



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**

**Bianka Márcia do Nascimento Xavier**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO 2-METOXI-4-(7-METOXI-1,2,3,4-TETRAHIDROISOQUINOLIN-1-IL)FENOL (MHTP) EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA**

**João Pessoa-PB**

**2018**

**BIANKA MÁRCIA DO NASCIMENTO XAVIER**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO 2-METOXI-4-(7-METOXI-1,2,3,4-TETRAHIDROISOQUINOLIN-1-IL)FENOL (MHTP) EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, como parte do requisito para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS,**

**ORIENTADORA:**

**Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam**

**João Pessoa-PB**

**2018**

**BIANKA MÁRCIA DO NASCIMENTO XAVIER**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO 2-METOXI-4-(7-METOXI-1,2,3,4-TETRAHIDROISOQUINOLIN-1-IL)FENOL (MHTP) EM UM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

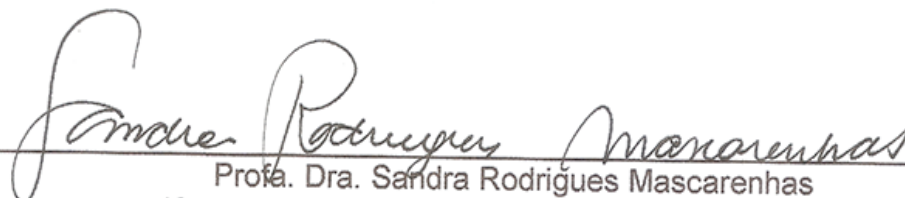
Dissertação de Mestrado aprovada em 16/02/2018

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (Orientadora)  
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)



---

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
(Centro Biotecnologia – UFPB – Avaliadora Interna)

---

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente  
(Centro Biotecnologia – UFPB – Avaliadora Externa)

*Dedico este trabalho aos meus pais e à Tássio Borges.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Márcia Regina Piuvezam, que me inspirou desde o primeiro dia de aula ainda na graduação em Biologia e que sempre me estimulou e me recebeu com os braços abertos. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pela confiança e por todo o apoio durante todo esse tempo.

Aos membros da banca: Professora. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas e Professora. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima por terem aceitado meu convite e pela contribuição para o enriquecimento deste trabalho.

Aos Professores da pós-graduação, pela contribuição acadêmica durante esse período do mestrado.

Ao professor Luís Cezar Rodrigues por ter cedido gentilmente o MHTP e ao André Luiz que me ajudou a sintetizar a substância.

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, principalmente Mônica e Lourdes, por toda ajuda sempre que possível.

À Caroline Manguiera que sempre se mostrou solícita.

À Universidade Federal da Paraíba e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela estrutura e apoio financeiro.

Aos camundongos, pois nada seria realizado sem eles.

À Isis Fernandes que me incentivou desde o momento em que decidi participar da seleção.

À minha turma do mestrado, pela convivência nesses 2 anos e pelas idas ao empório cookies. Agradeço em especial à Jéssica, Shellygton e Rodrigo por me emprestarem o sonicador nas madrugadas.

Aos integrantes do laboratório de imunofarmacologia, em especial a quem me ajudou diretamente nos experimentos.

Aos meus bordelaises que, mesmo com a distância, estiveram presente durante esse tempo e me apoiaram. Vocês sempre me inspiraram. Vous me manquez toujours.

Aos meus pais que são meus pilares na vida, sempre me deram tudo o que precisei, sempre me incentivaram e me apoiaram. Obrigada pela educação, por cada não e por cada sim. Tenho certeza que eu não teria conquistado tanta coisa sem seus ensinamentos e esforços.

À Tássio Borges, meu companheiro, confidente, amigo, marido, eterno namorado... Obrigada pela paciência de cada dia, por sempre me incentivar, por criticar quando precisei, por me mostrar que eu conseguiria, por passar noites em claro estudando química comigo e por estar ao meu lado em todos os momentos de medo, dúvidas, tristeza e felicidade. Essa conquista também é sua, pois nada teria sido possível sem você.

Obrigada a todos que acreditaram em mim e me deram forças para seguir em frente.

Serei eternamente grata!

*“Nobody said it was easy  
No one ever said it would be this hard”  
[Coldplay]*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

*[Marthin Luther King]*

## RESUMO

A lesão pulmonar aguda é uma síndrome de doença crítica que consiste em insuficiência respiratória aguda com infiltrado celular e é caracterizada por lesão da barreira capilar alveolar, acumulação de neutrófilos e indução de citocinas pró-inflamatórias, seguido de uma fibrose pulmonar. Devido à complexidade dos eventos fisiológicos e imunológicos que envolvem a lesão pulmonar aguda, ainda não há uma farmacoterapia totalmente estabelecida. O MHTP (2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il)fenol) é um alcaloide inédito sintetizado que possui semelhança química com as criptostilinas e com os alcaloides CKD712 ([*(S)*-1-( $\alpha$ -naftilmetil)-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina]) e THI52(1-naftiletil -6,7- dihidroxi -1,2,3,4- tetrahydroisoquinolina). O objetivo desse estudo foi investigar o potencial farmacológico do MHTP no tratamento da lesão pulmonar aguda experimental em dois momentos: 72 horas (fase aguda) e dez dias (fase crônica). Para tal, foi usado o modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos BALB/c machos. Foram realizados três tratamentos, por instilação nasal, com MHTP, sendo o primeiro uma hora após o desafio com LPS, o segundo com 24 horas e o terceiro com 48 horas. Para escolha da dose da substância, foi realizado experimento piloto com as doses de 1,25mg/kg; 2,5mg/kg; 5mg/kg; 10mg/kg e 20mg/kg. No tempo de 72 h, o tratamento com MHTP (2,5mg/kg; 5mg/kg; 10mg/kg e 20mg/kg) diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a migração de células totais, neutrófilos e linfócitos. A partir desse experimento, foi escolhida a dose de 2,5mg/kg por ter apresentado melhores resultados. Portanto, essa dose foi utilizada nos demais experimentos. Tal dose também diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e os parâmetros histológicos tais como: hemorragia, edema, infiltração celular e deposição de fibrose. No período de dez dias, o tratamento com MHTP, diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a migração de células totais, neutrófilos, macrófagos e linfócitos com aumento de peso e retorno normal às atividades nos animais. A taxa de sobrevivência dos animais tratados com MHTP foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior quando comparada com a dos animais LPS (doentes). Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho indicam que o MHTP exerce um efeito protetor na lesão pulmonar aguda, tanto na fase aguda (72h) como na fase crônica (dez dias) protegendo as células epiteliais alveolares e regulando a inflamação pulmonar, e sugerindo que o MHTP é um agente terapêutico promissor para o manejo dessa doença.

Palavras-chave: Lesão pulmonar aguda, MHTP, LPS, agudo, crônico.

## ABSTRACT

Acute lung injury is a critical illness syndrome consisting of acute respiratory failure with cellular infiltrate and is characterized by alveolar capillary barrier injury, neutrophil accumulation and induction of proinflammatory cytokines, followed by pulmonary fibrosis. Due to the complexity of the physiological and immunological events involving acute lung injury, there is still no fully established pharmacotherapy. MHTP (2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)phenol) is an unprecedented synthesized alkaloid that has chemical similarity to the cryptostolins and alkaloids CKD712 ((S)-1-(*a*-naphthylmethyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) and THI52 (1-naphthylethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline). The purpose of this study was to investigate the pharmacological potential of MHTP in the treatment of experimental acute lung injury in two moments: 72 hours (acute phase) and 10 days (chronic phase). In order to perform this, the model of acute lung injury induced by LPS in male BALB / c mice was used. Three treatments were performed by nasal instillation with MHTP, the first one occurred one hour after challenge with LPS, the second with 24 hours and the third with 48 hours. To select the dose of the substance, a pilot experiment was carried out at doses of 1.25mg / kg; 2.5mg / kg; 5mg / kg; 10mg / kg and 20mg / kg. The treatment with MHTP (2.5mg / kg, 5mg / kg, 10mg / kg and 20mg / kg) significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the migration of total cells, neutrophils and lymphocytes. Based on this experiment, the dose of 2.5mg / kg was chosen because it presented better results. Therefore, this dose was used in the other experiments. This dose also significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the production of the cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 and the histological parameters such as: hemorrhage, edema, cellular infiltration and fibrosis deposition. In the 10-day period, treatment with MHTP significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the migration of total cells, neutrophils, macrophages and lymphocytes with increased weight and normal return to activities in the animals. The survival rate of the MHTP treated animals was significantly ( $p < 0.05$ ) higher when compared to that of the LPS (sick) animals. Therefore, the results obtained in this study indicate that MHTP exerts a protective effect on acute lung injury, both in the acute phase (72h) and in the chronic phase (10 days), protecting the alveolar epithelial cells and regulating pulmonary inflammation, suggesting that MHTP is a promising therapeutic agent for the management of this disease.

Key words: Acute lung injury, MHTP, LPS, acute, chronic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Causas, sintomas e consequências da LPA.....	18
Figura 2- Esquema mostrando a diferença entre um alvéolo normal (esquerdo) e um alvéolo apresentando LPA (direito). .....	22
Figura 3- Mecanismos importantes na resolução da LPA.....	23
Figura 4- Estrutura química do 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il)fenol (MHTP) .....	33
Figura 5- Estrutura química das Criptostilinas I, II, III.....	33
Figura 6- Estrutura química do alcaloide CKD712.....	34
Figura 7- Estrutura química do alcaloide THI 52.....	34
Figura 8- Esquema da metodologia de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. ....	37
Figura 9 - Esquema de tratamento com MHTP no tempo de 72 horas. ....	38
Figura 10- Esquema de tratamento com MHTP no tempo de 10 dias.....	38
Figura 11- Representação da contagem de células totais e diferenciais.....	41
Figura 12- Representação do ensaio imunoenzimatico ELISA tipo sanduiche.....	42
Figura 13- Efeito do MHTP no tecido pulmonar na lesão pulmonar aguda no tempo de 72 horas. Cortes histológicos dos pulmões corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). ....	49
Figura 14- Cortes histológicos dos pulmões corados com Tricrômio de Gomori (TG) na lesão pulmonar aguda no tempo de 72 horas. ....	51
Figura 15- Camundongos no 9º dia após o desafio com LPS. ....	55
Figura 16- Efeito do MHTP no tecido pulmonar na lesão pulmonar aguda no tempo de 10 dias.....	61
Figura 17- Efeito do MHTP no tecido pulmonar na lesão pulmonar aguda no tempo de 10 dias. Cortes histológicos dos pulmões corados com Tricrômio de Gomori (TG). ....	63

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Esquema de tratamento na LPA no tempo de 72 horas .....	39
Tabela 2 Esquema de tratamento na LPA após escolha da dose de MHTP .....	39

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito do tratamento com MHTP na migração de células totais e diferenciais (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) para o espaço broncoalveolar no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 72 horas.....	45
Gráfico 2: Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão na lesão pulmonar aguda em 72 horas. ....	48
Gráfico 3: Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS. ....	50
Gráfico 4: Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS. ....	52
Gráfico 5: Efeito do MHTP na produção de citocinas inflamatórias na lesão pulmonar aguda no tempo de 72 horas.....	53
Gráfico 6: Pesos (em gramas) dos animais coletados todos os dias por 10 dias consecutivos.	54
Gráfico 7: Gráfico taxa de sobrevivência dos grupos em 10 dias. ....	55
Gráfico 8: Efeito do tratamento com MHTP na migração de células totais e diferenciais (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) para o espaço broncoalveolar no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 10 dias. ....	56
Gráfico 9: Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão na lesão pulmonar aguda em 10 dias.....	59
Gráfico 10: Efeito do MHTP na produção de citocinas inflamatórias na lesão pulmonar aguda no tempo de 10 dias. ....	60
Gráfico 11: Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS. ....	62
Gráfico 12: Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS. ....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALF- Fluido do lavado broncoalveolar  
CD - Cluster of differentiation  
CKD712 - [(S)-1-( $\alpha$ -naftilmetil)-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4- tetrahidroisoquinolina]  
E.P.M – Erro padrão da média  
ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay  
HBSS - Hank's Balanced Salt Solution  
HCl - Ácido clorídrico  
HE- Hematoxilina-eosina  
IL- Interleucina  
LPA- Lesão pulmonar aguda  
LPS- Lipopolissacarídeo bacteriano  
MHTP- 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il)fenol  
MPO- Mieloperoxidase  
NaCl- Cloreto de sódio  
NaOH- Hidróxido de sódio  
NF-kB- Fator nuclear kappa B  
NO- Óxido Nítrico  
PAF- Fator ativador de plaqueta  
PAMPs- Padrões moleculares associados a patógenos  
PGE2- Prostaglandina E2  
PI3K- Fosfatidilinositol 3-quinase  
PMN- polimorfonuclear  
ROS- Espécie reativa de oxigênio  
SDRA- Síndrome do desconforto respiratório agudo  
TG - Tricrômio de Gomori  
TGF- Fator de transformação do crescimento  
THI- Tetrahidroisoquinolinicos  
THI52 – 1- naftiletíl -6,7- dihidroxi -1,2,3,4- tetrahidroisoquinolina  
TLR- Receptor Toll-like  
TNF- Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Diagnóstico e fatores de risco.....	17
1.2 Indução da Lesão Pulmonar Aguda por Lipopolissacarídeo.....	18
1.3 Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda.....	20
1.4 Resposta Imune na Lesão Pulmonar Aguda.....	24
1.5 Modelos experimentais na LPA.....	26
1.6 Farmacoterapia para a LPA.....	28
1.7 Alcaloides.....	30
1.8 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il)fenol (MHTP).....	32
2. Objetivos.....	35
2.1 Geral.....	35
2.2 Específicos.....	35
3. Metodologia.....	35
3.1 Animais.....	35
3.2 Anestesia e Eutanásia.....	36
3.3 Protocolo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).....	36
3.4 Preparo do MHTP.....	37
3.5 Protocolo de tratamento com MHTP na LPA.....	37
3.6 Lavado broncoalveolar (BALF).....	39
3.7 Contagem de células total e diferencial.....	40
3.8 Quantificação de Proteínas Totais.....	41
3.9 Determinação da produção de Citocinas.....	41
3.10 Análise histológica.....	43
3.11 Taxa de sobrevivência.....	43
3.12 Análise Estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Efeito do MHTP na migração de células totais e diferenciais (macrófago, neutrófilos e linfócitos) no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 72 horas.....	44
4.2 Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão de animais do modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 72 horas.....	47
4.3 Estudos histológicos pela coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) dos pulmões dos animais em 72 horas.....	48
4.4 Estudos histológicos pela coloração com Tricrômio de Gomori (TG) dos pulmões dos animais em 72 horas.....	50

4.5 Efeito do MHTP na produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ no BALF de animais submetidos à lesão pulmonar aguda em 72 horas.....	52
4.6 Efeito do MHTP no peso dos animais submetidos a lesão pulmonar agudo no tempo de 10 dias.....	54
4.7 Efeito do MHTP na taxa de sobrevivência dos animais submetidos à lesão pulmonar aguda em 10 dias. ....	55
4.8 Efeito do MHTP na migração de células totais e diferenciais no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 10 dias.....	56
4.10 Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão de animais do modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 10 dias .....	58
4.11 Efeito do MHTP na produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ no BALF de animais submetidos à lesão pulmonar aguda em 10 dias.....	59
4.12 Estudos histológicos pela coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) dos pulmões dos animais em 10 dias .....	61
4.13 Estudos histológicos pela coloração com Tricrômio de Gomori (TG) dos pulmões dos animais em de 10 dias.....	63
5. DISCUSSÃO .....	64
6. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS .....	73
APÊNDICES .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), são doenças inflamatórias do pulmão e são caracterizadas clinicamente por uma inflamação aguda que tem por consequência as interrupções do endotélio pulmonar e das barreiras epiteliais promovendo a perda da integridade da membrana alvéolo-capilar e a redução da capacidade de complacência pulmonar (MATTHAY e ZIMMERMAN, 2005). Tal redução da complacência pulmonar tem sido também correlacionada com o extenso acúmulo de células polimorfonucleares e de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos (WALKEY et al., 2012; WARE e MATHAY, 2000) culminando com o dano alveolar e evoluindo para a SDRA podendo inclusive levar o paciente a óbito (WALKEY et al., 2012).

A mortalidade dos pacientes com LPA é entre 22% e 58% dependendo da gravidade, com a causa principal sendo a falência de múltiplos órgãos e afeta cerca de um em cada dez pacientes em Unidade de terapia intensiva (MACKAY e AL-HADDAD, 2010).

Desde que foi descrita pela primeira vez por Ashbaugh et al. (1967), a LPA tem sido estudada e sua fisiopatologia vem sendo determinada. Entretanto, devido à complexidade dos eventos fisiológicos e imunológicos que envolvem a lesão pulmonar aguda, ainda não há uma farmacoterapia totalmente estabelecida (D'ALESSIO et al., 2009; DUSHIANTHAN et al., 2011; WHEELER e BERNARD, 2007; MATTHAY et al., 2012). Diversos tratamentos e combinações terapêuticas têm sido utilizados (ventilação mecânica, uso de surfactantes, corticosteroide) no sentido de modificar ou alterar as propriedades mecânicas da inflamação pulmonar que ocorre durante a LPA. Entretanto, nenhum dos tratamentos disponíveis tem mostrado convincente melhoria dos danos pulmonares em estudos controlados (WHEELER e BERNARD, 2007). Assim, o tratamento eficaz para LPA requer resolução do edema alveolar e restauração da integridade da barreira endotelial e epitelial (JIA et al., 2014).

Dessa forma, a busca por substâncias com propriedades farmacológicas vem crescendo nesse cenário. A química de produtos naturais e a química orgânica sintética têm sido a força motriz para a pesquisa e descoberta de medicamentos (OJIMA, 2008). Historicamente, a maioria dos novos medicamentos tem sido gerada a partir de compostos derivados de produtos naturais principalmente dos metabólitos secundários (LAHLOU, 2013). Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos e,

portanto, têm apresentado atividades biológicas potentes e vêm fornecendo compostos líderes na descoberta de medicamentos para o tratamento de câncer, infecções microbianas, inflamações, hipercolesterolemia e rejeição de tecidos em transplantes de órgãos. Em adição, esses produtos naturais têm proporcionado uma série de ferramentas extremamente úteis para a pesquisa (OJIMA, 2008).

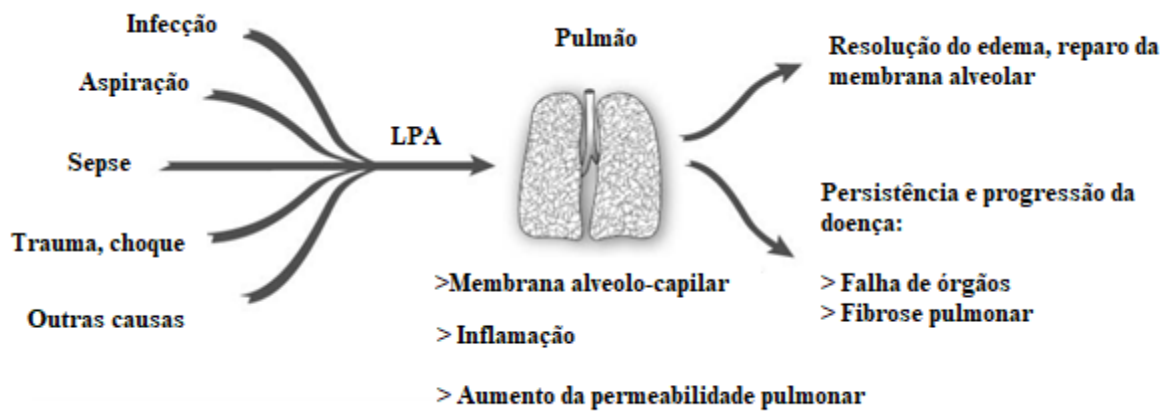
### **Diagnóstico e fatores de risco**

O diagnóstico da LPA é realizado através da análise das características histológicas, permeabilidade vascular, inflamação e disfunção fisiológica. Em humanos, a LPA se apresenta como uma condição inflamatória do pulmão na qual se observa os principais eventos da inflamação aguda com taxas de mortalidade substanciais, em torno de 30-50% e que, apesar das sofisticadas terapias intensivas baseadas em evitar as complicações e tratar a causa subjacente, a LPA não tem tratamento específico sendo, portanto, considerada um grande problema de saúde pública (D'ALESSIO et al., 2009; DUSHIANTHAN et al., 2011).

Estudos realizados nos Estados Unidos demonstram que essa doença afeta cerca de 190.000 pacientes anualmente com um número estimado de 75 mil mortes/ano (MATTHAY, WARE e ZIMMERMAN, 2012; WALKEY et al., 2012). Os fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento de LPA são sepse, trauma, pneumonia, aspiração de conteúdo gástrico, pancreatite e transfusão sanguínea (MATTHAY, WARE e ZIMMERMAN; 2012).

A incidência, o índice de mortalidade e a patogênese da LPA variam de acordo com o fator de risco subjacente. Outras indicações que impactam a incidência, a patogênese e o índice dessa doença incluem o consumo de álcool, diabetes, lesão renal aguda, obesidade, idade, gênero e genética. Apesar da manifestação primária ser insuficiência respiratória hipoxêmica, a síndrome não se limita, necessariamente, aos pulmões, pois muitos pacientes desenvolvem síndrome de disfunção múltipla de órgãos, contribuindo para o aumento da mortalidade (KAMINSKY, 2014). **A Erro! Fonte de referência não encontrada.** resume as informações mostradas anteriormente.

Figura 1 - Causas, sintomas e consequências da LPA



A figura mostra as diversas causas que podem promover o desenvolvimento da LPA que, em uma fase aguda, acomete a membrana alvéolo-capilar, promove um processo inflamatório e proporcionar o aumento da permeabilidade pulmonar. Essa fase pode tanto evoluir para uma resolução do edema, reparo da membrana alveolar, como também pode ocorrer a persistência e progressão da doença afetando vários órgãos e originando uma fibrose pulmonar. Fonte: (JOHNSON, MICHAEL e MATTHAY, 2010).

## 1.2 Indução da Lesão Pulmonar Aguda por Lipopolissacarídeo

Na busca de conhecimentos fisiopatológicos desenvolvidos na LPA que possam ser alvos de terapias desenvolveram-se vários modelos experimentais de LPA e entre eles o modelo experimental de LPS induzido por lipopolissacarídeo (LPS). O sistema imune inato possui uma família de receptores denominados receptores similares à Toll (TLR, *Toll-like receptors*) que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*) que representam importantes moléculas para a identificação de bactérias, vírus, fungos e protozoários (MEDZHITOV et al., 1997; ALBIGER et al., 2007).

Os TLR são estruturalmente caracterizados pela presença de um domínio rico em leucina em sua porção extracelular, compondo o sítio de ligação ao PAMP. Existem vários tipos de TLR e são classificados do tipo 1 ao 10 (TLR 1-10). Os TLR são expressos em várias células do sistema imune inato, tais como, monócitos, macrófagos, células dendríticas em

diferentes estágios de maturação e subtipos, mastócitos e polimorfonucleares (PMN). E, além dessas, as células epiteliais das mucosas também expressam os TLR, que podem estar presentes na membrana das células e/ou nos compartimentos citosólicos (TAKEDA et al. 2003).

O lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram negativas é uma molécula capaz de ativar os TLR principalmente o do tipo 4 (TLR-4), complexado com o receptor denominado CD14. O receptor CD14 se encontra ligado à proteína de ligação MD-2 e tal interação leva à ativação de vias bioquímicas que promovem a translocação de fatores de transcrição para o núcleo, com a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células ativadas (UNDERHILL e OZINSKI, 2002).

Após a interação entre o LPS e o receptor TLR4, ocorre a ativação da enzima PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), que catalisa a fosforilação de lipídios inositol na membrana celular, gerando fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato e 3,4-bifosfato, que modulam as funções de várias enzimas. A ativação dessa via enzimática pode regular negativamente as respostas inflamatórias disparadas por TLR (GUHA e MACKMAN 2002; FUKA e KOYASU, 2003). Esse processo de ativação culminará com a ativação de vários fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (ZHANG e GHOSH, 2001; ALBIGER et al., 2007).

Os genes que codificam muitos mediadores pró-inflamatórios têm sequências de reconhecimento NF- $\kappa$ B em seus promotores e incluem genes responsáveis por indução da produção da sintase de óxido nítrico (iNOS), da ciclooxigenase-2, da interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), responsáveis por muitos dos efeitos deletérios observados no LPS. Em adição, a ligação do LPS ao TLR-4 presente em monócitos e/ou macrófagos, promove a liberação de citocinas inflamatórias e óxido nítrico (NO). Além disso, o LPS ativa ambas as vias dependentes e independentes de MyD88, cada qual levando a ativação de MAPKs e NF- $\kappa$ B (TSOYI et al., 2008).

Sendo assim, o LPS é ativa vias metabólicas intracelulares nas respostas imunes inatas, levando a lesões pulmonares difusas sem mortalidade proibitiva, facilitando grandemente uma avaliação focalizada sobre a resolução da LPA (D'ALESSIO et al., 2009; MEI et al., 2007). Em suma, o LPS se liga ao receptor de *Toll-like* (TLR) -4 e promove a superprodução de várias citocinas pró-inflamatórias pelas células e induz síndromes inflamatórias, como sepse e lesão de múltiplos órgãos (KIM et al., 2017).

A LPA induzida por LPS foi considerada como um modelo experimental, que pode recapitular muitas das características de doença em humanos, embora não possa duplicar

exatamente todas as características da LPA/SDRA em humano. Um dos motivos é que a LPA/SDRA em humano é raramente causado por um único evento e geralmente está relacionada a interações complicadas entre risco primário e fatores adicionais (CHEN et al., 2010).

### **1.3 Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda**

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória. A inflamação é um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, apresentando como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. A finalidade do processo inflamatório é remover o estímulo lesivo e iniciar a recuperação tecidual local (TRACEY et al., 2008).

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular que tem início após o dano, na qual o aumento da perfusão tecidual e da permeabilidade é mediada por aminas vasoativas, histamina e serotonina, que são liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a lesão. Inicialmente, é observada a saída de eletrólitos e pequenas moléculas, constituindo o transudato posteriormente sai também moléculas maiores como albumina e fibrinogênio, constituindo um exsudato. A saída de proteínas para o espaço extravascular é acompanhada de saída de água, levando à marginalização dos leucócitos, que passam a circular junto ao endotélio. Concomitantemente, o endotélio local torna-se ativado e os endoteliócitos passam a expressar moléculas de superfície que colaboram para a maior aderência dos leucócitos e eventual migração destes para os tecidos. Macrófagos residentes no tecido lesado liberam citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e quimiocinas (TRACEY et al., 2008).

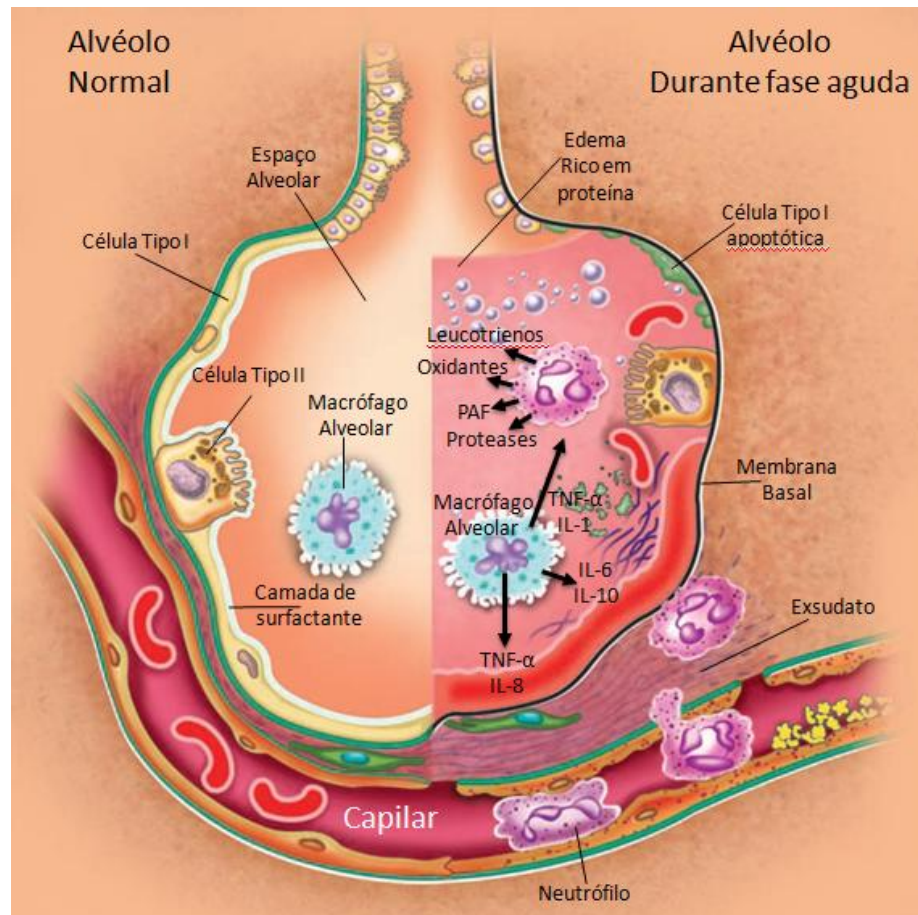
No tecido, as células buscam remover o patógeno por meio de sua capacidade fagocitária, permitindo o reparo da lesão. Na inflamação aguda as principais células são os neutrófilos e os macrófagos. A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo inflamatório, sendo observada concomitância de destruição e reparo tecidual. Na inflamação crônica o tecido apresenta um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (TRACEY et al., 2008).

A LPA é caracterizada por inflamação difusa da membrana alvéolo-capilar, em resposta a vários fatores de risco pulmonares ou extrapulmonares. Esses fatores de risco causam lesão pulmonar pelos mecanismos diretos (exemplo: aspiração de conteúdo gástrico,

pneumonia, lesão inalatória, contusão pulmonar) ou indiretos (exemplo: sepse, traumatismo, pancreatite, politransusão). Ocorre lesão à membrana alvéolo-capilar, independente da causa desencadeante da lesão pulmonar, com extravasamento de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar. O influxo de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar que ocorre devido a lesão epitelial, leva a inativação de surfactante, promovendo redução da quantidade e à alteração da funcionalidade do surfactante, com consequente aumento da tensão superficial alveolar, ocorrência de atelectasias e redução da complacência pulmonar. Na membrana basal dos alvéolos ocorre a formação de membrana hialina, que é rica em proteína e fibrina (DARHLEM e VAN AALDEREN, 2007; PAREKH et al., 2011).

A lesão ao endotélio capilar está associada com numerosos eventos inflamatórios, como recrutamento e ativação de neutrófilos, formação de radicais de oxigênio, ativação do sistema de coagulação e recrutamento de células mesenquimais, com a produção de pró-colágeno (O'KANE et al., 2009). Macrófagos alveolares secretam interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10, além de TNF- $\alpha$  que estimulam e ativam neutrófilos, que por sua vez liberam moléculas pro-inflamatórias (oxidantes, proteases, fator ativador de plaqueta (PAF), leucotrienos). No espaço alveolar, o balanço entre mediadores pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) e antiinflamatórios (IL-10, antagonistas do receptor de IL-1 e do receptor do TNF solúvel) favorece a manutenção da inflamação (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). A lesão pulmonar inicial é seguida por reparação, remodelamento e alveolite fibrosante (WARE, 2006).

Figura 2- Esquema mostrando a diferença entre um alvéolo normal (esquerdo) e um alvéolo apresentando LPA (direito).

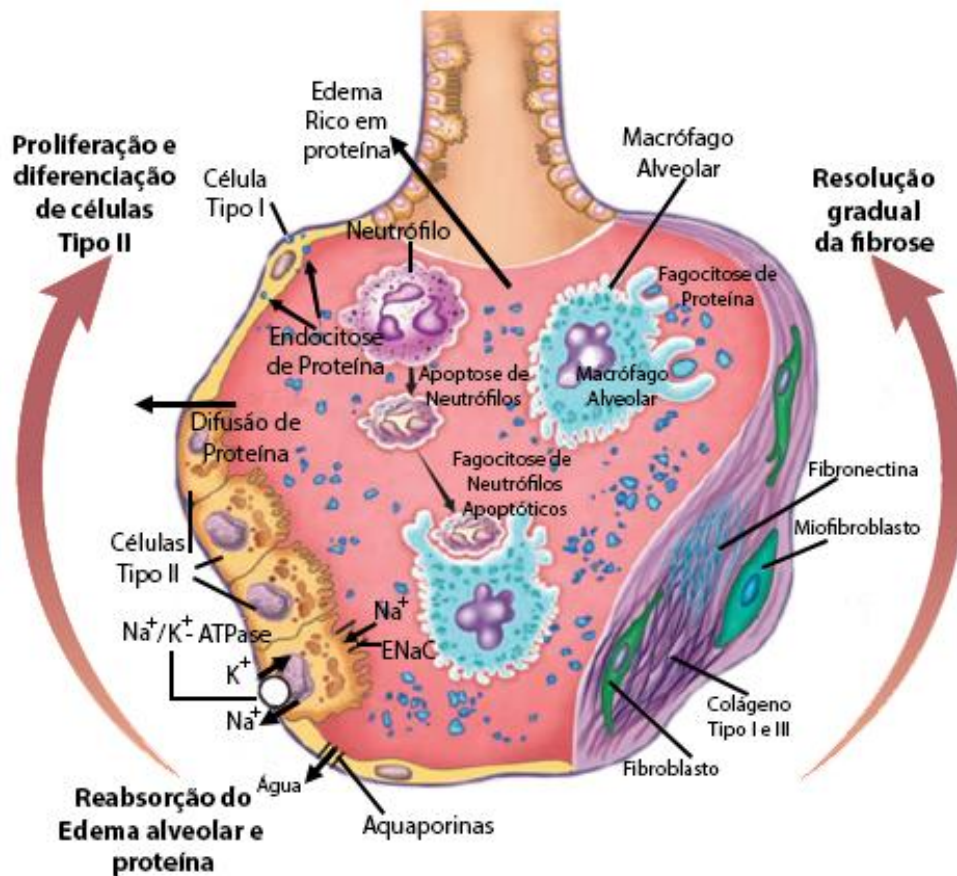


A figura mostra a diferença entre um alvéolo normal e um alvéolo que apresenta a LPA na fase aguda. No alvéolo normal, é possível observar a presença de um espaço alveolar, células do tipo I, células do tipo II (responsáveis pela formação da camada de surfactante que evita o colapso do pulmão) e macrófagos alveolares residentes. No alvéolo que apresenta LPA, é possível observar que vai ocorrer um aumento da permeabilidade do capilar, promovendo assim a saída de líquido e proteínas que formarão o exsudato. Além disso, também é importante a migração de neutrófilos que ocorre através do aumento de moléculas de adesão. Os macrófagos alveolares produzem mediadores pró-inflamatórios que ativarão os neutrófilos e esses produzirão mediadores, por exemplo : leucotrienos, PAF, oxidantes e proteases que exacerbam ainda mais a resposta inflamatória. Também é possível observar que, devido a destruição da membrana alveolar, o espaço alveolar é preenchido pelo exsudato formando o edema pulmonar. Fonte: (CHAO et al., 2017; GONZALES et al., 2015).

Pode ocorrer formação de trombos nos pequenos vasos pulmonares, que decorrem da ativação de fatores pró-coagulantes e da inibição da fibrinólise. A lesão pulmonar inicial é seguida por reparação, remodelamento e alveolite fibrosante (AMATO et al., 2007).

O curso subsequente da doença é variável e, em alguns pacientes, há reabsorção do fluido do edema alveolar e reparação da região lesionada do epitélio alveolar, seguida da recuperação clínica de insuficiência respiratória. Em outros pacientes, o edema alveolar persiste, seguido de organização de membranas hialinas e aparência gradual de fibrose intra-alveolar e cicatrização (Figura 3) (PAREKH et al., 2011).

Figura 3- Mecanismos importantes na resolução da LPA



A figura mostra o mecanismo para resolução da LPA. É possível observar que ocorrer uma reabsorção do edema pulmonar e que as células do tipo II vão sofrer um processo de proliferação e diferenciação. Ocorrerá apoptose dos neutrófilos que serão fagocitados por macrófagos alveolares através do processo de eferocitose. Fonte: (PAREKH et al., 2011).

#### 1.4 Resposta Imune na Lesão Pulmonar Aguda

A etiologia da LPA é dividida em causas diretas, isto é, quando a injúria acomete o pulmão, e em causas indiretas quando o pulmão é secundariamente afetado. Dentre as causas diretas podemos citar a broncopneumonia, aspiração do conteúdo gástrico, inalação de fumaça, contusão pulmonar, quase afogamento e embolia gordurosa. Nas causas indiretas temos sepse grave, bacteremia, múltiplas fraturas ósseas, pancreatite, trauma não pulmonar, overdose de drogas e transfusão de sangue (RANDHAWA e BELLINGAN, 2007; MACCALLUM e EVANS, 2004; WALKEY et al., 2012).

É possível distinguir três estágios na LPA que se sobrepõem temporariamente e espacialmente, sendo eles: exsudativa, proliferativa e fibrótica. O estágio exsudativo, é caracterizado pelo dano difuso do alvéolo devido ao edema intersticial e alveolar, assim como pela formação de membranas hialinas. Devido à perda de integridade celular, os alvéolos são preenchidos com fluido proteico o que resulta em comprometimento da troca gasosa. Diluição e disfunção do surfactante pulmonar levam ao colapso dos alvéolos e à diminuição da complacência pulmonar. Dentro de vários dias, o fluido diminui gradualmente e é possível observar o estágio proliferativo, caracterizado pela proliferação de células alveolares tipo II e fibroblastos. Na ausência de recuperação, alguns pacientes podem progredir para um estágio fibrótico caracterizado por fibrose difusa e outras alterações na estrutura pulmonar (CROSS e MATTHAY, 2011; WALKEY et al., 2012).

Histologicamente, o estágio proliferativo é caracterizado pela perda da integridade da barreira alvéolo-capilar devido à proliferação e alterações fenotípicas nas células alveolares e fibroblastos (BASTARACHE e BLACKWELL, 2009). Os mecanismos de lesão do epitélio alveolar incluem apoptose e necrose, observado na análise histológica pela extensa perda de epitélio e exposição da membrana basal dos pulmões de pacientes com LPA. O dano ao epitélio também prejudica a produção de surfactante que, em combinação com a formação de edema pulmonar, diminui significativamente a troca de gases e leva a hipoxemia persistente (BASTARACHE e BLACKWELL, 2009). O epitélio pode crescer abaixo da membrana hialina ou através da membrana, contribuindo para o desenvolvimento de fibrose intersticial. Nos pacientes em que o edema e dano alveolar não forem resolvidos pela regeneração, uma fase reparadora segue, caracterizada por remodelação, organização e trombose vascular local (CHOPRA et al., 2009; BHARGAVA e WENDT, 2012; MACKAY e AL-HADDAD, 2010).

Juntamente com a lesão da barreira alvéolo-capilar, existe influxo de leucócitos para os pulmões, principalmente neutrófilos, macrófagos e linfócitos que liberam moléculas e citocinas pró e anti-inflamatórias (BASTARACHE e BLACKWELL, 2009). A produção, pelos macrófagos residentes, de quimiocinas e sua presença em outros locais no processo inflamatório é importante para o direcionamento na migração de neutrófilos para os pulmões (RAMALLO et al., 2002). Em resposta a esse gradiente químico, os neutrófilos atravessam o endotélio e liberam ROS (reativos intermediários do oxigênio) e numerosas enzimas proteolíticas no local da inflamação (CHOPRA et al., 2009), como por exemplo a mieloperoxidase (MPO), uma enzima com atividade oxidativa, com atividade microbicida (KOTHARI et al., 2011).

Os neutrófilos (polimorfonucleares - PMN) desempenham um papel essencial na LPA, sua migração e ativação é uma marca na progressão da doença. Apesar de sua ativação ser vital para a defesa do hospedeiro, o excesso leva ao dano tecidual pela liberação de moléculas citotóxicas e agentes ativadores de células do sistema imunológico (GROMMES e SOEHNLEIN, 2011). Durante a LPA, a função de neutrófilos se torna desregulada, levando ao dano dos pulmões, progredindo para lesão tecidual associada (GAO et al., 2012).

Alguns mediadores inflamatórios que podem contribuir para a lesão pulmonar vascular incluem produtos de ativação do sistema complemento, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , leucotrieno e PAF. Mediadores secundários podem incluir metaloproteinasas de neutrófilos derivados da matriz, elastase e radicais O<sub>2</sub>. A IL-8, potente estimuladora de neutrófilos, também desempenha um papel central na LPA (GROENEVELD, 2003). Além desses mediadores, estudos relatam que a elevação e persistência da circulação de IL-6 está associada com o aumento da mortalidade em pacientes criticamente doentes com LPA e SDRA (MARSHALL et al., 2002).

A quantidade de quimiocinas produzidas localmente pelos macrófagos e de outros locais inflamatórios é importante para a direção da migração de neutrófilos para os pulmões (RAMALLO et al., 2002). Em resposta a esse gradiente químico, os neutrófilos atravessam o endotélio e liberam ROS e numerosas enzimas proteolíticas no local da inflamação (CHOPRA et al., 2009).

A LPA é uma síndrome inflamatória complexa que não pode ser totalmente estudada em cultura celular (*in vitro*) (REISS et al., 2011), dessa forma, modelos animais, ainda que limitados em sua capacidade de modelar a LPA, são indispensáveis para entender seus mecanismos fisiopatológicos e desenvolver novas terapias (WARE, 2008; JOHNSON e MATTHAY, 2010).

Os modelos experimentais de LPA podem ser iniciados por um conjunto diversificado de fatores precipitantes. Vários modelos animais para LPA têm sido desenvolvidos tais como pela indução com lipopolissacarídeo (LPS), hiperóxia, embolia e ácido oléico (LEIKAUF et al., 2002). Segundo Matute-Bello et al.(2012), a utilização de LPS na indução da LPA é o segundo modelo com maior número de citações no banco de dados do PubMed, menor apenas que o modelo de ventilação mecânica.

A lesão pulmonar induzida por LPS, em murinos, aumenta o número de neutrófilos e os níveis de citocinas no pulmão durante o primeiro e o segundo dias após a instilação de LPS juntamente com o aumento da permeabilidade vascular, seguido por um aumento nos níveis de albumina no 4º dia e acúmulo de linfócitos nos dias posteriores (NAKAJIMA et al., 2010; (MORRIS e LI, 2012). Mediadores como o TNF- $\alpha$  tem um pico máximo de produção dentro de poucas horas após a aplicação da endotoxina e assim precede a migração neutrófilos (FAFFE et al., 2000; REISS et al., 2011). A administração do LPS também ativa o processo inflamatório pela a produção de óxido nítrico (NO) (GAO et al., 2012). Estudos mostram que o NO desempenha um papel fundamental como neurotransmissor, vasodilatador e regulador imune em uma variedade de tecidos em concentrações fisiológicas. Por outro lado, o NO privado da indução pelo iNOS pode desempenhar um papel prejudicial, induzindo diretamente a fisiopatologia da LPA como dano tecidual, formação de peroxinitritos e outros mediadores inflamatórios (NIU et al., 2014).

### **1.5 Modelos experimentais na LPA**

Os modelos de animais fornecem uma ponte entre os pacientes e o laboratório, onde as hipóteses geradas em estudos humanos podem ser testadas diretamente em modelos animais. Sem modelos animais, não haveria nenhuma maneira de testar hipóteses clínicas geradas em pacientes e não haveria maneira de validar a importância dos achados laboratoriais fundamentais sem passar diretamente à experimentação humana (MATUTE-BELLO et al., 2008).

Os modelos de lesão pulmonar que dependem de uma causa direta causam lesões reproduzíveis que podem ser facilmente analisadas pela dose/duração da exposição (ALTEMEIER et al., 2004; CHUN et al., 2010). A instilação de padrões moleculares associados a patógenos naturais ou sintéticos (PAMPs), que se ligam à receptores específicos (por exemplo, receptores do tipo Toll ou TLRs) de reconhecimento de padrões codificados em

linhagens celulares germinais causam inflamação e lesão pulmonar facilmente reproduzíveis. O PAMP mais comum utilizado para induzir LPA é o lipopolissacarídeo (LPS), um componente das paredes celulares das bactérias gram-negativas. O LPS se liga ao seu receptor cognato, TLR4 e ao co-receptor, CD14 (ALTEMEIER, HUNG e MATUTE-BELLO, 2017) e essa ligação desencadeia na célula a produção de mediadores inflamatórios tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6.

A SDRA frequentemente desenvolve até 72h após a apresentação dos sintomas e frequentemente precede a ventilação mecânica, sugerindo que esse procedimento clínico pode desempenhar um papel no início da lesão pulmonar (JIA et al., 2008; ALTEMEIER, HUNG e MATUTE-BELLO, 2017).

Os modelos experimentais de LPA são empregados para testar novas potenciais intervenções terapêuticas, bem como para investigar as vias mecanicistas subjacentes que levam à lesão pulmonar. Tais modelos animais não são capazes de decifrar completamente os componentes celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manifestação da doença, porém, de acordo com a *American Thoracic Society*, os modelos experimentais de LPA devem apresentar evidências histológicas de lesões teciduais, ruptura capilar alveolar, inflamação e evidências fisiológicas de disfunção (MATUTE-BELLO et al., 2012).

Os principais benefícios de usar camundongos nos modelos experimentais incluem a disponibilidade de modelos genéticos para testar mecanismos específicos, o ciclo reprodutivo curto que permite a expansão rápida de populações de animais bem definidas, uma grande quantidade de reagentes disponíveis e menor custo em comparação com outras espécies (ALTEMEIER, HUNG e MATUTE-BELLO, 2017). Em adição, a variabilidade genética nessas populações pode dificultar a estimativa precisa dos tamanhos de amostra e, portanto, os experimentos que utilizam estoque exótico geralmente requerem tamanhos de amostra significativamente maiores, que precisam ser empiricamente determinados em estudos preliminares (MATUTE-BELLO et al., 2011).

Existem critérios a serem considerados quando é escolhido um modelo experimental para se trabalhar na LPA. Por exemplo, o histórico genético do tipo de animal e o sexo podem ter um impacto significativo na resposta experimental a lesões e, presumivelmente, a qualquer intervenção. No caso de modelos experimentais de lesões pulmonares, estudos mostram que o sexo provavelmente afeta a resposta à oxigenação (ALTEMEIER, HUNG e MATUTE-BELLO, 2017). Em estudo realizado por Prows e colaboradores (2009), observou-se que os camundongos da linhagem isogênica C57BL / 6 fêmeas são mais suscetíveis à lesão pulmonar induzida por hiperoxia do que os camundongos machos. É importante lembrar que nenhum

modelo animal reproduz todas as características complexas da LPA em humanos (D'ALESSIO et al., 2009).

Um modelo experimental bastante utilizado é a indução de LPA por LPS em camundongos da linhagem isogênica BALB/c, pois o LPS é facilmente administrado através de aspiração orofaríngea para atingir o grau desejado de inflamação e lesão. Por exemplo, para LPS extraído com fenol de *E. coli* 0111: B4 (Sigma-Aldrich), na dose de 2,5 - 3,75 mg / kg resulta em lesão pulmonar moderada que atinge o pico em 48-72h e o processo se resolve no décimo dia (D'ALESSIO et al., 2009; KLAFF et al., 2012).

Diante do exposto, o modelo experimental de indução da LPA por LPS, na dose de 2,5mg/kg, em camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c foi realizado nesse trabalho e as avaliações dos parâmetros biológicos foram realizadas com 72 horas e 10 dias a partir do desafio com LPS incluindo o tratamento dos animais com a molécula teste (alcaloide) no intuito de observar seus efeitos na fase aguda (72h) e na fase de resolução da LPA (décimo dia).

## **1.6 Farmacoterapia para a LPA**

O tratamento para LPA baseia-se em terapias ventilatórias e não ventilatórias que envolvem surfactantes e muitas outras drogas. No entanto, ambas as terapias são inespecíficas e estão associadas a vários efeitos colaterais (WHEELER e BERNARD, 2007; JOHNSON e MATTHAY, 2010).

Atualmente, a base do tratamento para LPA é evitar as complicações e tratar a causa subjacente, mantendo a oxigenação adequada via ventilação mecânica, juntamente com a administração criteriosa de líquidos, suporte nutricional adjunto, e o tratamento específico de qualquer causa conhecida subjacente da lesão ou doença (WALKEY et al., 2012).

A ventilação mecânica é a intervenção mais comum para apoiar pacientes com LPA e insuficiência respiratória hipoxêmica e é utilizada tanto em adultos como em crianças. No entanto, a própria ventilação pode contribuir para a lesão e a inflamação pulmonar, barotrauma, volutrauma, atelectrauma e biotrauma, caracterizando a lesão pulmonar associada à ventilação mecânica (ROTTA et al., 2015). A partir da década de 1990, foi reconhecido que a ventilação mecânica também pode piorar a lesão em pacientes com SDRA (ALTEMEIER, HUNG e MATUTE-BELLO, 2017).

Além da ventilação mecânica, também são observadas terapias que utilizam corticosteróides, vasodilatadores, antioxidantes, agentes e bloqueadores neuromusculares (RAGHAVENDRAN et al., 2008; WALKEY et al., 2012). Um avanço de suporte relatado pelo *National Heart, Lung and Blood Institute* é a estratégia de gerenciamento de fluidos, na qual é feita a utilização de diuréticos para atingir uma pressão venosa central inferior a 4 mmHg ou uma pressão de oclusão da artéria pulmonar abaixo de 8 mmHg (WIEDEMANN et al., 2006).

Como condição inflamatória pulmonar, muitos ensaios de drogas tentaram inibir a cascata inflamatória em vários pontos. Recentemente, com o advento da terapia baseada em células, mudou-se o foco, isto é, prevenir a inflamação prejudicial e redirecioná-la para um estado reparador. Além da modulação da inflamação, os processos fisiológicos alveolares da ventilação, a perfusão e a difusão gasosa foram objeto de intervenção farmacológica (SWEENEY, GRIFFITHS e MCAULEY, 2013).

Tratamentos e combinações terapêuticas têm sido utilizados para modificar ou alterar as propriedades mecânicas da inflamação do pulmão. Todavia, nenhum dos tratamentos disponíveis tem mostrado convincente melhoria dos resultados em estudos controlados (WHEELER e BERNARD, 2007). A falta de intervenções farmacológicas específicas é frustrante à luz de várias décadas de pesquisas que investigam a patogênese biológica e molecular de SDRA (BASTARACHE e BLACKWELL, 2009).

O uso de medicamentos inalatórios para o tratamento de doenças respiratórias tem sido de grande importância para a medicina por décadas, proporcionando alta concentração de drogas nas vias aéreas, rápida ação inicial e baixa exposição sistêmica, reduzindo dessa forma os efeitos colaterais (TRONDE et al., 2007). No entanto, a maioria dos medicamentos utilizados para tratar doenças respiratórias como corticosteróides, agonistas beta 2-adrenérgicos, inibidores da fosfodiesterase e antagonistas dos receptores de leucotrienos controlam os sintomas da doença, mas também induzem efeitos colaterais a longo prazo (KEMP, 2003; HOLGATE e POLOSA, 2008; POLOSA, 2008).

Portanto, se faz necessário a busca de medicamentos mais seguros, de uso contínuos e mais eficazes com baixo efeitos adversos no controle da LPA/SDRA. Os produtos naturais são considerados uma fonte abundante de novos candidatos ao desenvolvimento de drogas capazes de amenizar e/ou curar as diversas patologias incluindo a de cunho inflamatório (NEWMAN e CRAGG, 2016).

## 1.7 Alcaloides

Alcaloides são produtos naturais capazes de regular sistemas biológicos interagindo com micro e macromoléculas quando no interior do corpo (BHADRA e KUMAR, 2011). Essas moléculas são metabolitos secundários produzidos por uma variedade de organismos, como plantas, animais marinhos, bactérias e fungos e são amplamente distribuídos na natureza com diferentes estruturas, rotas biossintéticas e muitas atividades farmacológicas (KAINSA, KUMAR e RANI, 2012; CRAGG e NEWMAN, 2013).

Alcaloides são definidos como substâncias cristalinas que se ligam com ácidos para formar sais e derivam dos processos de biossíntese de aminoácidos ou transaminação (DEWICK, 2002). No entanto, os alcaloides formam um grupo de substâncias que, na verdade, são difíceis de definir porque apresentam uma variedade de estruturas que não possuem limites claros entre alcaloides e aminas complexas naturais (TREASE e EVANS, 2009).

Em 1983, Peletier definiu o alcaloide como "uma substância orgânica de origem natural, cíclica, contendo nitrogênio no estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. Essa definição de alcaloide permanece até hoje (ROBERTS e WINK 1998; PINTO, 2011).

Existem muitos sistemas diferentes de classificação de alcaloides devido à variedade de sua estrutura química, bioquímica, origem botânica e atividade farmacológica. Uma classificação didática é baseada em seus aminoácidos e duas categorias são consideradas: alcaloides não heterocíclicos ou atípicos chamados "proto-alcaloides" ou aminas biológicas; e alcaloides heterocíclicos ou típicos subdivididos de acordo com a sua estrutura de anel. Os alcaloides heterocíclicos ou típicos são derivados de fontes de plantas, têm um caráter básico, um ou mais átomos de nitrogênio, geralmente em um anel heterocíclico e geralmente demonstram uma ação fisiológica em homem e / ou outros animais. Um exemplo de um alcaloide típico (alcaloide aromático) são os alcaloides tetrahydroisoquinolinos comumente encontrados em numerosos produtos naturais estruturalmente diversos que exibem uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas (TREASE e EVANS, 2009; AMAT et al., 2010; AWUAH e CAPRETTA, 2010).

Apesar da sua capacidade de apresentar atividades farmacológicas, apenas no século 19, os alcaloides foram isolados e definiram suas atividades terapêuticas. Estes estudos

permitiram a introdução de vários tipos de alcaloides como fármacos para tratar numerosas doenças (AWUAH e CAPRETTA, 2010).

Os alcaloides isoquinolínicos apresentam diversas atividades biológicas, como efeitos opiáceos (exemplo tubocurarina), atividade cancerígena (cissampareína), antituberculose (cefantanina), efeito analgésico e antipirético (tetrandrina) (WHITEHOUSE et al., 1994).

Vários estudos demonstraram que a warifteína, um alcaloide bisbenzilisoquinolínico, apresenta efeitos farmacológicos em sistemas biológicos, incluindo imunomodulação, diminuindo a produção de imunoglobulina, efeito antidepressivo e inibição do recrutamento de eosinófilos para os pulmões no modelo experimental de asma (BEZERRA-SANTOS et al., 2006; COSTA et al., 2008).

Outro alcaloide bisbenzilisoquinolínico estudado, a curina, também apresentou algumas propriedades biológicas. Um estudo realizado por Dias et al. (2002) demonstrou que a curina tem efeito vasodilatador associado à inibição dos canais de cálcio. O primeiro estudo sobre o modelo alérgico inflamatório pulmonar, conduzido por Ribeiro-Filho et al. (2013), demonstrou que a administração oral de curina inibe significativamente a inflamação eosinofílica alérgica pulmonar e a formação de corpos lipídicos nos eosinófilos. Além da potente atividade anti-alérgica de curina, este alcaloide também foi estudado em modelos experimentais de inflamação aguda onde Leite e colaboradores (2014) analisaram seu efeito na nocicepção inflamatória usando o modelo experimental do contorno do ácido acético e também mostrou o efeito anti-edematogênico e anti-nocicepção desse alcaloide.

Tendo em vista que o principal método para obtenção de compostos biologicamente ativos provém da extração vegetal, que além de fornecer pequenas quantidades de substâncias biologicamente ativas, compromete a preservação da espécie vegetal e representa um método pouco atraente do ponto de vista econômico.

Desta forma, destacamos a importância dos métodos sintéticos para obtenção de compostos com atividades biológicas tendo como protótipos os compostos vegetais caracterizados, que além de viabilizar a produção em média e larga escala, oferece a flexibilidade necessária à preparação de análogos e miméticos que viabilizam não só os estudos farmacológicos *in-vivo* como oferece a oportunidade de estudos da relação estrutura-atividade (CORDEIRO, 2012).

A importância dos produtos naturais na descoberta e inspiração de novas drogas é comprovada e, por conseguinte, a sua síntese é de interesse significativo (STÖCKIGT et al., 2011).

### 1.8 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il)fenol (MHTP)

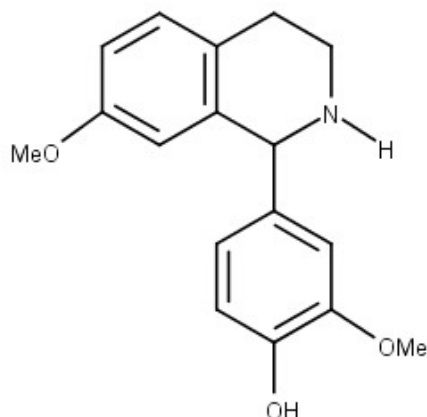
Os alcaloides apresentam uma variedade de atividades biológicas, entre elas estão a diminuição da sinalização via o fator de transcrição NFκB responsável pela síntese de diversas moléculas inflamatórias (KUO et al, 2012), efeito antitumoral (WAN et al., 2013) e efeitos antiinflamatórios e analgésicos (BAE et al., 2012; HU et al., 2016). Os alcaloides tetrahydroisoquinolínicos (THI) são de especial interesse devido às suas ações farmacológicas sobre a inflamação e distúrbios relacionados (TORRISI et al., 2010). Estudos demonstram que os análogos de THI são efetivamente inibidos na expressão de iNOS em muitas células ativadas com LPS (TORRISI et al., 2010; PARK et al., 2006). Além disso, alguns produtos naturais contendo fração de THI foram usados como antibióticos, antitumorais (KIM et al., 2010), antimaláricos (BUCHANAN et al., 2009) e antagonista ionotrópico do receptor de glutamato para o sistema nervoso central (DE LUCA et al., 2009).

Os alcaloides THI têm um centro assimétrico na sua estrutura e existem como enantiômeros. Embora dois enantiômeros opticamente ativos tenham as mesmas propriedades físicas do aquiral em geral, discrepâncias nas atividades farmacológicas são muitas vezes observadas entre os dois enantiômeros. Por conseguinte, o desenvolvimento de um único composto enantiomérico em vez de misturas racêmicas é fortemente encorajado no desenvolvimento de novos fármacos (TSOYI et al., 2008; MATTEI et al., 2010).

Os alcaloides isoquinolínicos e seus análogos foram utilizados como agentes anti-inflamatórios e estudados extensivamente por um longo período de tempo. Eles inibem a ativação induzida por LPS de NF-κB, TNF-α e NO (BAE et al., 2012).

O 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il)fenol (MHTP) (Figura 4) é um alcaloide inédito, sintetizado experimentalmente para prospecção de novos compostos com propriedades terapêuticas, tendo em vista o histórico positivo do grupo dos alcaloides frente as diversas doenças (CORDEIRO, 2012).

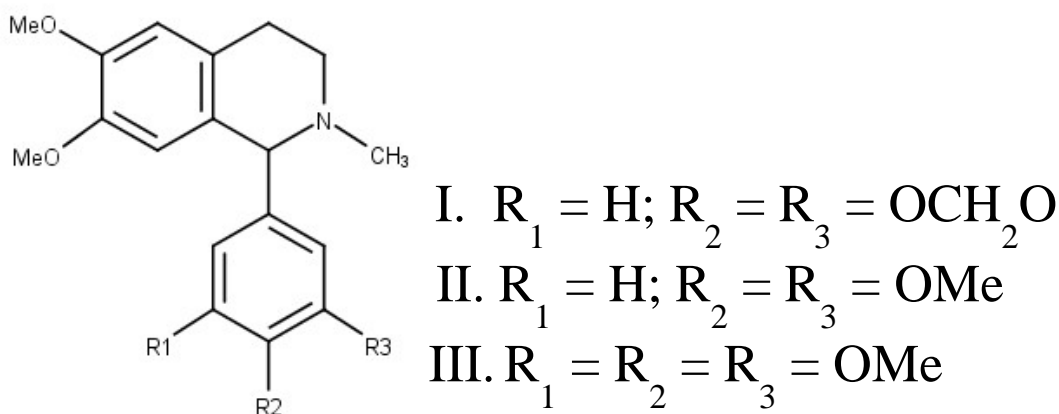
Figura 4- Estrutura química do 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il)fenol (MHTP)



Fonte: (CORDEIRO, 2012).

O MHTP possui semelhança química com as criptostilinas I, II e III isoladas a partir da planta *Cryptostylis fulva* (Orchidaceae) (Figura 5) as quais possuem consideráveis significâncias biológicas, por exemplo, como antagonistas farmacológicos para o receptor D1 de dopamina (MINOR,1994; MUNCHHOF e MEYERS, 1995).

Figura 5- Estrutura química das Criptostilinas I, II, III

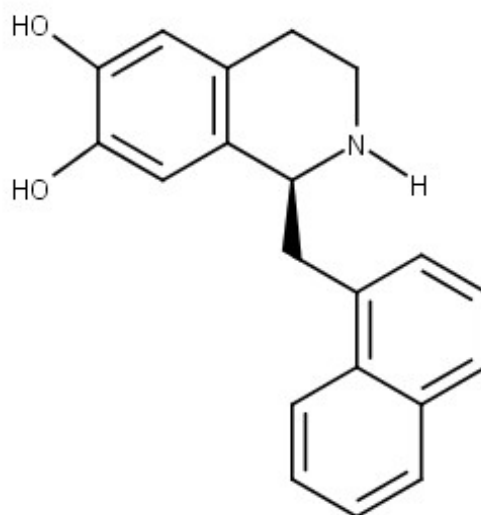


Fonte: (MUNCHHOF e MEYERS, 1995)

Além das criptostilinas, o MHTP é quimicamente semelhante aos alcaloides isoquinolínicos sintéticos CKD712 [(S)-1-( $\alpha$ -naftilmetil)-6,7-di-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina] (Figura 6) e THI52 (1- naftiletil -6,7- dihidroxi -1,2,3,4-

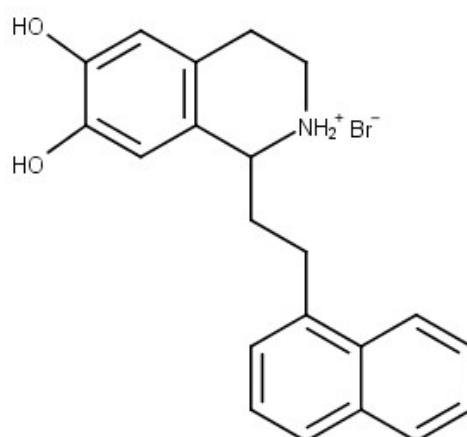
tetrahydroisoquinolina) (Figura 7) descritos na literatura por possuírem atividade anti-inflamatória (KANG et al., 2003; TSOYI et al., 2008).

Figura 6- Estrutura química do alcaloide CKD712



Fonte: (TSOYI et al., 2008).

Figura 7- Estrutura química do alcaloide THI 52



Fonte: (KANG et al., 2003).

Estudos prévios demonstram que o MHTP interferiu no desenvolvimento de certos aspectos da resposta inflamatória aguda com papel determinante na redução dos sinais cardinais tais como edema e nocicepção (DE OLIVEIRA et al., 2014) e, considerando a

importância desses achados preliminares e a possibilidade de inserir o alcaloide no arsenal de possíveis drogas a ser utilizada no intuito de minimizar os efeitos do processo inflamatório no organismos tivemos, o objetivo, nesse trabalho, de aprofundar nossos estudos com essa molécula no modelo experimental de lesão pulmonar aguda.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar os conhecimentos sobre os efeitos anti-inflamatório e imunomodulador do tratamento com MHTP em dois momentos importantes e críticos da lesão pulmonar aguda experimental (LPA) - 72 horas (fase aguda) e 10 dias (fase resolutive) após a indução com o lipopolissacarídeo (LPS).

### **2.2 Específicos**

- Estudar o efeito do MHTP na migração de células inflamatórias e no influxo de fluido rico em proteínas (exsudato) para a região broncoalveolar;
- Identificar os efeitos do MHTP na fisiopatologia pulmonar, como hemorragia e infiltrado celular, através da análise histológica dos pulmões de camundongos com LPA experimental;
- Determinar o efeito do MHTP na produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, no fluido do lavado broncoalveolar dos animais com LPA experimental;
- Investigar o efeito do MHTP na sobrevivência dos animais com LPA experimental.

## **3. Metodologia**

### **3.1 Animais**

Camundongos BALB/c machos (n=6) com idade entre 6 e 8 semanas e com peso entre 25 e 30g foram utilizados nos experimentos. Os animais, mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , foram submetidos a ciclos claro /escuro de 12

horas com livre acesso à água e ração do tipo *pellets* (PURINA) durante todo o período de experimentação. Os camundongos foram fornecidos pelo biotério Professor Thomas George do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos - IPeFarM/UFPB/João Pessoa, PB. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPeFarM/UFPB/João Pessoa, PB. Cada grupo experimental foi composto de seis camundongos. Após a utilização os animais foram encaminhados ao biotério Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM/UFPB, para o destino adequado.

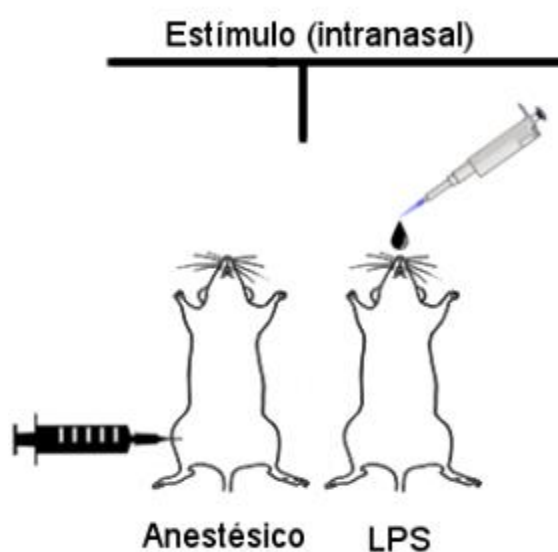
### **3.2 Anestesia e Eutanásia**

Os animais, antes de serem manipulados nos experimentos, foram sedados a partir da injeção intraperitoneal de 50µL da solução ketamina/xilazina (90-120 mg/kg de ketamina e 5-16 mg/kg de xilazina em solução salina [NaCl 0,9%]). A eutanásia dos animais foi realizada pela overdose da solução de anestésico de ketamina/xilazina (270–360mg/kg e 15–48mg/kg), sendo injetados 150µL dessa solução com injeção intraperitoneal no sentido de minimizar a dor, estresse e sofrimento dos animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008.

### **3.3 Protocolo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)**

Com a finalidade de induzir a lesão pulmonar aguda, os camundongos (n=6) foram previamente anestesiados e receberam, por instilação nasal, 40µL de LPS (2,5mg/kg de LPS - *Escherichia coli* 0111:B4- Sigma-Aldrich®) diluído em solução salina estéril. O grupo controle recebeu apenas 40µL do veículo estéril (salina) via intranasal. Os animais foram mantidos em condições normais de alimentação e água durante o período do experimento.

Figura 8- Esquema da metodologia de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



### 3.4 Preparo do MHTP

O MHTP foi pesado e foi preparada uma suspensão da substância para administração de 40 $\mu$ L por animal, na dose de 5 mg/kg utilizando a concentração de 3,125 mg/mL de MHTP em 500 $\mu$ L de salina, 50  $\mu$ L de Ácido Clorídrico (HCl) 1N e 40  $\mu$ L de hidróxido de sódio (NaOH) 1N. O pH foi ajustado para 7 pela adição de HCL e/ou NaOH e o volume completado para 2000  $\mu$ L com solução salina. Para a administração do MHTP nas doses de 1,25mg/kg, 2,5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg, foi retirado um volume da suspensão de 5 mg/kg e adicionado salina para obter a concentração previamente calculada de cada dose.

### 3.5 Protocolo de tratamento com MHTP na LPA

Os parâmetros inflamatórios, em análise, no protocolo da LPA experimental com o tratamento com o MHTP foram realizados em dois tempos: 72 horas para avaliar a fase aguda da doença e 10 dias para observar a fase crônica da doença. Em adição foi analisado se o MHTP atuaria na manutenção da sobrevivência dos animais submetidos à LPA. Primeiramente, no momento de 72 horas, foram avaliadas o tratamento com o MHTP nas diferentes doses (1,25mg/kg, 2,5mg/kg, 10mg/kg e 20mg/kg), conforme observado na Tabela 1, para definir aquela mais adequada a fim de dar continuidade aos experimentos evitando,

portanto, a utilização posterior de excesso de animais. Após a escolha da dose de MHTP que promoveu reposta anti-inflamatória considerável, essa dose foi utilizada nos demais experimentos, exibido na Tabela 2.

Nos tempos de 72 horas e 10 dias do protocolo experimental de LPA o tratamento com o MHTP foi realizado em três momentos. O primeiro momento do tratamento ocorreu uma hora após o desafio com LPS, o segundo ocorreu 24 horas após e o terceiro com 48 horas após o tratamento, como observado nas Figura 9 e Figura 10. Os tratamentos foram realizados com 40  $\mu$ L da substância por instilação nasal.

Figura 9 - Esquema de tratamento com MHTP no tempo de 72 horas.

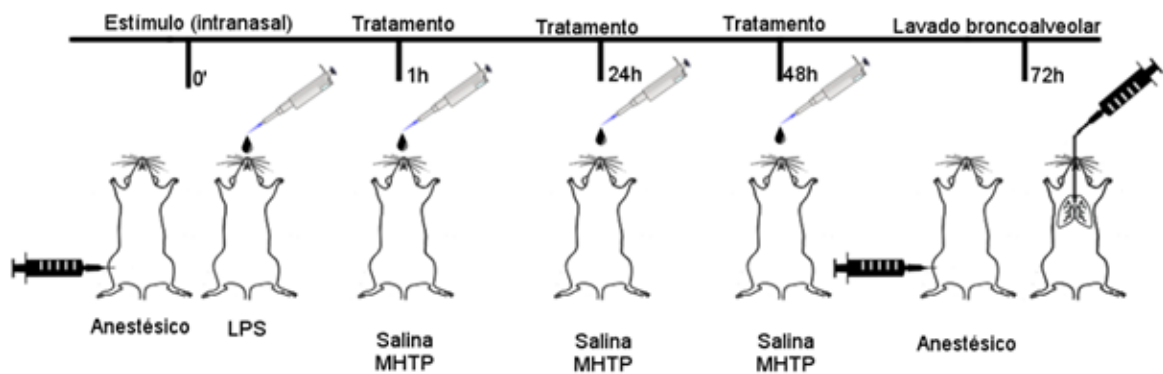


Figura 10- Esquema de tratamento com MHTP no tempo de 10 dias.

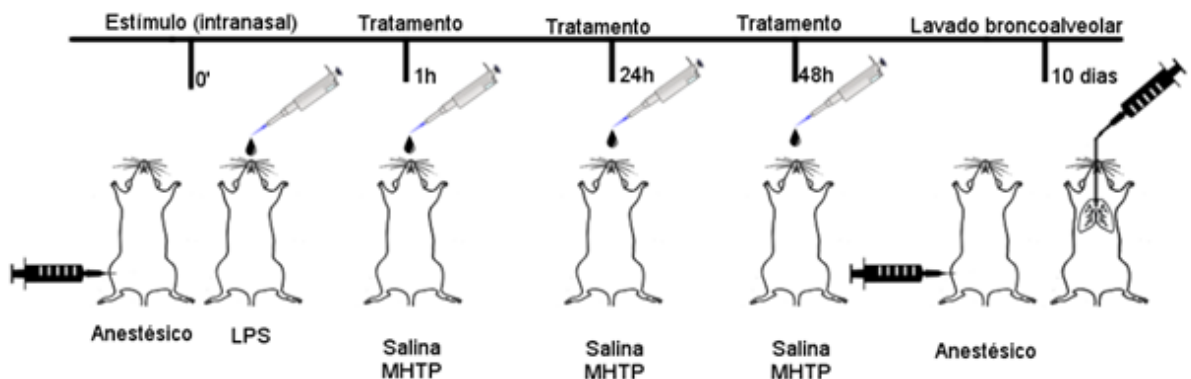


Tabela 1 Esquema de tratamento na LPA no tempo de 72 horas

Grupos	Tratamentos	Desafio
Basal	-	Salina (i.n.)
LPS	-	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
MHTP	MHTP 1,25mg/kg	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
MHTP	MHTP 2,5 mg/kg	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
MHTP	MHTP 5mg/kg	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
MHTP	MHTP 10 mg/kg	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
MHTP	MHTP 20 mg/kg	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)

Tabela 2 Esquema de tratamento na LPA após escolha da dose de MHTP

Grupos	Tratamentos	Desafio
Basal	-	Salina (i.n.)
LPS	-	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)
MHTP	MHTP 2,5mg/kg	LPS 2,5 mg/kg (i.n.)

### 3.6 Lavado broncoalveolar (BALF)

As células inflamatórias que migraram para o pulmão do animal após desafio com o LPS foram removidas pela técnica do lavado broncoalveolar (BALF) nos tempos de 72h e 10 dias após o desafio com LPS. Para a obtenção do BALF, os animais foram eutanasiados com overdose de anestésico. Em seguida, foi realizada a assepsia do animal com álcool 70° e uma incisão longitudinal foi feita, utilizando pinça e tesoura cirúrgica, na região cérvico-ventral para expor a traquéia do animal. Para uma melhor visualização da traqueia, os lobos da glândula tireoide foram separados e foi inserido, na traqueia, um cateter periférico IV-18G de poliuretano o qual foi conectado a uma seringa de 1,0 mL contendo de HBSS<sup>-/-</sup> gelado sendo injetando 0,5 mL cada. Após aproximadamente 10 segundos foi aspirada suspensão celular, finalizando a primeira lavagem. Esse procedimento foi realizado três vezes. O BALF coletado

foi armazenado em um tubo tipo *ependorf* mantido em gelo para manter a viabilidade celular para ser utilizado na contagem de células total e diferencial.

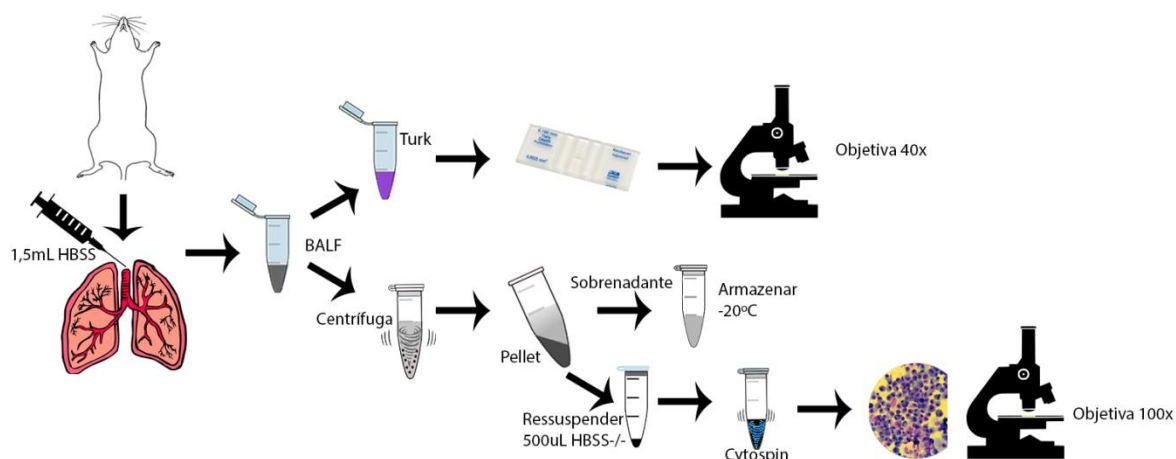
### 3.7 Contagem de células total e diferencial

Uma alíquota do BALF (10  $\mu\text{L}$ ) foi retirada e adicionada, na proporção 1:90 a solução de Turk. A solução de Turk apresenta ação hemolítica e lisa as hemácias e cora os leucócitos do BALF. A suspensão celular foi colocada na câmara hemocitométrica (Neubauer) para a contagem das células totais no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS). Para a contagem de células totais, foi utilizada a equação abaixo, onde  $C_T$  é o número de Células Totais do BALF,  $C_{CH}$  é o número de Campos da Câmara Hemocitométrica (CH),  $C_C$  é o número de Células Contadas na CH, e  $F_D$  é o Fator de Diluição do BALF.

$$C_T = \frac{C_C}{C_{CH}} \cdot F_D = \frac{C_C}{4} \cdot 4 \cdot 10^4$$

Após a realização da contagem das células totais, o BALF foi centrifugado (centrífuga CR422, JONAM) em 1500 RPM a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e armazenados para dosagem de citocinas e o *pellet* do BALF foi então ressuspensão em 500 $\mu\text{L}$  de HBSS<sup>-/-</sup> gelado e homogeneizado. Em seguida foi retirado 200  $\mu\text{L}$  do BALF para o grupo basal e 150  $\mu\text{L}$  do BALF para dos demais grupos e centrifugado na cytospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab), o qual se baseia em três passos principais: a fixação das células na lâmina por ação de um fixador, um corante básico cora de azul estruturas ácidas como o núcleo das células, e um corante ácido cora de rosa estruturas celulares básicas como o citoplasma, então esses contrastes de coloração celular proporciona uma visualização e contagem diferencial de células realizada por microscopia óptica (40 X - BX40, OLYMPUS). Para a contagem diferencial das lâminas, os leucócitos foram diferenciados em linfócitos, macrófagos e neutrófilos com relação a sua morfologia. Cada lâmina foi analisada cuidadosamente na objetiva de 100X com a utilização do óleo de imersão e um microscópio óptico (100 X - BX40, OLYMPUS). Foi utilizado um contador para que fossem contadas 100 células. A Figura 11 ilustra os métodos utilizados para contagem de células.

Figura 11- Representação da contagem de células totais e diferenciais.



### 3.8 Quantificação de Proteínas Totais

A determinação da quantidade de proteínas no BALF dos diferentes grupos de animais foi realizada por método colorimétrico do corante vermelho de pirogalol (kit sensiprot da Labtest). O vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul, com o máximo de absorção de 600nm. A absorbância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra.

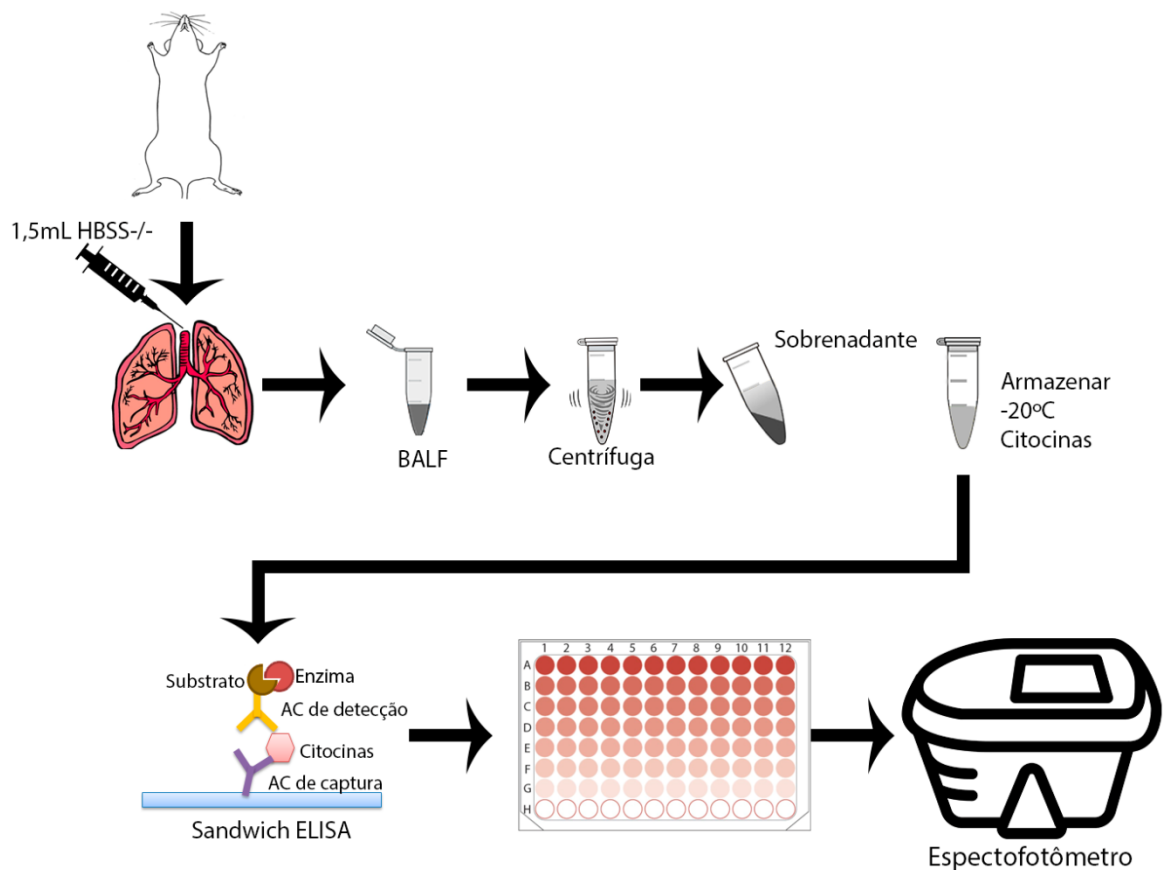
$$\text{Proteína (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 50$$

### 3.9 Determinação da produção de Citocinas

Os sobrenadantes dos BALF, provenientes dos diferentes grupos de animais, previamente armazenados a -20°C, foram utilizados para a quantificação das seguintes citocinas: TNF- $\alpha$  e IL-6, onde foi utilizado o método imunoenzimático ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Esse método é indicado para identificação das proteínas (TNF- $\alpha$  ou IL-6), e

é utilizado um anticorpo primário específico para a citocina, o qual é adsorvido no poço da microplaca. Em seguida, é adicionado o BALF contendo as citocinas (TNF- $\alpha$  ou IL-6). Em seguida, o segundo anticorpo específico para a citocina em análise e marcado com uma enzima é adicionado. Essa enzima reage com o substrato fazendo com que o cromógeno mude de cor. A presença de cor nos poços indica a presença da citocina (TNF- $\alpha$  ou IL-6), e os poços que não mudarem de cor indica a ausência da citocina em questão. A leitura foi realizada em leitor de placa (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir de cada curva-padrão de cada citocina quantificada. O processo descrito é ilustrado na Figura 12.

Figura 12- Representação do ensaio imunoenzimático ELISA tipo sanduíche.



### **3.10 Análise histológica**

Para avaliação das características histológicas, os lóbulos dos pulmões foram coletados e fixados em 10% de formalina tamponada com a finalidade de preservar a estrutura dos tecidos. Os pulmões fixados foram colocados em cassetes com as devidas etiquetas dos grupos experimentais e hidratados em imersão de água corrente por 24 horas. Ao final das 24 horas, ocorreu o procedimento de desidratação dos pulmões, no qual foram imersos em diferentes concentrações álcool etílico (sendo sempre da menor para a maior – 70%, 80%, 90% e 100%). Tal diferença de concentração (menor para a maior) é necessária para que ocorra a desidratação homogênea dos tecidos, evitando danos na estrutura tecidual durante o processamento da amostra.

Após esse procedimento e remoção do álcool, as amostras foram imersas em xilol I e xilol II e depois foram colocados em parafina líquida e moldados em blocos. Dessa forma, os blocos de parafina foram cortados com espessura de 5 $\mu$ m, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300).

Após os cortes, as amostras foram colocadas em lâminas e foi realizado o processo de reidratação e retirada da parafina para que as lâminas fossem montadas e posteriormente coradas. Para isso, os tecidos foram imersos em xilol I e xilol II e após em álcool etílico com concentrações diferentes (da maior para a menor – 100%, 90%, 80%, 70%).

Ao final desses procedimentos, as lâminas estavam prontas para serem coradas com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Gomori (TG). A coloração HE apresenta dois corantes: hematoxilina que é o corante básico e cora componentes ácidos como os núcleos de todas as células, e eosina que é corante ácido que cora componentes básicos como o citoplasma de todas as células, proporcionando uma observação geral de todas as estruturas pulmonares. Tal coloração permite visualizar uma grande quantidade diferente de estruturas teciduais enquanto que a coloração de TG tem a finalidade de identificar fibras de colágeno. Em seguida, foi realizada a montagem das lâminas e cada lâmina foi analisada com o objetivo de observar alterações histológicas dos tecidos pulmonares.

### **3.11 Taxa de sobrevivência**

Para realização desse experimento, foi utilizada para o desafio dos animais uma maior concentração do LPS (5 mg/mL) que leva a morte do animal, com a finalidade de observar se

o tratamento com o MHTP seria capaz de aumentar o tempo de sobrevivência desses animais. O protocolo de tratamento foi o mesmo utilizado no item 3.5 e a dose do MHTP foi de 2,5 mg/kg.

### **3.12 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média). Foi utilizado o programa GrafPad Prism versão 5.0 e foram considerados significativos os valores com  $p < 0,05$ , (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Foi utilizado o teste de variância ANOVA one-way com o pós-teste de múltipla variância de Tukey.

Os dados de sobrevivência foram apresentados pelo método de Kaplan-Meier e as comparações foram feitas pelo teste de log rank. Tal teste serve para comparar duas curvas de sobrevivência. Esse teste não paramétrico é baseado na diferença entre as taxas de falha (ou funções intensidade) de cada curva de sobrevivência.

## **4. RESULTADOS**

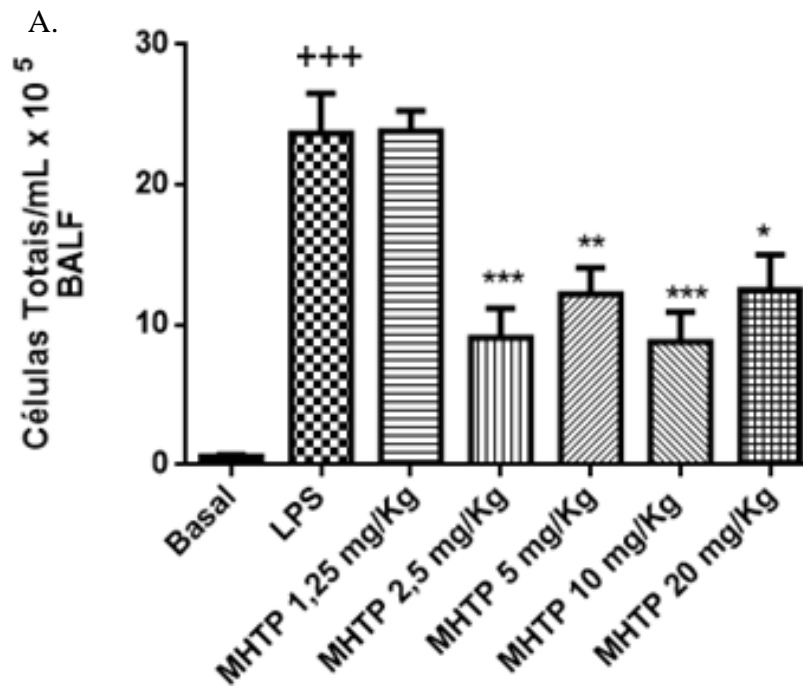
### **4.1 Efeito do MHTP na migração de células totais e diferenciais (macrófago, neutrófilos e linfócitos) no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 72 horas**

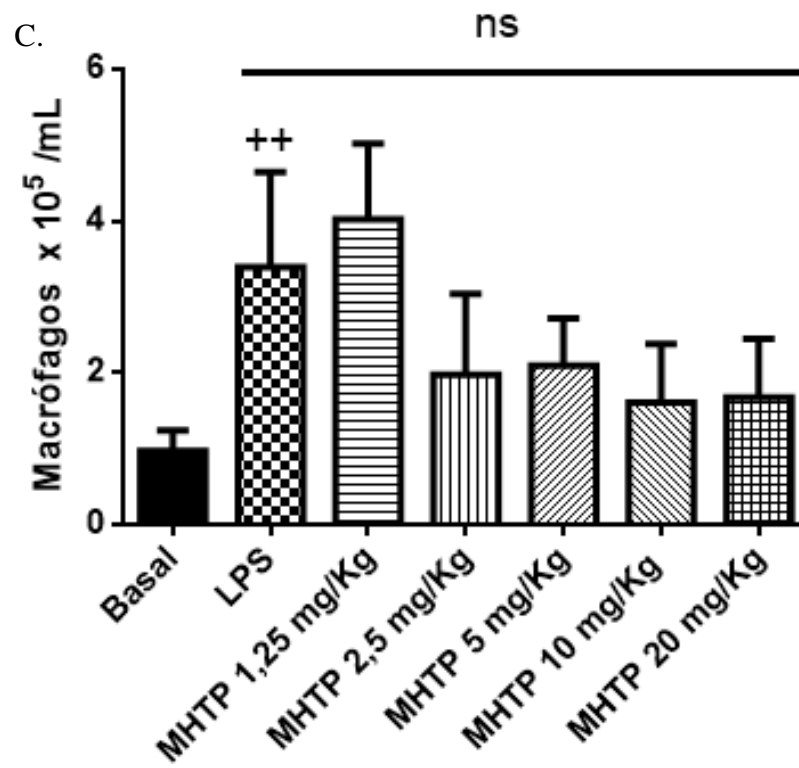
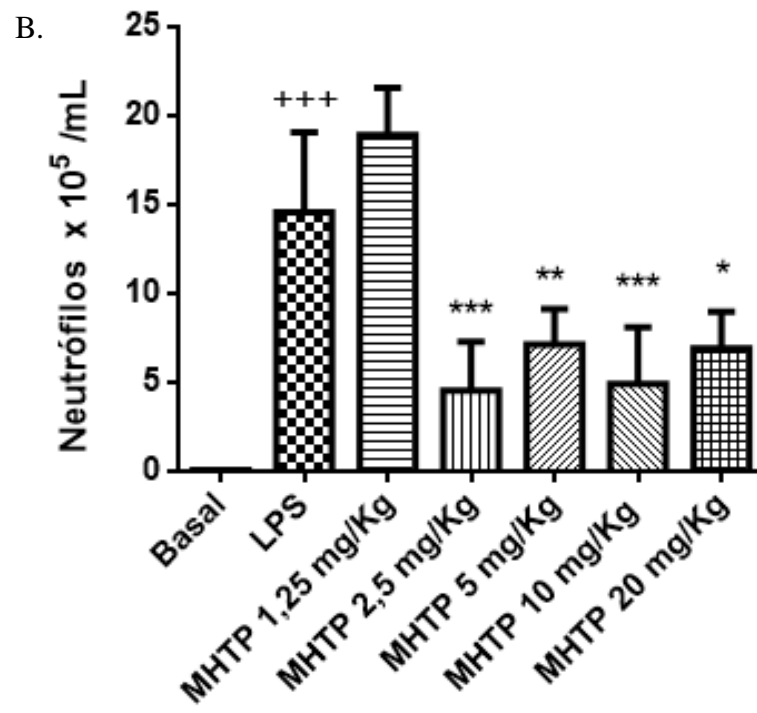
Como pode ser observado no Gráfico 1A, os camundongos expostos ao LPS mostraram um aumento nas células totais em relação ao grupo basal. O tratamento com MHTP nas diversas doses (2,5 mg/kg; 5mg/kg, 10mg/kg e 20 mg/kg) diminuíram respectivamente em 61,6%,48,4%, 62,8% e 47,2% o número de células totais em comparação com o grupo LPS. No entanto, não foi observada significância estatística na contagem de células totais com relação ao grupo de animais tratados com MHTP na dose de 1,25 mg / kg.

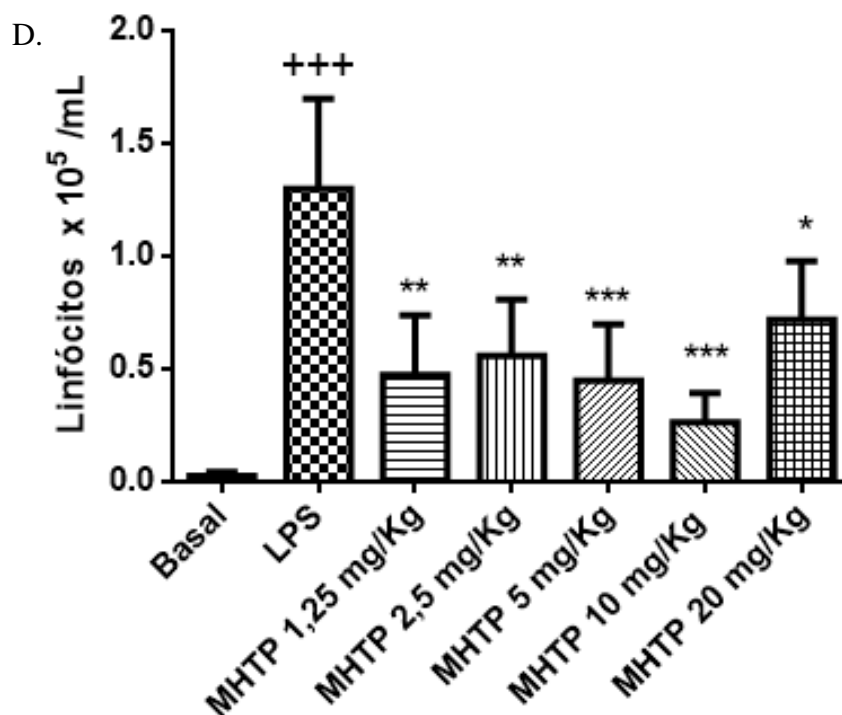
Além disso, também foram observados os efeitos do MHTP na contagem de células diferenciais (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). Os resultados mostraram que o desafio com o LPS aumentou significativamente o número de neutrófilos (Gráfico 1B), macrófagos (Gráfico 1C) e linfócitos (Gráfico 1D) no BALF em comparação com o grupo basal. No entanto, o tratamento com MHTP reduziu em 68,8% (2,5mg/kg), 51% (5mg/kg), 66,1% (10 mg/kg), 52,4% (20mg/kg) a infiltração de neutrófilos (Gráfico 1B) e linfócitos em 63,6% (1,25mg/kg),

57,11(2,5mg/kg), 65,5%(5mg/kg), 79,7% (10mg/kg), 44,6% (20mg/kg) (Gráfico 1D) induzidas por LPS. Resultado semelhante não foi observado com relação aos macrófagos já que não houve diferença significativa entre os grupos que receberam tratamento com o MHTP em comparação com o grupo de animais que foram desafiados com LPS e não tratados.

Gráfico 1- Efeito do tratamento com MHTP na migração de células totais e diferenciais (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) para o espaço broncoalveolar no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 72 horas.





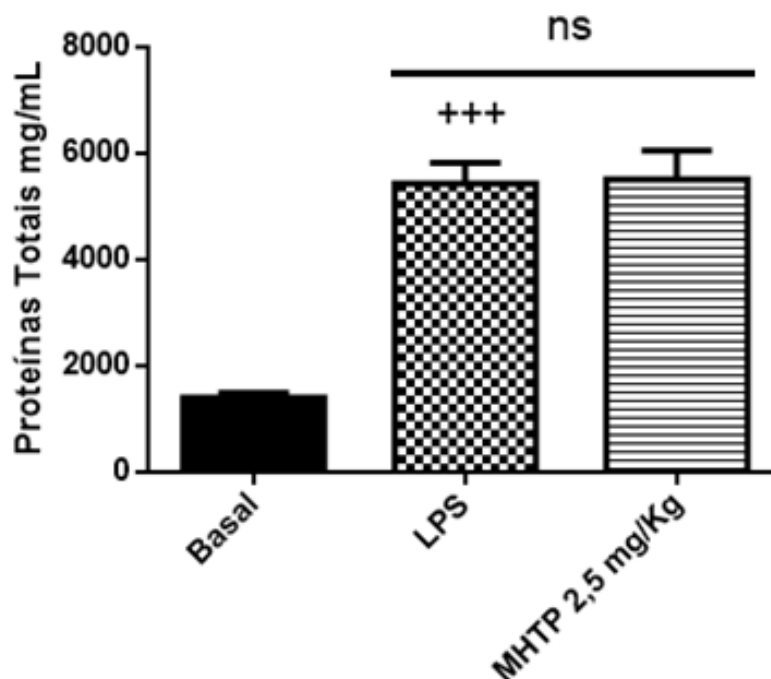


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados, via instilação nasal (i.n.), com MHTP (1,25 mg/kg; 2,5 mg/kg; 5 mg/kg; 10 mg/kg; 20 mg/kg) 1 hora após o desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 72 horas após o desafio e a migração de leucócitos foi quantificada em microscopia óptica comum. A) Células Totais; B) Neutrófilos; C) Macrófagos; D) Linfócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.

#### 4.2 Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão de animais do modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 72 horas

Não foi possível observar diferença estatística entre os animais tratados com MHTP em comparação com os animais do grupo LPS com relação a formação do exsudato medido pelo extravasamento de proteínas no tempo de 72 horas (Gráfico 2).

Gráfico 2- Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão na lesão pulmonar aguda em 72 horas.



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados, via instilação nasal (i.n.), com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 72 horas após o desafio e a produção de proteínas foi quantificada. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.

#### 4.3 Estudos histológicos pela coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E) dos pulmões dos animais em 72 horas

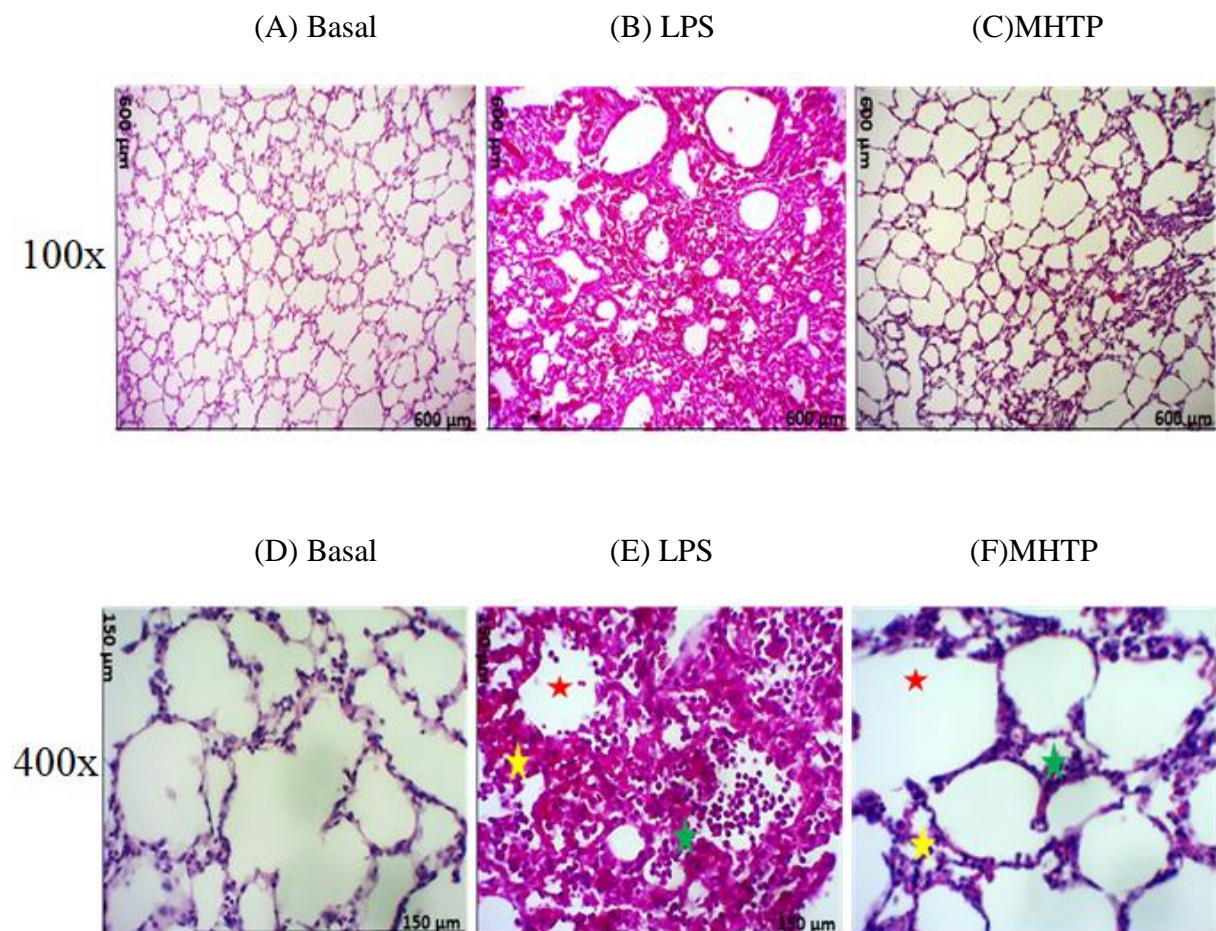
A coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) realizada nos cortes de tecido pulmonar dos camundongos BALB/c que desenvolveram a Lesão Pulmonar Aguda (LPA) permitiu avaliar aspectos morfológicos como infiltração celular, edema e hemorragia.

O grupo basal apresentou um tecido pulmonar com aspecto histológico normal, sem alterações como infiltrado celular, edema e/ou hemorragia, mantendo a arquitetura tecidual conservada (Figura 13 A e D). O tecido pulmonar do grupo LPS apresentou intensa infiltração celular em decorrência da inflamação intersticial desenvolvida. A presença de edema (estrela vermelha) foi observada, decorrente do aumento da permeabilidade da membrana alveolar

com presença de membranas hialinas e espessamento da parede alveolar, além do dano alveolar difuso também marcado por aglomerados de hemácias (hemorragia) (estrela amarela) após episódio de vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo nos capilares alveolares (Figura 13 B e E). A alteração histológica é demonstrada no *score* histológico no gráfico 3, onde o grupo LPS evidenciou uma inflamação tecidual ( $p < 0,0001$ ) em relação ao animal basal.

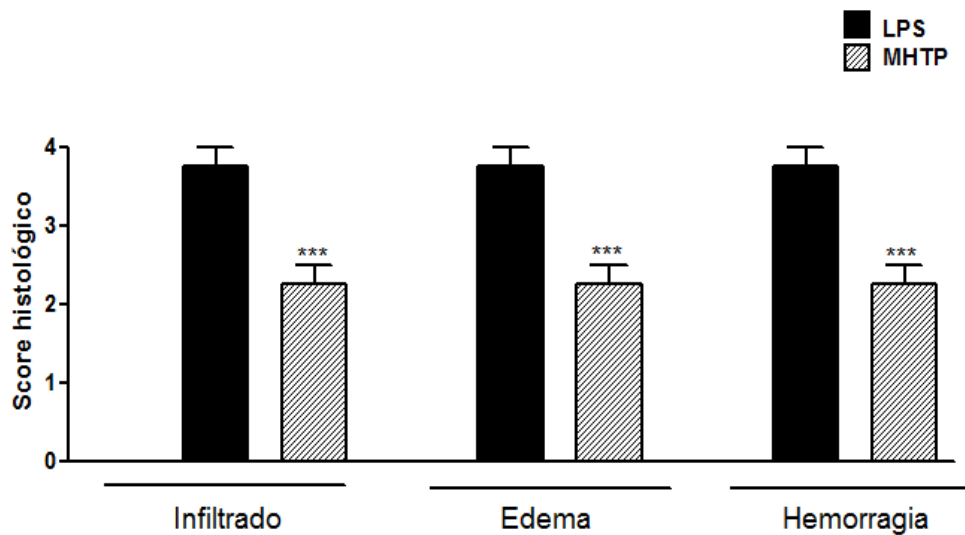
Entretanto, o tratamento com o MHTP diminui a inflamação intersticial decorrente da doença, reduzindo os parâmetros de migração celular (estrela verde), edema (estrela vermelha) e hemorragia (estrela amarela) com consequente diminuição do dano alveolar difuso (Figura 13 C e F e Gráfico 3).

Figura 13- Efeito do MHTP no tecido pulmonar na lesão pulmonar aguda no tempo de 72 horas. Cortes histológicos dos pulmões corados com Hematoxilina & Eosina (H&E).



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos BALB/c com LPA. Grupos Basal, LPS e MHTP. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E). Aumento total 100x (600  $\mu\text{m}$ ) e 400x (150  $\mu\text{m}$ ). ★ = infiltração celular, ★ = edema, ★ = hemorragia.

Gráfico 3- Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS.



Escore das alterações morfológicas no tecido pulmonar dos animais com LPA após coloração H&E. Camundongos (n=6) desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e não tratados (LPS) ou tratados com MHTP. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ANOVA “one-way” seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).

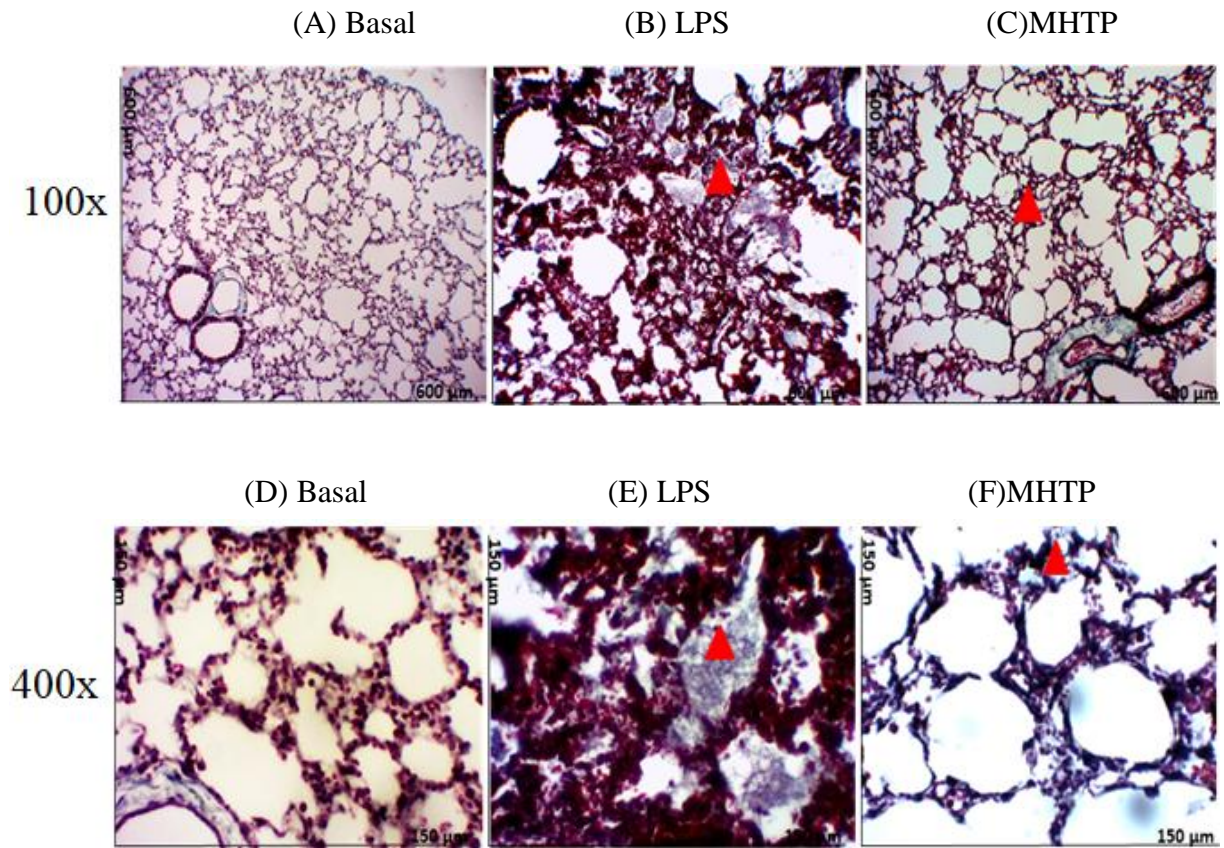
#### 4.4 Estudos histológicos pela coloração com Tricrômio de Gomori (TG) dos pulmões dos animais em 72 horas

A coloração de Tricrômio de Gomori (TG) foi utilizada em amostras de tecido pulmonar dos camundongos BALB/c com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) para avaliação da deposição de fibras colágenas do tecido conjuntivo, após o desenvolvimento da doença LPA, a coloração de fibras colágenas apresenta-se em um tom azul-esverdeado (seta vermelha) que contrasta com componentes celulares em uma tonalidade vermelho-amarronzado.

O grupo basal apresentou fibras colágenas destacadas pelo corante apenas nas regiões de presença fisiológica, como os vasos sanguíneos (Figura 14 A e D). O grupo LPS demonstrou aumento significativo (Gráfico 4) da quantidade de fibras colágenas (seta vermelha) quando comparado ao grupo basal principalmente quando comparadas as regiões

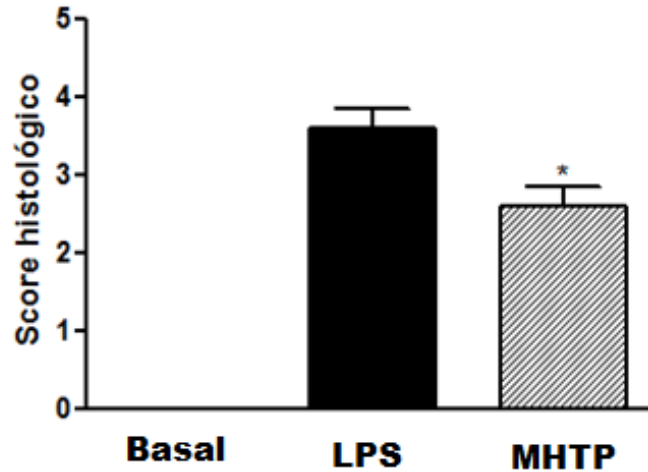
alveolares (Figura 14 B e E). O grupo MHTP apresentou uma diminuição desse parâmetro quando comparado ao grupo LPS (Figura 14 C e F).

Figura 14- Cortes histológicos dos pulmões corados com Tricrômio de Gomori (TG) na lesão pulmonar aguda no tempo de 72 horas.



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos com LPA. Grupo Salina, LPS e MHTP. Coradas em Tricromo de Gomori (TG). Aumento Total 100x (600 μm) e 400x (150 μm). ▲ = fibras colágenas.

Gráfico 4- Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS.

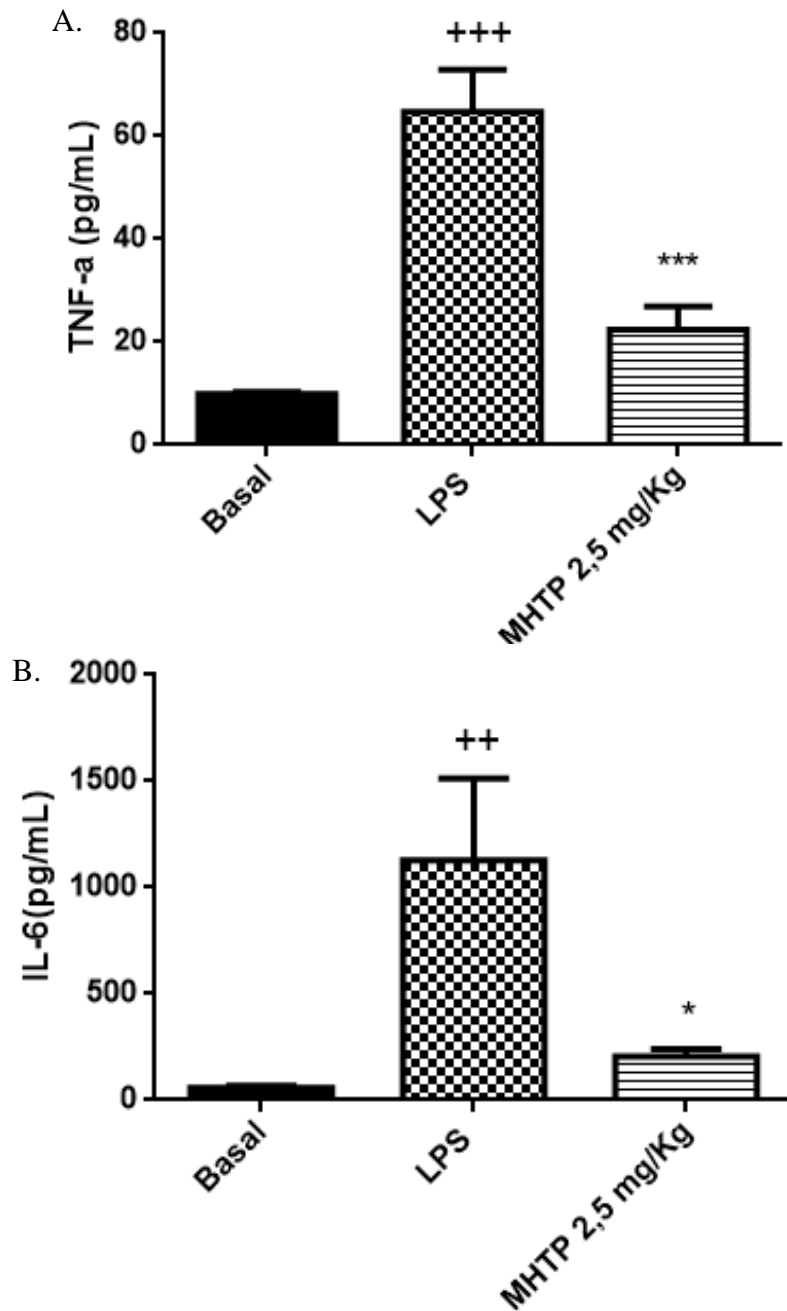


Escore qualitativo das quantidades de fibras no tecido pulmonar dos animais com LPA após coloração TG. Camundongos (n=6) desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e não tratados (LPS) ou tratados com MHTP. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ANOVA “one-way” seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).

#### 4.5 Efeito do MHTP na produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ no BALF de animais submetidos à lesão pulmonar aguda em 72 horas

O efeito do MHTP na produção de TNF $\alpha$  e IL-6 no BALF foi analisado pelo ensaio imunoenzimático - ELISA. A concentração de TNF $\alpha$  e IL-6 aumentou significativamente após os camundongos terem sido desafiados com LPS em comparação com o grupo basal. O tratamento com MHTP na dose de 2,5mg/kg reduziu 65,3% a geração de TNF $\alpha$  e 81,7% IL-6 (Gráfico 5).

Gráfico 5- Efeito do MHTP na produção de citocinas inflamatórias na lesão pulmonar aguda no tempo de 72 horas.

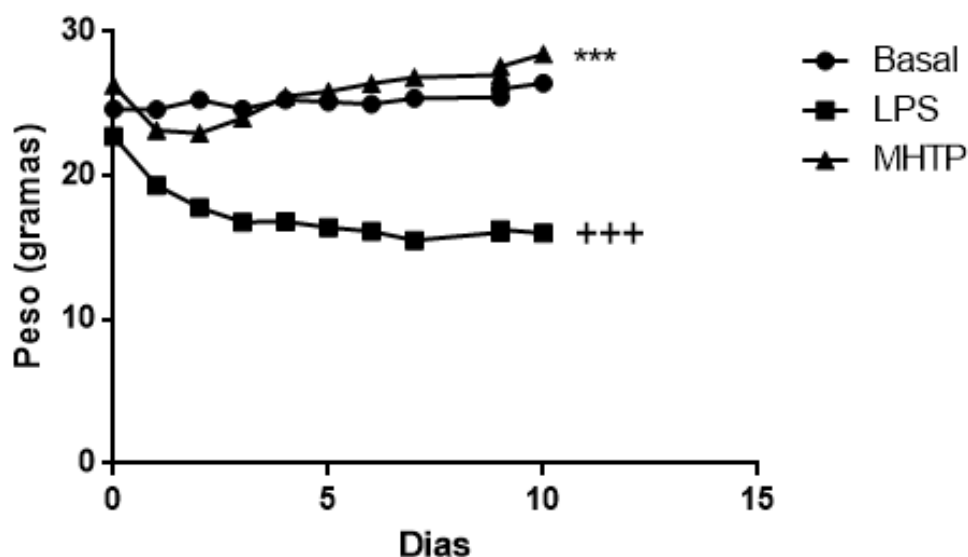


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados, via instilação nasal (i.n.), com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 72 horas após o desafio e produção de citocinas **A)** TNF- $\alpha$  e **B)** IL-6 foi quantificada por Elisa. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.

#### 4.6 Efeito do MHTP no peso dos animais submetidos a lesão pulmonar agudo no tempo de 10 dias.

Os camundongos desafiados com LPS foram observados quanto ao ganho ou perda de peso no período de 10 dias. Esses animais apresentaram doentes durante todo o período de pesagem, com diminuição da atividade física, piloereção (observado na Figura 15) e perda de peso sustentada durante os 10 dias (Gráfico 6). Em contraste, os camundongos tratados com MHTP exibiram retorno da atividade física após o desafio e ganho de peso entre o quarto e quinto dia em comparação do grupo LPS (Gráfico 6).

Gráfico 6- Pesos (em gramas) dos animais coletados todos os dias por 10 dias consecutivos.



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados via instilação nasal (i.n.) com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. Todos os animais dos grupos foram pesados por um período de 10 dias. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.

As figuras a seguir mostram visualmente as diferenças na aparência dos animais no 9º dia após o desafio com LPS.



A) Basal

B) LPS

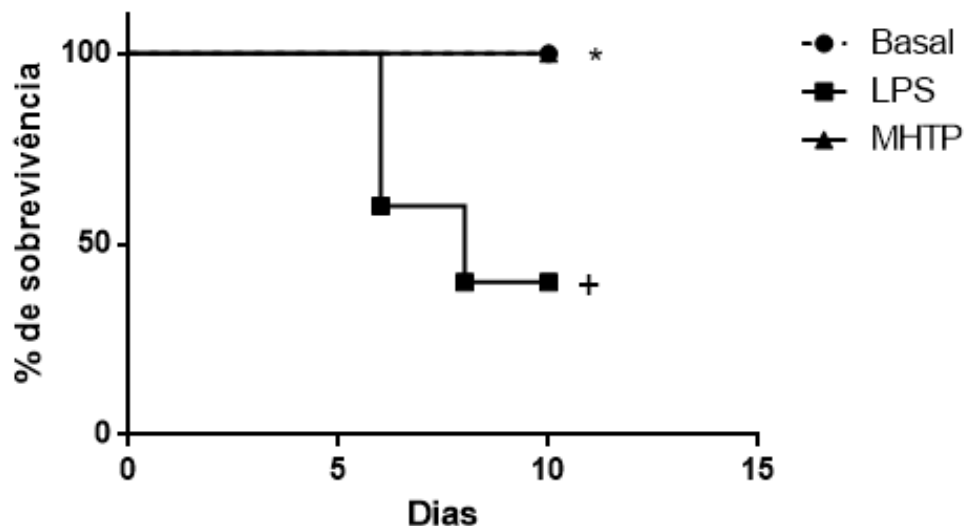
C) MHTP

Figura 15- Camundongos no 9º dia após o desafio com LPS.

#### 4.7 Efeito do MHTP na taxa de sobrevivência dos animais submetidos à lesão pulmonar aguda em 10 dias.

Observando o gráfico relacionado à sobrevivência dos animais, é possível ver a avaliação dos parâmetros de lesão em intervalos até ao dia 10. A mortalidade dos camundongos foi observada apenas no grupo com LPS do que nos animais basais e tratados com MHTP (Gráfico 7).

Gráfico 7- Gráfico taxa de sobrevivência dos grupos em 10 dias.



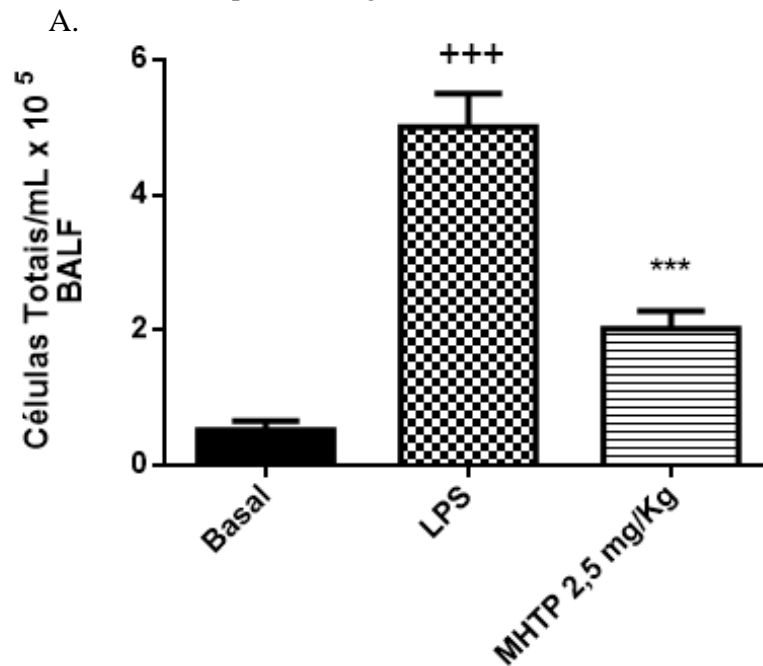
Camundongos BALB/c machos (n=5) foram desafiados com LPS e tratados, via instilação nasal (i.n.), com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. A sobrevivência foi observada todos os dias por um período de 10 dias consecutivos. A significância estatística foi definida pelo teste de Log-rank.

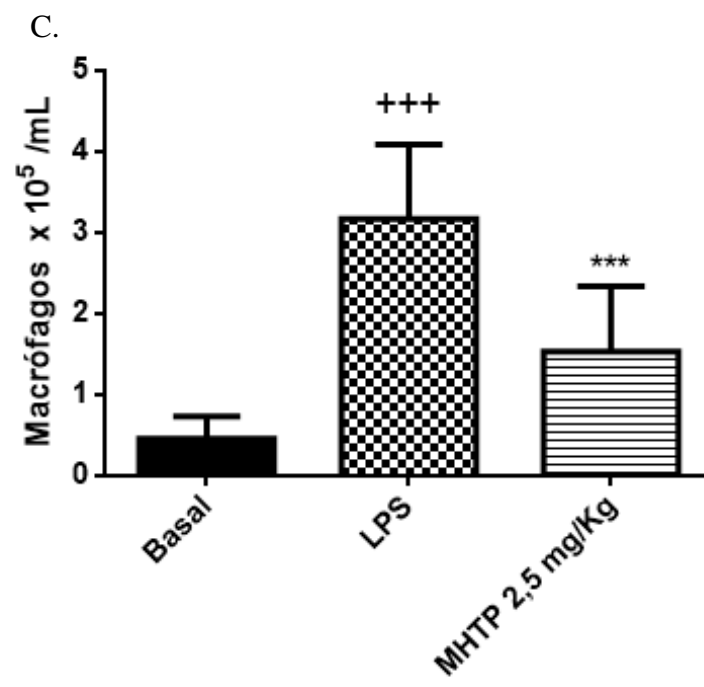
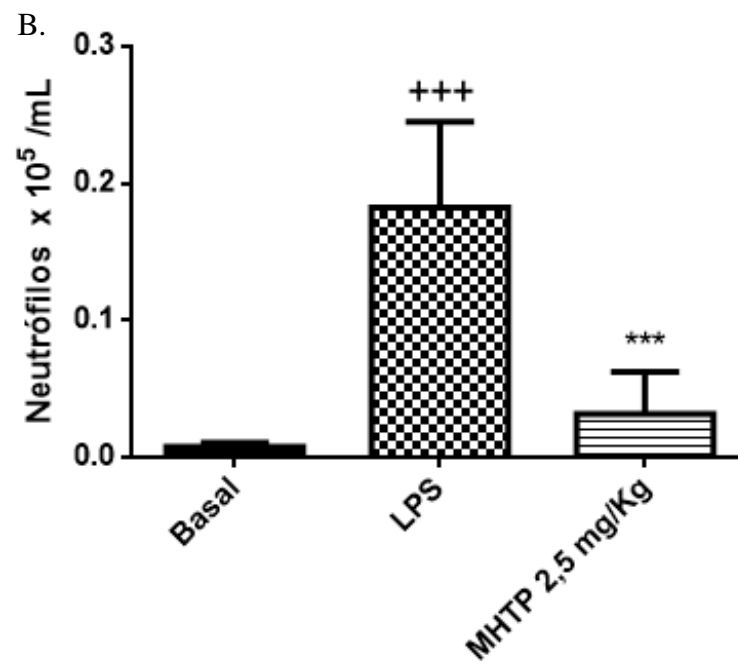
#### 4.8 Efeito do MHTP na migração de células totais e diferenciais no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 10 dias

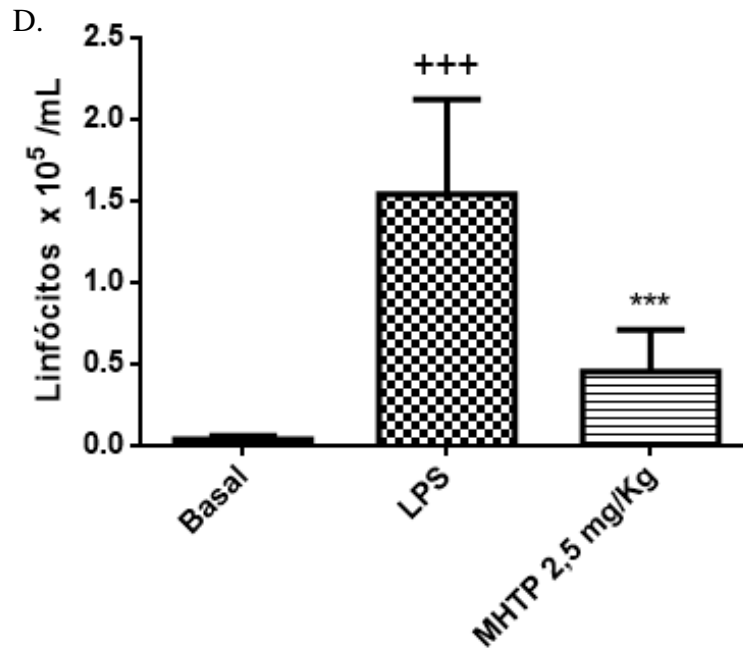
Em uma fase mais crônica da doença, os camundongos expostos ao LPS ainda mostraram um aumento da contagem de células totais em relação ao grupo basal. O tratamento com MHTP na dose de 2,5 mg/kg diminuiu 59,5% o número do infiltrado de células totais, em comparação com os do grupo LPS (Gráfico 8).

O tratamento com o MHTP promoveu redução com relação à migração celular em 82,7% de neutrófilo (Gráfico 8B), 51,4% de macrófagos (Gráfico 8C) e 70,6% de linfócitos (Gráfico 8D) em relação ao grupo LPS. Além disso, também foi possível observar mudança de perfil na doença em uma fase mais crônica sendo mais recorrente a presença de macrófagos e linfócitos ao local da lesão do que de neutrófilos em comparação ao tempo de 72 horas.

Gráfico 8- Efeito do tratamento com MHTP na migração de células totais e diferenciais (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) para o espaço broncoalveolar no modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 10 dias.





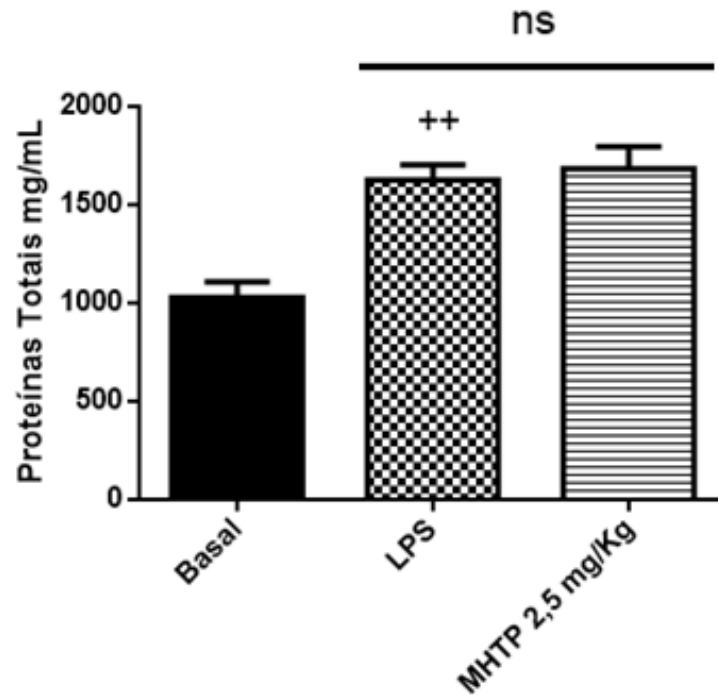


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados via instilação nasal (i.n.) com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 10 dias após o desafio e a migração de leucócitos foi quantificada em microscopia óptica comum. **A)** CélulasTotais; **B)** Neutrófilos; **C)** Macrófagos; **D)** Linfócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.

#### 4.10 Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão de animais do modelo experimental de lesão pulmonar aguda em 10 dias

Assim como no tempo de 72 horas, não foi possível observar diferença estatística na formação do exsudato (presença de proteínas) nos pulmões dos animais tratados com MHTP em comparação com os animais do grupo LPS no tempo de 10 dias (Gráfico 9).

Gráfico 9- Efeito do MHTP na formação do exsudato no pulmão na lesão pulmonar aguda em 10 dias.

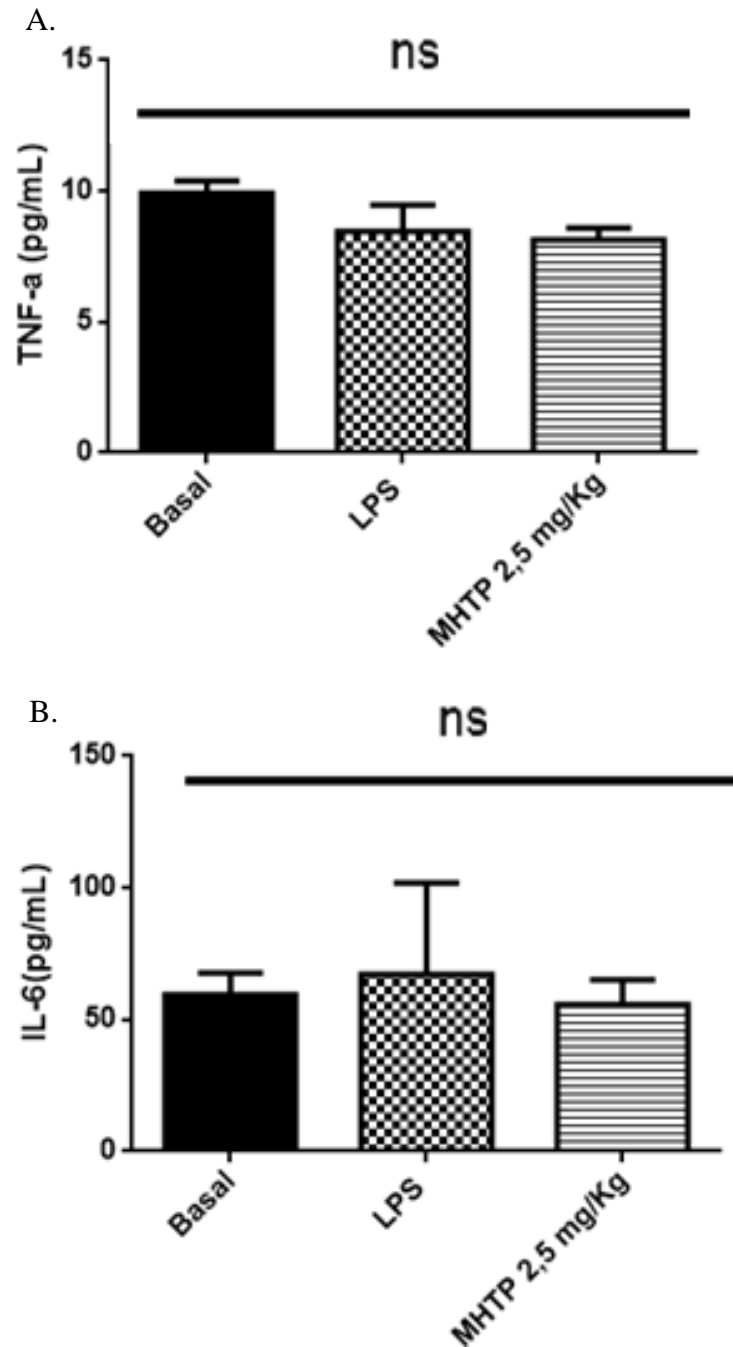


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados, via instilação nasal (i.n.), com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 10 dias após o desafio e a produção de proteínas foi quantificada. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.

#### 4.11 Efeito do MHTP na produção das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ no BALF de animais submetidos à lesão pulmonar aguda em 10 dias.

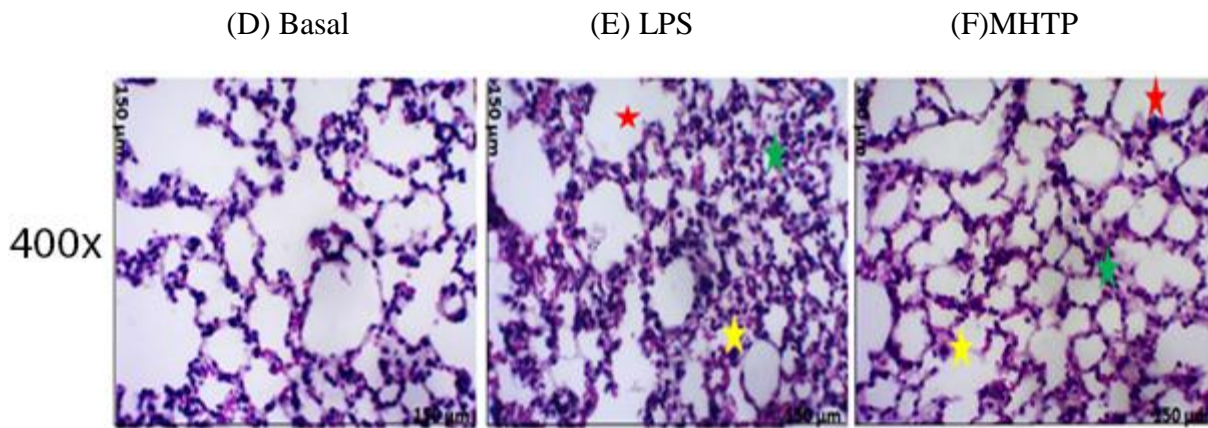
O efeito do MHTP na produção de TNF $\alpha$  e IL-6 no BALF foi analisado por ELISA. No tempo de 10 dias também não foi observada diferença estatística na produção de citocinas entre os grupos basal, LPS e MHTP (Gráfico 10).

Gráfico 10- Efeito do MHTP na produção de citocinas inflamatórias na lesão pulmonar aguda no tempo de 10 dias.



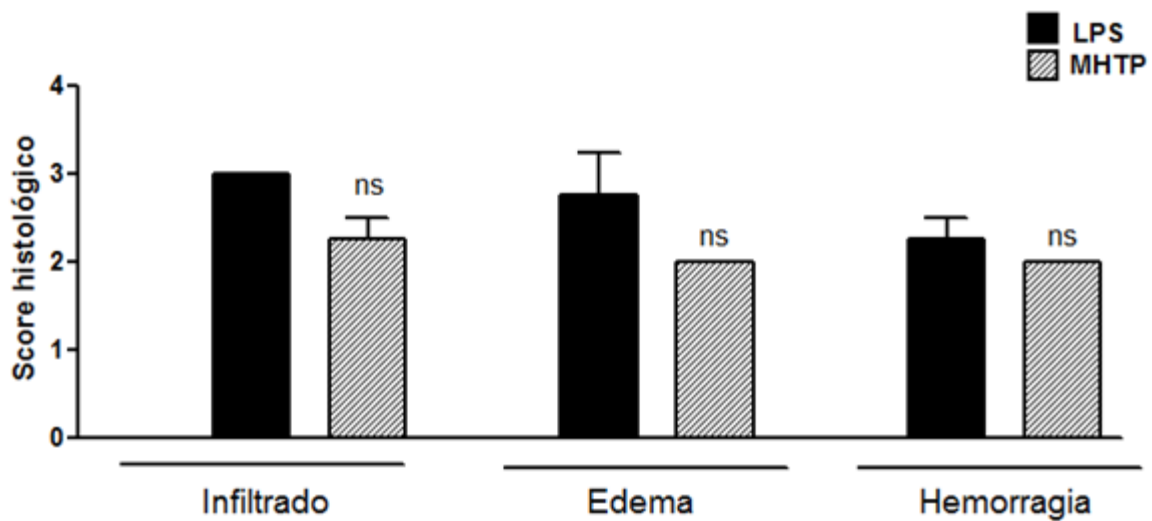
Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e tratados via instilação nasal (i.n.) com MHTP 2,5 mg/kg 1 hora após o desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 10 dias após o desafio e a produção de citocinas foi quantificada em microscopia óptica comum. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de variância de Tukey. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*p < 0,0001 comparado ao grupo LPS.





Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos BALB/c com LPA. Grupos Basal, LPS e MHTP. Coradas por Hematoxilina Eosina (H&E). Aumento total 100x (600  $\mu$ m) e 400x (150  $\mu$ m).  $\star$  = infiltração celular,  $\star$  = edema,  $\star$  = hemorragia.

Gráfico 11- Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS.

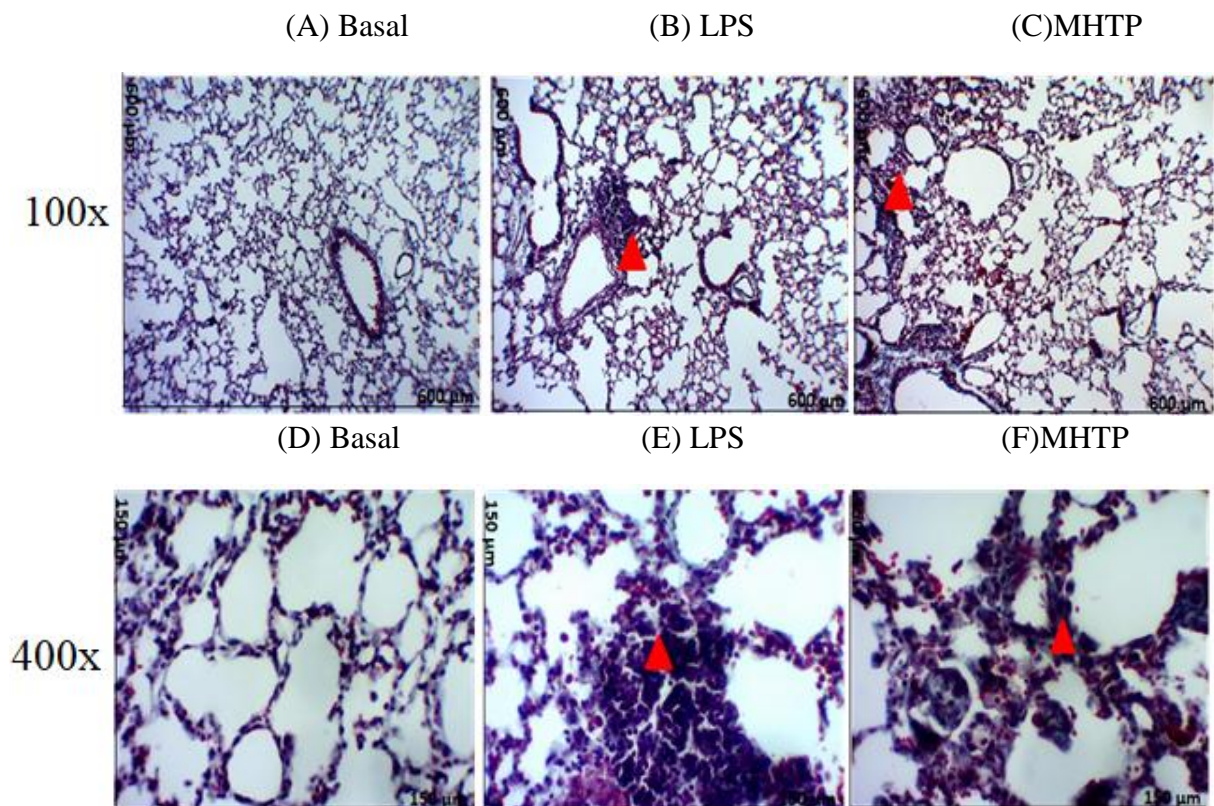


Score das alterações morfológicas no tecido pulmonar dos animais com LPA (10 dias) após coloração H&E. Camundongos (n=5) desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e não tratados (LPS) ou tratados com MHTP. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ANOVA “one-way” seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).

#### 4.13 Estudos histológicos pela coloração com Tricrômio de Gomori (TG) dos pulmões dos animais em de 10 dias

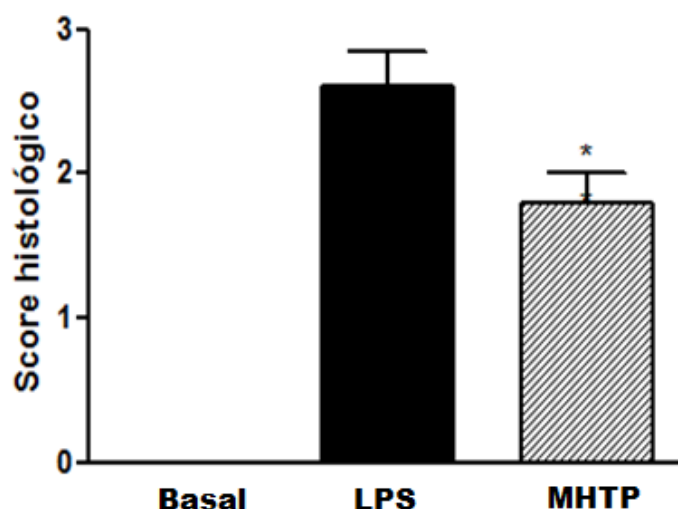
O grupo basal apresentou fibras colágenas destacadas pelo corante apenas nas regiões de presença fisiológica, como os vasos sanguíneos (Figura 17 A e D). O grupo LPS demonstrou aumento significativo da quantidade de fibras colágenas quando comparado ao grupo basal principalmente quando comparadas as regiões alveolares (Figura 17 B e E) (seta vermelha). Em algumas regiões as fibras foram mantidas após os 10 dias de experimento. O grupo MHTP apresentou uma diminuição significativa desse parâmetro quando comparado ao grupo LPS (Figura 17 C e F). Tal resultado também pode ser observado no Gráfico 12 que mostra o *score* histológico alterações morfológicas dos pulmões.

Figura 17- Efeito do MHTP no tecido pulmonar na lesão pulmonar aguda no tempo de 10 dias. Cortes histológicos dos pulmões corados com Tricrômio de Gomori (TG).



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos com LPA. Grupo Salina, LPS e MHTP. Coradas em Tricromo de Gomori (TG). Aumento Total 100x (600 µm) e 400x (150 µm). ▲ = fibras colágenas.

Gráfico 12- Score histológico do efeito do tratamento com MHTP sobre as alterações morfológicas no pulmão dos animais submetidos a LPA induzida por LPS.



Escore qualitativo das quantidade de fibras no tecido pulmonar dos animais com LPA após coloração TG. Camundongos (n=5) desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e não tratados (LPS) ou tratados com MHTP. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ANOVA “one-way” seguido do teste de *Kruskal-Wallis* (parâmetro histológico vs. escore).

## 5. DISCUSSÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são doenças relacionadas à insuficiência respiratória aguda que resultam de um distúrbio da barreira alvéolo-capilar associada a múltiplos distúrbios clínicos. A LPA associada à inflamação é uma doença grave que apresenta altas taxas de mortalidade, e não existe tratamento específico na clínica (CHI et al., 2012; JOHNSON e MATTHAY, 2010).

O modelo experimental de LPA induzido por lipopolissacarídeo (LPS) foi escolhido nesse trabalho para aprofundar os conhecimentos relacionados aos efeitos do alcaloide 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolin-1-il)fenol (MHTP) que, previamente, demonstrou apresentar efeito anti-inflamatório agudo (DE OLIVEIRA, 2014) e crônico (FERREIRA, 2016). A LPA possibilita estudar os numerosos componentes da resposta inflamatória aguda e por ser um modelo experimental de fácil reprodutibilidade (ALTEMEIER, HUNG e MATUTE-BELLO, 2017).

A migração de células inflamatórias imunes no pulmão lesionado está diretamente relacionada à permeabilidade microvascular e a disfunção da barreira alveolar (MATSUDA et al., 2014) sendo essa migração celular uma das principais características de caráter

inflamatório na LPA (CROSS e MATTHAY, 2011). Os neutrófilos infiltrados e ativados e os macrófagos alveolares induzem uma inflamação pulmonar extensa que resulta na destruição da membrana basal e altera a permeabilidade da membrana alvéolo-capilar (ZHAO et al., 2006; CEPKOVA e MATTHAY, 2006; GROMMES e SOEHNLEIN, 2011; YANG et al., 2017). Estudos mostram que a inibição da migração de neutrófilos para o local da inflamação é importante para diminuição da gravidade da doença e para sua resolução (ZHAO et al., 2014; ZHANG et al., 2015; WANG et al., 2016).

A ativação e o recrutamento de neutrófilos para o pulmão são principalmente atribuídos à produção local de citocinas (BHATIA, ZEMANS e JEYASEELAN, 2012). Além disso, a ativação dessas células também permite a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e proteases que levam à ruptura da barreira alveolar, aumento da permeabilidade e lesão tecidual (AMULIC et al., 2012; LIU et al., 2017).

Nesse trabalho foi possível observar que a administração com o LPS promoveu o aumento na migração de células, especificamente neutrófilos, para o espaço broncoalveolar e que o tratamento com MHTP nas doses de 2,5mg/kg, 5mg/kg, 10mg/kg ou 20 mg/kg foi capaz de reduzir a migração dessas células comprovando os resultados anteriores descritos por De Oliveira et al. (2014), no qual foi mostrado que o tratamento com MHTP na dose de 2,5mg/kg, reduziu a migração de leucócitos nos modelos experimentais de peritonite induzida por carragenina e LPA induzida por LPS. Em adição, os autores demonstram o efeito anti-edematogenico do MHTP no modelo experimental de edema de pata induzido por agentes flogísticos com inibição da atividade da prostaglandina E2 (PGE2). Além disso, em um estudo realizado por Ferreira (2016), o MHTP foi avaliado no modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica, onde apresentou efeito imunomodulador com a diminuição na migração de células inflamatórias para o pulmão bem como a produção de citocinas e muco.

Em adição, os nossos resultados mostram que o tratamento com MHTP não alterou a migração de macrófagos em 72 horas. Resultado semelhante foi demonstrado no estudo de De Oliveira (2014) com MHTP no período de 24 horas após o desafio com LPS onde não houve redução significativa de mononucleares.

Portanto, nesse trabalho comprovamos o efeito protetor do MHTP quanto à migração de células inflamatórias para o pulmão o que sugere que o alcaloide atua em algum (s) alvo (s) molecular (es) e/ou celular (es) relacionado (s) à permeabilidade alvéolo-capilar promovendo ação protetora contra a doença.

Um ponto importante a ser observado quando se avalia uma molécula em modelos experimentais de doença é verificar a sua toxicidade e/ou citotoxicidade. Estudos relacionados

a um possível efeito citotóxico do MHTP foram realizados por Paiva (2014), no qual foi demonstrado que o tratamento de macrófagos peritoneais com MHTP (0,1 - 50  $\mu$ M), por 24h, não alterou a viabilidade celular. Entretanto, as concentrações de 100 ou 200  $\mu$ M foram tóxicas para os macrófagos peritoneais.

Estudos preliminares também foram realizados *in vivo*, no qual a toxicidade aguda do MHTP foi avaliada pela administração de 1000 mg/kg de MHTP, por via oral, e foi observado que a substância não apresentou alterações bioquímicas e/ou comportamentais (FERREIRA, 2014). A partir dessas descobertas, pode-se afirmar que as doses do MHTP utilizadas nesse estudo são consideradas seguras para o animal experimental.

Estudos mostram que a diminuição na produção de surfactante contribui para a instabilidade alveolar e hipoxemia arterial, potencialmente aumentando a formação de edema pulmonar. A análise do lavado broncoalveolar (BALF) indica que os componentes lipídicos e proteicos do material ativo de superfície são alterados em pacientes com a doença (MATTHAY e ZIMMERMAN, 2005). Dessa forma, a destruição generalizada do epitélio alveolar promove a inundação dos espaços alveolares com exsudatos proteicos.

Nesse trabalho demonstramos que o tratamento com o MHTP não foi capaz de interferir na formação de exsudato quando comparado ao grupo de animais LPS tanto em 72 horas quanto em 10 dias, sugerindo que o alcaloide atua a nível de migração celular por inibir, por exemplo, a expressão de moléculas de adesão no endotélio. De forma a comprovar tal hipótese, experimentos adicionais deverão ser realizados. Resultado semelhante também foi encontrado no modelo experimental de LPA realizado por De Oliveira (2014), onde o MHTP também não interferiu na diminuição da formação do exsudato.

A produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 aparecem, concomitantemente, com o infiltrado celular no espaço alveolar na LPA e estão correlacionadas com a fase aguda inicial da resposta inflamatória desempenhando um papel crítico na doença, assim como contribuem para a lesão pulmonar (GIEBELEN et al., 2007; BHATTACHARYA e MATTHAY, 2013).

No presente estudo, observamos que o LPS induziu um aumento significativo na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 no BALF dos animais com LPA quando comparado com os BALF dos animais do grupo basal e que o tratamento com o MHTP nos animais doentes promoveu diminuição na produção dessas citocinas quando as mesmas foram quantificadas no BALF oriundo de 72 horas do desenvolvimento da doença, período considerado o pico da resposta inflamatória aguda nesse protocolo experimental de LPA. Tal resultado sugere que o MHTP apresenta efeito inibitório nas células responsáveis pela produção dessas citocinas na LPA

podendo ser resultado da inibição da migração de células inflamatórias para o sítio inflamado e/ou inibição das células residentes do tecido pulmonar como o próprio epitélio, endotélio e macrófagos residentes. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo realizado por Niu et al. (2014), no qual o pré-tratamento com alcaloides totais reduziu significativamente a concentração de TNF- $\alpha$ .

Vários estudos mostram que TNF- $\alpha$  e IL-6 participam do desenvolvimento precoce dessa doença (BHATIA e MOOCHHALA, 2004; ZHANG et al., 2009; ZHANG et al., 2017) e que seus níveis no tecido pulmonar estão aumentados em pacientes com LPA (MINAMINO, KOMURO, 2006; GANTER et al., 2008). Altos níveis de IL-6 circulante têm sido associados ao aumento da mortalidade em pacientes críticos com SDRA, sepse e trauma (MARSHALL et al., 2002). Dessa forma, a inibição na liberação dessas citocinas inflamatórias pode minimizar os danos teciduais que ocorrem na LPA induzida por LPS (GOLDRING e GOLDRING, 2004; ZHANG et al., 2017) respaldando, portanto, o efeito protetor do MHTP no processo inflamatório na LPA.

Em adição, o TNF- $\alpha$  e a IL-6 participam do recrutamento de leucócitos para os pulmões induzido por LPS (HUANG et al., 2014; LI et al., 2007). Um dos primeiros mediadores endógenos pro-inflamatórios no processo da LPA é o TNF- $\alpha$  (GIEBELEN et al., 2007) e sua ligação com receptores no tecido pulmonar conduz a liberação de enzimas, por exemplo Ik B quinase, causando danos ao parênquima pulmonar (BOUROS et al., 2004), pois induzem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares, resultando no recrutamento de leucócitos para o local inflamatório (LI et al., 2012). Além disso, TNF- $\alpha$  induz a produção de uma série de outras enzimas como COX-2 e iNOS e a síntese da IL-6 que junto com o TNF- $\alpha$  promove febre, maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células *natural killer* (NK) (OLIVEIRA et al., 2011). Dessa forma, TNF- $\alpha$  e IL-6 servem como marcadores preditivos para a gravidade da doença (CHI et al., 2012). Estudos demonstraram que os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  foram considerados para reduzir a lesão pulmonar. Dessa forma, a inibição da produção de citocinas TNF- $\alpha$  é um mecanismo chave no controle da LPA (FENG et al., 2008).

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho com o MHTP na LPA nos levam a sugerir que o alcaloide em questão apresenta efeito imunomodulador diminuindo a produção de citocinas que promovem a inflamação aguda na lesão pulmonar aguda e, portanto, protegendo o animal dos danos teciduais causados pelo LPS.

O efeito do MHTP na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias pode estar relacionado com a inibição de vias de sinalização (por exemplo, a via do NF- $\kappa$ B) que resultam na produção desses mediadores. Dessa forma, faz-se necessário a realização de estudos complementares para a comprovação de tal hipótese.

Em um estudo realizado por Wu et al. (2014) observou-se que a fração de alcaloides totais da planta *Aconitum tanguticum* diminuiu a migração de células totais, neutrófilos e linfócitos bem como diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em um modelo experimental de LPA induzida por LPS. Em adição, Tang et al. (2014) encontrou resultados semelhantes com o tratamento utilizando a substância critotanshinona da planta *Salvia miltiorrhiza*, onde houve uma diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-6 no modelo experimental de LPA induzida por LPS.

O efeito do MHTP também foi avaliado nas alterações histopatológicas características da LPA. Os resultados mostraram que o tratamento com MHTP reduziu o processo de inflamação tecidual devido à diminuição do infiltrado celular e da hemorragia observados por Hematoxilina & Eosina no período de 72 horas. No trabalho realizado por Niu e colaboradores (2014) observou-se também que a fração de alcaloides totais atenuou a inflamação pulmonar com diminuição do edema intersticial, do colapso alveolar, do espessamento da parede alveolar e da infiltração de células inflamatórias em camundongos com LPA induzido por LPS.

Em adição, nosso trabalho avaliou a formação de fibras colágenas entre os grupos analisados e foi observado que existe um aumento na formação dessas fibras no grupo de animais LPS (doentes) quando comparado o grupo basal e que o tratamento com MHTP foi capaz de diminuir esse parâmetro quando comparado ao grupo LPS.

A formação de fibrose também foi analisada em um estudo realizado por Imazu et al. (2011), onde foi observado que o tratamento com ghrelina (um peptídeo n-acilado) diminuiu a formação de fibras colágenas no pulmão de camundongos que apresentavam a LPA induzida por bleomicina.

Considerando que um dos objetivos desse trabalho foi verificar a ação do MHTP na fase resolutiva da doença (décimo dia após o desafio com LPS), observamos um efeito protetor do alcaloide quanto à diminuição na migração de neutrófilos para o espaço alveolar e diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando seu efeito tanto no período agudo (72h) quanto no período crônico (dez dias) da doença.

A remoção de neutrófilos do espaço alveolar é uma necessidade absoluta de ocorrência de resolução (SERHAN e SAVILL, 2005). Embora o destino dos neutrófilos não tenha sido investigado especificamente, é muito provável que sofram apoptose seguida de eferocitose

por macrófagos alveolares (PATEL et al., 2012), o que é crucial para a resolução da resposta inflamatória. A apoptose das células inflamatórias é fundamental para a resolução da inflamação, e a falta para retirada dessas células leva a danos excessivos nos tecidos e lesões sustentadas (D'ALESSIO et al., 2009). A redução dos níveis de neutrófilos foi efetivamente refletida por mudanças em mediadores pró-inflamatórios solúveis, também consistentes com uma mudança significativa no meio alveolar de um estado pró-inflamatório para um estado de pro-resolução.

Um estudo realizado por Patel et al. (2012), mostrou que o BALF dos animais com LPA apresentou uma mudança drástica no perfil das células dentro do espaço alveolar após a lesão. Antes da instilação com ácido, o conteúdo celular era quase em sua totalidade composto por macrófagos alveolares e após a instilação ácida, a proporção de neutrófilos aumentou no BALF mostrando um pico no segundo dia (48h) após o desafio, seguido de uma queda significativa ao dia 3(72h) e ausência efetiva no dia 10. Além disso, os autores também encontraram um aumento gradual na proporção de linfócitos no décimo dia com diminuição do número de neutrófilo.

Tais resultados corroboram com os dados apresentados nesse trabalho, onde foi observada uma diminuição na presença de neutrófilos em 10 dias, assim como, é possível observar um aumento na presença de linfócitos quando comparado o tempo de 72 horas e o de 10 dias.

Embora o influxo e a ativação de neutrófilos no pulmão sejam importantes na patogênese da LPA, pesquisas mostram que os macrófagos também apresentam um papel importante para a modulação das respostas inflamatórias, a lesão pulmonar resultante e, principalmente, a resolução dessas respostas (JOHNSTON et al., 2012).

Os macrófagos alveolares desempenham um papel crítico nas respostas imunes inatas no pulmão, devido a sua capacidade de reconhecer patógenos pelos receptores *Toll-like*, bem como por sua capacidade de produzir uma ampla gama de mediadores pro-inflamatórios (exemplo: IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ) ou anti-inflamatórios (por exemplo: IL-10) e quimiocinas, fagocitose apoptótica de neutrófilos e destruição de patógenos. No pulmão e no espaço alveolar, a inflamação está intimamente ligada ao fenótipo dos macrófagos ativados que participam do início de respostas inflamatórias e são denominados macrófago tipo 1 (M1, pro-inflamatório) e macrófago do tipo 2 (M2, anti-inflamatório) (GALVÁN-PEÑA et al., 2014; HEROLD, MAYER e LOHMEYER, 2011; D'ALESSIO et al., 2009).

Na resposta de reparo tecidual, os macrófagos M2 realizam a eliminação de fatores de prejudiciais e a restauração da integridade do tecido danificado (WERMUTH e JIMENEZ,

2015). A resolução da inflamação e lesão pulmonar é um processo ativo e coordenado, dependente da depuração de patógenos, sinalização pró-inflamatória reduzida e remoção de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios, bem como transição para um ambiente anti-inflamatório e reparativo. Os macrófagos residentes e recrutados são fundamentais para a resolução da inflamação pulmonar com a sua capacidade de transição de um ambiente pró-inflamatório para um anti-inflamatório e um fenótipo de reparação tecidual (NEIL et al., 2014; HEROLD, MAYER e LOHMEYER, 2011; JANSSEN et al., 2011; DAS et al., 2015).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que existe uma mudança de perfil celular na LPA, onde inicialmente é encontrada grande quantidade de neutrófilos e, em uma fase crônica, maior presença de macrófagos. Tal resultado pode ser observado através dos dados de celularidade encontrados nos grupos LPS e MHTP, sugerindo, portanto, uma mudança de um perfil inflamatório na fase aguda para um perfil de reparação e regeneração tecidual na fase mais crônica. Entretanto se faz necessário experimentos adicionais para caracterizar o tipo de macrófago existente no tecido pulmonar após o tratamento com o MHTP.

Nesse contexto, a manutenção de macrófagos na região bronco-alveolar, embora essas células estejam relacionadas aos eventos iniciais da LPA, pode ser importante para o processo de resolução e reparação da doença (AGGARWAL et al., 2014). Estudos realizados utilizando o BALF de humanos com LPA demonstraram que o aumento do número de macrófagos alveolares de fenótipo celular maduro (M2) foram associados a resultados favoráveis, sendo células essenciais para o retorno do organismo a homeostase (STEINBERG et al., 1994; ROSSEAU et al., 2000).

Em estudos realizados por D'Alessio e colaboradores (2009) observou-se que os linfócitos parecem não apresentar um papel importante na patogênese da lesão devido à gravidade da lesão ocorrer até o 4º dia após o desafio com LPS e o número dessas células nesse tempo ser semelhante ao encontrado nos animais do grupo controle. Entretanto, na fase crônica da doença, os autores observaram a presença de Tregs (linfócitos T reguladores), indicando que a presença dessas células no pulmão estejam realizando a transição de um ambiente pró-inflamatório para uma resolução da lesão.

No nosso trabalho demonstramos que houve um aumento na quantidade de linfócitos no BALF de animais com LPA no período de 10 dias (fase crônica da doença) em relação ao período de 72 horas (fase aguda). Entretanto não foi possível, nesse trabalho, caracterizar o tipo de linfócito, portanto se faz necessário estudos complementares para a caracterização

celular para comprovar a hipótese de que o MHTP estaria induzindo o aumento de células Tregs no espaço alveolar dos animais com LPA.

Patel et al. (2012) observaram aumento na proporção de linfócitos dentro do espaço alveolar no período de 10 dias da lesão, o que destaca o envolvimento potencial de células T reguladoras na resolução da LPA.

Outro fator importante na LPA, além da sobrevivência, é o ganho ou perda de peso corporal dos animais. Para tais análises, é recomendado o aumento na concentração do LPS para 5mg/mL a ser administrado no animal (KLAFF et al. 2012). Em um estudo realizado por D'Alessio et al. (2009) onde avaliaram a sobrevivência e peso dos animais no período de 10 dias, os autores demonstraram que a mortalidade no animal com LPS foi 15%-20% maior do que a do grupo controle e, os animais do grupo LPS apresentaram diminuição da atividade física, piloereção e perda de peso sustentada até o décimo dia. Entretanto, os animais do grupo controle que não apresentavam a doença aumentaram de peso normalmente.

Nosso estudo mostrou que na fase inicial (72 horas), os animais com LPS diminuem consideravelmente o peso e apresentam diferenças na aparência (por exemplo: piloereção e dificuldade para respirar), apesar de não ter sido observada mortalidade durante esse período. Entretanto na fase mais tardia (período de 10 dias), foi observado que os animais tratados com MHTP apresentaram aumento de peso e a aparência geral dos animais tratados se assemelhou à do grupo basal, esses dados sugerem que o MHTP, devido aos seus efeitos imunomodulador e anti-inflamatório, auxilia na recuperação do animal com LPA. Corroborando com nossos resultados, Niu e colaboradores (2014) demonstrou que fração de alcaloides totais da *Corydalis denticulato-bracteata* foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais com LPA e, os resultados obtidos no trabalho de Patel et al. (2012) onde a LPA foi induzida por aspiração ácida observou-se que, durante os primeiros dois dias, os animais apresentaram movimento reduzido, piloereção, diferença na respiração e perda de peso sustentada até o terceiro dia de desafio sugerindo lesão pulmonar.

Apesar dos resultados das alterações histopatológicas ter apresentado uma diminuição significativa nos parâmetros avaliados no tempo de 72 horas, não foi encontrada diferença estatística (com a coloração de hematoxilina & eosina) entre o grupo LPS e o grupo tratado com MHTP no décimo dia da lesão. Entretanto, observando a formação de fibrose, é possível constatar que o tratamento com MHTP auxilia na diminuição na deposição de fibras colágenas quando comparado ao grupo LPS. Esse resultado pode ser analisado em associação com a diminuição de macrófagos no tempo de 10 dias nos animais tratados com o MHTP. Os macrófagos, como citado anteriormente, são importantes células no desenvolvimento da

fibrose pulmonar, pois produzem agentes quimiotáticos para neutrófilos e TGF- $\beta$  que induz fibroblastos e miofibroblastos a produzirem várias proteínas de matriz (CASSETTA, CASSOL e POLI, 2011).

Resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado por Patel et al. (2012), onde os autores mostram que a presença de fibrose diminuiu a elastância pulmonar e que não retornou completamente aos valores normais no período de 10 dias da doença embora a lesão alveolar generalizada ter ocorrido em 48h, houve redução nas alterações alveolares no décimo dia. Segundo os autores, o perfil celular intersticial no décimo dia consistiu principalmente em células mononucleares e linfócitos.

Diante do exposto, observamos que o MHTP apresentou ação imunomoduladora e anti-inflamatória no modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos machos da linhagem BALB/c atuando na fase inicial da doença e na fase mais tardia da doença. Os resultados com o tratamento com o MHTP na LPA nos indicam que existe uma transição de um ambiente pró-inflamatório nos alvéolos para uma fase de resolução e reparo favoráveis. Desta forma, podemos inferir que o MHTP desempenha um papel fundamental na mediação da resolução de lesão pulmonar na LPA via modulação das respostas imunes com diminuição da migração de neutrófilos, mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$  e IL-6, das alterações histopatológicas características da LPA.

## **6. CONCLUSÃO**

Nesse estudo, foi possível observar os efeitos imunomodulares e anti-inflamatórios do MHTP na lesão pulmonar induzida por LPS em camundongos da linhagem BALB/c devido à diminuição na migração de neutrófilos para a região alveolo-capilar, na produção de citocinas pro-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-6, nos períodos de 72h (fase aguda) e 10 dias (fase crônica). Em adição, o MHTP induziu uma melhora nos padrões de lesão pulmonar quando das avaliações realizadas nos cortes histológicos. Tais melhoras dizem respeito à diminuição na migração de células inflamatórias no tecido pulmonar induzido pelo LPS bem como diminuição na deposição de fibrose no espaço alveolar nos períodos de 72 h e 10 dias. Além disso, foi possível observar que o MHTP promoveu uma melhora significativa na fisionomia dos animais com a diminuição da piloereção e com o aumento de peso dos animais.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, N.R., KING, L.S., D’ALESSIO, F.R. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. **AJP Lung Cell Mol Physiol.** v.306(8), 2014.

ALBIGER, B., DAHLBERG, S., HENRIQUES-NORMARK, B., NORMARK, S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptor. **J Intern Meds.** v. 261(6), p-511-528, 2007.

ALTEMEIER, W.A., MATUTE-BELLO, G., FREVERT, C.W., KAWATA, Y., KAJIKAWA, O., MARTIN, T.R., GLENNY, R.W. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 28, p-L533-L542, 2004.

ALTEMEIER, W. A., HUNG, C. F., MATUTE-BELLO, G. Acute Lung Injury and Repair. p. 5–24, 2017.

AMAT, M., ELIAS, V., LLOR, N. A General Methodology for the Enantioselective Synthesis of 1-Substituted Tetrahydroisoquinoline Alkaloids. **Euro JOC.** V.21, p-4017 – 4026, 2010.

AMATO, M.B., CARVALHO, C.C. et al. Ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda(LPA)/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo(SDRA)- III Consenso Brasileiro de Ventilação Mecânica. **J Bras Pneumol.** V. 33(Supl 2), p-S119-S127, 2007.

AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D., ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Rev. Immunol.** v.30, p-459–489, 2012.

ASHBAUGH, D.G., BIGELOW, D.B., PETTY, T.L., LEVINE, B.E. Acute respiratory distress in adults. **Lancet.** V.2, p-319–23, 1967.

AWUAH, E, CAPRETTA, A. Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **The Journal of Organic Chemistry.** v.75, p.5627-5634, 2010.

BAE, D.S., KIM, Y. H., PAN, C. H., NHO, C. W., SAMDAN J., YANSAN, J., LEE, J. K. Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. **BMB reports.** V. 45(2): 108-113, 2012.

BANDEIRA-MELO, C., PIUVEZAM, M.R., BOZZA, P.T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodioides* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology.** v. 6, p.1152–1160, 2006.

BASTARACHE, J. A., BLACKWELL, T. S. Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome. **Disease Models & Mechanisms.** V.2(5-6), p- 218–223, 2009.

BEZERRA-SANTOS, C.R., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOSA-FILHO, J.M., BANDEIRA-MELO, C., PIUVEZAM, M.R., BOZZA, P.T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int. Immunopharmacol.** V.6, p-1152-1160, 2006.

BHADRA, K., KUMAR, G. S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. **Med Res Rev.** v.31(6), p-821-62, 2011.

BHARGAVA, M., WENDT, C.H. Biomarkers in acute lung injury. **Transl. Res.** v. 159, p-205–217, 2012.

BHATIA, M., MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **The Journal of pathology.** V.202, p- 145-156, 2004.

BHATIA, M., ZEMANS, R. L., JEYASEELAN, S., Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. **J. Respir. Cell Mol. Biol.** V.46, p- 566–572, 2012.

BHATTACHARYA, J., MATTHAY, M.A. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. **Annu. Rev. Physiol.**v. 75,p- 593-615, 2013.

BOUROS, D., M.G. ALEXANDRAKIS, K.M. ANTONIOU, et al. The clinical significance of serum and bronchoalveolar lavage inflammatory cytokines in patients at risk for acute respiratory distress syndrome. 2004.

BUCHANAN, M. S., DAVIS, R. A., DUFFY, S., AVERY, V. M., QUINN, R. J. Antimalarial Benzylisoquinoline Alkaloid from the Rainforest Tree *Doryphora sassafrás*. **Journal of Natural Products.** V. 72 (8), p-1541-1543, 2009.

CASSETTA L, CASSOL E, POLI G. Macrophage Polarization in Health and Disease. **Sci World J.** v.11, p-2391-2402, 2011.

CEPKOVA, M., MATTHAY, M.A. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Journal of Intensive Care Medicine.** v.21, p- 119–143, 2006.

CHEN, Y., YAO, Y., SUMI, Y., et al. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation. **Sci Signal.** V.3(125), p-45, 2010.

CHI G, WEI M, XIE X, SOROMOU LW, LIU F, ZHAO S. Suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. **Inflammation.** V. 36(2), p-501-511, 2013.

CHI, G., WEI, M., XIE, X., SOROMOU, L. W., LIU, F., ZHAO, S. Suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B Pathways by Limonene Contributes to Attenuation of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Acute Lung Injury. **Inflammation**, 2012.

CHOPRA, M., REUBEN, J. S., SHARMA, A. C. Acute Lung Injury: Apoptosis and Signaling Mechanisms Experimenta. **Biology and Medicine.** V. 234. P-361-371, 2009.

CHUN, C.D., LILES, W.C., FREVERT, C.W., GLENNY, R.W., ALTEMEIER, W.A. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor-3-induced lung inflammation via a MyD88-dependent, TLR4-independent pathway: a controlled animal study. **BMC Pulm Med.** p-10-57, 2010.

CORDEIRO, M. B. **Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012.

COSTA, H.F.; BEZERRA-SANTOS, C.R.; BARBOSA FILHO, J.M.; MARTINS, M.A.; PIUVEZAM, M.R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **Int. Immunopharmacol.** V. 8, p- 519-525, 2008.

CROSS, L. J., MATTHAY, M.A. Biomarkers in acute lung injury: insights into the pathogenesis of acute lung injury. **Crit. Care Clin.** V.27, p- 355–377, 2011.

D’ALESSIO, F. R., TSUSHIMA, K., AGGARWAL, N. R., WEST, E. E., WILLETT, M. H., BRITOS, M. F., PIPELING, M. R., BROWER, R. G., TUDER, R. M., MCDYER, J. F., KING, L. S. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. **The Journal of Clinical Investigation.** V 119, n 10. 2009.

DARHLEM, P., VAN AALDEREN, W.M.C., BOS, A.P. Pediatric acute lung injury. **Paediatric respiratory reviews.** V. 8. P-348-362, 2007.

DAS, A., SINHA, M., DATTA, S., ABAS, M., CHAFFEE, S., K. SEN, C. K., ROY, S. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. **The American Journal of Pathology.** v. 185, n. 10, 2015.

DE LUCA, L., BARRECA, M.L., FERRO, S., CHRIST, F., IRACI, N., GITTO, R., MONFORTE, A.M., DEBYSER, Z., CHIMIRRI, A. Pharmacophore-Based Discovery of Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions between HIV-1 Integrase and Cellular Cofactor LEDGF/p75. **ChemMedChem.** v. 4(8), p-1311-1316, 2009.

DE OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahidroisoquilínico.** 113 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, **Wiley**, Chichester, p. 315, 2002.

DIAS, C. S., BARBOSA-FILHO, J. M., LEMOS, V.S., CÔRTEZ S.F. Mechanisms Involved in the Vasodilator Effect of Curine in Rat Resistance Arteries. **Planta Med.** v. 68, 2002.

DUSHIANTHAN, A., GROCOTT, M. P. W., POSTLE, A. D., CUSACK, R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. **Postgraduate Medical Journal.** v. 87. p- 612-622, 2011.

FAFFE, D. S., SEIDL, V. R., CHAGAS, P. S., GONÇALVES DE MORAES, V. L., CAPELOZZI, V. L., ROCCO, P. R., ZIN, W. A. Respiratory effects of lipopolysaccharide-

induced inflammatory lung injury in mice. **European Respiratory Journal**. v.15(1), p-85-91, 2000.

FENG Q, REN Y, WANG Y, et al. Anti-inflammatory effect of SQC-b-CD on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **J Ethnopharmacol**. P-118:51, 2008.

FUKAO, T., KOYASU, S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol**. v. 24(7), p- 358-363, 2003.

GALVÁN-PEÑA, S., O'NEILL, L.A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Front Immunol**. v.5, p- 420, 2014.

GANTER, M.T., ROUX, J., MIYAZAWA, B., HOWARD, M., FRANK, J.A., SU, G., SHEPPARD, D., VIOLETTE, S.M., WEINREB, P.H., HORAN, G.S., MATTHAY, M.A., PITTEP, J.F. Interleukin-1beta causes acute lung injury via alphavbeta5 and alphavbeta6 integrin- dependent mechanisms. **Circ. Res**. v. 102, p- 804–812, 2008.

GAO, M., CHEN, L., YU, H., SUN, Q., KOU, J., YU, B. Diosgenin down-regulates NF- $\kappa$ B p65/p50 and p38MAPK pathways and attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **International Immunopharmacology**. v.14(2), p-240-245, 2012.

GIEBELEN, I.A., VAN WESTERLOO, D.J., LAROSA, G.J., DE VOS, A.F., VAN DER POLL, T. Local stimulation of alpha7 cholinergic receptors inhibits LPS-induced TNF- alpha release in the mouse lung. **Shock**. v. 28, p-700-703, 2007.

GOLDRING, S.R., GOLDRING, M.B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. **Clin Orthop Relat R**. v.S27, 2004.

GROENEVELD, A. B. J. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Vascular Pharmacology**. p-247– 256, 2003.

GROMMES, J., SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**. v.17 p. 293–307, 2011.

GUHA, M., MACKMAN, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. **J Biol Chem**. v.277(35), p- 32124-3232, 2002.

HEROLD S, MAYER K, LOHMEYER J. Acute lung injury: how macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair. **Front Immunol**. v. 2. p. 65, 2011.

HOLGATE, S.T, POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**. v.3, p-218–230, 2008.

HU, Y., MAO, A., YU, Z., HE, K. Anti-endotoxin and anti-inflammatory effects of Chinese herbal medicinal alkaloid ingredients in vivo. **Microbial Pathogenesis**. v. 99. p- 51-55, 2016.

HUANG, G., DENG, J., CHEN, C., et al. Methanol Extract of *Antrodia camphorata* Protects against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK Pathways in Mice. 2014.

IMAZU, Y., YANAGI, S., MIYOSHI, K., TSUBOUCHI, H., YAMASHITA, S., MATSUMOTO, N., ASHITANI, J., KANGAWA, K., NAKAZATO, M. Ghrelin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury by protecting alveolar epithelial cells and suppressing lung inflammation. **European Journal of Pharmacology**. v. 672, p- 153–158, 2011.

JANSSEN, W.J., BARTHEL, L., MULDROW, A., OBERLEY-DEEGAN, R.E., KEARNS, M.T., JAKUBZICK, C., HENSON, P.M. Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 184, p-547–560, 2011.

JIA, Y., CHEN, K., LIN, P., LIEBER, G., NISHI, M., YAN, R., WANG, Z., YAO, Y., LI, Y., WHITSON, B. A., DUANN, P., LI, H., ZHOU, X., ZHU, H., TAKESHIMA, H., HUNTER, J. C., MCLEOD, R. L., WEISLEDER, N., ZENG, C., MA, J. Treatment of acute lung injury by targeting MG53-mediated cell membrane repair. **Nature Communications**, 2014.

JOHNSON, E.R., MATTHAY, M.A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. **J Aerosol Med Pulm Drug Deliv**. v.23 (4), p-243-252, 2010.

JOHNSTON, L. K., RIMS, C. R., GILL, S. E., MCGUIRE, J. K., ANNE M. MANICONE, A. M. Pulmonary Macrophage Subpopulations in the Induction and Resolution of Acute Lung Injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v 47, 2012.

KAMINSKY, D. Sistema Respiratório. **Elsevier Brasil**. v.3, p 344, 2014.

KANG, Y.J, LEE, B.K., LEE, Y.S., HAN, G., MIN, K., HYO, J., HYANG, S., WON, S., HYE, J., HYE, S., DUCK, H., KI, C. Suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase gene expression by THI 52, a new synthetic naphthyl-benzylisoquinoline alkaloid. **Biochem Pharmacol**. v.65(3), p-457-464, 2003.

KEMP, J.P. Recent advances in the management of asthma using leukotriene modifiers. **Am J Respir Med**. v. 2, p-139–156, 2003.

KIM, K. H., LEE, I. K., PIAO, C. J., CHOI, S. U., LEE, J. H., KIM, Y. S., LEE, K. R. **Bioorg. Med. Chem. Lett**. v. 20, p- 4487-4490, 2010.

KIM, Y., LEE, S., KIM, M.J., KANG, B. C., DHAKAL, H., CHOI, Y. A., PARK, P. H., CHOI, H., SHIN, T. Y., CHOI, H.G., KWON, T.K., KHANG, D., KIM, S. H., Tyrosol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response and maintaining the alveolar capillary barrier. **Food and Chemical Toxicology**, 2017.

KLAFF, L.S., GILL, S.E., WISSE, B.E., MITTELSTEADT, K., MATUTE-BELLO, G., CHEN, P., et al. Lipopolysaccharide-induced lung injury is independent of serum vitamin d concentration. **PLoS ONE**. v.7, 2012.

KOTHARI, N.; KESHARI, R.S.; BOGRA, J.; KOHLI, M.; ABBAS, H.; MALIK, A.; DIKSHIT, M.; BARTHWAL, M.K. Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. **Journal of Critical Care**. v.26, p-435.e1–435.e7, 2011.

KUO, Y.C., LIN, W.C., CHIANG, I.T., CHANG, Y.F., CHEN, C.W., SU, S.H., CHEN, C.L., HWANG, J.J. Sorafenib sensitizes human colorectal carcinoma to radiation via suppression of NF-kappaB expression in vitro and in vivo. **Biomed Pharmacother**. v. 66(1), p-12–20, 2012.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacol Pharmacy**. v.4 (3), p-17-31, 2013.

LEIKAUF, G. D., MCDOWELL, S. A., WESSELKAMPER, S. C., HARDIE, W. D., LEIKAUF J. E., KORFHAGEN, T. R., PROWS, D. R. Acute Lung Injury: Functional Genomics and Genetic Susceptibility. **Chest Journal**. p-70S-75S, 2002.

LI, C. Q., HE, L.C., JIN, J.Q. Atractylenolide I and atractylenolide III inhibit Lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  and NO production in macrophages. **Phytother. Res**. v.21, p-347–353, 2007.

LI, X. J., LIU, D. P., CHEN, H. L., PAN, X. H., KONG, Q. Y., PANG, Q. F. Lactoferrin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**. v.12(2), p-460-4, 2012.

LI, Y., YEH, C., YANG, M., KUAN, Y. Luteolin Suppresses Inflammatory Mediator Expression by Blocking the Akt/NF $\kappa$ B Pathway in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

LIU, Y., SONG, M., ZHU, G., XI, X., LI, K., WU, C., HUANG, L. Corynoline attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by activating Nrf2. **International Immunopharmacology**. v.48 p. 96–101, 2017.

MACCALLUM, N., EVANS, T. Acute lung injury. **Anaesthesia & intensive care medicine**. v. 5. p- 389-391, 2004.

MACKAY, A.; AL-HADDAD, M. Acute lung injury. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. 487-489, 2010.

MARSHALL, R. P., WEBB, S., HILL, M. R., HUMPHRIES, S. E., LAURENT, G. J. Genetic polymorphisms associated with susceptibility and outcome in ARDS. **Chest Journal**, v. 121, n. 3, p. 68S-9S, 2002.

MATSUDA, A., YANG W.L., JACOB A., AZIZ M., MATSUO S., MATSUTANI T., UCHIDA E., WANG P. FK866, a visfatin inhibitor, protects against acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice via NF-kappaB pathway. **Ann. Surg**. v.259 (5), p-1007-1017, 2014.

MATTEI, P., BOEHRINGER, M., DI GIORGIO, P., FISCHER, H., HENNIG, M., HUWYLER, J., KOÇER, B., KUHN, B., LOEFFLER, B. M., MACDONALD, A., NARQUIZIAN, R., RAUBER, E., SEBOKOVA, E., SPRECHER, U. Discovery of Carmegliptin: A Potent and Long-Acting Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.20, p-1109-1113, 2010.

MATTHAY, M. A., WARE, L. B., ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Clinical Investigation.** v.122(8), p-2731–2740, 2012.

MATTHAY, M.A., ZIMMERMAN, G.A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. **Am Journal Respiratory Cell Molecular Biology.** v.33, p-319–327, 2005.

MATUTE-BELLO, G., DOWNEY, G., MOORE, B. B., GROSHONG, S. D., MATTHAY, M. A., SLUTSKY, A. S., KUEBLER, W. M. Acute Lung Injury in Animals Study Group. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology.** v.44, p- 725–738, 2012.

MATUTE-BELLO, G., FREVERT, C. W., MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular.** v.295, p- L379–L399, 2008.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, JR. C. Innate immunity: the virtues of a monoclonal system of recognition. **Cell** v.9, p- 295-298, 1997.

MEI, S.H., MCCARTER, S.D., DENG, Y., PARKER, C.H., LILES, W.C., STEWART, D.J. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. **PLoS Med.** v. 4, p. 269, 2007.

MINAMINO, T., KOMURO, I. Regeneration of the endothelium as a novel therapeutic strategy for acute lung injury. **J. Clin. Invest.** v.116, p-2316–2319, 2006.

MINOR, D.L., WYRICK, S.D., CHARIFSON, P.S., WATTS, V.J., NICHOLS, D.E., MAILMA, R.B. Synthesis and Molecular Modeling of 1-Phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and Related 5,6,8,9 Tetrahydro-13bHdibenzo[a,h]quinolizines as D1 Dopamine Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry.** v.37 (25), p -4317–4328, 1994.

MORRIS, M., LI, L. Molecular Mechanisms and Pathological Consequences of Endotoxin Tolerance and Priming. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis.** v.60, p-13–18, 2012.

MUNCHHOF, M. J., MEYERS, A. I. A Novel Route to Chiral, Nonracemic 1-Alkyl- and 1-Aryl-Substituted Tetrahydroisoquinolines. Synthesis of (-)-Salsolidine and (+)-Cryptostyline II. **J. Org. Chem.** v.60 (22), p- 7086–7087, 1995.

NAKAJIMA, T., SUAREZ, C.J., LIN, K.W., JEN, K.Y., SCHNITZER, J.E., MAKANI, S.S., PARKER, N., PERKINS, D.L., FINN, P. W. T Cell Pathways Involving CTLA4 Contribute To a Model of Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology.** v.184, p-5835-5841, 2010.

National Heart, Lung and Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network, Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR *et al.* Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. **N Engl J Med.** v.354, p-2564–75, 2006.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.** v.79 (3), p-629-661, 2016.

NIU, X., HU, H., LI, W., LI, Y., HUANG, H., MU, Q., YAO, LI, H. Protective effect of total alkaloids on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Journal of Surgical Research.** v. 189., p-126-134, 2014.

O’KANE, C.M., MCKEOWN, S.W., PERKINS, G.D. et al. Salbutamol up-regulates matrix metalloproteinase-9 in the alveolar space in the acute respiratory distress syndrome. **Crit Care Med.** v.37, p-2242–9, 2009.

OJIMA, I. Mini-Perspective: Modern Natural Products Chemistry and Drug Discovery. **J Med Chem.** v.51(9), p- 2587–2588, 2008.

OLIVEIRA, C. M. SAKATA, R. K., ISSY, A. M., GEROLA, L. R., SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol.** v. 61, n 2, p-255-265, 2011.

PAIVA FERREIRA, L.K.D. **Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica e genotoxicidade do alcaloide sintético MHTP [1-(3- metoxi- 4-hidroxifenil)-7- metoxi-1,2,3,4,- tetrahidroisoquinolina]**. Trabalho de conclusão de graduação: Farmácia. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.

PAREKH, D., DANCER, R. C., THICKETT, D. R. Acute lung injury. **Clinical Medicine.** v. 11, n. 6, p- 615-8, 2011.

PARK, J.E., KANG, Y.J., PARK, M.K., YOUNG, S., KIM, H. J., SEO, H. G., LEE, J. H., SOOK, H., CHOI, Y., SHIN, J. S., LEE, H. W., AHN, S. K., CHANG, K. C. Enantiomers of higenamine inhibit LPS-induced iNOS in a macrophage cell line and improve the survival of mice with experimental endotoxemia. **Int Immunopharmacol.** v.6(2), p-226-233, 2006.

PATEL, B. V., WILSON, M. R., TAKATA, M. Resolution of acute lung injury and inflammation – a translational mouse model. **Eur Respir J.** v. 39(5), p- 1162–1170, 2012.

PINTO, G. C. (Trabalho de conclusão de graduação- Instituto de Química). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, 2011.

POLOSA, R. An overview of chronic severe asthma. **Intern Med J.** v.38, p-190–198, 2008.

PROWS, D. R., WINTERBERG, A. V., GIBBONS, W. J., BURZYNSKI, B. B., LIU, C., NICK, T. G. Reciprocal backcross mice confirm major loci linked to hyperoxic acute lung injury survival time. **Physiol Genomics.** v. 38, p- 158–168, 2009.

RAGHAVENDRAN, K., PRYHUBER, G. S., CHESS, P. R., DAVIDSON, B. A., KNIGHT, P. R., NOTTER, R. H. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Current Medicinal Chemistry.** v.15(19), p- 1911–1924, 2008.

- RAMALLO, G., MARQUES, T., PRATS, N., BELETA, J., KUNKEL, S.L., GODESSART, N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. **J Immunol.** v.169(11), p-6467-73, 2002.
- RANDHAWA, R.; BELLINGAN, G. Acute lung injury. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine.** v. 8, p. 477-480, 2007.
- REISS, L. K., UHLIG, U., UHLIG, S. Models and mechanisms of acute lung injury caused by direct insults. **European Journal of Cell Biology.** p-590-601, 2011.
- RIBEIRO-FILHO, J., CALHEIROS, A.S., VIEIRA-DE-ABREU, A., DE CARVALHO, K.I.M., MENDES, D. DA SILVA, MELO, C.B., MARTINS, M.A., DIAS, C. DA SILVA, PIUVEZAM, M.R., BOZZA, P.T. Curine inhibits eosinophil activation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.273, 2013.
- ROBERTS, M. F., WINK, M. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. **Plenum Press**, 1998.
- ROSSEAU, S., HAMMERL, P., MAUS, U., WALMRATH, H.D.,SCHUTTE, H., GRIMMINGER, F., SEEGER, W., LOHMEYER, J. Phenotypic characterization of alveolar monocyte recruitment in acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v.279, p-L25–L35, 2000.
- ROTTA, A. T., PIVA, J. P., ANDREOLIO, C., DE CARVALHO, W. B., GARCIA, P. C. R. Progressos e perspectivas na síndrome do desconforto respiratório agudo em pediatria. **Rev Bras Ter Intensiva**, 2015
- SERHAN, C.N., SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol.** v. 6(12), p-1191–7, 2005.
- STÖCKIGT, J., ANTONCHICK, A. P., WU, F., WALDMANN, H. The Pictet-Spengler Reaction in Nature and in Organic Chemistry. **Angew Chem Int Ed Engl.** v.50(37), p-8538-64, 2011.
- SWEENEY, R. M., GRIFFITHS, M. & MCAULEY, D. Treatment of acute lung injury: current and emerging pharmacological therapies. **Semin. Respir. Crit. Care Med.** v.34, p-487–498, 2013.
- TAKEDA, K., KAISHO, T., AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev. Immunol.** v. 21, p-335-376, 2003.
- TANG, M., TIAN, Y., LI, D., LV, J., LI, Q., KUANG, C., HU, P., WANG, Y., WANG, J., SU, K., WEI, L. TNF-alpha mediated increase of HIF-1alpha inhibits VASP expression, which reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury (ALI), 2014.
- TORRISI, C., BISBOCCI, M., INGENITO, R., ONTORIA, J. M., ROWLEY, M., SCHULTZ-FADEMRECHT, C., TONIATTI, C., JONES, P. BIOORG. Discovery and SAR

of novel, potent and selective hexahydrobenzothiazidinone inhibitors of poly (ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1). **Med. Chem. Lett.** v. 20, p-448-452, 2010.

TRACEY D, KLARESKOG L, SASSO EH, SALFELD JG, TAK PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacol Ther.** v.117, p-244-279, 2008.

TRONDE A, BOSQUILLON C, FORBES B. Drug Absorption Studies. Berlin: Springer US VII, p.135–163, 2007.

TSOYI, K., KIM, H.J., SHIN J.S., et al. HO-1 and JAK2/STAT-1 signals are involved in preferential inhibition of iNOS over COX-2 gene expression by newly synthesized tetrahydroisoquinoline alkaloid, CKD712, in cells activated with lipopolysaccharide. **Cell Signal.** v.20, p- 1839–1847, 2008.

UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Curr Opin Immunol.** v.14, p- 103-110, 2002.

WALKEY, A. J., SUMMER, R., HO, V., ALKANA P. Acute respiratory distress syndrome: epidemiology and management approaches. **Clinical Epidemiology.** p-159–169, 2012.

WAN, J., LIU, T., MEI, L., LI, J., GONG, K., YU, C., LI, W. Synergistic antitumour activity of sorafenib in combination with tetrandrine is mediated by reactive oxygen species (ROS)/Akt signaling. **British Journal of Cancer.** v.109, p-342–350, 2013.

WAN, L.M., TAN, L., WANG, Z.R., LIU, S.X., WANG, Y.L., LIANG, S.Y., ZHONG, J.B., LIN, H.S. Preventive and therapeutic effects of Danhong injection on lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice. **Journal of ethnopharmacology.** v. 149, p- 352-359, 2013.

WANG, C., ZENG, L., ZHANG, T., LIU, J., WANG, W. Casticin inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Eur J Pharmacol.** v.789, p-172-178, 2016.

WARE, L. B., MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med.** v.342(18), p-1334-49, 2000.

WARE, L.B. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Sem.Respir.Crit.Care Med.** v.27, p-337–349, 2006.

WARE, L.B. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Seminars in respiratory and critical care medicine.** v.27, p-337-349, 2008.

WERMUTH, P. J., JIMENEZ, S. A. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. **Clinical and Translational Medicine** v. 4, 2015.

WHEELER, A. P., BERNARD, G. R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. **The Lancet.** v.369, p- 1553–65, 2007.

WHITEHOUSE, M. W., FAIRLIE, D. P., THONG, Y. H. Anti-inflammatory activity of the isoquinoline alkaloid, tetrandrine, against established adjuvant arthritis. **Agents Actions**. v.4, p-123-127, 1994.

WIEDEMANN HP, WHEELER AP, BERNARD GR, et al. Comparison of two fluidmanagement strategies in acute lung injury. **N Engl J Med** . v. 354, p-2564-2575, 2006.

WU, G., DU, L., ZHAO, L., et al. The total alkaloids of *Aconitum tanguticum* protect against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. **J Ethnopharmacol**. v.155(3), p-1483-1491, 2014.

YANG, F., CAO, Y., ZHANG, J., YOU, T., ZHU, L. Glucocalyxin A improves survival in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 1, p. 147–153, 2017.

YANG, W., QIANG, D., ZHANG, M., MA, L., ZHANG, Y., QING, C., XU, Y., ZHEN, C., LIU, J., CHEN, Y. Isoforskolin pretreatment attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in animal models. **International Immunopharmacology**. v. 6, p- 683-92, 2017.

ZHANG, G., GHOSH, S. Toll-like receptor–mediated NF- $\kappa$ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J Clin Invest**. v.107(1), p-13-19, 2001.

ZHANG, X., SONG, K., XIONG, H., LI, H., CHU, X., DENG, X. Protective effect of florfenicol on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **Int Immunopharmacol**. v.9, p-525-1529, 2009.

ZHANG, J. L., HUANG, W. M., ZENG, Q. Y. Atractylenolide I protects mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **European Journal of Pharmacology**. v. 765, p- 94–99, 2015.

ZHAO, C., SUN, J., FANG, C., TANG, F. 1,8-cineol attenuates LPS-induced acute pulmonary inflammation in mice. **Inflammation**. v. 37, n. 2, p- 566–572, 2014.

## APÊNDICE



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito imunomodulador do 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina em um modelo murino de lesão pulmonar aguda (LPA)”, protocolo nº 014/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Marcia Regina Piuvezam – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 19/04/2017.

Vigência do Projeto	2016 - 2018
Espécie/linhagem	Camundongos isogênico Balb/C
Número de animais	188
Idade/peso	6-8 semanas (25-30 g)
Sexo	Machos
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB