS, E. E.; MELIEF, M.-J.; WIERENGA-WOLF, A. F.; DIJKE, I. E.; TALENS, S.; MEURS, M. V.; VOERMAN, J. S.; BOVEN, L. A.; LAMAN, J. D. Myelin ingestion alters macrophage antigen-presenting function in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 90, n. 1, p. 123-132, 2011.

Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds

Larissa Cardoso Corrêa de Araújo^{1,2}, Jaciana dos Santos Aguiar¹, Thiago Henrique Napoleão², Fernanda Virgínia Barreto Mota¹, Sandra Cabral da Silva¹, Maiara Celine de Moura², Marília Cavalcanti Coriolano², Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho², Teresinha Gonçalves da Silva^{1*}, Patrícia Maria Guedes Paiva²

1 Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel: +55-81-2126-8347; fax: +55-81-2126-8346.
E-mail address: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Abstract

Moringa oleifera seeds are used in various parts of the world, especially in rural areas of developing countries, to treat drink water. The lectins cMoL and WSMoL isolated from seeds are able to reduce water turbidity by coagulant activity. This study evaluated aqueous extract, diluted aqueous extract prepared according to the population uses, cMoL and WSMoL for cytotoxic and anti-inflammatory properties. Aqueous extract and cMoL were potentially cytotoxic to human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), while WSMoL and diluted aqueous extract did not exhibit cytotoxicity. *M. oleifera* preparations did not show hemolytic activity on murine erythrocytes as well as were not cytotoxic for the cancer cell lines NCI-H292, HT-29 and HEP-2. Evaluation of acute toxicity revealed that aqueous extract (2000 mg/kg) did not cause systemic toxicity in mice. cMoL, WSMoL and aqueous extract in low doses (6.25 µg/mL) and diluted extract at 50 µg/mL exhibited anti-inflammatory activity on LPS-stimulated murine macrophages, by regulating the production of nitric oxide and cytokines TNF- α and IL-1 β . Aqueous extract in the doses of 125, 250 and 500 mg/kg promoted reduction in leukocyte migration in the carrageenan-induced pleurisy. The reduction of leukocyte migration was accompanied by reduced activity of the enzyme myeloperoxidase, nitric oxide levels and by regulating of the cytokine TNF- α and IL-1 β . Moreover, the histological analysis of the lungs of the animals subjected to treatment with the extract also showed a reduced number of polymorphonuclear leukocytes. In conclusion, this study indicated that extract used by people and WSMoL are potentially safe for mammalian cells but it is recommended caution to use cMoL and more concentrated extract due to their potential to cause damage to important immune system cells as well as by the immunosuppressive potential of the extract. *M. oleifera* seeds can constitute potential sources of pharmacological tools due to anti-inflammatory property.

Keywords: *Moringa oleifera*, cytotoxicity, pleurisy, lectin.

Introduction

Moringa oleifera Lam is one of the fourteen species of the genus *Moringa* (family Moringaceae) and can be found in India, Pakistan, Afghanistan and Bangladesh, being also cultivated in Africa and Latin America [1]. This plant is used for various purposes, being the seeds used in water treatment, particularly by people in developing countries [2, 3].

Studies focusing on the chemical composition of this plant have identified a lot of bioactive substances which may confer several pharmacological properties to the preparations obtained from seeds [4, 5, 6]. Among these molecules are the lectins cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin) and WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin) [7, 8]. Lectins are glycoproteins from non-immune origin that possess carbohydrate-binding sites being able to interact reversibly and high specifically with sugars through hydrogen bonds, hydrophobic interactions and Van der Waals bonds. These proteins are also known by their ability to agglutinate erythrocytes [9, 10, 11, 12].

The *M. oleifera* seed lectins have shown coagulant activity constituting two of the active principles linked to the ability of seeds in reducing water turbidity [8, 13]. cMoL and WSMoL are insecticidal agents on *Anagasta kuehniella* and *Aedes aegypti*, respectively [7, 14, 15] and WSMoL showed antibacterial activity against species that cause diseases in humans [13]. The compounds 4(α -L-rhamnosyloxy) phenylacetonitrile, 4-hydroxyphenylacetonitrile, and 4-hydroxyphenyl-acetamide isolated from roasted *M. oleifera* seeds showed mutagenic effect on micronucleus assay using albino mice [16]. WSMoL was not genotoxic by Ames, Kado and cell-free plasmid DNA assays [13, 17]. Although aqueous extract from the seeds is used for treat drink water, studies about the pharmacological properties of cMoL and WSMoL are still incipient.

Studies have shown the anti-inflammatory activity of lectins such as that isolated from the marine alga *Caulerpa cupressoides*, which was able to reduce leukocyte migration in a murine model of inflammation [18] and the lectin from *Synadenium carinatum* latex, whose anti-inflammatory activity was demonstrated by reduction of the number of cells related to inflammation in a murine model of asthma as well as the ability of this lectin in acting upon key elements of inflammation such the transcription factor NF- κ B [19].

Carrageenan is a widely used phlogistic agent which promotes inflammation related to elevation of levels of NO, leukocyte migration and fluid extravasation [20]. Among the trials that use this polysaccharide as phlogistic agent, the pleurisy allows the assessment of the activity of products on various parameters associated with the inflammatory process [21]. This model can be divided into two phases, the first (4 hours after induction of inflammation) is characterized by the predominance of neutrophils, while the second (48 hours after induction of inflammation) shows predominantly mononuclear cells in the pleural cavity [22]. Furthermore, the pleurisy mimics the inflammatory process that occurs in asthmatic patients [23] and neutrophils are among the cells found in greater quantities in asthma [24].

This work investigated aqueous extract, diluted aqueous extract, cMoL and WSMoL from seeds for cytotoxicity to peripheral blood mononuclear, cancer cell lines (NCI-H292, HT-29 and HEp-2) and hemolytic activity on murine erythrocytes. Also, aqueous extract was evaluated for acute toxicity in mice. The search for natural products with promising therapeutic effect and with low side effects in humans stimulated the investigation of the extracts and lectins for *in vitro* anti-inflammatory effect (LPS-stimulated murine macrophages) as well as *in vivo* (pleurisy model) anti-inflammatory activity of the aqueous extract.

Materials and methods

Plant material

Seeds of *M. oleifera* were collected in Recife City, State of Pernambuco, northeastern Brazil, and stored at -20 °C. A sample of the collected material is archived as voucher specimen number 73 345, at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* – IPA (*Instituto Agrônômico de Pernambuco*, Recife, Brazil).

Cell lines and cell culture

The cancer cell lines used for the *in vitro* cytotoxicity tests, NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HT-29 (human colon adenocarcinoma) and HEp-2 (human larynx epidermoid carcinoma), were grown in DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% FBS, 100 µg/mL of penicillin–streptomycin–amphotericin B solution at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. The cells were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro, Brazil and maintained in the Laboratory of Cell Culture, Department of Antibiotics from Federal University of Pernambuco, Brazil. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from peripheral blood from healthy volunteer donors (approved by the Ethics Comittee from Federal University of Pernambuco under the number 0342.0.172.000-11) and macrophages were collected from peritoneal cavity of Balb/c mice.

Animals

Male Balb/c *Mus musculus* mice weighing 20-25 g were obtained from Laboratory of Immunopathology *Keizo-Asami* (LIKA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. Male Swiss *Mus musculus* mice (25-30 g) were obtained from the bioterium of the Department of Antibiotics from UFPE. Before use in the experiments, the mice were housed under standardized conditions (22±2 °C, 12-12 light/dark photoperiod, and 50–60% humidity) and fed with a standard mouse diet with water *ad libitum*. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of the UFPE (process number 23076.029506/2012-64), and the experiments were performed in accordance with the rules of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and ethical principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). The animals subjected to surgery were anaesthetized using a

ketamine and xylazine association. The remaining experiments involving animals were performed to cause minimum suffering.

Aqueous and diluted aqueous extracts from *M. oleifera* seeds

Aqueous *M. oleifera* seed extract was prepared using crushed seeds. The resulting powder (10 g) was mixed with distilled water (100 mL) in a magnetic stirrer for 16 h at 4 °C. The mixture was filtered through cotton gauze and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant corresponded to aqueous extract. The aqueous extract was lyophilized to dryness using a LIOTOP freeze-dryer model L101 (Liobras, São Carlos, Brazil).

Diluted aqueous extract was prepared as used by Brazilian people for treatment of turbid water following the recommendations of the non-governmental organization ESPLAR (www.esplar.org.br) except for the inclusion of filtration steps [17]. Macerated shelled seeds (2.0 g) were added to distilled water (100 mL) and manually agitated for 5 min. The suspension was passed through filter paper and to perform the assays the stock solution (20 µg/µL) was diluted with distilled water to obtention of the tested concentrations for each test.

Isolation of cMoL and WSMoL

cMoL was isolated according to the procedure described by Santos et al. (2009) [8]. *M. oleifera* seed powder (10 g) was extracted with 0.15 M NaCl (100 mL) in a magnetic stirrer for 6 h at 28 °C. After filtration through gauze and centrifugation the proteins from saline extract were precipitated with 60% ammonium sulphate for 4 h at 28 °C. The precipitated protein fraction was dialyzed against distilled water (4 h, 4 °C) followed by 0.15 M NaCl (4 h) and loaded (10 mg of protein) onto a guar gel column (10.0 cm x 1.0 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl (20 mL/h flow rate). cMoL was eluted with 1.0 M NaCl and dialyzed against 0.15 M NaCl (4 h, 4 °C).

WSMoL was isolated according to the procedure described by Coelho et al (2009) [7]. *M. oleifera* seed powder (10 g) was extracted with distilled water (100 mL) in a magnetic stirrer for 16 h at 28 °C. After filtration through gauze and centrifugation the proteins from water extract were precipitated with 60% ammonium sulphate for 4 h at 28 °C. The precipitated protein fraction was collected by centrifugation, dissolved in 0.15 M NaCl, and submitted for dialysis (3.5 kDa cut-off membrane) against 0.15 M NaCl (6 h at 4 °C). The dialysed fraction (80 mg of proteins) was then applied to a chitin column (18 x 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl (0.3 mL/min flow rate). After extensive washing with the equilibrating solution, WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid and dialysed against 0.15 M NaCl (6 h at 4 °C).

Protein content

The protein concentration in all samples was estimated using bovine serum albumin (31-500 µg/mL) as standard [25]. In chromatography steps, protein elution was monitored by measuring the absorbance at 280 nm.

Hemagglutinating activity

The assay was conducted in microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) using a suspension (2.5% v/v) of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde [26]. Hemagglutinating activity was determined by mixing a twofold serial dilution of sample (50 μ L) with 0.15 M NaCl in microtiter plates. Next, the erythrocyte suspension (50 μ L) was added to each well and the assay was incubated for 45 min at 27 °C. One hemagglutination unit was defined as the reciprocal of the highest dilution of the sample promoting full erythrocyte agglutination. Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between the hemagglutinating activity and protein concentration (mg/mL) [27].

Evaluation of extracts for saponin

Saponin detection was performed by qualitative test [28]. Aqueous and diluted aqueous extracts were vigorously agitated for two minutes followed by rest for two hours. It was considered as a positive result the persistence of foam at the end of the rest period. Also was performed the test of capillary flow to compare the flow of the extracts with distilled water. Extracts with flow greater than that of water were considered positive for presence of saponins.

Evaluation of cytotoxicity of *M. oleifera* extracts and lectins on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs were purified from human blood by gradient separation using the solution for cell separation Histopaque-1077 (Sigma–Aldrich). Cells were isolated from a 6 mL blood sample in 5 mL of phosphate buffered saline (PBS) to which was added 3 mL of Ficoll Histopaque-1077. After centrifugation at 1500 rpm for 30 min the mononuclear cells (present in the intermediate region between the red cells and serum) were aspirated. The lymphocyte suspension was transferred to another tube to which PBS was added until the volume of 11 mL and centrifuged for 20 min at 1000 rpm. Then, the supernatant was discarded and the lymphocyte pellet resuspended to a final concentration of 3×10^5 cells/mL in 2 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Lymphocytes proliferation was induced by addition of 3% phytohemagglutinin, a mitogen which acts fundamentally on T lymphocytes becoming they the predominant cell population in this assay [29].

To determine the cytotoxicity on PBMCs, *M. oleifera* samples were added to cell cultures in serial concentrations (aqueous extract: 0.78–50 μ g/mL; diluted aqueous extract: 6.25–400 μ g/mL; lectins: 1.56–100 μ g/mL) and incubated for 72 h at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. Next, MTT was added (25 μ L, 0.5 mg/mL) and microplates were placed in an incubator for 3 h and then DMSO was added (100 μ L to each well). The optical density of the wells was measured at 540 nm. The concentration that inhibits 50% of cell growth in regard to control (IC₅₀) was determined. Two independent experiments were performed in duplicate. Samples with IC₅₀ < 10 μ g/mL

were considered very toxic, with IC_{50} between 10 and 100 $\mu\text{g/mL}$ were potentially toxic, and those with $IC_{50} > 100\mu\text{g/mL}$ considered non-cytotoxic [30, 31].

Hemolytic Assay

The hemolytic assay was performed in 96-well microplates. Each well received a 0.85% NaCl solution containing 10 mM CaCl_2 . Samples (50 μL) of aqueous or diluted aqueous extracts at 15.62 to 2000 $\mu\text{g/mL}$ in 5% DMSO, cMoL or WSMoL at 0.19 to 25 $\mu\text{g/mL}$ in 0.15 M NaCl were added to wells containing 100 μL of the saline solution to get a 1:2 dilution. Each well received 100 μL of a 2% (v/v) suspension of mouse erythrocytes in 0.85% saline containing 10 mM CaCl_2 . In negative controls, 100 μL of the saline solution plus 50 μL of the saline solution or 50 μL of 5% DMSO were plated. Positive control (to obtain 100% hemolysis) contained 80 μL of saline solution plus 20 μL of 0.1% Triton X-100 in 0.85% saline. After centrifugation during 1 h followed by incubation for 1 h at 27 °C, the supernatant was discarded, and the released hemoglobin was measured by absorbance at 450 nm. Two independent experiments were performed in duplicate. The effective concentrations that cause 50% hemolysis (EC_{50}) in regard to that observed in the positive control were calculated being only considered active extracts with $EC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ [32].

Evaluation of cytotoxicity of *M. oleifera* extract and lectins on cancer cell lines

Cell viability was measured by MTT reduction assay, which is based on the conversion of the salt 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazole)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a formazan product by the action of the enzyme succinyl dehydrogenase present in mitochondria of viable cells [33, 34]. The cancer cell lines NCI-H292, HT-29 and HEp-2 cells (10^5 cells/mL) in DMEM medium were plated in 96-well microplates and incubated during 24 h at 37 °C. After this period, 25 μL of aqueous extract (50 $\mu\text{g/mL}$) or lectins (25 $\mu\text{g/mL}$) were added to each well and incubated for 72 h. Next, MTT dye (25 μL , 0.5 mg/mL) was added to the wells and the assay was incubated for more 3 h. After this period the medium was removed and dimethylsulfoxide (DMSO, 100 μL) was added to the wells for solubilization of the generated formazan salts. The optical density of the wells was measured at 540 nm and compared to that in the control (cells incubated only with medium). Two independent experiments were performed in duplicate. The samples were classified according to the inhibition percent of cell viability in the following categories: inactive (1-20%), weakly active (20-50%), moderately active (50-70%) or very active (70-100%) [35].

Acute toxicity

Acute toxicity of the aqueous extract was determined in accordance with the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) for testing of chemicals, n° 423, adopted on December 17, 2001. Female Swiss albino mice animals (n=3 for each group) received a single administration of aqueous extract at a dose of 2000 mg/kg or saline solution (control). The animals were observed individually during the first hour and at the times of 2, 12 and 24 h after administration

aiming for the death record or to investigate possible toxic effects. During the following 14 days the animals were observed once daily. A range of signs such as general activity, irritability, touch response, contortions, tremors, convulsions, tachycardia, piloerection, stereotyped movements, somnolence, defecation, diarrhea and miction were analyzed. The daily consumption of water and food as well as the body weight of the mice during the experiment were also recorded. On the 14th day after administration of the extract, the animals were anesthetized with 0.1 to 0.2 mL/100g of an association of ketamine and xylazine (2:1) and the blood was collected by cardiac puncture and placed in tubes with anticoagulant (EDTA). Hematological indices were determined using an automated analyzer Horiba ABX Micros 60-Horiba. The organs (liver, kidney and spleen) were analyzed macroscopically, dried and weighed to calculate the index of organs, which is given by the following formula: *Organ weight (mg)/ Body Weight (g)*.

Effect of *M. oleifera* extracts and lectins on viability of LPS-stimulated peritoneal macrophages

Balb/c mice received by intraperitoneal route 2.5 mL 3% sodium thioglycollate. After 72 hours, the animals were euthanized in a CO₂ chamber and peritoneal exudate was collected by washing the cavity with cold sterile PBS (5 mL). The viability of the adherent cells was assessed by trypan blue exclusion test and cell suspension was cultured (5×10^6 cells/mL) in microplates containing RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, antibiotic solution (1000 UI/mL penicillin and 100 mg/L streptomycin), 200 mM L-glutamine and incubated for 2 h at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. After that, non-adherent cells were discarded and samples (100 µL) of aqueous extract (6.25–50 µg/mL), diluted aqueous extract (50–400 µg/mL) and lectins (6.25–100 µg/mL) in presence of LPS (1 µg/mL) were added to macrophages adhered on the plate. After incubation at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h, the supernatant was collected for further analysis of the nitrite and cytokine production and the cell viability was assessed by MTT assay. Each concentration was tested in quadruplicate. Three independent experiments were performed and to assess the *in vitro* anti-inflammatory activity only concentrations at which the percentage of viable cells was more than 70% were chosen [36].

Evaluation of *in vivo* anti-inflammatory effect of aqueous extract on carrageenan-induced pleurisy assay

Animals were pretreated orally with aqueous seed extract (125, 250 or 500 mg/kg), dexamethasone (0.5 mg/kg) or saline solution (NaCl 0.85%) using groups with six animals divided randomly. One hour after treatment, animals were anesthetized with 0.1 to 0.2 mL/100g of an association of 50% ketamine and 2% xylazine (2:1). Pleurisy was induced by administration of 0.1 mL of phlogistic agent carrageenan (1%) in pleural cavity through surgery. Four hours after induction of inflammation, animals

were euthanized, the thorax was opened and the pleural cavity was washed with 1.0 mL of sterile PBS with heparin (20 IU/ mL). Samples of pleural lavage fluid were collected for evaluation of cytokine and NO levels as well as cell migration. Fragments of the lung were also collected to evaluate the activity of the enzyme myeloperoxidase and for histopathological analysis [37]. The cell count was performed on an automated analyzer ABX micros 60-Horiba.

At the end of pleurisy the lung fragments were collected and fixed in 10% buffered formalin. The tissue was dehydrated with graded ethanol, embedded in paraffin, blocks and sectioned. The sections were stained with hematoxylin-eosin for examination under light microscopy.

Analysis of nitrite and measurement of cytokines

The nitrite present in the supernatant of macrophages culture and in the pleural exudate was used as an indicator of NO production using the Griess reaction. Briefly, the samples (50 μ L) were mixed with an equal volume of Griess reagent in a 96-well microtiter plate and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was read at 540 nm using a microplate reader and the nitrite concentrations were determined by comparison with a standard curve of sodium nitrite. Results were expressed as μ M.

The concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were measured using sandwich ELISA kits specific for mice (eBioscience, San Diego, California, USA) according to the manufacturer's instruction. Results were expressed at pg/mL.

Myeloperoxidase activity assay

Myeloperoxidase activity assay was used as an indicator of polymorphonuclear leukocyte accumulation. Lung tissues were collected and weighed 4 h after the carrageenan injection. Each fragment of organ was homogenized in a solution containing 0.5% (w/v) hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and the homogenate was centrifuged for 5 min at 7000 rpm. An aliquot of the supernatant was allowed to react with a solution of hydrogen peroxide and *o*-dianisidine in potassium phosphate buffer. Myeloperoxidase activity was measured by the rate of change in absorbance at 450 nm after 5 min incubation [38].

Statistical Analysis

For analysis of cell viability, the IC₅₀ was calculated from nonlinear regression using the software GraphPad Prism v. 5.0. For the remaining tests, one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test were used to evaluate the differences among the treatments. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results and discussion

Protein content and Hemagglutinating activity

Characterization of *M. oleifera* extracts reveals that aqueous extract has 1.52 mg/mL of protein and specific hemagglutinating activity of 42.10 while diluted aqueous extract has 0.0486 mg/mL of protein and specific hemagglutinating activity of 2634. Thus, although the diluted extract has low protein concentration, the high hemagglutinating activity indicates the predominance of lectins.

Evaluation of cytotoxicity of *M. oleifera* extracts and lectins on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

cMoL and aqueous extract were potentially cytotoxic for PBMCs (Table 1), with IC_{50} of 11.72 μ g/mL and 34.3 ± 2.31 μ g/mL, respectively. On the other hand, cells treated during 72 h with WSMoL at the tested concentrations did not present alterations in the viability. The IC_{50} of 144 μ g/mL determined for diluted aqueous extract reveals no cytotoxicity to PBMCs of the preparation used by people to treat drink water. PBMCs are frequently employed to evaluate the cytotoxicity of natural or synthetic products on normal cells [39]. *M. oleifera* seeds used to treat drink water contain isothiocyanates [40] that are toxic to normal cells and in the present work PBMCs were used to evaluate the cytotoxicity of the extracts and lectins from *M. oleifera* seeds. The results showed that diluted aqueous extract is safe while aqueous extract, a more concentrated preparation, may be potentially harmful. Probably it is due to the lower concentration of toxic compounds in diluted aqueous extract than that of aqueous extract and in this sense it is not recommendable to prepare extracts using amount of seeds higher than that used by people for water treatment. Rolim et al. [17] also showed that *M. oleifera* seed extract at concentrations 3, 4, 5 and 7.5-fold higher than that used by people was mutagenic by Ames and Kado assays.

Maintenance of the integrity of PBMCs is essential for the body's defense to attack by pathogens and in inflammatory process [41, 42]. In this study, none of the tested preparations was effectively cytotoxic to lymphocytes, which affording a wide range of pharmacological studies with extracts and lectins. The lectin WSMoL seems be a potential tool for pharmacological studies since it did not cause damage to human normal cells. On the other hand, cMoL showed to be potentially cytotoxic.

Hemolytic Assay

Hemolytic assay was performed to assess the potential of *M. oleifera* seed extracts and lectins to cause injuries in the plasma membrane of the cells, either by forming pores or by total collapse. Table 1 show that both aqueous and diluted aqueous extracts did not cause hemolysis even at concentrations up to ten times greater than that

used by population to treat water for human consumption. cMoL and WSMoL also did not cause hemolysis at all tested concentrations.

In the search for new substances with promising pharmacological activity that do not cause harmful effects to the body, trials investigating the capacity of synthetic or natural products to cause damage to erythrocyte membrane are widely employed [43, 44]. Although the aqueous extract and cMoL were potentially cytotoxic to PBMCs all preparations evaluated in this work did not show hemolytic activity and thus are safe to plasma membrane of erythrocytes. Saponins were not detected in aqueous and diluted aqueous extracts and the non occurrence of erythrocyte lysis can be related to absence in *M. oleifera* preparations of these substances that are widely associated with hemolysis [45, 46]. Saponins were also not found in *M. oleifera* seed extracts prepared with water, petroleum ether, chloroform or ethanol [47].

Evaluation of cytotoxicity of *M. oleifera* extract and lectins on cancer cell lines

Evaluation of cytotoxicity on cancer cell lines was performed by treatment with a single concentration of aqueous extract (50 µg/mL), cMoL (25 µg/mL) and WSMoL (25 µg/mL). The aqueous extract inhibited the growth of NCI-H292 (42.7%), HEp-2 (24.9%) and HT-29 (51.3%) but the lectins were not active on HT-29. cMoL inhibited NCI-H292 (33.9%) higher than HEp-2 (25.0%) growth while WSMoL promoted similar inhibition of NCI-H292 (38.7%) and HEp-2 (32.6) growth. Other concentrations were not evaluated due to low anticancer activity detected. Aqueous and diluted aqueous extracts as well as the lectins cMoL and WSMoL were not active against the cancer lines tested although it has been reported that *M. oleifera* seeds contain compounds capable of reducing the viability of cancer cells [40]. The anti-proliferative activity of preparations investigated here should not be excluded since genetic differences can lead to the expression of distinct membrane receptors promoting the activation of differentiated routes in other cells types subjected to the same treatment [48].

In vitro anti-inflammatory activity of *M. oleifera* seed extracts and lectins

The *M. oleifera* seed extracts and lectins were evaluated for *in vitro* anti-inflammatory activity using LPS-stimulated murine peritoneal macrophages. Firstly, the cytotoxicity of the samples to these cells was evaluated (Table 2) in order to avoid the use of cytotoxic concentrations for analysis of anti-inflammatory effect and consequently false positive results. Aqueous and diluted aqueous extracts as well as cMoL and WSMoL affected cell viability in a dose-dependent manner. Treatment with cMoL promoted weak cytotoxic effect at the concentration of 6.25 µg/mL. For WSMoL, both treatments at 6.25 and 12.5 µg/mL resulted in a high percentage of viable cells and thus the lowest concentration was selected for the next assay. The smallest

reduction on viability observed was detected at concentration of 6.25 µg/mL for aqueous extract and 50 µg/mL for diluted aqueous extract.

The anti-inflammatory activity of *M. oleifera* seeds was demonstrated previously [49] by the ability of an infusion (10 g of seed powder in 100 mL of distilled water) to reduce edema formation in rats. Also, was isolated from *M. oleifera* seeds the β -sitosterol, a compound with potent anti-inflammatory activity against airway inflammation, whose mechanism of action includes reducing the production of TNF- α [50]. These reports stimulated the evaluation of *in vitro* anti-inflammatory of aqueous and diluted aqueous extracts as well as cMoL and WSMoL by measuring the levels of mediators involved in the inflammatory process using LPS-stimulated murine macrophages.

The aqueous extract (6.25 µg/mL) was able to reduce the NO production while the diluted aqueous extract (50 µg/mL), prepared according to the population use, did not cause a statistically significant reduction of this mediator (Table 3). Both lectins (6.25 µg/mL) were able to reduce NO production by macrophages stimulated with LPS when compared to cells exposed only to lipopolysaccharide. These results indicate that the detected *in vitro* anti-inflammatory activity of *M. oleifera* aqueous extract and both lectins is at least in part due regulation of NO production.

Bacterial endotoxins, such as LPS activate macrophages leading to the production of several molecules among which is NO [51] characterized as an important pro-inflammatory mediator associated with the activation of T lymphocytes as well as increased vascular permeability observed in inflammatory processes [52, 53].

Table 4 shows the data from measurement of cytokine production. Aqueous and diluted aqueous extract as well as cMoL promoted statistically significant ($p < 0.05$) reduction in the levels of TNF- α and IL-1 β released by LPS-stimulated macrophages. WSMoL reduced the production of TNF- α and increased the levels of IL-1 β . None of the tested *M. oleifera* samples acted in the regulation of IL-6.

LPS promotes activation of NF- κ B in macrophages, stimulating the production of NO and pro-inflammatory cytokines [55] and it's possible that the reduction of NO levels is related to the inhibition of activation of nuclear transcription factor κ B, which regulates the expression of iNOS and of genes related to the production of cytokines [55]. This statement can be enhanced by inhibition of TNF- α and IL-1 β by aqueous extract and cMoL, both *in vitro* and *in vivo*.

The reduction of NO levels induced by aqueous extract can be due to the synergistic effect of its constituents, including the lectins. The diluted aqueous extract, however, did not reduce the levels of NO although had promoted significantly decreased of the production of TNF- α and IL-1 β . The action mechanism of this extract may be related to inhibition of NF- κ B activation and the absence of activity on NO production suggests a translational or post translational regulation of iNOS, however further studies should be conducted to confirm these hypothesis.

TNF- α is largely related to LPS-induced nitric oxide production, as shown by Steege et al., (1998) [56] using the combination of anti- TNF- α and anti-IFN-gamma

antibodies. Thus, the reduction in NO levels observed in this study, may be due to the marked reduction in the levels of TNF- α .

Activation of macrophages with LPS can also be associated with cytokine production via p38 MAPK, mainly stimulated by MAP kinase kinase 3 (MKK3) and MKK6. It was demonstrated that MKK3 regulates IL-1 β but not TNF- α [57]. Despite having reduced the production of TNF- α , WSMoL not reduced the levels of IL-1 β . Therefore, it can be suggested that a possible mechanism of action of WSMoL is acting on MKK3, stimulating this protein kinase. Anti-inflammatory effect of the extracts and cMoL by regulating p38 MAPK pathway may also a probable way of operation for these preparations.

It was demonstrated that IL-6 is related to controlling of the production of proinflammatory cytokines, avoiding that they are synthesized in harmful levels [58]. The no reduction in the levels of IL-6 by aqueous and diluted aqueous extracts as well as cMoL and WSMoL can be contributed to no elevation of levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β .

Acute toxicity

The acute toxicity for Swiss albino mice of the aqueous extract was determined aiming to choose the dose to be employed in the *in vivo* anti-inflammatory assay as well as to provide additional data on the safe use of *M. oleifera* seed preparations. In the first hours following administration of the extract (2000 mg/kg) systemic signs of intoxication were not observed as well as no deaths were recorded. Throughout the 14 days of trial, there were also no changes in the general activity of the animals or deaths. Table 5 shows that there were no significant differences ($p < 0.05$) in body weight between the control and treated groups. Additionally, there was no change in the consumption of water and food as well as no significant difference between the organs index. However, despite the normality of physiological parameters, there was a reduction in the number of erythrocytes, leukocytes, platelets, hemoglobin and hematocrit (Table 6).

As was observed slight decrease in some hematological parameters as well as a marked reduction in the number of platelets after treatment with the dose of 2000 mg/kg, also was evaluated the acute toxicity of the aqueous extract at the dose of 500 mg/kg. There was no statistical difference compared to control, among the parameters analyzed (data not shown).

The slight decrease in values of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit detected in the acute toxicity assay of aqueous extract is still within normal parameters [59]. It has been reported that ethanolic extract of *M. oleifera* seeds has immunosuppressive activity [60] and the decrease in the number of neutrophils and platelets observed here can be due to presence of compounds with immunosuppressive activity. The data from acute toxicity assay reveals that aqueous extract did not cause

toxicity at systemic level, but suggests caution in the use of them in highest concentrations due to the immunosuppressive potential.

In this work, the doses selected for *in vivo* anti-inflammatory assay were 125, 250 and 500 mg/kg for aqueous extract, which were respectively 16-, 8- and 4-fold lower than that used in the acute toxicity assay. It has been reported acute toxicity (LD₅₀ of 446.5 mg/kg) in mice (i.p. route) of aqueous extract obtained by mixing powder of one seed ($\cong 0.2$ g) in 10 mL of distilled water under stirring for 60 minutes [61]. In our study there were no observed deaths despite having been used a more concentrate extract and a higher dose (2000 mg/kg). Different routes of administration were used and probably the processes of digestion and metabolism that occurs when oral route is employed reduced the toxicity of aqueous extract.

Evaluation of *in vivo* anti-inflammatory effect of aqueous extract on carrageenan-induced pleurisy assay

Oral administration of the aqueous extract, at the selected doses, before the induction of pleurisy by carrageenan caused a reduction of leukocyte migration in a dose dependent manner, as shown in Table 7. All doses showed effectiveness in reducing cell migration and the highest percentage of inhibition was obtained for dose of 500 mg/kg (71.2%).

Aqueous extract reduced the NO production with percentages of inhibition of up to slightly more than 90% in comparison with control (Table 8). This result corroborates with that obtained in the *in vitro* anti-inflammatory assay and demonstrates that the reduction of NO production may be involved in the mode of action of the extract against acute inflammation induced by carrageenan.

The Table 9 shows the results of measurement of cytokines levels in lung exudate from *in vivo* anti-inflammatory assay. The aqueous extract of *M. oleifera* seeds also reduced the levels of cytokines TNF- α and IL-1 β in a dose dependent manner, as occurred with the leukocyte migration. Despite the efficiency observed for doses of 250 and 500 mg/kg, animals treated with the dose of 125 mg/kg exhibited no statistically significant ($p < 0.05$) reduction in the levels of TNF- α when compared to control group. With respect to IL-1 β it was observed slight decrease for the animals treated with the dose of 125 mg/kg, while the animals that received the extract at doses of 250 and 500 mg/kg showed significant reduction ($p < 0.05$) of this interleukin level. The extract was not able to reduce the levels of IL-6 in any of the doses tested. These results agree with those from *in vitro* assay.

A clinical trial using *M. oleifera* seed powder in asthmatic patients showed improvement of the symptoms of this disease [63]. Later, the investigation of part of the mechanism involved with this action, using an alcoholic extract demonstrated that *M. oleifera* reduces mast cell degranulation, acts as bronchodilator, possess spasmolytic activity and reduces edema formation [6]. However, have not been conducted other

studies to broaden the understanding of the effect of the seeds of this plant on the inflammatory process, especially using aqueous preparations.

The decrease in levels of TNF- α by aqueous extract seems to be crucial for the reduction of inflammation since this cytokine acts stimulating the production of other proinflammatory cytokines [64]. The reduced leukocyte migration observed may be related to low levels of TNF- α and IL-1 β since the first acts as a potent chemotactic agent while the second stimulates expression of adhesion molecules on endothelial cells [65, 66].

In accordance with the results obtained for leukocyte migration, the myeloperoxidase activity, an indicative of the presence of neutrophils, was significantly reduced ($p < 0.05$) in a dose dependent manner in mice treated with *M. oleifera* seed extract with compared to the control (Figure 1).

The enzyme myeloperoxidase, which is stored in granules of neutrophils, acts as an indirect indicator of the activity of these cells. Thus, the reduction of this enzyme activity, also observed in a dose dependent manner, can be explained by the effect of the extract on cell migration, which was also demonstrated by histological analysis of the lungs of animals subjected to treatment with the extract before induction of inflammation in the pleural cavity.

Histological analysis (Figure 2) of the lungs of animals subjected to pleurisy allows identification of extensive infiltration of polymorphonuclear leukocytes (PLMN), with perialveolar distribution. Treatment with aqueous extract at 500 mg/kg decreased PLMN infiltration and preserved the integrity of the alveoli and bronchi. The dose of 250 mg/kg also reduced infiltration of polymorphonuclear cells when compared to control. Furthermore, treatment with 125 mg/kg did not inhibit the infiltration, corroborating the minimal reduction in the number of PLMN in the exudate from the pleural cavity.

Plant lectins with anti-inflammatory activity have been described [19, 67, 68]. Aqueous and aqueous diluted extracts showed ability to agglutinate erythrocytes, which is indicative of the presence of lectins and therefore, it can be suggested that the anti-inflammatory properties of these extracts may be mediated by this type of molecule, notably WSMoL by their solubility in water.

Thus, the reduction of the number of these cells was associated with a reduction of myeloperoxidase activity, NO levels and production of cytokines TNF- α and IL-1 β , without interfering on the production of IL-6.

Conclusions

Aqueous extract and cMoL are potentially cytotoxic to peripheral blood mononuclear cells, while WSMoL and the diluted aqueous extract are not cytotoxic to these cells. None of the tested *M. oleifera* preparations promoted hemolysis in erythrocytes of mammals and aqueous extract did not cause systemic toxicity level in mice. The extracts and lectins demonstrated *in vitro* anti-inflammatory activity on LPS-

stimulated macrophages by regulating the production of cytokines and NO. The anti-inflammatory property of aqueous extract was confirmed using a model of acute inflammation *in vivo* and it was observed reduction of leukocyte migration, myeloperoxidase activity and levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . Further studies should be performed to investigate the action of the preparations on prostaglandin synthesis, as well as the activity of lectins in animal models aiming provide a better understanding of the mechanism of action.

References

1. Oliveira JTA, Silveira SB, Vasconcelos KM, Cavada BS, Moreira RA (1999) Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. J Sci Food Agric, 79: 815-820.
2. Maroyi A (2006) The utilization of *Moringa oleifera* in Zimbabwe: A sustainable livelihood approach. JSDA, 8: 161-169.
3. Lea M (2010) Bioremediation of Turbid Surface Water Using Seed Extract from *Moringa oleifera* Lam. (Drumstick) Tree. Curr Protoc Microbiol. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01g02s16.
4. Kawo AH, Abdullahi BA, Gaiya ZA, Halilu A, Dabai M, et al. (2010) Preliminary phytochemical screening, proximate and elemental composition of *Moringa oleifera* lam seed powder. Bajopas, 2: 96-100.
5. Hamza AA (2010) Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. Food Chem Toxicol, 48: 345-355.
6. Mehta A, Agrawal B (2008) Investigation into the mechanism of action of *Moringa oleifera* for its anti-asthmatic activity. Orient Pharm Exp Med, 8: 24-31.
7. Coelho JS, Santos ND, Napoleão, TH, Gomes FS, Ferreira RS, et al. (2009) Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere, 77: 934-938.
8. Santos AFS, Luz LA, Argolo ACC, Teixeira JA, Paiva PMG, et al. (2009) Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. Process Biochem, 44: 504-508.
9. Kennedy JF, Paiva PMG, Correia MTS, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB (1995) Lectins, versatile proteins of recognition: a review. Carbohydr Polym, 26: 219-230.

10. Elgavish S, Shaanan B. (1997) Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci*, 22: 462-467.
11. Raja SB, Murali MR, Kumar NK, Devaraj SN (2011) Isolation and Partial Characterisation of a Novel Lectin from *Aegle marmelos* Fruit and Its Effect on Adherence and Invasion of *Shigellae* to HT29 Cells. *PLoS One*, 6: e16231.
12. Weis I, Drickamer K (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem*, 65: 441-73.
13. Ferreira RS, Napoleão TH, Santos AFS, Sá RA, Carneiro-da-Cunha MG, et al. (2011) Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. *Lett Appl Microbiol*, 53: 186-192.
14. Oliveira CFR, Luz LA, Paiva PMG, Coelho LCBB, Marangoni S, et al. (2011) Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochem*, 46:498-504.
15. Santos NDL, Moura KS, Napoleão TH, Santos GKN, Coelho LCBB, et al. (2012) Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. *Plos One*, 7: e44840.
16. Villasenor IM, Lim-Sylianco CY, Dayrit F (1989) Mutagens from roasted seeds of *Moringa oleifera* seeds. *Mutat Res*, 224:209-212.
17. Rolim LADMM, Macêdo MFS, Sisenando HA, Napoleão TH, Felzenszwalb I, et al. (2011) Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. *J Food Sci*, 76: 53-58.
18. Vanderlei ESO, Patoilo KKNR, Lima NA, Lima APS, Rodrigues JAG, et al. (2010) Antinociceptive and anti inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *Int Immunopharmacol*, 10:1113–1118.
19. Rogerio AP, Cardoso CR, Fontanari C, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, et al. (2007) Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* látex. *Glycobiology*, 17: 795–804.
20. Yoo, H.-J.; Kang, H.-J.; Jung, H.-J.; Kim, K.; Lim, C.-J.; et al. (2008) Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of *Saururus chinensis* extract. *J Ethnopharmacol*, 120: 282–286.

21. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, et al. (2011) Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. *Biochem Pharmacol*, 81: 636–648.
22. Dalmarco EM, Fröde TS, Medeiros YS (2004) Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. *Transpl Immunol*, 12: 151-157.
23. Saleh TSF, Calixto JB, Medeiros YS (1996) Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br J Pharmacol*, 118: 811-819.
24. Fahy JV (2009) Eosinophilic and Neutrophilic Inflammation in Asthma: insights from Clinical Studies. *Proc Am Thorac Soc*, 6: 256-259.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-295.
26. Bing DH, Weyand JG, Stavinsky AB (1967) Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 124: 1166–1170.
27. Paiva PMG, Coelho LCB (1992) Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol* 36: 113–118.
28. Kokate A (1999) *Phytochemical Methods*. *Phytotherapy*, 78: 126-129.
29. Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, et al. (2004) The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci*, 75: 699-716.
30. Gad SC (1993) Alternatives to *in vivo* studies in toxicology. In: Ballantyne B, Marrs TC, Siversen T, editors. *General and Applied Toxicology*. Macmillan Press. pp. 179-206.
31. Ampasavate C, Okonogi S, Anuchapreeda S (2010) Cytotoxicity of extracts from fruit plants against leukemic cell lines. *Afr J Pharm Pharmacol*, 4: 013-021.
32. Costa-Lotufo LV, Khan MTH, Wilke AADV, Jimenez PC, Pessoa C, et al. (2005) Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *J Ethnopharmacol*, 99: 21-30.

33. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
34. Alley MC, Scudiere DA, Monks, A.; Hursey ML, Czerwinski MJ, et al. (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: 589-601.
35. Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Kolesnikova N, Maharaj VJ, et al. (2008) In vitro anticancer screening of South African plants. *J Ethnopharmacol*, 119: 455-461.
36. Ko HJ, Song A, Lai MN, Ng LT (2011) Immunomodulatory properties of *Xylaria nigripes* in peritoneal macrophage cells of Balb/c mice. *J Ethnopharmacol*, 138: 762–768.
37. Fröde TS, Medeiros YS (2001) Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm*, 10: 223-227.
38. Huy NT, Trang DTX, Kariu T, Sasai M, Saida K, et al. (2006) Leukocyte activation by malarial pigment. *Parasitol Int*, 55:75-81.
39. Deb DD, Parimala G, Devi SS, Chakraborty T (2011) Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact*, 193: 97-106.
40. Ragasa CY, Levida RM, Don MJ, Shen CC (2012) Cytotoxic Isothiocyanates from *Moringa oleifera* Lam Seeds. *Philipp Sci Lett*, 5: 46-52.
41. Grotzke JE, Lewinsohn DM (2005) Role of CD8+ T lymphocytes in control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect*, 7: 776–788.
42. Brown V, Warke TJ, Shields MD, Ennis MT (2003) Cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax*, 58: 311–316.
43. Roopan SM, Khan FRN (2009) Synthesis, antioxidant, hemolytic and cytotoxicity activity of AB ring core of mappicine. *Arkivoc*, 2009: 161-169.
44. Kalaivani T, Rajasekaran C, Suthindhiran K, Mathew L (2011) Free Radical Scavenging, cytotoxic and hemolytic activities from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. indica (Benth.). *Evid Based Complement Alternat Med*, doi:10.1093/ecam/neq060
45. Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V, Pichette A. (2009) Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-

synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem*, 17: 2002–2008.

46. Ng T, Li WW, Yeung HW (1986) A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. *J Ethnopharmacol*, 18: 55-61.

47. Usman MRM (2012) Phytochemical investigation and study of anti-nflamatory activity of *Moringa oleifera* lam. *IJPRD*, 3: 114-119.

48. Hsieh TC, Elangovan S, Wu JM (2010) Differential Suppression of Proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Exposed to α -, γ - and δ -Tocotrienols Is Accompanied by Altered Expression of Oxidative Stress Modulatory Enzymes. *Anticancer Res*, 30: 4169-4176.

49. Cáceres A, Saraviab A, Rizzoa S, Zabala L, Leon E, et al. (1992) Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*. 2: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. *J Ethnopharmacol*, 36: 233-237.

50. Mahajan SG, Mehta AA (2011) Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma. *Eur J Pharmacol*, 650: 458-464.

51. Tiwari M, Dwivedi UN, Kakkar P (2010) Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food Chem Toxicol*, 48: 2913–2919.

52. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Érsek B, et al. (2010) Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 12: 210-216.

53. Takács T, Czakó L, Morschl E, László F, Tiszlavicz L, et al. (2002) The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. *Pancreas*, 25: 277-282.

54. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev*, 57: 217-252.

55. Lee TH, Jung M, Bang MH, Chung DK, Kim J (2012) Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF- κ B activation in RAW264.7 macrophage cells. *Int Immunopharmacol*, 13: 264–270.

56. Steege JCA, Van de Ven MWCM, Forget PPh, Brouckaert P, Buurman WA (1998) The role of endogenous $\text{ifn-}\gamma$, $\text{tnf-}\alpha$ and il-10 in LPS-induced nitric oxide release in a mouse model. *Cytokine*, 10: 115-123.
57. Lu HT, Yang DD, Wisk M, Gatti E, Mellman I, et al. (1999) Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J*, 18: 1845–1857.
58. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, et al. (1998) IL-6 Is an Antiinflammatory Cytokine Required for Controlling Local or Systemic Acute Inflammatory Responses, *J Clin Invest*, 101: 311–320.
59. Margareth FFMD, Isac AM, Hosana BS, Kardilândia MO, Tereza HCV, et al. (2006) Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos *swiss* e *ratos Wistar*. *Rev Bras Cien Sa*, 10: 171-176.
60. Mahajan SG, Mehta AA (2010) Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. in experimental immune inflammation. *J Ethnopharmacol*, 130: 183-186.
61. Ferreira PM, Carvalho AF, Farias DF, Cariolano NG, Melo VM, et al. (2009) Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. *An Acad Bras Cienc*, 81: 207-216.
62. Mikami T, Miyasaka K (1983) Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy. *Eur J Pharmacol*, 95:1-12.
63. Agrawal B, Mehta A (2008) Antiasthmatic Activity of *Moringa oleifera* Lam: A clinical study. *Indian J Pharmacol*, 40: 27-31.
64. Houser KR., Johnson DK, Ishmael FT (2012) Anti-inflammatory effects of ethoxyphenolic compounds on human airway cells. *J Inflamm*, 9: 1-12.
65. Nilsson O, Fowler CJ, Jacobsson SO (2006) The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 inhibits $\text{TNF-}\alpha$ -induced neutrophil transmigration across ECV304 cells. *Eur J Pharmacol*, 547: 165–173.
66. Yu YM, Wang ZH, Liu CH, Chen CS (2007) Ellagic acid inhibits IL-1 β -induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Nutr*, 97: 692–698.

67. Nunes BS, Rensonnet NS, Dal-Secco D, Vieira SM, Cavada BS, et al. (2009) Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn-Schmied. Arch Pharmacol*, 379: 379:609–616.
68. Alencar NMN, Oliveira RSB, Figueiredo JG, Cavalcante IJM, Matos MPV, et al. (2010) An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. *Inflamm Res*, 59: 245-254.

Figure captions

Figure 1. Effect of the concentrate extract from *M. oleifera* seeds on the activity of myeloperoxidase in the lungs of mice subjected to carrageenan-induced pleurisy after treatment with the extract at doses of 125, 250 or 500 mg/kg. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of groups with 6 animals. * $p < 0.05$ in comparison with control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Figure 2. Effect of the concentrate extract from *M. oleifera* seeds on the infiltration of polymorphonuclear leukocytes in the lungs of mice subjected to carrageenan-induced pleurisy assay (x 400). The fragments were stained with hematoxylin-eosin. (A) Inflammation in mice treated with carrageenan. (B) Reduction of the presence of PLMN in mice that were previously treated with the extract at 500 mg/kg. (C) Reduction of the presence of PLMN in mice that were previously treated with the extract at 250 mg/kg. (D) Extensive infiltration of PLMN in mice that were previously treated with the extract at 125 mg/Kg. Lc = Leukocyte.

Table 1. Cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells and hemolytic activity of *M. oleifera* seed extracts and lectins.

Treatment	Cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells	Hemolytic activity
	IC ₅₀ (µg/mL)	EC ₅₀ (µg/mL)
Aqueous extract	34.3 ± 2.31	>2000
Diluted aqueous extract	144.8 ± 1.56	>2000
cMoL	11.72 ± 1.51	> 25
WSMoL	>100	> 25

Data are presented as mean ± standard deviation of two independent experiments. IC₅₀ (the concentration that inhibits 50% of cell growth in regard to control) was calculated by nonlinear regression. EC₅₀: the effective concentrations that cause 50% hemolysis in regard to that observed in positive control.

Table 2. Effect of *M. oleifera* seed extracts and lectins on the viability of LPS-stimulated peritoneal macrophages.

Concentration (µg/mL)	Viable cells (%)			
	Aqueous extract	Diluted aqueous extract	cMoL	WSMoL
6.25	77.56±4.3	NT	89.47±2.3	71.5±2.15
12.5	64.98±1.3	NT	66.4±0.9	73.8±1.7
25	57.95±0.5	NT	57.38±0.6	56.0±0.1
50	56.95±0.2	85.33±1.0	32.2±1.4	53.6±1.8
100	NT	57.9±1.6	14.4±0.8	17.5±1.5
200	NT	46.7±2.0	NT	NT
400	NT	23.3±0.9	NT	NT

Data are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments. NT: not tested.

Table 3. Effect of *M. oleifera* seed extracts and lectins (cMoL and WSMoL) on nitric oxide production by murine macrophages stimulated with LPS.

Treatment	NO (μM)
Control	1.18±0.09
LPS (1 μg/mL)	14.53±0.53*
Aqueous extract (6.25 μg/mL)	5.05±0.14*#
Diluted aqueous extract (50 μg/mL)	12.9±1.08*
cMoL (6.25 μg/mL)	4.24±0.8*#
WSMoL (6.25μg/mL)	4.21±0.60*#

Data are presented as mean ± standard deviation of three independent experiments* p<0.05 compared to control (cells in medium culture only) by ANOVA followed by Newman-Keuls test. # p<0.05 compared to LPS (p<0.05) by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 4. Effect of *M. oleifera* seed extracts and lectins (cMoL and WSMoL) on TNF-α, IL-1β and IL-6 production by murine macrophages stimulated with LPS.

Treatment (μg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Control	52.3±2.2	34.6±2.6	351.4±33.7
LPS (1 μg/mL)	732.5±13.7*	577.5±3.3*	410.4±23.8*
Aqueous extract (6.25 μg/mL)	100.0±19.3*#	186.28±48.4*#	401.6±8.0*
Diluted aqueous extract (50 μg/mL)	305.8±7.4*#	266.29±39.4*#	419.3±0.3*
cMoL (6.25 μg/mL)	351.1±1.8*#	114.72±7.3*#	403.8±18.1*
WSMoL (6.25μg/mL)	492.2±65.2*#	726.67±41.5*#	402.0±2.7*

Data are presented as mean ± standard deviation. * p<0.05 compared to control (cells in medium culture only) by ANOVA followed by Newman-Keuls test. # p<0.05 compared to LPS (p<0.05) by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 5. Effect of *M. oleifera* aqueous extract (2000 mg/kg) on physiological parameters of mice 14 days after administration.

Group	Feed intake (g)	Water consumption (mL)	Animal weight (g)		Index of organs (mg/g)		
			Initial	Final	Liver	Kidney	Spleen
Extract	16.85±2.88	28.46±4.73	29.56±0.64	32.86±1.47	61.60±1.6	4.85±0.12	5.78±0.50
Control	16.38±2.51	28.12±3.72	29.4±1.6	31.2±2.3	60.02±2.45	5.41±0.27	6.76±0.42

Data are presented as mean ± standard deviation, with 3 animals per group. No statistical differences ($p>0.05$) were identified by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 6. Effect of aqueous extract (2000 mg/kg) on hematological parameters of mice 14 days after administration.

Parameter	Extract	Control
Red blood cells ($10^6/\text{mm}^3$)	8.10±0.96*	11.17±0.30
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	8.06±0.62*	12.5±1.0
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	72.66±12.6*	250±9.19
Hemoglobin (g/dL)	14.66±0.15*	17.8±1.27
Hematocrit (%)	42.76±3.97*	57.2±4.8
VCM (μm)	52.33±0.57	51±2.82
HCM (pg)	16.73±0.25	15.75±0.49
CHCM (%)	31.33±1.36	31.1±0.28

Data are presented as mean ± standard deviation, with 3 animals per group. * $p<0.05$ with compared to control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 7. Number of polymorphonuclear leukocytes ($\times 10^3$) in exudate of the pleural cavity after 4 h of pleurisy induction by carrageenan in mice previously treated with aqueous extract.

Treatment	Number of polymorphonuclear leukocytes	Inhibition (%)
Control	11.1 $\pm$ 1.1	-
Sham	2.2 $\pm$ 0.1	-
Aqueous extract		
125 mg/kg	6.1 $\pm$ 0.9*	45.4
250 mg/kg	4.9 $\pm$ 0.8*	56.1
500 mg/kg	3.2 $\pm$ 0.4*	71.2
Dexamethasone 0.5 mg/kg	4.1 $\pm$ 0.4*	63.6

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of groups with 6 animals. * $p < 0.05$ in comparison with control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 8. Effect of aqueous extract on nitric oxide production (μM) in the assay of carrageenan-induced pleurisy.

Treatment	NO (μM)	Inhibition (%)
Control	35.5 $\pm$ 1.5	-
Sham	2.73 $\pm$ 0.6	-
Aqueous extract		
125 mg/kg	11.8 $\pm$ 1.6*	66.8
250mg/kg	4.68 $\pm$ 1.7*	86.8
500 mg/kg	3.10 $\pm$ 0.6*	91.3
Dexamethasone 0.5 mg/kg	2.54 $\pm$ 0.1*	92.8

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of groups with 6 animals. * $p < 0.05$ in comparison with control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Table 9. TNF- α , IL-1 β and IL-6 (pg/mL) levels after the end of carrageenan-induced pleurisy assay in exudate of the pleural cavity of mice previously treated with aqueous extract.

Treatment	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Control	469.4 $\pm$ 21.2	723.8 $\pm$ 18.7	429.20 $\pm$ 15.3
Sham	6.7 $\pm$ 1.3	7.11 $\pm$ 0.1	143.7 $\pm$ 32,4
Aqueous extract			
125 mg/Kg	440.0 $\pm$ 39.7	529.4 $\pm$ 9.4*	416.2 $\pm$ 32.9
250mg/Kg	237.1 $\pm$ 7.0*	191.3 $\pm$ 40.1*	413.3 $\pm$ 15.7
500 mg/Kg	167.3 $\pm$ 36.1*	12.0 $\pm$ 1.9*	424.1 $\pm$ 14.1
Dexamethasone 0.5 mg/Kg	215.53 $\pm$ 58.14*	143.50 $\pm$ 33.08*	356.4 $\pm$ 2,0*

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation of groups with 6 animals. *p<0.05 in comparison with control by ANOVA followed by Newman-Keuls test.

Figure 1

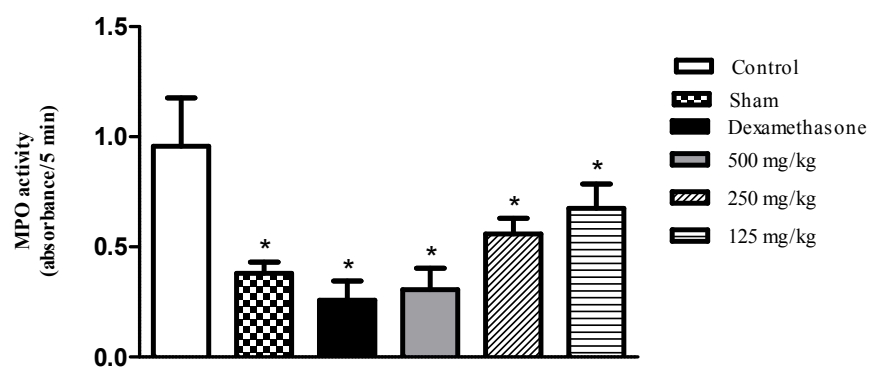
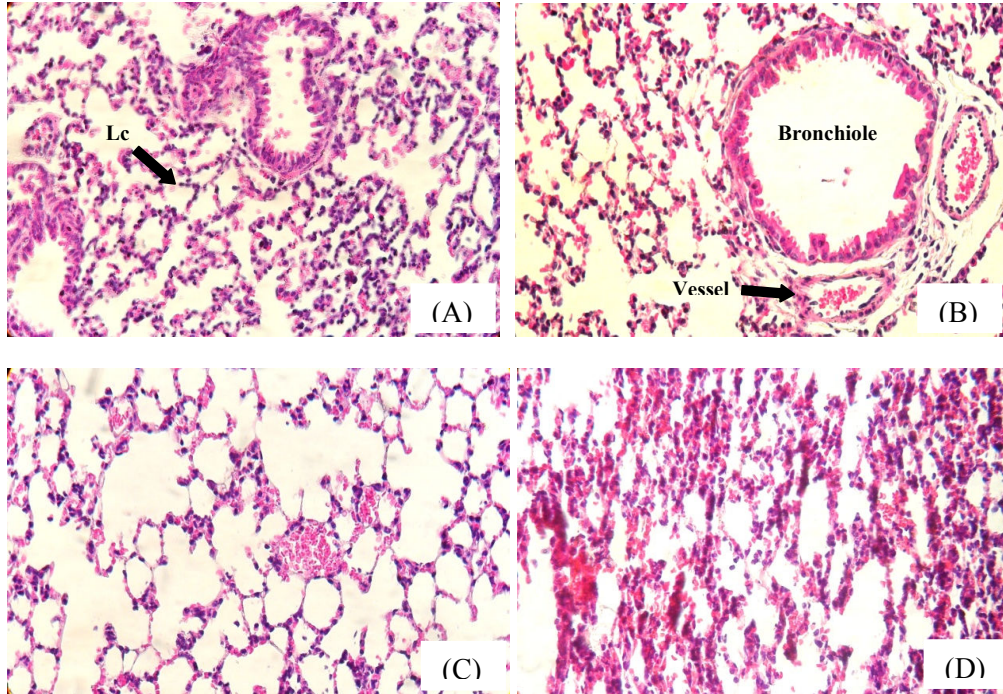


Figure 2



4 CONCLUSÕES

- cMoL e o extrato aquoso são potencialmente citotóxicos para células mononucleares de sangue periférico humano, enquanto WSMoL e o extrato aquoso diluído não reduzem a viabilidade destas células;
- Extrato aquoso, extrato aquoso diluído e as lectinas cMoL e WSMoL não apresentam atividade hemolítica sobre eritrócitos murinos e atividade anticâncer sobre as linhagens cancerígenas NCI-H292, HT-29 e HEP-2;
- A utilização de única dose elevada do extrato aquoso não promoveu toxicidade sistêmica em camundongos, porém, o extrato pode atuar, potencialmente, como imunossupressor;
- As preparações de *M. oleifera* com atividade anti-inflamatória *in vitro* interferem diferentemente na produção de mediadores inflamatórios com o extrato aquoso e cMoL reduzindo TNF- α , IL-1 β e NO, extrato aquoso diluído reduzindo TNF- α e IL-1 β e WSMoL reduzindo TNF- α e NO.
- O estudo revelou que a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato aquoso também se dá por meio da redução da migração leucocitária na inflamação aguda, níveis de TNF- α , IL-1 β e NO, bem como sobre a produção da enzima mieloperoxidase, sem alterar os níveis de IL-6.

Anexo A

PLOS ONE Manuscript Guidelines

1. [Format Requirements](#)
2. [Guidelines for Standard Sections](#)
 - [Title](#)
 - [Authors and Affiliations](#)
 - [Abstract](#)
 - [Introduction](#)
 - [Materials and Methods](#)
 - [Results, Discussion, and Conclusions](#)
 - [Acknowledgments](#)
 - [References](#)
 - [Tables](#)
 - [Figure Legends](#)
3. [Specific Reporting Guidelines](#)
 - [Human Subject Research](#)
 - [Clinical Trials](#)
 - [Animal Research](#)
 - [Observational and Field Studies](#)
 - [Cell Line Research](#)

1. Format Requirements

PLOS ONE does **not** consider presubmission inquiries. All submissions should be prepared with the following files:

- Cover letter
- Manuscript, including tables and figure legends
- Figures (guidelines for preparing figures can be found at the [Figure and Table Guidelines](#))
Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service." Submissions are **not** copyedited before publication.

Submissions that do not meet the [PLOS ONE Publication Criterion for language standards](#) may be rejected.

Cover Letter

You should supply an approximately one page cover letter that:

- Concisely summarizes why your paper is a valuable addition to the scientific literature

- Briefly relates your study to previously published work
 - Specifies the type of article you are submitting (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
 - Describes any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
 - Suggests appropriate *PLOS ONE* Academic Editors to handle your manuscript (view a [complete listing of our academic editor](#))
 - Lists any recommended or opposed reviewers
- Your cover letter should **not** include requests to reduce or waive publication fees. Should your manuscript be accepted, you will have the opportunity to include your requests at that time. See [PLOS ONE Editorial Policy](#) for more information regarding publication fees.

Manuscript Organization

PLOS ONE considers manuscripts of any length. There are no explicit restrictions for the number of words, figures, or the length of the supporting information, although we encourage a concise and accessible writing style. We will **not** consider monographs.

All manuscripts should include line numbers and page numbers.

Manuscripts should begin with the ordered sections:

- Title
 - Authors
 - Affiliations
 - Abstract
 - Introduction
- and end with the sections of:

- Acknowledgments
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be included in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file. Find more information about preparing figures [here](#).

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

There are no explicit requirements for section organization between these beginning and ending sections. Articles may be organized in different ways and with different section titles, according to the authors' preference. In most cases, internal sections include:

- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions (optional)

PLOS ONE has no specific requirements for the order of these sections, and in some cases it may be appropriate to combine sections. Guidelines for individual sections can be found [below](#).

Abbreviations should be kept to a minimum and defined upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Standardized nomenclature should be used as appropriate, including appropriate usage of species names and SI units.

2. Guidelines for Standard Sections

Title

Manuscripts must be submitted with both a full title and a short title, which will appear at the top of the PDF upon publication if accepted. Only the full title should be included in the manuscript file; the short title will be entered during the online submission process.

The full title must be 150 characters or fewer. It should be specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the subject field. Avoid abbreviations if possible. Where appropriate, authors should include the species or model system used (for biological papers) or type of study design (for clinical papers).

Examples:

- Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A *Caenorhabditis elegans* Model
- Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial

The short title must be 50 characters or fewer and should state the topic of the paper.

[Back to top](#)

Authors and Affiliations

All author names should be listed in the following order:

- First names (or initials, if used),
- Middle names (or initials, if used), and
- Last names (surname, family name)

Each author should list an associated department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all author names and affiliations should be listed at the end of the article.

This information cannot be changed after initial submission, so please ensure that it is correct.

To qualify for authorship, a researcher should contribute to **all** of the following:

1. Conception and design of the work, acquisition of data, or analysis and interpretation of data

2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content
3. Final approval of the version to be published

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author must have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments.

When a large group or center has conducted the work, the author list should include the individuals whose contributions meet the criteria defined above, as well as the group name.

One author should be designated as the corresponding author, and his or her email address or other contact information should be included on the manuscript cover page. This information will be published with the article if accepted.

See the [PLOS ONE Editorial Policy regarding authorship criteria](#) for more information.

[Back to top](#)

Abstract

The abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should **not** include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

[Back to top](#)

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

[Back to top](#)

Materials and Methods

This section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. These are published online only, but are linked to the article and are fully searchable. Further information about formatting Supporting Information files, can be found [here](#).

Methods sections of papers on research using **human or animal subjects and/or tissue or field sampling** must include required ethics statements. See the [Reporting Guidelines for human research](#), [clinical trials](#), [animal research](#), and [observational and field studies](#) for more information.

Methods sections of papers with **data that should be deposited in a publicly available database** should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.

Methods sections of papers using **cell lines** must state the origin of the cell lines used. See the [Reporting Guidelines for cell line research](#) for more information.

Methods sections of papers adding **new taxon names** to the literature must follow the Reporting Guidelines below for a new [zoological taxon](#), [botanical taxon](#), or [fungal taxon](#).

[Back to top](#)

Results, Discussion, and Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled "Results and Discussion") or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled "Discussion"). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn. Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the *PLOS ONE* [Publication Criteria](#) for more information.

[Back to top](#)

Acknowledgments

People who contributed to the work but do not fit the [PLOS ONE authorship criteria](#) should be listed in the acknowledgments, along with their contributions. You must ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Funding sources should **not** be included in the acknowledgments, or anywhere in the manuscript file. You will provide this information during the manuscript submission process.

[Back to top](#)

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Manuscripts that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only as “unpublished data.”

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets. Journal name abbreviations should be those found in the [NCBI databases](#). A number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., [Reference Manager](#), [EndNote](#)).

Proper formatting of the references is crucial; some examples are shown below.

- **Published papers.** Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequencing and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Genet Mol Res 10: 1576-1588.
Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.
- **Accepted, unpublished papers.** Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.
- **Electronic journal articles.** Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. Global Health 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.
- **Books.** Bates B (1992) Bargaining for life: A social history of tuberculosis. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.
- **Book chapters** Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.

[Back to top](#)

Tables

Tables should be included at the end of the manuscript. All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined [above](#). Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible. Larger tables can be published as [Supporting Information](#). Please ensure that table formatting conforms to our [Guidelines for table preparation](#).

[Back to top](#)

Figure Legends

Figures should **not** be included in the manuscript file, but figure legends should be. Guidelines for preparing figures can be found [here](#).

Figure legends should describe the key messages of a figure. Legends should have a short title of 15 words or less. The full legend should have a description of the figure and allow readers to understand the figure without referring to the text. The legend itself should be succinct, avoid lengthy descriptions of methods, and define all non-standard symbols and abbreviations.

Further information about figure legends can be found in the [Figure Guidelines](#).

[Back to top](#)

3. Specific Reporting Guidelines

Human Subject Research

Methods sections of papers on research using human subject or samples must include ethics statements that specify:

- The name of the approving institutional review board or equivalent committee(s). If approval was not obtained, the authors must provide a detailed statement explaining why it was not needed
 - Whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the manuscript:
 - Why written consent could not be obtained
 - That the Institutional Review Board (IRB) approved use of oral consent
 - How oral consent was documented
- For studies involving humans categorized by race/ethnicity, age, disease/disabilities, religion, sex/gender, sexual orientation, or other socially constructed groupings, authors should:
- Explicitly describe their methods of categorizing human populations
 - Define categories in as much detail as the study protocol allows
 - Justify their choices of definitions and categories, including for example whether any rules of human categorization were required by their funding agency
 - Explain whether (and if so, how) they controlled for confounding variables such as socioeconomic status, nutrition, environmental exposures, or similar factors in their analysis
- In addition, outmoded terms and potentially stigmatizing labels should be changed to more current, acceptable terminology. Examples: "Caucasian" should be changed to "white" or "of [Western] European descent" (as appropriate); "cancer victims" should be changed to "patients with cancer."

For papers that include identifying, or potentially identifying, information, authors must download the [Consent Form for Publication in a PLOS Journal](#) (PDF), which the individual, parent, or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. The signed consent form should not be submitted with the manuscript, but authors should securely file it in the individual's case notes and the methods section of the manuscript should explicitly state that consent authorization for publication is on file, using wording like:

The individual in this manuscript has given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publish these case details.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding human subject research, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

[Back to top](#)

Clinical Trials

Authors of manuscripts describing the results of clinical trials must adhere to the [CONSORT](#) reporting guidelines appropriate to their trial design, available on the [CONSORT Statement website](#). Before the paper can enter peer review, authors must:

1. Provide the registry name and number in the methods section of the manuscript
2. Provide a copy of the trial protocol as approved by the ethics committee and a completed [CONSORT checklist](#) as Supporting Information (which will be published alongside the paper, if accepted)

3. Include the [CONSORT flow diagram](#) as the manuscript's "Figure 1"

Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and we reserve the right to ask for a copy of the patient consent form.

The methods section must include the name of the registry, the registry number, and the URL of your trial in the registry database for each location in which the trial is registered.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding clinical trials, see the [Editorial Policies](#).

[Back to top](#)

Animal Research

Methods sections of manuscripts reporting results of animal research must include required ethics statements that specify:

- The full name of the relevant ethics committee that approved the work, and the associated permit number(s) (where ethical approval is not required, the manuscript should include a clear statement of this and the reason why)
- Relevant details for efforts taken to ameliorate animal suffering
For example:

This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Minnesota (Permit

Number: 27-2956). All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

The organism(s) studied should always be stated in the abstract. Where research may be confused as pertaining to clinical research, the animal model should also be stated in the title.

We encourage authors to use the [ARRIVE \(Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments\) guidelines](#) as a reference.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding animal research, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

[Back to top](#)

Observational and Field Studies

Methods sections for submissions reporting on any type of field study must include ethics statements that specify:

Permits and approvals obtained for the work, including the full name of the authority that approved the study; if none were required, authors should explain why

- Whether the land accessed is privately owned or protected
 - Whether any protected species were sampled
 - Full details of animal husbandry, experimentation, and care/welfare, where relevant
- For more information about *PLOS ONE* policies regarding observational and field studies, see the [Publication Criteria](#) and [Editorial Policies](#).

[Back to top](#)

Cell Line Research

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished *de novo* cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

For more information about *PLOS ONE* policies regarding observational and field studies, see the [Publication Criteria](#).

[Back to top](#)

Table Guidelines

Tables submitted for publication should be included at the very end of the article file (.doc, .rtf, .tex). Supporting Information tables should be submitted as separate files in any of the following formats (although authors should aim to ensure that the file type is most appropriate to the information displayed): Word (.doc), Excel (.xls), PDF, PPT, JPG, EPS, or TIFF.

Title and Footnotes

Each table needs a concise title of no more than one sentence, placed above the table with the table number (e.g., Table 1). The legend and footnotes should be placed below the table. Footnotes may be used to explain abbreviations.

Specifications

Tables that do not conform to the following requirements may give unintended results when published. Problems may include the movement of data (rows or columns), loss of spacing, or disorganization of headings. Note: Multi-part tables with varying numbers of columns or multiple footnote sections should be divided and renumbered as separate tables.

In the published version, tables will be formatted in PLOS style. This includes alternate row shading, content left-aligned in cells, title above the table and legend/footnotes below the table.

Tables must:

- Be cell-based (e.g., created in Word with Tables tool (preferred) or in Excel).
- Be editable (i.e., not a graphic object).
- Have heading/subheading levels in separate columns.
- Be no larger than one printed page (7 in x 9.5 in). Larger tables can be published as online supporting information. Note: some wide tables may be printed sideways in the PDF.

Tables must *not*:

- Use returns or tabs within a cell.
- Have color or shading.
- Use lines, rules, or borders.
- Contain spaces within cells to align text.
- Have *vertically* merged cells; horizontally merged cells are fine.
- Have inserted text boxes or pictures.
- Have tables within tables.
- Include empty columns, rows, or cells to create spacing.
- Include hyperlinked text.

If your submitted table contains any of these elements, they will be returned for adjustments.

Figure Dimensions

Figures for publication will be sized to fit 1, 1.5, or 2 columns of the final printable PDF of the article. Dimensions will also depend on the article type. Please follow the sizing recommendations below for your original submission to create high-quality, appropriately sized figures. See [Figure Types](#) below for descriptions and recommendations for line drawings, grayscale drawings, halftones, and combination figures. See below for sizing information.

Figure Alignment

Figures will be left-aligned on the page or column, so please design them accordingly.

Figure Width

Widths depend on article type layout and are listed in the tables below, but must be within the minimum of 3.27in/8.3cm wide and the maximum of 6.83in/17.35cm wide. Figures can have a maximum height of 9.19in/23.35 cm. If your figures have labels that are in 8 point type or if your figures are very detailed, we recommended that your figure be created so that it will span two columns. Images will be published in horizontal orientation, and cannot be rotated 90 degrees to have a vertical orientation. Please size figure widths to one of the column sizes listed below.