



Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Produtos

Naturais e Sintéticos Bioativos



**Efeito do alcaloide Curina nas vias de transdução de sinais TLR4/NFκB
em granulócitos do pulmão no modelo experimental de Lesão Pulmonar
Aguda**

Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira

Orientanda

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Orientadora

João Pessoa – PB

Fevereiro / 2020

Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira

**Efeito do alcaloide Curina nas vias de transdução de sinais TLR4/NFκB
em granulócitos do pulmão no modelo experimental 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 requisito para a obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, na área de concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

João Pessoa – PB
Fevereiro / 2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383e Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva.

Efeito do alcaloide Curina nas vias de transdução de sinais TLR4/NFkB em granulócitos do pulmão no modelo experimental de Lesão Pulmonar Aguda / Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira. - João Pessoa, 2020.
93 f.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.
Dissertação (Mestrado) -
UFPB/CCS.

1. lesão pulmonar aguda. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Curina. 4. fator de transcrição NFkB. 5. receptor do tipo toll 4 TLR4. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Título.

UFPB/BC

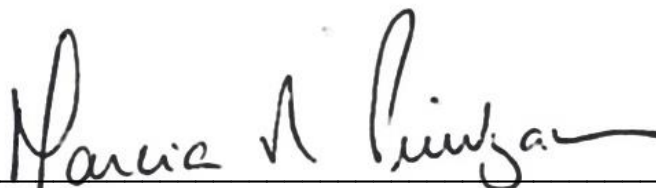
LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

**Efeito do alcaloide Curina nas vias de transdução de sinais TLR4/NFκB
em granulócitos do pulmão no modelo experimental 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**.

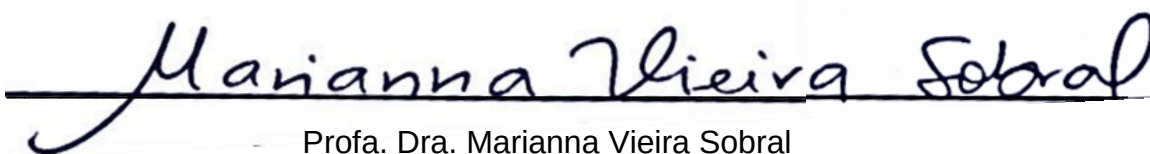
Dissertação aprovada em _____

BANCA EXAMINADORA



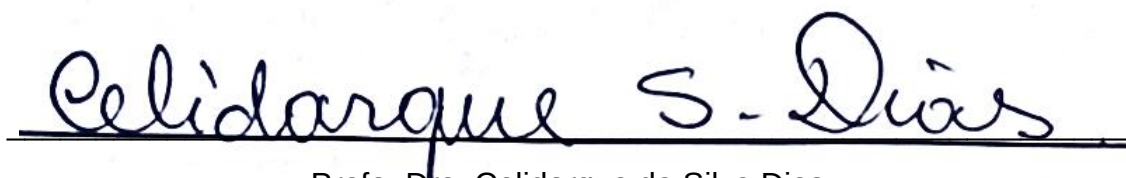
Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (**Orientadora**)

(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)



Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB. Avaliadora Interna)



Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias

(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB. Avaliadora Externa)

*“Tudo o que fizerem, seja em palavra ou em ação, façam-no em nome do
Senhor Jesus, dando por meio dele graças a Deus Pai.”*
Colossenses 3:17

A maior representação de amor
que já pude sentir na vida: minha
família, **meus pais, Clélia Paiva e
Luiz Carlos, e minha irmã,
Laércia Paiva**, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Único Digno de toda honra e glória, Deus. Obrigada Senhor Jesus, por teu amor infalível, por teu cuidado magnífico e por estar comigo em todos os momentos, me conduzindo da melhor maneira, fazendo cumprir em mim o teu propósito. A sua mão nunca deixou-me vacilar, tuas asas são sempre o meu descanso, teu esconderijo é o meu lugar de segurança. Sem o Senhor não seríamos nada, nem tão pouco, conseguiríamos realizar qualquer coisa, que tudo seja teu, por ti e para ti, meu querido Deus.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Souza Ferreira e Clélia Paiva da Veiga, pelo amor sem reservas, por toda renúncia em virtude de nossa educação, por todo cuidado, por todas as vezes em que a situação parecia difícil, vocês estarem firmes, nos dando forças para continuar. Se cheguei até aqui, com certeza, esse mérito é por vocês. São a base mais sólida da minha formação, do meu caráter, minha fonte de forças, meu maior orgulho. Obrigada por se esforçarem em ser o melhor nas condições que temos. Minha mainha, obrigada por ser o maior exemplo de mãe que eu já conheci. Por se doar inteiramente, por não ter limites em amar, por se preocupar tanto comigo, por me ouvir, mesmo que muitas vezes não entenda do assunto, por ser minha parceira, por, mesmo cansada, levar meu “leitinho”. Eu tenho os melhores pais do mundo, tudo é por vocês. Obrigada por ensinar que mesmo que as pedras apareçam, o nosso esforço e a nossa educação é o que nos fazem fortes para superá-las. Vocês são a prova viva de que o amor pode transformar, que o amor é a maior expressão da presença de Deus em nossas vidas, os amo incondicionalmente.

A Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, defini-la é uma das tarefas mais difíceis que possa existir. Minha irmã, minha amiga, minha chefe, minha colega de profissão, de laboratório, minha mentora, minha pós, e o mais importante, minha inspiração! É minha irmã, quão grata eu sou a Deus pela sua vida, por ter em casa um exemplo de profissional, de pesquisadora, de mulher, de determinação, de cuidado, de zelo, de dedicação. Você é a melhor no que se dedica a fazer e isso muito me norteia e ensina. Obrigada por me direcionar, obrigada por me entender, literalmente em tudo, obrigada por ser o abraço no desespero, por ser o norte em meio a tempestade, por ser segurança em meio

a solidão, pelo incentivo e preocupação. Minha irmãzinha linda, com carinha de nova, mas que é mais velha. Tudo o que me tornei, em cada detalhe, tem seus traços. Obrigada por ser a chefe mais braba e bruta que já tive, mas que sempre esteve ao meu lado, mesmo quando eu não acreditava em mim, você acreditou. Obrigada por não soltar a minha mão. Você é a responsável por, hoje, eu estar concluindo mais essa etapa tão importante para a realização do meu sonho, eu te amo muito. E coube estarmos juntas em mais uma fase de nossa ascensão profissional, você tornando-se a doutora mais competente que já conheci.

À minha voinha, Maria Alves de Souza Ferreira, por ser tanto, por ser a minha maior parceira. Por, mesmo com aqueles “puxões de orelha”, me amar tanto, me entender, por ressignificar cada minuto em que estamos juntas. A senhorinha mais enxuta, desenrolada, fitness que conheço. A vó que representa os outros três e da melhor maneira, obrigada por ser o “combo mais completo”.

À minha família, tias, tios, primas e primos, em especial, tia Mariinha, Raquel e Socorro por serem ajuda, por estarem sempre à disposição com uma palavra, um abraço, um almoço, um incentivo. São essas coisas que nos dão um combustível para seguir. Minhas primas: Conceição (Fia Moça), Thiala, Clélia (Flor) e Catherine, vocês fazem parte de toda minha trajetória.

Ao meu cunhado, Luís Romero Barbosa, por ter entrado na nossa família para somar, para agregar e por toda ajuda que você se disponibiliza. Que Deus possa estar sempre com você e Laércia e gostaria de deixar registrado a importância que tens na minha vida, bem como que és contribuinte direto desta etapa.

Ao Pastor Mano e Rinalda, por todo apoio em oração, por todo cuidado e preocupação com a minha caminhada. Por serem os anjos de Deus aqui na terra para cuidar de mim. Vocês são parte fundamental de todo esse projeto.

A Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam, por ser a melhor orientadora que se possa existir neste meio científico. Aquela que faz da orientação acadêmica uma oportunidade para transformar a vida dos seus alunos. Meu exemplo de profissional. Obrigada por acreditar em mim, por me apoiar, por me incentivar, por me ensinar. A senhora é um dos maiores presentes que Deus colocou em minha vida. Como não agradecer por tamanha graça em ter o privilégio de conviver e aprender tanto com esse ser humano tão diferenciado? Obrigada por ser calma em meio ao turbilhão de situações que eu tenho. Por ser a maior

incentivadora deste trabalho e não me deixar desistir, nem muito menos desanimar. Por ser compreensiva e por doar-se tanto. Eu amo a senhora, professora. E estou feliz por saber que iremos continuar juntas. Seu jeito em orientar torna a caminhada científica mais suave, doce e encorajante.

Àqueles que são, sem dúvida nenhuma, a família que escolhi e que Deus colocou para me auxiliar nessa jornada tão árdua: meus amigos. Tanto os presentes que ganhei na graduação, “melhores farmacêuticos”, bem como os que fui presenteada fora dela, sou muito feliz em tê-los ao meu lado. Em especial, Fernanda, Ana Luiza, Cinthia, Grasiela, Paula, Liliane e Jackeline.

Minhas “super-poderosas”, Fernanda e Ana Luiza, obrigada por todo apoio incondicional, por me ouvirem, por compartilharmos tanto da vida e serem o melhor, por não deixar nossa amizade cair no esquecimento, vocês são as melhores amigas que alguém pode ter.

Cinthia, minha parceira do mestrado, minha grande amiga, aquela que me ajudou tanto. Amiga, muito obrigada por ter vivenciado essa “loucura do mestrado” juntas! Por segurar firme e não soltarmos as mãos. Por ser a melhor dupla que alguém pode ter. Obrigada por todos os choros, sorrisos, incertezas, conquistas, dúvidas e realizações. Você foi, com certeza, a pessoa mais marcante da minha vida neste mestrado. E se consegui concluir, você tem contribuição direta nisto. Obrigada pelas noites de estudo, por ser o combustível quando a reserva já estava acabando. Te amo!

Paula e Liliane, vocês são importantes demais na minha vida, ajudaram-me a tornar mais leve essa caminhada, obrigada por todas as conversas, por todo apoio, mesmo que não entendessem muito, por vibrar pelas conquistas, por me ouvir, por chorar comigo, por me ajudar em tudo o que eu precisava. Por serem solícitas e disponibilizarem o ombro e o ouvido amigo, sempre que necessário. Vocês tornaram minha vida melhor e sou muito grata a Deus pela oportunidade de tê-las conhecido e saibam que estarão no meu coração sempre. São minhas incentivadoras e obrigada por torcerem e me acompanharem. Amo muito cada uma de vocês.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos, por toda ajuda prestada neste mestrado. Por toda contribuição para minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) da UFPB, Laércia, Larissa R., Talissa, Grasiela, Raquel, Allysson, Louise, Cosmo, Rita e João, bem como aos Professores Giciane, Sandra e Cláudio, e também aos alunos Luiz, Guilherme e Juliane, por toda contribuição no desenvolvimento dos experimentos, por toda conversa na bancada, por toda troca de experiências e pelo apoio, que é tão importante para finalização do trabalho.

À minha aluna de IC, Louise Manguiera, que me ensinou a arte de ensinar, que contribuiu de forma significativa para a execução destes experimentos e que se doa por completo a cada oportunidade que lhe é concedida. Você chegará longe e será uma farmacêutica competente e muito dedicada.

À professora Dra. Celidarque da Silva Dias, por ser uma inspiração pra mim, por estar disponível sempre, por todo apoio durante a graduação e, agora no mestrado. Por ter o sorriso mais encantador e que tanto me ajudou. E ainda, por nos ceder a substância, objeto deste trabalho. A senhora marcou minha vida e gostaria de deixar registrado minha admiração pela sua vida.

À Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral, pelo apoio em toda minha trajetória científica, desde a farmacoterapia, atenção farmacêutica, toxicologia e em tudo que precisei. A senhora é um exemplo pra mim e agradeço seu aceite em fazer parte deste momento especial para mim e pelas contribuições que tornarão nosso trabalho melhor.

Aos funcionários da UFPB, em especial, Mônica, por todo apoio diário nas conversas no laboratório, e os funcionários do Biotério, Seu Luiz, Adriano, Lourdes, por toda presteza e atenção quando solicitados.

À Universidade Federal da Paraíba, ao CNPQ e CAPES, pela estrutura física, recursos humanos e estímulo a pesquisa que proporcionaram o desenvolvimento de minhas atividades,

Muito obrigada a todos!

*“Antes que te formasse no ventre te conheci, e antes que saíesses da
madre, te santifiquei; às nações te dei por profeta.”*

(Jeremias 1:5)

*“Deem graças ao Senhor, porque ele é bom. O seu amor dura para
sempre!”*

(Salmos 136:1)

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?”

(Salmos 116:12)

RESUMO

A lesão pulmonar aguda (LPA) e, a sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) são doenças inflamatórias que acometem os pulmões, com ruptura da barreira alvéolo-capilar e perda da complacência pulmonar orquestradas por intenso processo inflamatório mediado, majoritariamente, por neutrófilos que culmina com o dano alveolar difuso e hipóxia tecidual. Até o momento, não se tem uma farmacoterapia adequada, portanto, a busca por alternativas farmacológicas que melhorem o quadro inflamatório, os danos teciduais e restaure a arquitetura pulmonar torna-se promissora. Neste contexto, a curina, um alcaloide natural bisbenzilisoquinolínico, com propriedades antialérgica, analgésica e anti-inflamatória é o alvo desse estudo, o qual objetivou desvendar o(s) mecanismo(s) de ação do alcaloide no modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA). Para tal, camundongos BALB/c machos foram desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com curina uma, 24 e 48 horas após o desafio e, 72 horas após a administração do LPS, os animais foram eutanasiados e coletado o material biológico para as análises. O tratamento com a curina inibiu ($p < 0,05$) a migração celular para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) dependente majoritariamente da inibição de neutrófilos. Em adição, a curina restaurou a arquitetura pulmonar, diminuindo o edema, a permeabilidade vascular e reduzindo a concentração de proteínas totais no BALF, bem como a razão úmido/seco do pulmão. A curina também diminuiu ($p < 0,05$) a produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. De maneira surpreendente, a curina demonstrou sua atividade anti-inflamatória via modulação negativa na expressão do receptor TLR-4, com consequente diminuição da fosforilação e ativação da porção p65 do NF κ B, interferindo, portanto, no processo inflamatório característico da LPA. De forma conclusiva, o tratamento com a curina reverteu o quadro inflamatório e edematogênico na LPA, por inibir a via de sinalização TLR4/NF κ B, tornando-a uma molécula promissora, candidata a possível fármaco, a ser testado em ensaios clínicos no sentido de ser incluída no arsenal diminuto e restrito de medicamentos para a síndrome do desconforto respiratório agudo.

Palavras-chaves: lesão pulmonar aguda; Lipopolissacarídeo; Curina; fator de transcrição NF κ B; receptor do tipo toll 4 TLR4.

ABSTRACT

Acute lung injury (ALI) and its most severe form, acute respiratory distress syndrome (ARDS) are inflammatory diseases that affect the lungs, with rupture of the alveolar-capillary barrier and loss of lung compliance orchestrated by an intense mediated inflammatory process, mainly by neutrophils that culminate with the diffuse alveolar data and tissue hypoxia. So far, there is no adequate pharmacotherapy, so the search for pharmacological alternatives that improve the inflammatory condition, tissue damage and restore pulmonary architecture is promising. In this context, Curine, a naturally occurring bisbenzylisoquinoline alkaloid, with antiallergic, analgesic and anti-inflammatory properties is the target of this study, which aimed to demonstrate the mechanism (s) of action of the alkaloid in the experimental model of acute lung injury (ALI). For this purpose, male BALB / c mice were challenged with lipopolysaccharide (LPS) and treated with Curine one, 24 and 48 hours after the challenge and, 72 hours after LPS administration, the animals were euthanized and biological material was collected for analysis. Treatment with curine inhibited ($p < 0.05$) cell migration to bronchoalveolar lavage fluid (BALF), which was mainly dependent on neutrophil inhibition. In addition, curine restored the pulmonary architecture, reducing edema, vascular permeability and reducing the concentration of total proteins in the BALF as well as the Wet / Dry (W/D) ratio of the lung. Curine also decreased ($p < 0.05$) the production of inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6. Surprisingly, the curine demonstrated its anti-inflammatory activity via negative modulation in the expression of the TLR-4 receptor, with a consequent decrease in phosphorylation and activation of the p65 portion of NFkB, thus interfering in the inflammatory process characteristic of ALI. In conclusion, the treatment with curine reversed the inflammatory and edematogenic conditions in LPA, via TLR4 / NFkB signaling, making it a promising molecule, candidate for a possible drug, to be tested in clinical trials in order to be included in the arsenal small and restricted number of drugs for acute respiratory distress syndrome.

Keywords: acute lung injury; Lipopolysaccharide; Curine; transcription factor NFkB; TLR4 4 toll-type receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

AECC - *American-European Consensus Conference*

BALF – Fluido do Lavado Broncoalveolar

CEUA - Comissão de ética de animais

DAMP - *Damage-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado a dano)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

EPM - Erro padrão da média

ESICM - *European society of intensive care medicine* (Sociedade europeia de medicina intensiva)

FiO₂ - Fração de oxigênio inspirado

H&E - Hematoxilina-Eosina

i.m. - Intramuscular

i.n – Instilação nasal

IKKs - *Inhibitory kappa B Kinases*

IL-1 β - Interleucina 1-beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

iNOS - *Inducible nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase induzível)

LBP - *Lipopolysaccharide Binding protein* (Proteína de ligação ao lipopolissacarídeo)

LPA – Lesão pulmonar aguda

LPS - Lipopolissacarídeo

LTB₄ - Leucotrieno B₄

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína cinase ativada por mitógenos)

MCP-1 - *Monocyte Chemoattractant protein-1* (Proteína quimiotática de monócito-1)

MD-2 - *Myeloid differentiation protein 2* (Proteína mielóide diferenciadora 2)

mL - Mililitro

MPO - Mieloperoxidase

MyD88 - *Myeloid differentiation primary response 88* (Resposta primária de diferenciação de mielóides 88)

NET - *Neutrophil extracellular traps* (Armadilha extracelular de neutrófilos)

NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Fator Nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados)

PAMP - *Pathogen-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado a patógeno)

PaO₂ - Pressão parcial de oxigênio arterial

PBS - *Phosphate buffered saline* (Salina Tampão Fosfato)

PEEP - *Positive end-expiratory pressure* (Pressão positiva expiratória final)

PGE₂ - Prostaglandina E₂

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinosítídeo 3-cinase)

PKB - *Protein kinase B* (Proteína cinase B)

PMN - Polimorfonucleares

SDRA - Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

STAT - *Signal transducer and activator of transcription* (Transdutor de sinal e ativador de transcrição)

TIRAP - *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein* (Proteína adaptadora que contém o domínio TIR)

TLR-4 - *Toll-like receptor 4* (Receptor do tipo Toll-4)

TNF- α - *Tumor Necrosis Factor-alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

TRIF - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (Domínio TIR contendo adaptador do Indutor de Interferon)

UTI - Unidade de terapia intensiva

v.o – Via oral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Populações de granulócitos demarcadas para análise da expressão do receptor TLR-4 e da porção p65 do Fator de Transcrição NF- κ B. 45
- Figura 2. Efeito da Curina nos aspectos histopatológicos pulmonar, no modelo de LPA induzida por LPS, utilizando a coloração de HE. 51
- Figura 3. Efeito da Curina na expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em granulócitos presentes do BALF dos animais com LPA induzida por LPS. 56
- Figura 4. Efeito da Curina na porção p65 do Fator de Transcrição NF κ B em granulócitos presentes no BALF de animais com LPA induzida por LPS. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais no modelo da LPA.	40
Tabela 2. Escore histológico	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da Curina na migração de células totais e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de LPA induzida por LPS.....	47
Gráfico 2. Efeitos da Curina na permeabilidade vascular e no extravasamento proteico no modelo experimental da LPA induzida por LPS.	48
Gráfico 3. Efeito da Curina no edema de pulmão característico no modelo experimental da LPA induzida por LPS.....	49
Gráfico 4. Efeito da Curina nos aspectos histopatológicos pulmonar, no modelo de LPA induzida por LPS, utilizando a coloração de HE.....	52
Gráfico 5. Efeito da Curina na produção de citocinas de perfil inflamatório no desenvolvimento da LPA induzida por LPS.	54
Gráfico 6. Efeito da Curina na expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em granulócitos presentes do BALF dos animais com LPA induzida por LPS.....	55
Gráfico 7. Efeito da Curina na porção p65 do Fator de Transcrição NFkB em granulócitos presentes no BALF de animais com LPA induzida por LPS	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).....	20
1.1.1. Histórico e Definição	20
1.1.2. Etiologia, epidemiologia e incidência	22
1.1.3. Fisiopatologia	24
1.1.4. Modelos experimentais	30
1.1.5. Tratamento.....	32
1.2. Perspectivas de novas alternativas terapêuticas	33
1.2.1. Produtos Naturais.....	33
1.2.2. <i>Chondodendron platyphyllum</i> (A.St.Hil) (Menispermaceae) e o alcaloide curina	35
2. OBJETIVOS	38
2.1. Geral	38
2.2. Específicos.....	38
3. METODOLOGIA	39
3.1. Obtenção e preparo da Curina.....	39
3.2. Animais	39
3.3. Protocolo Experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	40
3.4. Quantificação celular	41
3.5. Dosagem de proteínas totais	41
3.6. Razão do peso do pulmão úmido/seco	42
3.7. Análise histológica do tecido pulmonar	42
3.8. Quantificação das citocinas.....	44
3.9. Marcação celular do receptor do tipo <i>Toll Like 4</i> (TLR4) e da porção p65 do fator de transcrição NF-κB em granulócitos.	44
3.10. Análise Estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Efeito da Curina na migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar, no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por lipopolissacarídeo (LPS).	46
4.2. Efeito da Curina na permeabilidade vascular e extravasamento proteico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por lipopolissacarídeo (LPS)	48

4.3. Efeito da Curina no edema pulmonar característico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por lipopolissacarídeo (LPS)	49
4.4. Efeito da Curina nos aspectos histopatológicos pulmonares no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS), utilizando a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE)	50
4.5. Efeito da Curina na produção de citocinas inflamatórias no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).	53
4.6. Efeito do tratamento da Curina na expressão do receptor do tipo <i>Toll Like 4</i> (TLR4) em granulócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) dos animais com lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)	55
4.7. Efeito da Curina na ativação da porção p65 do Fator de Transcrição NF-κB em granulócitos presentes no BALF de animais com LPA induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)	57
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA.....	84
ANEXO 2: PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA)

1.1.1. Histórico e Definição

Uma grande variedade de insultos/fatores pode produzir danos agudos nos pulmões, inclusive aqueles que os ferem diretamente. Os primeiros termos utilizados para caracterizar a lesão pulmonar aguda foram: pulmão de choque, pulmão pós-perfusão, pulmão molhado traumático e atelectasia congestiva (PETTY, 1999; TOMASHEFSKI, 2000). Em 1967, Ashbaugh e colaboradores descreveram formalmente, pela primeira vez, uma síndrome caracterizada por início agudo de dificuldade respiratória grave após uma lesão identificável. Os sinais incluíram dispneia, complacência pulmonar reduzida, infiltrados radiográficos difusos no tórax e hipoxemia refratária ao oxigênio suplementar (ASHBAUGH et al., 1967). Em 1994, a *American-European Consensus Conference* (AECC) definiu que a SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo) representa a forma mais grave em um espectro de condições de doença abrangidas pelo termo lesão pulmonar aguda (LPA), bem como caracterizou a SDRA como o início agudo de hipoxemia com infiltrados bilaterais em radiografia frontal de tórax, sem evidência clínica de hipertensão atrial esquerda (BERNARD et al., 1994), sendo a primeira definição, em consenso, aceita entre especialistas.

Segundo os critérios da AECC, o grau de hipoxemia para o diagnóstico da SDRA é obtido quando a razão da pressão parcial de oxigênio arterial normalizada pela fração de oxigênio inspirado (PaO_2/FiO_2) é igual ou menor que 200 mmHg. Entretanto, dificuldades para padronização de critérios explícitos foram considerados limitantes no diagnóstico da síndrome, por exemplo, o tempo de início relativo à lesão ou doença que causa a SDRA, o uso da razão PaO_2/FiO_2 e confiabilidade para avaliação da radiografia de tórax (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; FERGUSON et al., 2012; NASCIMENTO VIANA, 2015).

Apenas em 2011, a *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM/Berlim) reuniu uma comissão internacional com especialistas para

revisar a definição da SDRA (FERGUSON et al., 2012). A definição de Berlim, como ficou conhecida, foi endossada pela *American Thoracic Society* (ATS) e pela *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e está atualmente em vigor (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; UMBRELLO et al., 2017). Com essa revisão foi possível contornar várias das limitações da definição apresentada pela AECC, não obstante, características clínicas necessárias para estabelecer o diagnóstico da SDRA, como a causa do edema pulmonar e a análise das radiografias de tórax ainda podem apresentar vieses na interpretação clínica, levando à falha no reconhecimento da SDRA e subtratamento da síndrome (BELLANI et al., 2016).

De acordo com a definição de Berlim, a SDRA é definida como a forma aguda de lesão pulmonar difusa que ocorre em pacientes com fator de risco predisponente, atendendo aos seguintes critérios: (i) início dentro de uma semana de um insulto clínico conhecido e/ou novo ou a piora dos sintomas respiratórios; (ii) presença de opacidades bilaterais na radiografia de tórax, não totalmente explicada por derrame, por colapso pulmonar ou por nódulos; (iii) diagnóstico de insuficiência respiratória não totalmente explicado por insuficiência cardíaca e/ou sobrecarga de fluidos e (iv) presença de hipoxemia, definida por um limiar específico da relação PaO_2/FiO_2 medida com um requerimento mínimo da PEEP (pressão expiratória final positiva) ≥ 5 cmH₂O, identificando assim três categorias de gravidade: leve ($200 \text{ mmHg} < PaO_2/FiO_2 \leq 300 \text{ mmHg}$), moderada ($100 \text{ mmHg} < PaO_2 / FiO_2 \leq 200 \text{ mmHg}$) e grave ($PaO_2/FiO_2 \leq 100 \text{ mmHg}$) (FERGUSON et al., 2012; UMBRELLO et al., 2017). A SDRA tem curso clínico rápido e a taxa de mortalidade alta, com mais da metade dos pacientes afetados morrendo de insuficiência respiratória em dias a semanas (KATZENSTEIN; BLOOR; LEIBOW, 1976; KATZENSTEIN; ALA, 1997; TOMASHEFSKI, 2000)(RANIERI et al., 2012).

Devido à dificuldade de modelos animais reunir todos os critérios necessários e mimetizar todas as principais características histopatológicas da SDRA humana, a LPA em animais, principalmente roedores, é o modelo mais aceito para melhor elucidar os estudos e a compreensão da fisiopatologia desta síndrome, sendo a LPA enquadrada na fase leve da SDRA (CHEUNG; GRAZIANO; SMITH, 2017).

Portanto, a LPA e sua forma mais grave, a 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; ZIMMERMAN, 2005). Tal redução da complacência pulmonar tem sido também correlacionada com o extenso acúmulo de células polimorfonucleares (neutrófilos) e de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos (WALKEY et al., 2012; WARE; MATTHAY, 2000), culminando com o dano alveolar e evoluindo para a SDRA podendo inclusive levar o paciente a óbito (WALKEY et al., 2012).

1.1.2. Etiologia, epidemiologia e incidência

As causas da SDRA não são bem compreendidas e abrangem um amplo espectro de etiologias, as quais podem ser divididas em causas pulmonares ou diretas e causas extrapulmonares ou indiretas (REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI, 2017). A lesão direta ocorre quando a agressão atinge o pulmão através das vias aéreas ou por traumatismo no tórax, enquanto que a lesão indireta ocorre quando o agente causador da lesão atinge os pulmões pela corrente sanguínea (SIEGEL, 2011).

As causas diretas incluem infecções virais, fúngicas ou bacterianas pulmonares, aspiração de conteúdo gástrico, trauma torácico com contusão pulmonar, hemorragia alveolar, aspiração de mecônio (crianças), quase-afogamento, cirurgia torácica, hiperóxia e inalação de fumaça ou outros produtos tóxicos. As causas indiretas incluem sepse, choque hipovolêmico, trauma não-torácico, transfusões múltiplas, reação a drogas, queimaduras, circulação extracorpórea, choque não-cardiogênico e pancreatite (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; RAGHAVENDRAN et al., 2008).

Os fatores de risco para SDRA demonstram um padrão consistente de, primariamente, pacientes com pneumonia (35-50%), seguidos por sepse não-pulmonar (30%), aspiração (10%) e trauma (10%) (BELLANI et al., 2016). Além desses fatores de risco clínicos, a alta ocorrência da SDRA tem sido associada também a fatores de risco demográficos e ambientais como, idade avançada, raça não-branca e algumas variantes genéticas (REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI, 2017).

Apesar da robusta quantidade de pesquisa conduzida desde a sua descrição, a SDRA possui muitas questões epidemiológicas básicas sem solução, apresentando dados heterogêneos e estimativa de incidência subestimada (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; RAGHAVENDRAN et al., 2008). Diferenças na disponibilidade de metodologias de diagnóstico, nos recursos da área da saúde, nas práticas de internação hospitalar e nas redes de medicamentos emergenciais impactam, claramente, no reconhecimento de doenças críticas como a SDRA (REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI, 2017). Além disto, a falta de testes padrão-ouro ou de um biomarcador específico compromete o diagnóstico preciso, causando uma ampla variação na incidência da SDRA mundial (PHAM; RUBENFELD, 2017).

Observa-se uma enorme diversidade intercontinental da incidência da SDRA, variando de 17,9; 34 e 78,9 a cada 100.000 pessoas/ano, na Europa (LUHR et al., 1999), Austrália (BERSTEN et al., 2002) e EUA (RUBENFELD et al., 2005), respectivamente. Além disso, são encontradas oscilações no mesmo continente, variando de 10,6; 17,9 e 25,5 a cada 100.000 pessoas/ano na Finlândia (LINKO et al., 2009), Escandinávia (LUHR et al., 1999) e Espanha (MANZANO et al., 2005), respectivamente.

No Brasil, os estudos também refletem a característica heterogênea dos dados epidemiológicos, apresentando em comum uma alta mortalidade. Um estudo realizado na UTI do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em 2006, com 524 pacientes, encontrou uma incidência de 8,6% para os casos da SDRA (OLIVEIRA; BASILLE FILHO, 2006). Outro estudo conduzido no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, com admissão de 1.732 pacientes, obteve 16% de incidência no ano de 2011 (FRANCA et al., 2011). Em 2013, um estudo prospectivo multicêntrico de coorte coordenado pelo Instituto de Pesquisa e Educação do Hospital Sírio-Libanês e Instituto d'Or de Pesquisa e Educação, utilizando dados de 45 UTIs de 12 estados brasileiros, obteve uma incidência de 31% em 773 pacientes (AZEVEDO et al., 2013). Diferente deste último estudo, uma pesquisa de 2014, com universo de 7.133 pacientes em 14 UTIs no estado do Espírito Santo, apresentou uma incidência de apenas 1,8% (CASER et al., 2014). Mais recente, em 2016, outro estudo epidemiológico avaliando os casos em UTIs do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com um total de 2.430

pacientes, revelou uma incidência de 15% da SDRA nos pacientes avaliados (FIALKOW et al., 2016).

Apesar destas limitações, tem havido um aumento na compreensão da fisiopatologia e de importantes fatores de risco, tanto para o desenvolvimento da SDRA quanto para as taxas de mortalidade (PHAM; RUBENFELD, 2017). Em 2016, o *LUNG-SAFE* (Grande Estudo Observacional para Compreender o Impacto Global da Insuficiência Respiratória Aguda Grave) realizou um estudo transversal para fornecer dados epidemiológicos sobre a SDRA em UTIs de 50 países, incluindo Brasil, demonstrando que a SDRA é responsável por 10% das internações, representando mais de 3 milhões de pacientes com SDRA anualmente, com uma mortalidade de aproximadamente 40% (BELLANI et al., 2016).

Levando em consideração a alta taxa de mortalidade, a dificuldade no diagnóstico, além das complicações no tratamento, essa síndrome é considerada um grande problema de saúde pública (ALESSIO et al., 2009; DUSHIANTHAN et al., 2011).

1.1.3. Fisiopatologia

O aumento da permeabilidade capilar e o acúmulo extravascular de fluido proveniente de edema rico em proteínas, resultante de uma resposta inflamatória, é o mecanismo fisiopatológico central da SDRA (PIERRAKOS, 2012). Associado à inflamação, e especialmente a presença de neutrófilos e, conseqüentemente, seus produtos, que desempenham um papel patogênico importante na LPA/SDRA (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015b; QU et al., 2019), o edema proveniente do aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar compromete a combinação ventilação/perfusão, a troca gasosa e as propriedades mecânicas do pulmão, incluindo a diminuição da complacência pulmonar total, o aumento da resistência das vias aéreas e alterações nas curvas de pressão-volume (GROENEVELD, 2002).

Clinicamente, essas alterações se manifestam como quadro de hipoxemia com opacidades bilaterais na radiografia de tórax, associada à diminuição da complacência pulmonar e ao aumento da mistura venosa e do espaço fisiológico

necrosado, resultando em falência respiratória aguda, podendo, em estágios mais avançados, ocasionar a falência múltipla de órgãos (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; HENDERSON et al., 2017; MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012).

A barreira alvéolo-capilar é formada por dois componentes, o endotélio microvascular e o epitélio alveolar (WARE; MATTHAY, 2000). O endotélio microvascular é, normalmente, justaposto às células epiteliais alveolares, e ambos regulam as trocas gasosas através da membrana alvéolo-capilar (WANG et al., 2013). O epitélio alveolar, por sua vez, é formado por 90% de células alveolares do tipo I, as quais são facilmente lesionadas e 10% de células alveolares do tipo II que são mais resistentes à lesão (WARE; MATTHAY, 2000). As células alveolares do tipo II são responsáveis pela produção de surfactante, transporte iônico, e proliferação/diferenciação das células do tipo I após a lesão. O dano às células epiteliais alveolares do tipo I leva ao aumento da entrada de líquido nos alvéolos e à diminuição da eliminação de fluidos; enquanto que o dano às células do tipo II diminui a produção de surfactante, levando à redução da complacência, colapso alveolar e liberação de citocinas (MARTIN, 1999; UMBRELLO et al., 2017).

A formação do edema oriunda da 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 desses para os tecidos. Macrófagos residentes no tecido lesado liberam citocinas inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e quimiocinas (TRACEY et al., 2008). Com a lesão à membrana alvéolo-capilar, especialmente, à lesão epitelial, vai ocorrer o extravasamento de fluido rico em proteínas para o espaço alveolar, dessa forma 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 (PAREKH; DANCER; THICKETT, 2011).

A SDRA pode ser didaticamente dividida em 3 estágios fisiopatológicos, que se sobrepõem temporariamente e espacialmente, sendo eles: exsudativo, proliferativo e fibrótico. O primeiro, logo após ao dano, é chamado de estágio exsudativo e é caracterizado por dano alveolar difuso devido ao extravasamento de fluido rico em proteínas e acúmulo de células inflamatórias nos espaços alveolares. 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.

O segundo estágio, chamado proliferativo, se desenvolve após, aproximadamente, 10 a 14 dias, sendo caracterizado pela resolução do edema pulmonar, proliferação de células alveolares do tipo II, metaplasia escamosa, infiltração intersticial por miofibroblastos e colocação precoce de colágeno. 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; BLACKWELL, 2009). Alguns pacientes evoluem para o terceiro estágio da fibrose, caracterizada pela obliteração da arquitetura normal, fibrose difusa e formação de cisto (RAWAL; YADAV; KUMAR, 2016; WARE; MATTHAY, 2000).

A fase final, ou fibrótica, da SDRA não ocorre em todos os pacientes, mas tem sido associada à ventilação mecânica prolongada e ao aumento da mortalidade (B. TAYLOR THOMPSON, M.D., RACHEL C. CHAMBERS, PH.D., AND KATHLEEN D. LIU, M.D., 2017). 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 (BHARGAVA; WENDT, 2012; CHOPRA; REUBEN; SHARMA, 2009; MACKAY; AL-HADDAD, 2010).

A SDRA, frequentemente, desenvolve até 72 horas após a apresentação dos sintomas e está intimamente relacionada a ventilação mecânica, sugerindo que esse procedimento clínico pode desempenhar um papel no início da lesão pulmonar. Na SDRA experimental, LPA, o tempo exato da lesão é conhecido e todo o pulmão prossegue pelas fases ao mesmo tempo, pois as alterações

patológicas parecem ocorrer consistentemente através das fases, de forma sobreposta (ALTEMEIER; HUNG; MATUTE-BELLO, 2017; CHEUNG; GRAZIANO; SMITH, 2017; JIA et al., 2014).

Na fisiopatologia da SDRA há um marcante processo inflamatório com envolvimento de diversos tipos celulares. O papel dos macrófagos durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, em geral, é pró-inflamatório no estágio inicial (HUANG et al., 2018). Os macrófagos alveolares residentes, localizados na interface do tecido, estão predominantes nos espaços alveolares, com uma densidade aproximada de sete por alvéolo (HUANG et al., 2018; SHORT et al., 2014). Após estímulo nocivo, os macrófagos alveolares residentes mudam imediatamente para o fenótipo M1 em resposta à infecção e ativação de receptores *Toll-like* (TLRs), como o TLR4, ou outros receptores de reconhecimento (AGGARWAL; KING; D'ALESSIO, 2014; EAPEN et al., 2017). Essas células atuam como a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos, tais como endotoxinas e vírus (BECK-SCHIMMER et al., 2005; SHORT et al., 2014), liberando vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- α e a IL-1 β (BHATIA; ZEMANS; JEYASEELAN, 2012). Uma vez que os macrófagos alveolares são estimulados, eles recrutam e ativam monócitos e neutrófilos circulantes para o local da lesão por meio da liberação de quimiocinas (HAN; MALLAMPALLI, 2015; SHORT et al., 2014; YANG et al., 2018).

O influxo de neutrófilos para os pulmões em resposta a macrófagos alveolares ativados é comumente observado em pacientes com SDRA e em modelos experimentais da síndrome, como na LPA (FUJISHIMA, 2014), estando associado à gravidade da SDRA (WILLIAMS; CHAMBERS, 2014). 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; SOEHNLEIN, 2011). Durante a SDRA, a função de neutrófilos se torna desregulada, levando ao dano dos pulmões, progredindo para lesão tecidual associada (GAO et al., 2013).

Nessas condições patológicas, um grande número de neutrófilos ativados pode danificar o epitélio alveolar, provavelmente, pela liberação de moléculas intracelulares tóxicas que induzem a dissolução de junções estreitas, bem como

apoptose e necrose de células epiteliais alveolares tipo I e tipo II. Esses mediadores tóxicos incluem proteases, como elastases e metaloproteinases de matriz, mieloperoxidase (MPO), peptídeos catiônicos, como defensinas e espécies reativas de oxigênio (MATTHAY; ZEMANS, 2011; ZEMANS; COLGAN; DOWNEY, 2009). Além da liberação de citocinas, há a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs- *neutrophil extracellular traps*), um mecanismo imunológico que permite aprisionar patógenos, mas que, em tempo prolongado e com excessiva produção, pode levar a danos teciduais (NARASARAJU et al., 2011). As moléculas citotóxicas também induzem necrose tecidual, apoptose e autofagia, causando a lesão tecidual característica da SDRA (FUJISHIMA, 2014; MARTIN, 2008).

Numerosas citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na inflamação aguda e no desenvolvimento da SDRA. Dentre essas, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 apresentam níveis elevados nos pulmões de pacientes com SDRA (PARK et al., 2001; YANG et al., 2017), assim como os maiores níveis dessas citocinas foram encontrados em pacientes não-sobreviventes comparado com os sobreviventes (FUJISHIMA, 2014; MEDURI et al., 1995).

A IL-1 β é produzida por células hematopoiéticas, como monócitos do sangue, macrófagos teciduais e células dendríticas em resposta a ativação do receptor TLR, componentes do sistema complemento ativados, outras citocinas (como TNF- α) e a própria IL-1 (DINARELLO, 2011; GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).

O TNF- α possui um papel importante como indicador principal, escolhido em quase todas as pesquisas clínicas ou básicas, sendo encontrado em maiores níveis em diferentes modelos de SDRA (LIN et al., 2018). A IL-6 é considerada um biomarcador confiável de gravidade da doença em pacientes críticos com alto risco para SDRA e foi encontrado aumentado no lavado broncoalveolar (LBA) e no plasma em modelo experimental (CHEN et al., 2012; DENIS et al., 1994). A elevação e persistência da circulação de IL-6 está associada com o aumento da mortalidade em pacientes criticamente doentes com SDRA (MARSHALL et al., 2002).

Na busca de conhecimentos fisiopatológicos desenvolvidos na SDRA/LPA que possam ser alvos de terapias desenvolveram-se vários modelos experimentais de LPA e entre eles o modelo experimental de LPA 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 (ALBIGER et al., 2007; MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

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; KAISHO; AKIRA, 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; OZINSKY, 2002). Após a interação entre o LPS e o receptor TLR4, ocorre a sinalização intracelular de vias, de forma que esse processo de ativação culminará com a ativação de vários fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (ALBIGER et al., 2007; ZHANG; GHOSH, 2001).

Os genes que codificam muitos mediadores pró-inflamatórios têm sequências de reconhecimento NF- κ B em seus promotores e incluem genes responsáveis por indução da produção da sintase de óxido nítrico (iNOS), da ciclooxygenase-2, da interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsáveis por muitos dos efeitos deletérios observados no LPS. Em adição, a ligação do LPS ao TLR-4 presente em neutrófilos, 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 (map cinases) e NF- κ B (TSOYI et al., 2008).

Sendo assim, o LPS 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 SDRA (ALESSIO et al., 2009; MEI et al., 2007). Em suma, a sinalização do LPS é iniciada pelas ações sequenciais da proteína de fase aguda LBP (proteína de ligação ao LPS), da proteína de membrana CD14 (em forma de âncora fixada em GPI ou solúvel), da proteína acessória de ligação a lipídio, MD-2 e do receptor de transdução de sinal TLR-4 (KIM et al., 2017)(BEUTLER; RIETSCHHEL, 2003; BRYANT et al., 2010). O CD14 divide os agregados de LPS em moléculas monoméricas e as apresenta ao complexo TLR4/MD-2, levando à ativação de múltiplos componentes de sinalização como as moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF e, conseqüentemente, as vias de sinalização MAPK, NF- κ B e IRF3, levando a ativação gênica e a superprodução de citocinas pró-inflamatórias pelas células, o que induz o desenvolvimento de síndromes inflamatórias graves, como sepse e lesão de múltiplos órgãos, incluindo a SDRA (KUZMICH et al., 2017; PÅLSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004; PARK; LEE, 2013).

1.1.4. Modelos experimentais

A complexidade da fisiopatologia da SDRA e a heterogeneidade das causas limitam o desenvolvimento de modelos experimentais que possam reproduzir todos os aspectos encontrados nos pacientes, de forma que a complexidade impossibilita o seu estudo em cultura celular (*in vitro*). Dessa forma, os modelos de estudos em animais utilizados em ensaios não-clínicos apresentam dificuldades de extrapolação dos resultados para os seres humanos (BASTARACHE; BLACKWELL, 2009; MARTIN; MATUTE-BELLO, 2011). Entretanto, esses estudos são indispensáveis para a melhor elucidação da fisiopatologia da síndrome, assim como na descoberta de possíveis terapias (ROCCO; NIEMAN, 2016).

Os modelos experimentais de SDRA, comumente chamados de LPA, assim como na síndrome, podem ser iniciados por um conjunto diversificado de

fatores. Na literatura, vários modelos animais utilizam diversos mediadores para causar a inflamação pulmonar, por exemplo, ventilação mecânica, hiperóxia, indução por ácido oleico ou por lipopolissacarídeo (LPS) (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). O LPS é um dos mais difundidos, devido à facilidade de administração e reprodutibilidade dos protocolos experimentais e por apresentar respostas semelhantes as infecções bacterianas, além de serem protocolos rápidos e confiáveis para triagem e otimização de novas drogas (CHOW et al., 2003; MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

O LPS, um complexo glicolipídico altamente tóxico, é o componente principal da parede celular de bactérias gram-negativas (MORRIS; LI, 2012). O dano causado por essa molécula ao tecido pulmonar é caracterizado por uma fase aguda, que leva ao influxo de leucócitos polimorfonucleares (principalmente, neutrófilos), altos níveis de MPO e citocinas próinflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) (DE SOUZA XAVIER COSTA et al., 2017). O LPS causa dano pulmonar agudo em camundongos 24 h após a administração intranasal ou intratraqueal (CHEN; BAI; WANG, 2010), com o influxo de neutrófilos, intenso edema e produção de citocinas acontecendo a partir de 4-6 h após estímulo com LPS (ASTI et al., 2000; KNAPP et al., 2006).

Os modelos murinos de LPA para representar a SDRA são extensamente utilizados como ferramenta para testar novas potenciais intervenções terapêuticas e investigar os mecanismos moleculares subjacentes à lesão pulmonar (BERGER; DELPHIN, 2017). Os camundongos apresentam vantagens que incluem a disponibilidade de modelos genéticos para testar mecanismos específicos, o curto ciclo reprodutivo, que permite a rápida expansão de populações de camundongos bem definidas, um grande número de reagentes disponíveis para camundongos e um custo mais baixo quando comparado com outras espécies (BERGER; DELPHIN, 2017). A resposta baseada em gênero é outro fator importante para a seleção de animais. Camundongos machos são mais propensos a desenvolver LPA, consequentemente a SDRA, enquanto camundongos fêmeas têm uma vantagem de sobrevivência em comparação com machos quando expostos a LPS (CHEN; BAI; WANG, 2010) (ALTEMEIER; HUNG; MATUTE-BELLO, 2017).

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, o que torna uma metodologia interessante para a melhor compreensão da doença desenvolvida (ALESSIO et al., 2009; KLAFF et al., 2012; WANG et al., 2016).

1.1.5. Tratamento

As dificuldades em testar e validar terapias farmacológicas para a SDRA são devidas à múltipla etiologia e heterogeneidade do paciente acometido (RAGHAVENDRAN et al., 2008). Os pacientes com diagnóstico da SDRA apresentam fatores de risco subjacentes variados e diferentes condições pré-mórbidas e comórbidas complexas (CALFEE et al., 2014; FAMOUS et al., 2017; FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018). Portanto, a fisiopatologia complexa e multifacetada da SDRA pode necessitar de intervenções baseadas em combinações de terapias em vez de um único agente. Estudos sobre os mecanismos de ação e de interações são essenciais na triagem de terapias para testes clínicos finais (RAGHAVENDRAN et al., 2008).

A base atual para o tratamento da SDRA é a ventilação mecânica, a qual é a intervenção mais comum para apoiar pacientes com a SDRA e insuficiência respiratória hipoxêmica e é utilizada tanto em adultos como em crianças. No entanto, a própria ventilação pode contribuir para o agravamento da 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; MATUTE-BELLO, 2017).

Os principais avanços recentes em terapias potenciais para SDRA se dividem em intervenções não-farmacológicas e farmacológicas. As intervenções não farmacológicas incluem a manutenção do paciente em posição prona, pressão expiratória final positiva, ventilação oscilatória de alta frequência, manobras de recrutamento pulmonar, remoção extracorpórea de dióxido de carbono e gerenciamento de fluidos. A intervenção farmacológica é realizada a

partir do uso de surfactante, antioxidantes, inibidor da esterase de neutrófilos, aspirina, bloqueadores neuromusculares como os β 2-adrenérgicos, estatinas, fator de crescimento de queratinócitos recombinante, corticosteroides e/ou vasodilatadores inalados (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; PHAM; RUBENFELD, 2017; RAWAL; YADAV; KUMAR, 2016; UMBRELLO et al., 2017)(100).

Apesar de décadas de pesquisa e de uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia, a SDRA continua a representar um grande problema para clínicos e pesquisadores: diagnóstico desafiador com o subconhecimento global da síndrome, intervenções farmacológicas ineficazes e muitos resultados decepcionantes, apresentando uma alta mortalidade (cerca de 40%) (BELLANI et al., 2016; PHAM; RUBENFELD, 2017). Além disso, os sobreviventes podem apresentar distúrbios físicos e neuropsiquiátricos substanciais e persistentes comprometendo, significativamente, a qualidade de vida até 5 anos após o paciente ter se recuperado da SDRA (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; HERRIDGE et al., 2011).

Entretanto, não há uma farmacoterapia padrão-ouro para o tratamento da SDRA, o que implica diretamente na qualidade da vida do indivíduo que é acometido por esta enfermidade (NIEMAN et al., 2020). Dessa forma, novas estratégias terapêuticas eficazes que possam modular a inflamação e levar a melhora dos pacientes com SDRA são uma necessidade premente.

1.2. Perspectivas de novas alternativas terapêuticas

1.2.1. Produtos Naturais

O uso de plantas medicinais como forma de curar os processos inflamatórios é de origem antiga e fundamentada no uso popular por sucessivas gerações (PETROVSKA, 2012). Historicamente, a maioria dos novos medicamentos tem sido gerada a partir de compostos derivados de produtos naturais, principalmente dos metabólitos secundários (MCCHESENEY, 2002), os quais têm mostrado atividades biológicas potentes e vêm fornecendo compostos líderes na descoberta de medicamentos para o tratamento de câncer, infecções microbianas, inflamação, hipercolesterolemia e rejeição de tecidos em

transplantes de órgãos (OJIMA, 2008). Os produtos naturais são considerados uma fonte abundante de novos candidatos ao desenvolvimento de drogas capazes de amenizar e/ou curar as diversas doenças incluindo as de cunho inflamatório (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre as diversas classes que os produtos naturais apresentam, uma das mais importantes são os alcaloides.

Alcaloides são produtos naturais capazes de regular sistemas biológicos interagindo com micro e macromoléculas quando no interior do corpo (BHADRA; KUMAR, 2011). Essas moléculas são metabólitos 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 (MARIA et al., [s.d.]; SOUTO et al., 2011; WEBER; OPATZ, 2019).

Essa classe química é definida como substâncias cristalinas que se ligam com ácidos para formar sais e derivam dos processos de biossíntese de aminoácidos ou transaminação ("Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach - Paul M. Dewick - Google Livros", [s.d.]) (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 (STÖCKIGT et al., 2011; WEBER; OPATZ, 2019).

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 (WEBER; OPATZ, 2019). Apesar da sua capacidade de apresentar atividades farmacológicas, apenas no século 19, os alcaloides foram isolados e definiram suas atividades terapêuticas. Esses estudos permitiram a introdução de vários tipos de alcaloides como fármacos para tratar numerosas doenças (AWUAH; 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; FAIRLIE; THONG, 1994).

Um outro alcaloide, a warifteína, um alcaloide bisbenzilisquinolínico, 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., 2012; COSTA et al., 2008).

1.2.2. *Chondodendron platyphyllum* (A.St.Hil) (Menispermaceae) e o alcaloide curina

Chondodendron platyphyllum A. St. Hil (Miers) (Menispermaceae) é uma planta medicinal encontrada no nordeste do Brasil. Esta planta, popularmente conhecida como “abutua grande”, é usada na medicina popular brasileira, para alívio de sintomas de numerosas doenças, tais como anemia, diarreia e febre, (PIO CORRÊA, 1984).

A família dessa planta foi estabelecida por AL de Jussieu em 1789 sendo composta por 71 gêneros e cerca de 520 espécies (pers. estimativa), fazendo parte da ordem Ranunculales (JACQUES; BERTOLINO, [s.d.]), 2008). No Brasil é representada por cerca de 12 gêneros e 106 espécies, tendo a Amazônia como seu maior centro de distribuição (OLIVEIRA MARI MANAUS, 2007). A família ficou bastante conhecida, principalmente, pelos estudos químicos e farmacológicos com gêneros tais como *Curarea*, *Abutua*, *Amnospermum*, *Cissampelos*, *Sciadotenia*, *Telotoxicum*, *Chondodendron* que são usados na preparação de curare (BISSET, 1988).

Os curares, termo genérico que descreve a expressão “veneno de flecha”, são usados especialmente pelos índios do sul da Amazônia. Na América do Sul, os curares são preparados por meio da infusão da planta e o extrato concentrado resulta da lenta evaporação do solvente. Os curares são conhecidos por promover uma atividade relaxante na musculatura esquelética, competindo com a acetilcolina pelo receptor nicotínico (BISSET, 1988).

A família Menispermaceae é bem conhecida pela produção de vários tipos de alcaloides (BARBOSA-FILHO; VASCONCELOS LEITÃO DA-CUNHA; GRAY, 2000). Estudos fitoquímicos utilizando as cascas das raízes de *C. platyphyllum* demonstraram que essa planta é rica em alcaloides bisbenzilisoquinolínicos, tais como isocurina, curina (DIAS et al., 2002) e 12-O-metilcurina (GUEDES et al., 2002).

Os alcaloides bisbenzilisquinolínicos (BBA) são obtidos biogeneticamente a partir da dimerização oxidativa do núcleo básico benzilisquinolínico (BARBOSA-FILHO; VASCONCELOS LEITÃO DA-CUNHA; GRAY, 2000) e são conhecidos por terem várias atividades farmacológicas, inclusive atividade antiparasitária, em particular contra *Leishmania* sp. (FOURNET et al., 1993), *Trypanossoma cruzi* (DE ARIAS et al., 1994) e *Plasmodium* sp. (ANGERHOFER et al., 1999) e antialérgica (BEZERRA-SANTOS et al., 2006; COSTA et al., 2008).

A curina é o principal alcaloide bisbenzilisquinolínico (BBA) obtido de *Chondrodendron platyphyllum* (Menispermaceae). Estudos anteriores relataram que esse alcaloide, bem como os compostos estruturalmente relacionados isocurina e 12-O-metilcurina, têm efeitos farmacológicos promissores (DIAS et al., 2002), corroborando dados etnofarmacológicos que apontam *C. platyphyllum* como planta com propriedades medicinais. Estudos demonstraram que o BBA são compostos naturais bioativos que apresentam atividades anti-inflamatórias, antialérgicas e analgésicas (SOUTO et al., 2011) e existem evidências de que seu mecanismo de ação envolve uma inibição direta dos canais de cálcio (DIAS et al., 2002; GUEDES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2011).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram os efeitos do tratamento com curina em um modelo experimental de asma alérgica. A administração oral deste composto a camundongos alérgicos inibiu significativamente a inflamação eosinofílica e a hiper-responsividade das vias aéreas (AHR), que são características críticas da resposta alérgica neste modelo. Além disso, a curina impediu a formação do corpo lipídico em eosinófilos e a produção de citocinas *in vivo*, sugerindo que ela tem um papel inibitório na ativação dos eosinófilos. Uma similaridade entre os efeitos antialérgicos de curina e verapamil (um bloqueador dos canais de cálcio), bem como a inibição da contração traqueal induzida por cálcio pela curina, sugeriu fortemente que seus efeitos antialérgicos estão associados à modulação das respostas dependentes de cálcio (RIBEIRO-FILHO et al., 2013).

Esses achados foram confirmados por outro estudo, no qual foi demonstrado os efeitos antialérgicos da curina e do verapamil em um modelo de ativação de mastócitos em camundongos. Além de inibir o comportamento de coçar, o tratamento oral com curina impediu a reação de choque anafilático em

camundongos com problemas sistêmicos. Além disso, esses tratamentos inibiram a produção de mediadores lipídicos e citocinas associados à ativação de mastócitos (RIBEIRO-FILHO et al., 2014). É importante ressaltar que uma análise dos parâmetros físicos, comportamentais, histológicos, hematológicos e bioquímicos revelou que o tratamento oral com curina por sete dias consecutivos não induziu toxicidade evidente em camundongos (RIBEIRO-FILHO et al., 2013). Além disso, esse alcaloide apresentou efeitos analgésicos que não foram associados a uma atividade no sistema nervoso central, mas envolvem mecanismos anti-inflamatórios (LEITE et al., 2014). Recentemente, a curina impediu a ativação de macrófagos, bem como o recrutamento e consequente ativação de neutrófilos em um modelo de pleurisia induzida por LPS, inibindo o processo inflamatório agudo mediado por neutrófilos e macrófagos (RIBEIRO-FILHO et al., 2019).

A evidência acumulada coloca a curina como um potente composto anti-inflamatório e antialérgico com baixa toxicidade. Por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*, já foram descritas as propriedades farmacológicas gerais deste alcaloide. No entanto, os mecanismos subjacentes aos seus efeitos anti-inflamatórios ainda são pouco conhecidos. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da curina em um modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS, elucidando seu provável mecanismo de ação para reverter esse processo inflamatório severo e complexo.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o efeito do alcaloide curina, de *Chondodendron platyphyllum* A. St. Hil (Miers) (Menispermaceae), nos mecanismos inflamatório e imunomodulador no modelo experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) induzida com Lipopolissacarídeo (LPS).

2.2. Específicos

- Quantificar a migração de células inflamatórias para o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) de camundongos com LPA, tratados ou não com curina;
- Avaliar o efeito antiedematogênico da curina, via mensurações do edema pulmonar, extravasamento proteico e da razão do peso pulmonar;
- Quantificar citocinas de perfil inflamatório (TNF- α , IL1 β e IL-6) no processo inflamatório na LPA;
- Mensurar o processo patológico instalado no tecido pulmonar dos animais com LPA, tratados ou não com a curina;
- Determinar o(s) mecanismo(s) de ação da curina nas células do BALF dos animais com LPA quanto ao receptor do tipo *Toll Like 4* (TLR4) e o fator de transcrição p65-NF κ B.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção e preparo da Curina

As cascas do caule de *Chondodendron platyphyllum* foram pulverizadas em moinho tipo HARLEY e submetidas à extração sob percolação exaustiva com etanol a 95° GL, entre três a quatro dias por série de extração. O extrato foi concentrado a vácuo a uma temperatura em torno de 50 a 60 °C, dando origem a um extrato etanólico bruto. Este extrato foi submetido ao tratamento com solução de ácido clorídrico (HCl) a 3% e filtrado em celite (545 FISCHER SCIENTIFIC). Esta solução ácida foi extraída com clorofórmio e em seguida alcalinizada a frio com hidróxido de amônio (NH₄OH) até pH 8 e extraída sucessivas vezes com clorofórmio até os testes de Mayer e Dragendorff apresentarem resultados negativos. A fase clorofórmica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada no rotavapor (50°C), obtendo-se a fração de alcaloides terciários totais (ATT). A fração ATT foi submetida a cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada analítica e preparativa para o isolamento do alcaloide Curina (DIAS, 1999). A curina foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), da Universidade Federal da Paraíba/João Pessoa, PB, Brasil, para a realização deste trabalho.

3.2. Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos com idades entre 6 a 8 semanas, pesando entre 20 a 25g foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB), João Pessoa, PB, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h as 18h claro e de 18h as 6h escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental foi representado por 6 animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)/Brasil, além de observar as exigências

dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intramuscular (i.m.) de uma solução anestésica contendo 29 mg/mL de ketamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9 %). Este projeto foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob o protocolo de número 034/2016 (Anexo 1).

3.3. Protocolo Experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

O modelo experimental da lesão pulmonar aguda foi desenvolvido e adaptado das metodologias descritas anteriormente (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015a; WANG et al., 2016). Para tal, no dia zero (0), os camundongos foram desafiados, por instilação nasal (i.n.), com uma solução de lipopolissacarídeo (LPS - 2,5 mg/kg, *E. coli* 0111: B4 (Sigma-Aldrich) em salina. Nos intervalos de uma, 24 e 48 horas após o desafio, os animais foram tratados por via oral (v.o.) com a Curina nas doses de 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg/kg. Após 72 horas do desafio, os animais foram eutanasiados, ocorrendo o desfecho do protocolo e a coleta do material biológico para análise dos parâmetros imunológicos. Após a escolha da dose, os experimentos foram sequenciados com os grupos: Basal, LPS e LPS + Curina 2,5 mg/kg.

A tabela 1 demonstra os tratamentos e desafios dos grupos experimentais para melhor compreensão.

Tabela 1. Grupos experimentais no modelo da LPA.

Grupo	Desafio	Tratamento
Basal	Salina	Salina
LPS	LPS	Salina
LPS + Curina	LPS	Curina 1,25 mg/kg
LPS + Curina	LPS	Curina 2,5 mg/kg
LPS + Curina	LPS	Curina 5,0 mg/kg

LPS + Curina

LPS

Curina 10,0 mg/kg

Fonte: Ferreira, 2020.

3.4. Quantificação celular

Para quantificar as células inflamatórias que migraram para a cavidade pulmonar, foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) 72 horas após o desafio com o LPS. Para a coleta do BALF utilizou-se 1,5 mL de HBSS+/- gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia, o fluido coletado foi transferido para tubos tipo *eppendorf* e armazenado em isopor refrigerado. A contagem do número total de células no BALF foi realizada em câmara hemocitométrica após diluição (1:10) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) da suspensão celular contida no BALF e as células foram contadas no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS).

Após a realização da contagem das células totais, os tubos foram centrifugados a 300 g (centrífuga CR422, JONAM) a uma temperatura de 4 °C, por 6 minutos. Os sobrenadantes foram separados e congelados no freezer a temperatura de -20 °C para posterior dosagem de citocinas e mensuração das proteínas totais. Para contagem diferencial, o *pellet* foi ressuspensão em 500 µL de HBSS+/- gelado, homogeneizado e retirados 200 µL de cada tubo contendo o BALF e foram centrifugados em centrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas contendo as células foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram definidos em duas populações celulares: mononucleares e polimorfonucleares (neutrófilos) (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015b).

3.5. Dosagem 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

pirogalo (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 600 nm. A absorbância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019).

3.6. Razão do peso do pulmão úmido/seco

Após a eutanásia dos camundongos, os pulmões foram removidos e pesados para obtenção do peso “úmido”. Em seguida, os pulmões foram colocados a 60 °C por 48 horas e, após esse período, foram novamente pesados e obtido o peso “seco”. O índice de edema pulmonar foi calculado pela razão entre o peso úmido e o peso seco dos tecidos pulmonares avaliados (JIANG et al., 2015).

3.7. Análise histológica do tecido pulmonar

Para avaliar as características histológicas pulmonares dos camundongos, o pulmão foi coletado 72 horas após o desafio com LPS e fixado em formalina tamponada, em sequência, foi hidratado em água corrente durante 24 horas; desidratado por 30 minutos em diferentes concentrações de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%); xilol por 30 minutos; parafina líquida (parafina histológica- ERVIEGAS, São Paulo, SP), após solidificação, obteve-se o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior. O corte histológico teve espessura de 5 µm, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Com os cortes de tecido aderidos nas lâminas, esses foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E), para avaliação da arquitetura pulmonar e parâmetros teciduais gerais do processo inflamatório.

Após a montagem das células no tecido foi realizada a análise morfológica pela definição de escores (pontuações), com a finalidade de quantificar as avaliações visuais, correlacionando esses resultados aos aspectos clínicos dos animais acometidos com LPA, onde as pontuações atribuídas finais foram de acordo com a extensão das lesões avaliadas para o corante de tecido utilizado.

Para a análise tecidual dos cortes corados com Hematoxilina-Eosina (H&E), foram pontuados escores de 0 a 4, onde a soma dos parâmetros foi quantificada, de acordo com a extensão da lesão evidenciada. As alterações histológicas analisadas para a extensão da lesão causada foram: infiltrado celular, formação de edema e a presença de focos hemorrágicos, caracterizando hemorragia, o espessamento do septo alveolar, bem como o dano alveolar difuso. As seguintes pontuações foram: [0] ausência de alterações histológicas; [1] alterações suaves correspondentes a presença dessas alterações em menos de 25% do campo analisado; [2] alterações moderadas correspondentes a presença dessas alterações entre 25% e 49% do campo analisado; [3] alterações acentuadas correspondentes a presença dessas alterações entre 50% e 75% do campo analisado e [4] alterações muito acentuadas correspondentes a presença dessas alterações em mais de 75% do campo analisado. As possíveis alterações foram avaliadas em todos os campos de cada lâmina de forma duplo-cego, onde foram analisadas quatro lâminas. A tabela 2 demonstra as pontuações histológicas utilizadas.

Tabela 2. Escore histológico

Alterações:	
Score	Infiltrado celular, edema e hemorragia
0	Ausência de alterações histológicas
1	Suave: menos de 25% do campo analisado
2	Moderada: 25% a 49% do campo analisado
3	Acentuada: 50% a 75% do campo analisado
4	Muito acentuada: mais de 75% do campo analisado

Fonte: Ferreira, 2020.

3.8. Quantificação das citocinas

Para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram utilizados os sobrenadantes dos BALF dos camundongos e realizado o ensaio imunoenzimático ELISA, de acordo com as recomendações especificadas nos Kits do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

3.9. Marcação celular do receptor do tipo *Toll Like 4* (TLR4) e da porção p65 do fator de transcrição NF- κ B em granulócitos.

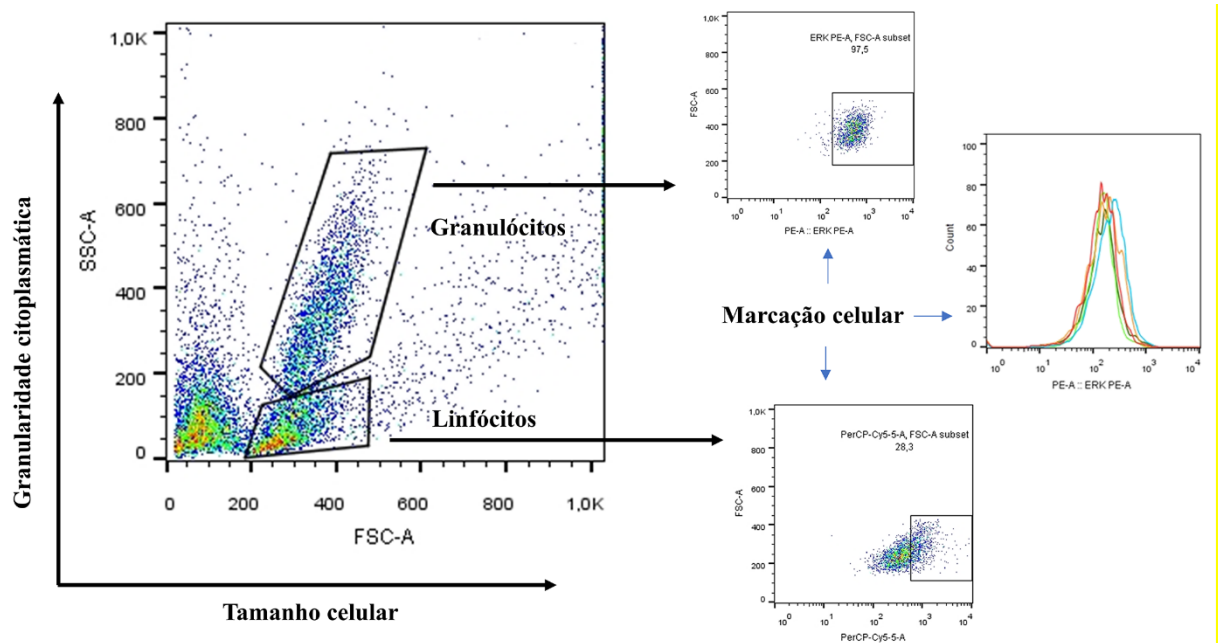
A análise celular por citometria de fluxo permite a distinção de populações celulares heterogêneas a partir de parâmetros como “*forward-scattered light*” (FSC) e “*side-scattered light*” (SSC), os quais distinguem as células pelo tamanho (difração da luz-FSC) e granularidade (difusão da luz-SSC) respectivamente. Desse modo foi quantificado as populações de granulócitos presentes no BALF dos animais submetidos ao protocolo experimental de LPA (VAN RIJT et al., 2004).

A avaliação da expressão do receptor TLR-4 e da porção p65 do fator de transcrição NF- κ B, essenciais para síntese de citocinas e moléculas pró-inflamatórias que modulam o mecanismo patológico da LPA, foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo. Para tal, o BALF foi coletado, centrifugado, retirado o sobrenadante e ressuspenso em volume calculado para 5×10^5 células/mL de HBSS+/- gelado e destinado à análise dos parâmetros FSC e SSC no citômetro de fluxo (FACSCanto™II) onde para cada marcador avaliado foi utilizado anticorpo específico e marcação fluorescente. O protocolo específico para cada marcação foi realizado de acordo com as recomendações apresentadas no Kit do fabricante utilizado (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

A análise por citometria de fluxo foi realizada pela intensidade da fluorescência dos marcadores celulares. Para a marcação de TLR-4 (PE) foi detectada após passagem em filtro de 564 - 606 nm e para a marcação de p65-NF- κ B (PerCP-Cy5.5) em filtro de 670 - 735 nm. O citômetro de fluxo (FACSCanto™II, com o software de aquisição da BD (FACS Diva 6.1.) está

equipado com três lasers de excitação 405nm 30mW (diodo em violeta), 488nm 20mW (argônio em azul) e 633nm 17mW (Hélio Neônio em vermelho) de potência, resfriado a ar. Na figura 1 está demarcada as populações de granulócitos que foram utilizadas para analisar a expressão do receptor TLR-4 e a ativação da porção p65 do Fator de Transcrição NF- κ B neste estudo.

Figura 1. Populações de granulócitos demarcadas para análise da expressão do receptor TLR-4 e da porção p65 do Fator de Transcrição NF- κ B.



Fonte: Ferreira, 2020.

3.10. Análise Estatística

Para as análises estatísticas desse trabalho foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 7.0 e valores com $p < 0,05$, considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Para analisar os dados do Citometro de Fluxo foi utilizado o programa FlowJo, versão 10. Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados empregando-se o teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de Tukey onde (a) $p < 0,05$ comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$ comparado ao grupo LPS.

4. RESULTADOS

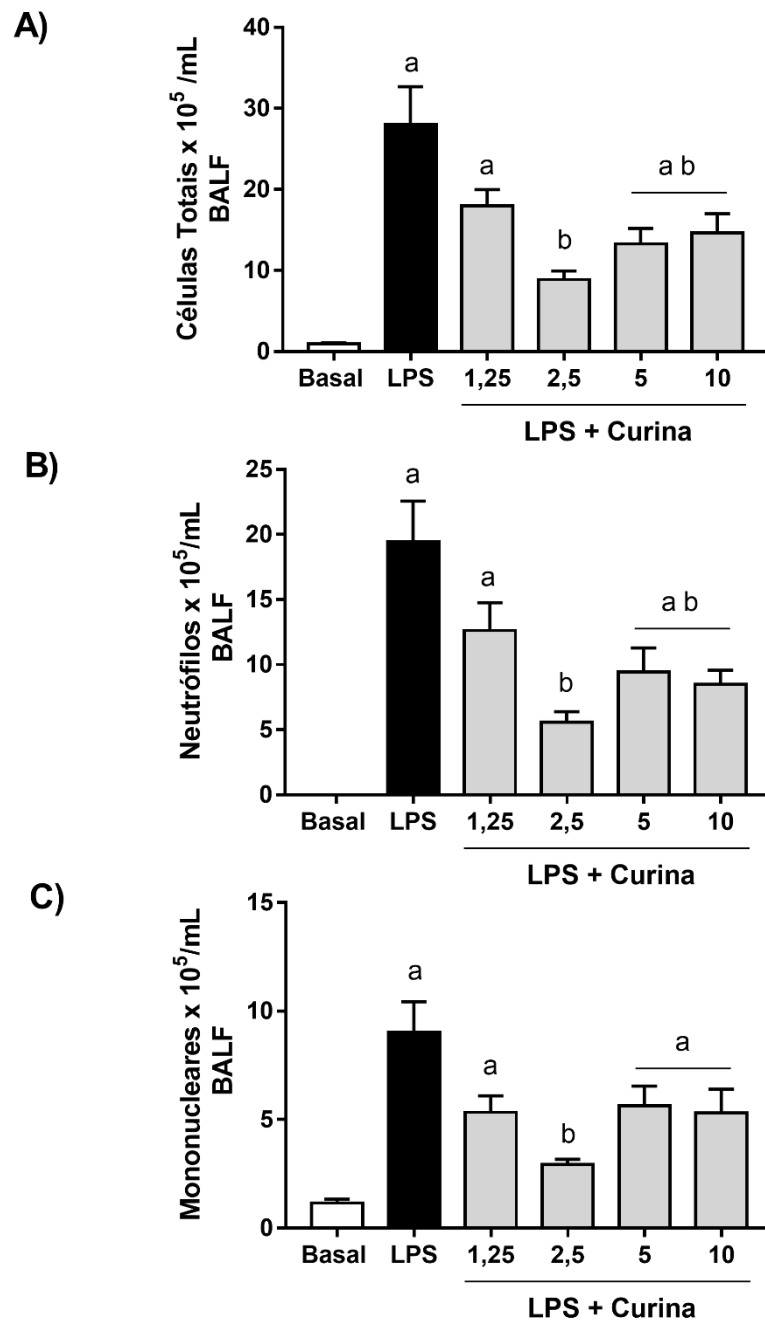
4.1. Efeito da Curina na migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar, no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

O perfil celular no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) nos animais dos diferentes grupos experimentais está expresso no Gráfico 1. A. células totais ($10^5/\text{mL}$); B. neutrófilos ($10^5/\text{mL}$) e C mononucleares ($10^5/\text{mL}$). Os animais do grupo LPS (animais doentes) quando comparados aos do grupo Basal (animais saudáveis) apresentaram aumento ($p < 0,05$) na migração de células totais em 29 vezes ($28,02 \pm 4,656$ vs $0,956 \pm 0,412$, respectivamente); de neutrófilos em 20 vezes ($19,42 \pm 3,123$ vs $0,008 \pm 0,005$, respectivamente) e de mononucleares em sete vezes ($9,015 \pm 1,414$ vs $1,155 \pm 0,179$, respectivamente).

Os animais doentes tratados com a Curina nas doses de 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg ou 10 mg/kg apresentaram redução ($p < 0,05$) nas migrações de células inflamatórias totais em 69%, 53% e 48% respectivamente, de neutrófilos em 72%, 52% e 57% respectivamente, entretanto, apenas a dose de 2,5 mg/kg apresentou redução ($p < 0,05$) de mononucleares em 68% quando comparados aos animais do grupo LPS. Em adição, os animais tratados com a dose de 2,5 mg/kg de Curina foram estatisticamente semelhantes aos animais do grupo Basal quanto à migração de células totais, de neutrófilos e de mononucleares, indicando o reestabelecimento das condições de homeostase nesses animais. Os animais tratados com a dose de 1,25 mg/kg de curina não apresentaram redução no padrão de migração celular quando comparados aos do grupo Basal.

Diante desses resultados, a dose de Curina escolhida para dar continuidade ao trabalho foi a de 2,5 mg/kg..

Gráfico 1. Efeito da Curina na migração de células totais e leucócitos diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de LPA induzida por LPS.



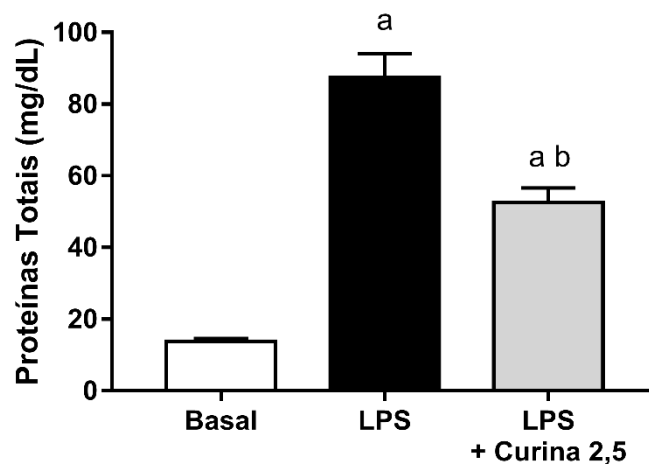
Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados por via a oral (v.o) com Curina nas doses 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg/kg, uma, 24 e 48 horas após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e a uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação do BALF o *pellet* foi ressuspensão e citocentrifugado, corado pelo método de panótico, para contagem diferencial das populações celulares. **(A)** Células Totais, **(B)** Neutrófilos e **(C)** Mononucleares. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS. Experimentos realizados em triplicada.

4.2. Efeito da Curina na permeabilidade vascular e extravasamento proteico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

A permeabilidade vascular foi mensurada por meio do extravasamento proteico presente no BALF dos animais, de forma que a concentração de proteínas totais é diretamente proporcional a permeabilidade vascular. A concentração de proteínas totais (mg/dL) está demonstrada no Gráfico 2. Os animais do grupo LPS apresentaram aumento ($p < 0,05$) em seis (06) vezes na concentração de proteínas totais quando comparados aos do grupo Basal ($87,44 \pm 6,65$ vs $13,86 \pm 0,769$, respectivamente)

Os animais doentes tratados com a Curina (2,5 mg/kg) apresentaram diminuição ($p < 0,05$) em 40% do exsudato proteico, quando comparados aos do grupo LPS. Entretanto, a diminuição do exsudato proteico promovida pela Curina não foi suficiente para reverter esse processo aos níveis basais.

Gráfico 2. Efeitos da Curina na permeabilidade vascular e no extravasamento proteico no modelo experimental da LPA induzida por LPS.



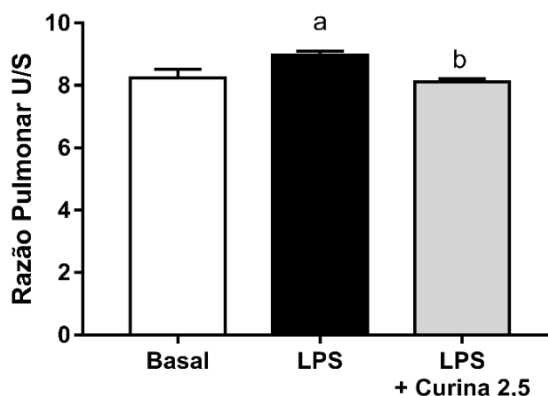
Camundongos BALB/c machos ($n=6$) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF). Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas totais através do teste SENSIPROT® e, em seguida, lido em espectrofotômetro no comprimento 600nm. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS. Experimentos realizados em triplicada.

4.3. Efeito da Curina no edema pulmonar característico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

O edema pulmonar característico no modelo experimental de LPA foi mensurado pela razão do peso pulmonar úmido/seco, de forma que todo líquido que forma o edema foi evidenciado no peso úmido (U) e evaporado (seco – S) após o processo de secagem, indicando a extensão tecidual do edema formado. A razão do peso dos pulmões úmido/seco (U/S) está demonstrada no Gráfico 3. Os animais do grupo LPS apresentaram aumento ($p < 0,05$) na razão pulmonar quando comparados aos do grupo Basal ($8,969 \pm 0,137$ vs $8,241 \pm 0,271$) indicando a presença do edema induzida pelo desafio com o LPS,

Em adição, os animais doentes tratados com Curina (2,5 mg/kg) apresentaram redução ($p < 0,05$) em 10% na razão pulmonar úmido/seco quando comparados com os do grupo LPS indicando a efetividade do tratamento em reverter o edema aos níveis basais.

Gráfico 3. Efeito da Curina no edema de pulmão característico no modelo experimental da LPA induzida por LPS.



Camundongos BALB/c machos ($n=6$) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o pulmão, pesado e armazenado em estufa por 48h e, em seguida, os pulmões foram pesados novamente, obtendo-se a razão do peso pulmonar úmido/seco. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS. Experimentos realizados em triplicada.

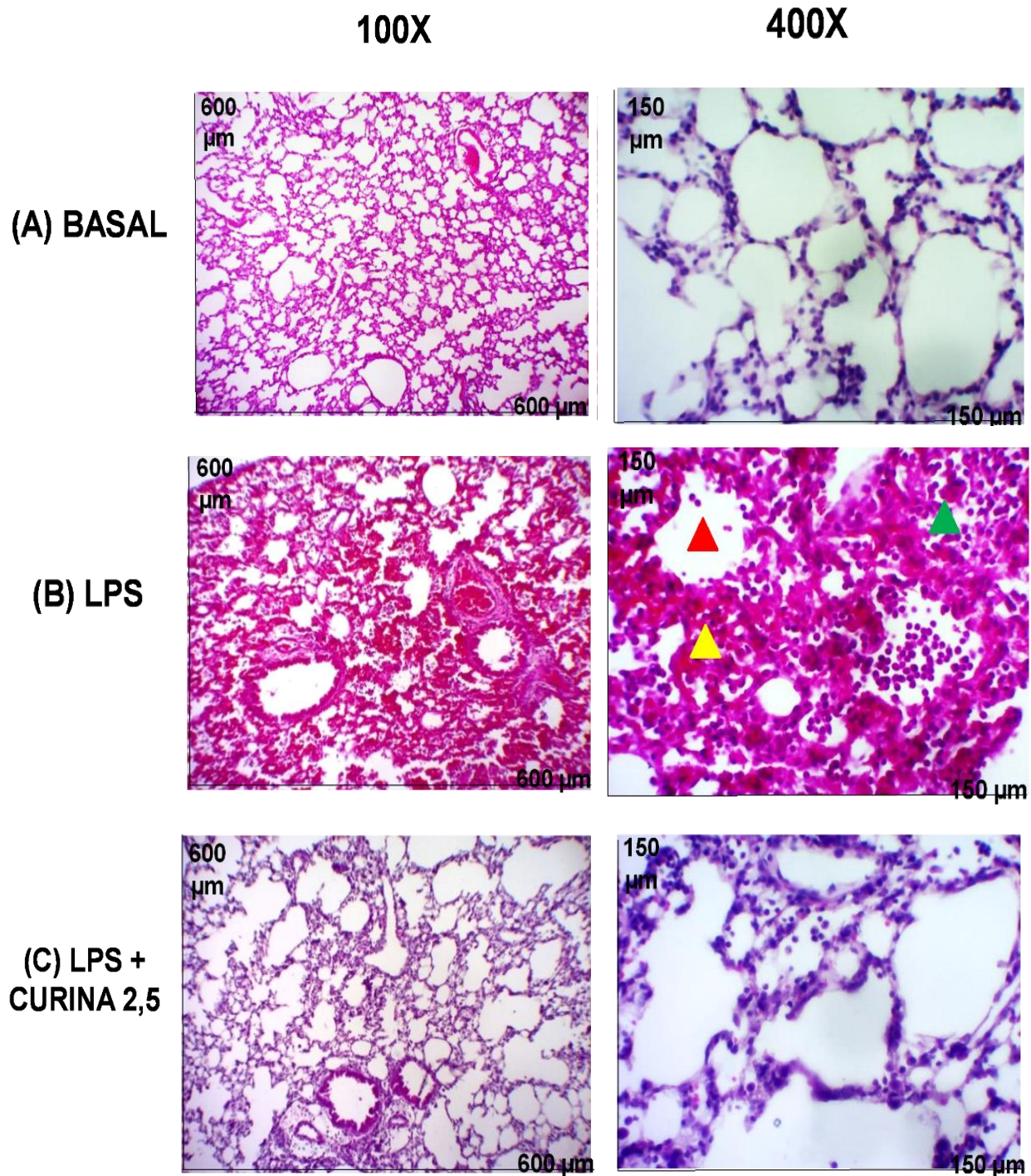
4.4. Efeito da Curina nos aspectos histopatológicos pulmonares no modelo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS), utilizando a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE)

Os aspectos histológicos do tecido pulmonar dos animais dos grupos experimentais estão demonstrados na Figura 2 e no Gráfico 4.

O desafio com LPS (grupo LPS) promoveu, no tecido pulmonar, intensa infiltração celular a nível de alvéolos em decorrência da inflamação intersticial desenvolvida (triângulo verde). A presença de edema foi observada, decorrente do aumento da permeabilidade da membrana alveolar com presença de membranas hialinas e espessamento da parede alveolar (triângulo vermelho), além do dano alveolar difuso também marcado por aglomerados de hemácias (hemorragia) após episódio de vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo nos capilares alveolares (triângulo amarelo). No escore inflamatório das alterações morfológicas tecidual foi observado um intenso processo inflamatório com infiltrado celular na cavidade pulmonar do grupo LPS ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo Basal.

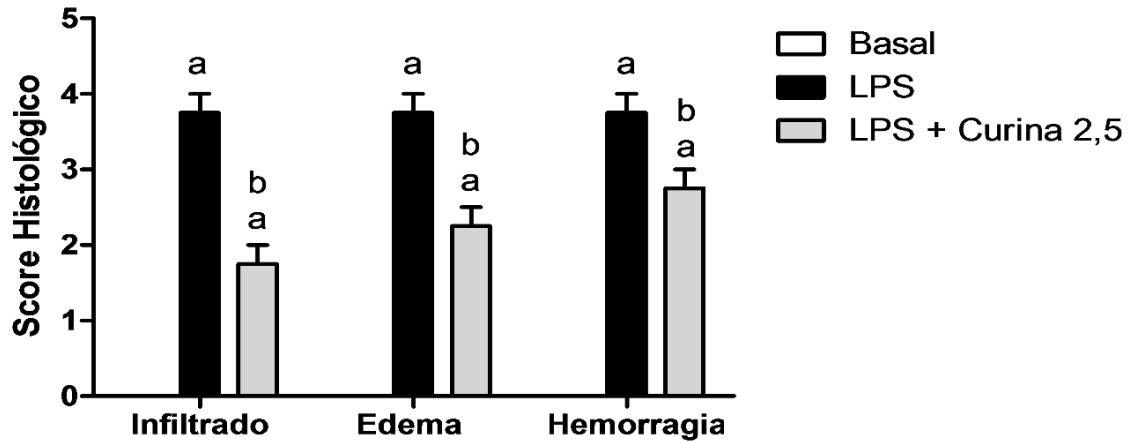
Os animais doentes tratados com a Curina (2,5 mg/kg) apresentaram redução nos parâmetros inflamatórios nos tecidos pulmonares quando comparados aos animais não tratados (grupo LPS), demonstrando redução ($p < 0,05$) no dano alveolar difuso. A redução do escore inflamatório no tecido pulmonar dos animais tratados com a Curina foi de 54% no parâmetro de infiltrado celular, 40% do edema formado e 27% do processo hemorrágico quando comparados aos do grupo LPS.

Figura 2. Efeito da Curina nos aspectos histopatológicos pulmonar, no modelo de LPA induzida por LPS, utilizando a coloração de HE.



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o pulmão para as análises histológicas. Após o órgão ser submetido a protocolos de desidratação, hidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Na Figura 2, estão representadas as fotomicrografias nos aumentos de 100x (600 μm) e 400x (150 μm), onde pode-se observar os seguintes parâmetros inflamatórios: infiltrado celular (triângulo verde); edema (triângulo vermelho) e hemorragia (triângulo amarelo). Resultados representativos de experimentos realizados em triplicada.

Gráfico 4. Efeito da Curina nos aspectos histopatológicos pulmonar, no modelo de LPA induzida por LPS, utilizando a coloração de HE.

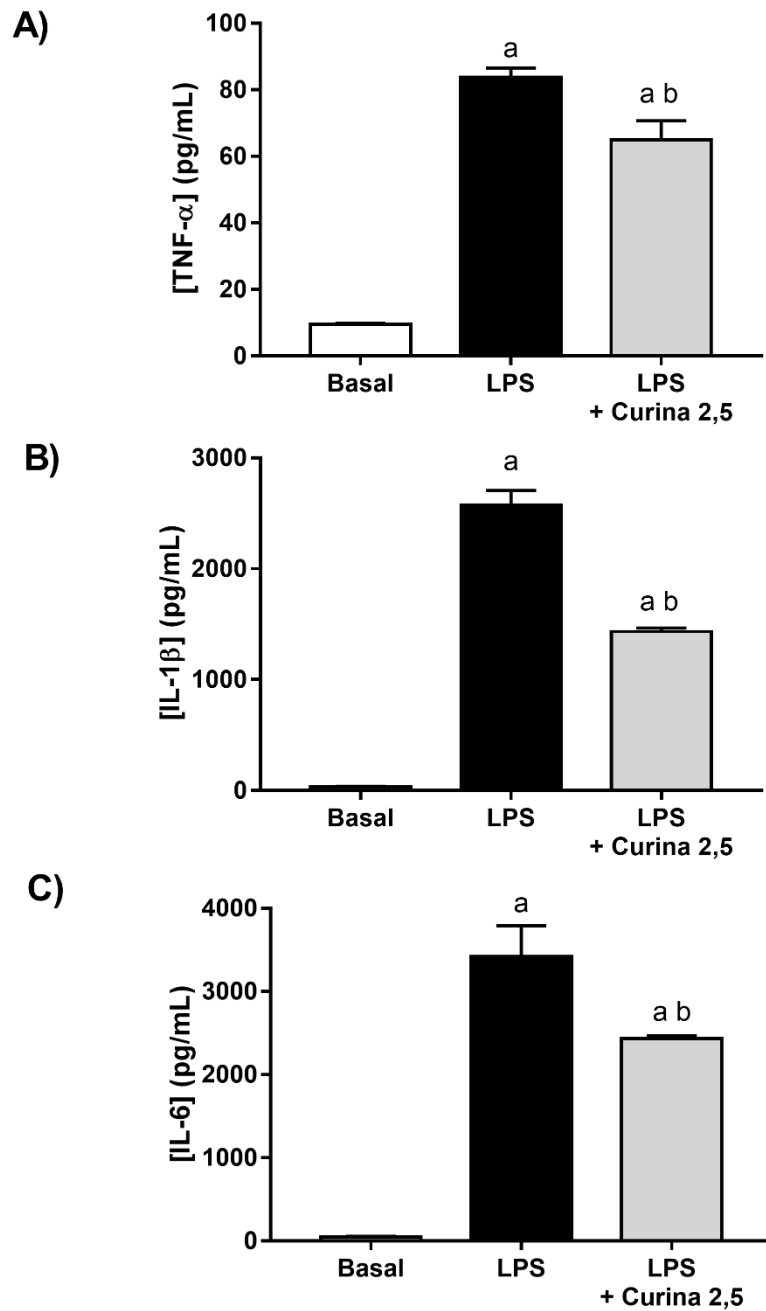


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o pulmão para as análises histológicas. Após o órgão ser submetido a protocolos de desidratação, hidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Foi realizado o score inflamatório, onde se foi pontuado os seguintes parâmetros: [0] ausência de alterações histológicas; [1] alterações suaves correspondentes a presença dessas alterações em menos de 25% do campo analisado; [2] alterações moderadas correspondentes a presença dessas alterações entre 25% e 49% do campo analisado; [3] alterações acentuadas correspondentes a presença dessas alterações entre 50% e 75% do campo analisado e [4] alterações muito acentuadas correspondentes a presença dessas alterações em mais de 75% do campo analisado. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS.

4.5.Efeito da Curina na produção de citocinas inflamatórias no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão demonstrados no Gráfico 4 (A. TNF- α ; B. IL-1 β e C. IL-6. O desafio com LPS (grupo LPS) promoveu aumento ($p<0,05$) em oito (08) vezes nos níveis de TNF- α ($83,72 \pm 2,809$ vs $9,445 \pm 0,3502$), em 77 vezes nos níveis de IL-1 β ($2572 \pm 135,4$ vs $33,37 \pm 5,63$) e em 70 vezes nos níveis de IL-6 ($3423 \pm 370,1$ vs $48,37 \pm 5,317$) quando comparados aos do grupo Basal. Os animais doentes tratados com a Curina (2,5 mg/kg) apresentaram diminuição ($p<0,05$) em 23% de TNF- α , em 56% de IL-1 β e em 29% de IL-6, quando comparados aos do grupo LPS.

Gráfico 5. Efeito da Curina na produção de citocinas de perfil inflamatório no desenvolvimento da LPA induzida por LPS.



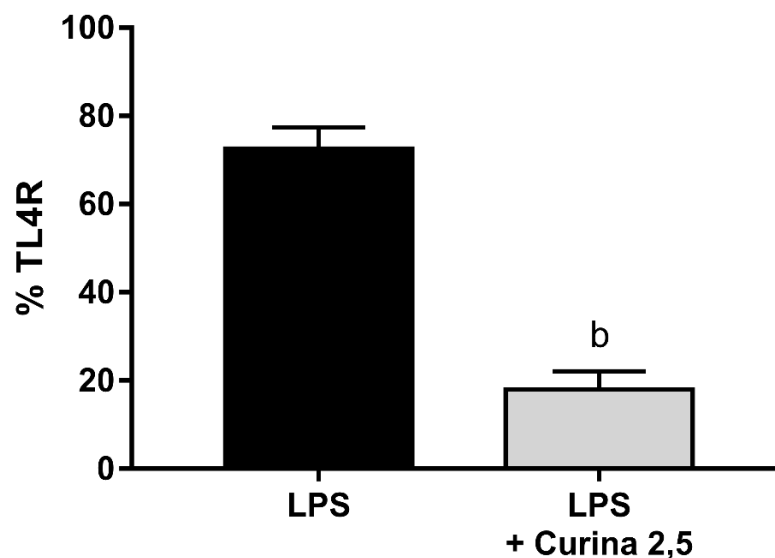
Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o BALF, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de citocinas seguindo o protocolo estabelecido no kit através do método imunoenzimático do tipo ELISA sanduiche. A) expressa a [TNF- α], B) expressa a [IL-1 β] e C) expressa a [IL-6]. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS. Experimentos realizados em triplicada.

4.6. Efeito do tratamento da Curina na expressão do receptor do tipo *Toll Like 4* (TLR4) em granulócitos presentes no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) dos animais com lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

O receptor do tipo Toll 4 (TLR4) é o ligante, na célula, ao lipopolissacarídeo (LPS) e é imprescindível para o desenvolvimento da LPA induzida por LPS. A Figura 3 e o Gráfico 6 demonstram a porcentagem da frequência de expressão deste receptor nas células dos animais dos diferentes grupos experimentais, analisados pela técnica de citometria de fluxo.

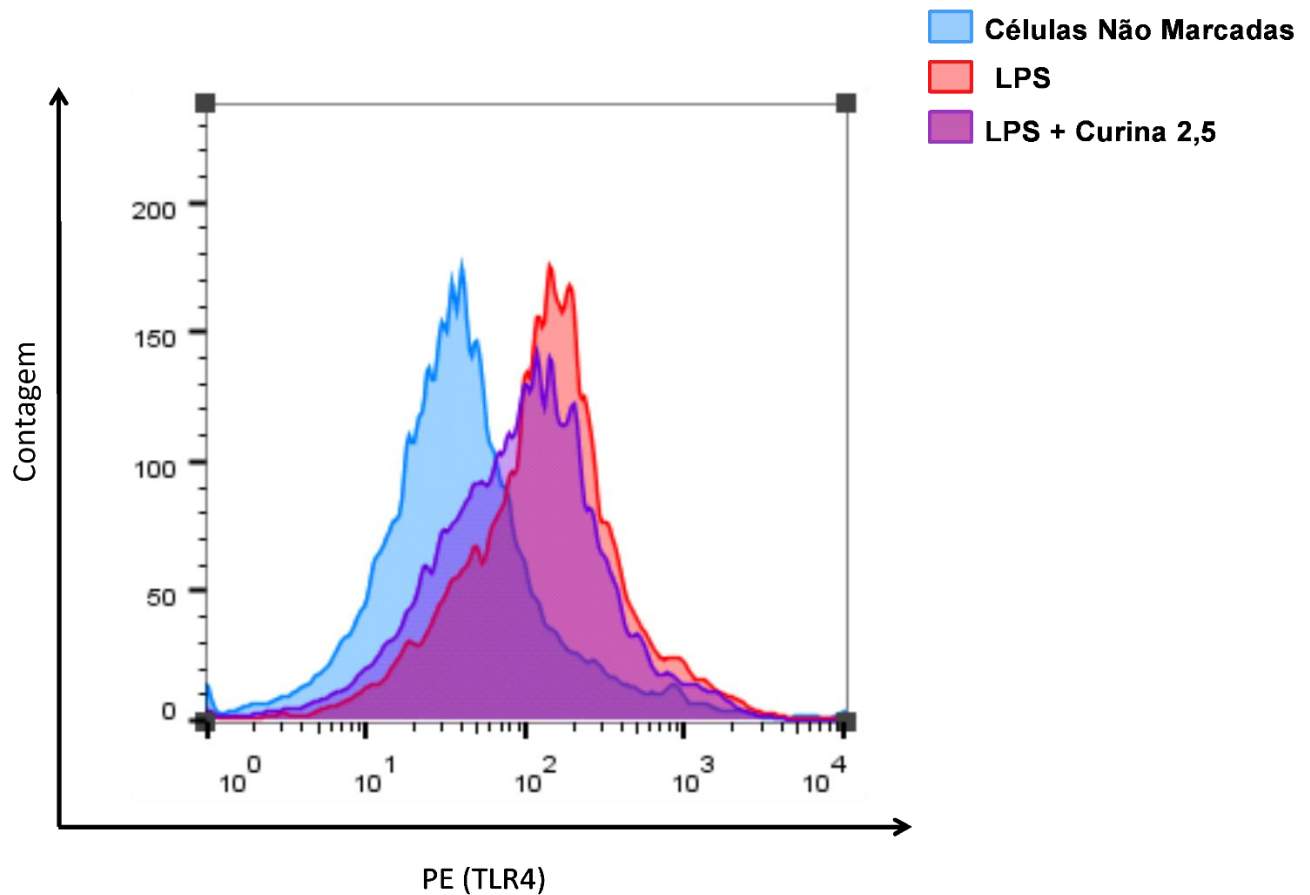
O tratamento com a Curina (2,5 mg/kg) diminuiu ($p < 0,05$) em 77% a expressão do TRL4 nos granulócitos quando comparados com os animais doentes (grupo LPS) ($17,93 \pm 4,173$ vs $72,63 \pm 4,756$, respectivamente)

Gráfico 6. Efeito da Curina na expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em granulócitos presentes do BALF dos animais com LPA induzida por LPS.



Camundongos BALB/c machos ($n=6$) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. Setenta e duas (72) horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo. A expressão do TLR4 (PE) foi analisada em granulócitos. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS. Experimentos realizados em triplicada.

Figura 3. Efeito da Curina na expressão do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) em granulócitos presentes do BALF dos animais com LPA induzida por LPS.



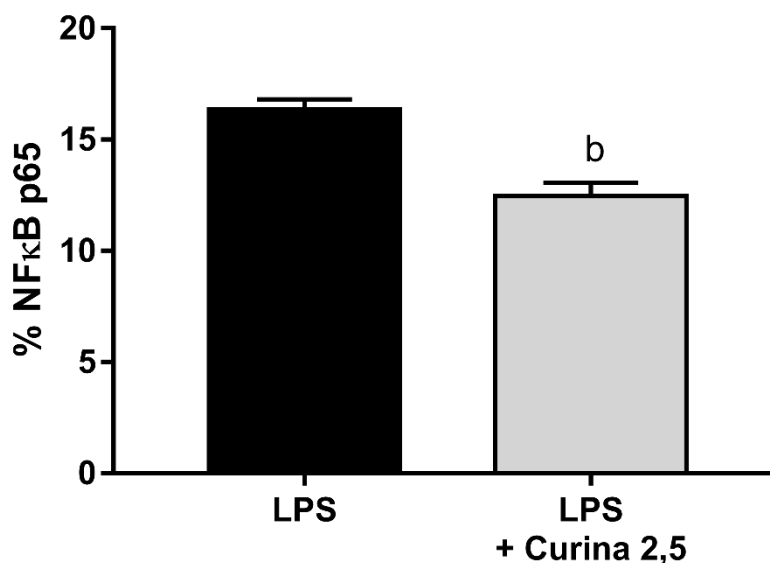
Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. 72 horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo. A expressão do TLR4 (PE) foi analisada em granulócitos. Na **Figura 3** está inserido um histograma representativo dos grupos experimentais. Os dados foram analisados no programa Flowjo versão 10. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicada.

4.7. Efeito da Curina na ativação da porção p65 do Fator de Transcrição NF- κ B em granulócitos presentes no BALF de animais com LPA induzida por Lipopolissacarídeo (LPS)

A frequência de expressão da porção p65 do Fator de Transcrição NF- κ B em granulócitos no BALF de animais com LPA, analisada pela técnica de citometria de fluxo, está representada na Figura 4 e no Gráfico 7.

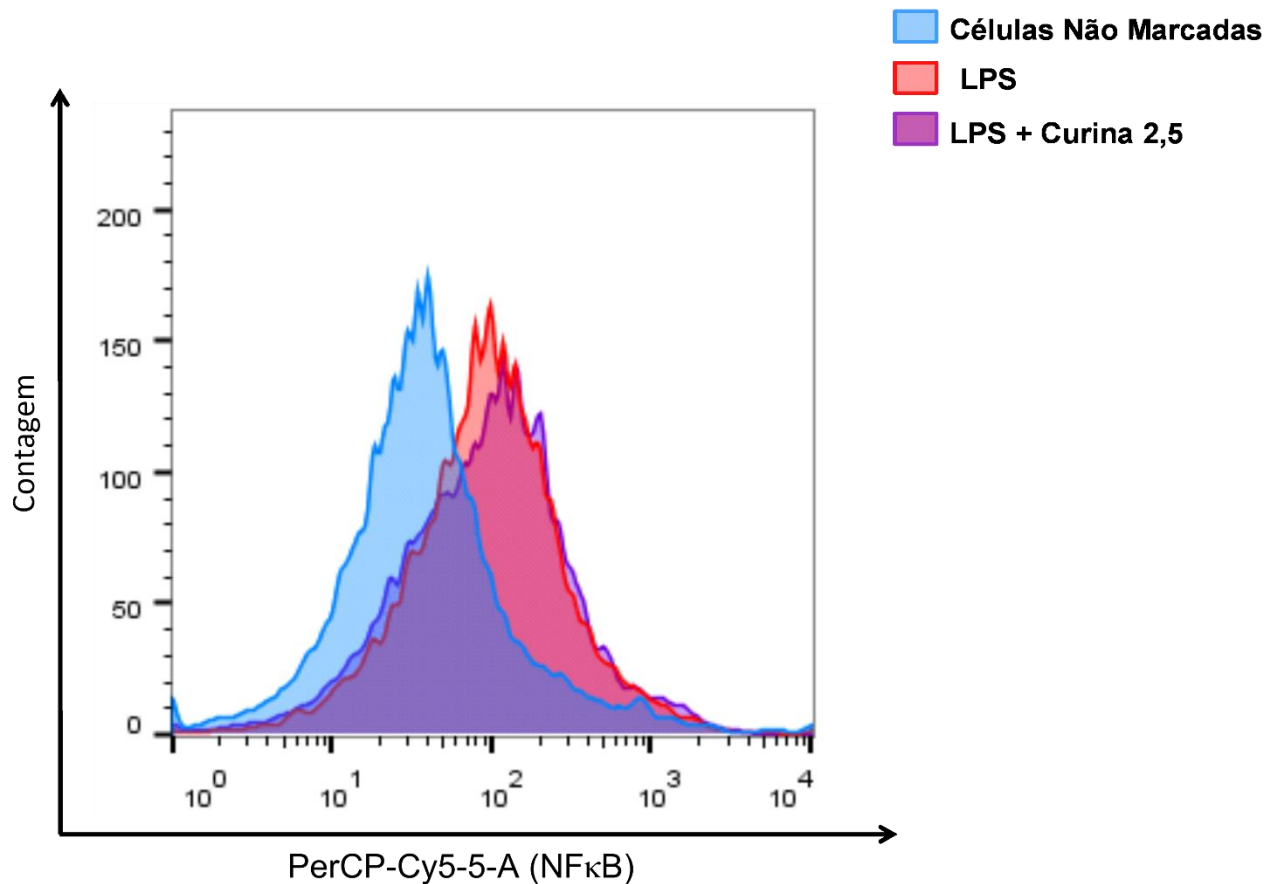
O tratamento com a Curina (2,5 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) em 24% a ativação da porção fosforilada p65 do Fator de Transcrição NF- κ B em granulócitos no BALF quando comparado com a dos animais do grupo LPS ($12,45 \pm 0,606$ vs $16,37 \pm 0,437$ respectivamente)

Gráfico 7. Efeito da Curina na porção p65 do Fator de Transcrição NF κ B em granulócitos presentes no BALF de animais com LPA induzida por LPS



Camundongos BALB/c machos ($n=6$) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. 72 horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo. A porção p65 do Fator de Transcrição NF κ B (PerCP-Cy5-5) foi analisada em granulócitos. 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 Tukey. (a) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo Basal e (b) $p < 0,05$, quando comparado ao grupo LPS. Experimentos realizados em triplicada.

Figura 4. Efeito da Curina na porção p65 do Fator de Transcrição NFκB em granulócitos presentes no BALF de animais com LPA induzida por LPS.



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com Lipopolissacarídeo (LPS) e tratados via a oral (v.o) com Curina na dose de 2,5 mg/kg, uma hora após o desafio. 72 horas após a instilação de LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo. A ativação do NFκB (p65) (PerCP-Cy5-5-A) foi analisada em granulócitos. Na **Figura 4** está inserido um histograma representativo dos grupos experimentais. Os dados foram analisados no programa Flowjo versão 10. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicada.

5. DISCUSSÃO

A curina vem sendo apontada como um promissor alcaloide a ser utilizado na terapêutica de processos inflamatórios pulmonares, entretanto, seus mecanismos moleculares estão para serem desvendados (DANTAS et al., 2015; DIAS et al., 2002; LEITE et al., 2014; MEDEIROS et al., 2011; RIBEIRO-FILHO et al., 2013, 2014, 2019; RIBEIRO-FILHO; PIUVEZAM; BOZZA, 2015, RIBEIRO-FILHO et al. 2019). As principais evidências desse trabalho são que a Curina exerce ação protetora aos efeitos deletérios do lipopolissacarídeo (LPS) no modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA) atenuando o processo inflamatório devido à diminuição da migração de granulócitos para a cavidade pulmonar, das citocinas de perfil inflamatório e do edema pulmonar. Essa atividade anti-inflamatória da curina é decorrente de sua ação em mecanismos intracelulares regulatórios envolvendo a via a transdução de sinais TLR-4/NFκB, imprescindível para a patogênese da LPA.

Esse trabalho apresenta significativa importância no contexto dos efeitos aferidos à curina pois é pioneiro em demonstrar sua atividade anti-inflamatória em modelo de LPA induzida por LPS, em elucidar, no mínimo, um dos mecanismos de ação envolvido, e finalmente em contribuir na compreensão dos efeitos da curina nos processos histopatológicos da LPA.

Sabe-se que o LPS, componente principal das membranas externas de bactérias gram-negativas, induz a lesão pulmonar aguda devido a superprodução de citocinas de perfil inflamatório, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 que são marcadamente reconhecidas como mediadores primordiais na patogênese da LPA (KNAPP et al., 2006).

Nesse trabalho, consistente com os relatos anteriores (LI et al., 2018; MENG et al., 2018; PULJIC et al., 2007), foi demonstrado que o desafio intranasal com LPS em camundongos da linhagem isogênica BALB/c promoveu o aumento de infiltrado celular, majoritariamente neutrofílico, bem como o aumento da permeabilidade vascular, com destruição da barreira alvéolo-capilar, contribuindo eficazmente para a formação do edema e consequente perda do processo de trocas gasosas, levando a hipóxia tecidual, além de apresentar um aumento expressivo na produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esses

mecanismos inflamatórios foram desencadeados pela via de sinalização TLR-4/NFκB.

O tratamento com a curina demonstrou prevenir a lesão pulmonar aguda, atenuando os danos teciduais causados pelo desafio com LPS, de forma a reduzir a migração celular, principalmente de neutrófilos, diminuir o infiltrado proteico, bem como a razão pulmonar úmido/seco (U/S), demonstrando efeito na diminuição do edema tecidual característico desta doença. Em adição, reverteu os danos histopatológicos; diminuiu a produção das citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6, essenciais para a manutenção do processo inflamatório da LPA com modulação negativa na expressão do receptor TLR-4 e, consequentemente, da ativação do NFκB.

A curina é um alcaloide bisbenzilisquinolínico (BBA), derivado da planta *Chondodendron platyphyllum* A. St. Hil (Miers) (Menispermaceae), e que apresenta importantes efeitos farmacológicos já descritos (DANTAS et al., 2015; DIAS et al., 2002; LEITE et al., 2014; MEDEIROS et al., 2011; RIBEIRO-FILHO et al., 2013, 2014, 2019). Em adição, a molécula apresenta baixa toxicidade por não induzir alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos, físicos e comportamentais, não induz úlcera gástrica (RIBEIRO-FILHO et al., 2013), além de apresentar efeito vasodilatador, reduzindo as concentrações intracelulares de Ca^{2+} em células musculares lisas, inibindo os canais de cálcio do tipo 1.2, interferindo na ativação e degranulação de mastócitos, diminuindo a liberação dos mediadores CysLT e PGD₂ e prolongando o tempo de sobrevivência do animal no choque anafilático (MEDEIROS et al., 2011; RIBEIRO-FILHO et al., 2014).

Ribeiro-Filho e col. (2013) demonstraram a atividade anti-alérgica da curina em modelo experimental de asma alérgica via a inibição da migração e ativação de eosinófilos, formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, diminuição na produção de eotaxina e IL-13 por células do lavado broncoalveolar BALF. Em adição, Leite e col. (2014) demonstraram o efeito anti-edematogênico da curina nos modelos experimentais de edema induzido por agentes flogísticos, tais como carragenina, zymosan, histamina e composto 48/80. Os autores ainda demonstraram que a curina inibiu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético, de forma a interferir na formação do edema. A curina também apresentou potente efeito citotóxico nas linhagens celulares leucêmicas (HL-60

e K562) e aumento do número de células apoptóticas em cerca de 60% nas células HL-60 (DANTAS et al., 2015). Esse alcaloide inibe a produção de PGE₂ em *in vitro*, sem interferir a expressão de COX-2, caracterizando uma atividade analgésica (LEITE et al., 2014).

Recentemente, estudos utilizando o modelo experimental de pleurisia induzida por LPS demonstraram que a Curina apresentou importantes efeitos anti-inflamatórios associados à inibição da ativação de macrófagos e recrutamento de neutrófilos, bem como à produção reduzida de citocinas inflamatórias, LTB₄, NO e modulação do influxo de Ca²⁺. Importante ressaltar que os efeitos da curina descritos acima foram evidenciados com tratamento por via oral, na dose de 2,5 mg/kg (RIBEIRO-FILHO et al., 2019).

Diante do exposto acima, pode-se inferir que a curina é um importante alcaloide natural com atividade anti-inflamatória evidenciada em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

A escolha do modelo experimental de LPA induzida por LPS para averiguar os efeitos da curina se deve ao fato de que a LPA e sua forma mais grave, a SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo), são problemas de saúde mundial, com morbimortalidade elevada e caracterizada por extensa reação inflamatória tecidual, marcada por neutrófilos, juntamente com a ruptura da barreira alvéolo-capilar levando ao grave comprometimento das trocas gasosas. Entretanto, até o presente momento não existe uma farmacoterapia adequada para tratar essa doença, sendo, portanto, urgente e necessário a busca por estratégias terapêuticas para o seu manejo (CHANG et al., 2018; CRUZ; WEISS; ROCCO, 2016).

O infiltrado celular, principalmente de neutrófilos (PMN), no tecido alveolar na LPA é um biomarcador importante, pois a presença em excesso e persistência de PMN nos alvéolos pode resultar em dano adicional ao tecido pela liberação de múltiplos mediadores tóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO), proteases e citocinas pró-inflamatórias que exacerbam a LPA (BHATTACHARYA; MATTHAY, 2013; LI et al., 2018).

Na patogênese dessa doença, os neutrófilos são as primeiras células imunes recrutadas para o local da inflamação, acompanhados pelo aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar e edema pulmonar (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; REBETZ; SEMPLE; KAPUR, 2018). Os neutrófilos ativados

transmigram para o espaço alveolar, onde secretam quimioatraentes, como LTB₄ e recrutam mais leucócitos no sentido de amplificar a resposta inflamatória. Tem sido demonstrado que o influxo de neutrófilos no pulmão tenha um papel fundamental na progressão da LPA (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Em adição, são células que produzem altas concentrações de IL-1 β , TNF- α e IL-6, responsáveis por manter a inflamação pulmonar (ABRAHAM, 2003; PUGIN et al., 1996; TAK; FIRESTEIN, 2001).

Um dos mecanismos dos neutrófilos ativados para a realização de tais efeitos está associado à ativação da via de sinalização NF- κ B, implicando diretamente na superprodução das citocinas pró-inflamatórias (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996; LI; PENG, 2000). Os neutrófilos ainda são os responsáveis pela liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010) que são estrutura fibrosa ou única em forma de rede e é composta por grânulos e elementos nucleares com atividade proteolítica contra bactérias e infecções por micróbios mas também por lesar o tecido pulmonar (BRINKMANN et al., 2004; CAUDRILLIER et al., 2012; URBAN et al., 2006).

Caudrillier e col. (2012) demonstraram que o NET oriundo de neutrófilos e plaquetas desempenha um papel crucial no modelo experimental de lesão pulmonar aguda. Narasaraju e col. (2011) mostraram, em modelo experimental de SDRA induzida por influenza, quantidades excessivas de neutrófilos e formação de NET com lesão pulmonar associada. Entretanto, não apenas a formação de NET por neutrófilos é a causa da lesão pulmonar, como também as proteínas liberadas, tais com a elastease neutrofílica que em adição promove o aumento da expressão e liberação das citocinas, bem como da promoção da própria NET (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016; DENGLER et al., 2013; LIU et al., 2016).

Abraham (2003) demonstrou que, clinicamente, o número de células inflamatórias, primordialmente neutrófilos, no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com SDRA correlaciona-se estreitamente com a gravidade da doença e a atenuação desse infiltrado celular reduz o dano pulmonar e melhora da função capilar-alveolar (CETINKAYA et al., 2005; CHIGNARD; BALLOY, 2000; FUJISHIMA, 2014).

Em consonância com investigações anteriores (JIANG et al., 2016; MA et al., 2015; QU et al., 2019; SHAABAN et al., 2018a; SZARKA et al., 1997), o presente estudo revelou que a administração de LPS induziu a infiltração de células inflamatórias nos pulmões, principalmente neutrófilos. Entretanto, o tratamento com Curina diminuiu acentuadamente o influxo dessas células na cavidade pulmonar dos animais doentes, levando à atenuação da lesão pulmonar observada nos estudos com os tecidos pulmonares corados com H&E. A migração de macrófagos também foi revertida com o tratamento com a Curina, conferindo a redução do processo inflamatório e consequente ativação neutrófilica relacionada basicamente por essas células. Esses resultados são expressivos, pois indicam que a Curina possa estar modulando negativamente a migração de neutrófilos pela diminuição na expressão de moléculas de adesão, como selectinas e integrinas no endotélio pulmonar, bem como na produção de moléculas quimiotáticas demonstrado anteriormente por RIBEIRO-FILHO e col. (2019).

A ativação de neutrófilos e macrófagos no tecido pulmonar participa no aumento da permeabilidade da barreira alveolar-capilar, o que resulta no desenvolvimento de edema pulmonar e para avaliar esse parâmetro, tem sido descrito que a estimativa da razão Úmido/Seco do pulmão e do conteúdo de proteínas determinam a integridade da barreira alveolar-capilar e a extensão do edema pulmonar (ABRAHAM, 2003; BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016; EL-AGAMY, 2011; GE et al., 2010; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; JOHNSON; MATTHAY, 2010; TILGNER et al., 2016).

A quebra da integridade da barreira alveolar-capilar com o aumento da permeabilidade vascular pulmonar resulta em uma condição fisiopatológica caracterizada por inundação de líquido a nível alveolar e edema pulmonar e subsequente hipoxemia. O edema pulmonar pode levar a hemorragia alveolar aguda onde as células endoteliais e os pneumócitos sofrem necrose, o que agrava ainda mais o quadro clínico do paciente. Desta forma, o edema é a consequência da perda da integridade alveolar, promovendo o quadro hipoxêmico e consequente morte do paciente (AL-HARBI et al., 2016; MOHAMMAD RIZWAN SIDDIQUI, 2019; PHAM, 2006).

Nossos resultados demonstram que os animais doentes apresentaram aumento expressivo do conteúdo proteico no pulmão e da razão pulmonar U/S

(Úmido/Seco) caracterizando, portanto, a perda da integridade e consequente aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar com extenso dano alveolar. Entretanto, o tratamento com a Curina nesses animais reverteu o excesso de conteúdo proteico no BALF, como também reduziu a razão U/S, conferindo à molécula atividade anti-edematogênica no quadro da LPA. Esse efeito da Curina na LPA é corroborado com resultados descritos em trabalhos anteriores que demonstram a atividade anti-edematogênica em modelos experimentais de edema induzidos por agentes flogísticos, e de também ter sido observado diminuição da permeabilidade vascular induzida por ácido acético no modelo experimental de peritonite (LEITE et al., 2014; RIBEIRO-FILHO et al., 2014).

Devido ao fato da ativação de neutrófilos ocorrer nos pulmões de animais com LPA e liberar moléculas citotóxicas que induzem a ruptura e disfunção endotelial, responsáveis pelas principais manifestações clínicas da síndrome (CHABOT et al., 1998; FUJISHIMA, 2014), nós analisamos o dano histológico pulmonar corados com H&E dos animais doentes e tratados com curina pelo sistema de escore semiquantitativo.

Nesse sentido, observou-se no tecido pulmonar de animais doentes hemorragia, infiltrado celular, edema, espessamento do septo alveolar, bem como o estreitamento dos espaços alveolares, demonstrando a gravidade da doença e, consequente, destruição e perda da integridade tecidual. O tratamento desses animais com a Curina reverteu os danos teciduais analisados corroborando com os dados obtidos do fluido do lavado bronco alveolar (diminuição da migração de neutrófilos, permeabilidade vascular com conteúdo proteico e edema).

Diante desses resultados parciais pode-se inferir que a Curina reverte o quadro patológico da LPA induzida por LPS modulando negativamente os parâmetros que levam a gravidade da doença e ainda promove o retorno a homeostase tecidual.

Na LPA/SDRA tem sido descrito que moléculas produzidas por células no tecido pulmonar, tais como citocinas com perfil inflamatório (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) são corresponsáveis pela patogênese e manutenção da lesão pulmonar e estão intimamente associadas à presença de leucócitos, principalmente neutrófilos, no local inflamado.

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α são importantes indicadores sistêmicos da fase aguda da inflamação, sendo seus níveis elevados associados à piora da condição clínica (DINARELLO, 2007) e, macrófagos teciduais ativados produzem grandes quantidades dessas citocinas (TAKASHIMA et al., 2014). O TNF- α é a primeira citocina multifuncional produzida por macrófagos alveolares estimulados por LPS, e inicia a cascata inflamatória estimulando outras células a secretar citocinas e quimiocinas, como IL-6 e IL-1 β , proteína inflamatória de macrófagos e proteína quimiotática de monócitos (MCP1), que subsequentemente mediam o recrutamento de PMNs e aumentam a gravidade da lesão pulmonar (SHI et al., 2010; YEH et al., 2014) por induzir a diminuição da complacência pulmonar e causar hipoxemia grave (FUJISHIMA, 2014; SHAABAN et al., 2018b).

A IL-1 β tem como fonte de sua produção os neutrófilos ativados presentes nos alvéolos na LPA/SDRA (ZHANG et al., 2017). Em pacientes com SDRA, a IL-1 β é o principal mediador inflamatório encontrado no lavado broncoalveolar (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016; MOKRA; KOSUTOVA, 2015). Estudos clínicos indicam que as interações entre a IL-1 β e sua família de ligantes e receptores em diversas populações celulares presente no tecido pulmonar apresentam papel crucial no desenvolvimento da LPA/SDRA, por estimular a produção de uma grande variedade de outros mediadores, como as quimiocinas CXCL-8, ativador de neutrófilos de células epiteliais (ENA-78), peptídeo quimiotático de monócitos (MCP-1) e macrófagos peptídeo inflamatório-1 (MIP-1) (BAUERNFEIND et al., 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2011).

Semelhantemente, a IL-6 também apresenta papel fundamental no quadro patológico da LPA, onde níveis elevados de IL-6 no líquido do lavado broncoalveolar têm sido caracterizado como mal prognóstico em pacientes com LPA/SDRA, e a elevação persistente desta citocina em humanos com SDRA ou sepse tem sido associadas a resultados graves podendo levar a morte do paciente (RAEBURN et al., 2002).

Os resultados do presente estudo indicaram o aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no BALF de animais doentes, o que está de acordo com resultados anteriores descritos (EL-AGAMY, 2011; YEH et al., 2014). O tratamento de animais doentes e tratados com a Curina suprimiu acentuadamente a produção dessas citocinas. Em modelos animais de lesão

tecidual, como a pleurisia induzida por LPS (RIBEIRO-FILHO et al., 2019), o papel da Curina foi abordado e os autores demonstraram que houve inibição na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e correlacionaram tanto com a diminuição do recrutamento de neutrófilos como também com a ativação de macrófagos. Os resultados desses trabalhos e dos observados por Ribeiro-Filho e col. (2019) indicam que a Curina suprime a infiltração de células inflamatórias no pulmão e diminui o grave processo inflamatório pela inibição da liberação de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6 e o TNF- α .

Nos mecanismos de ativação celular induzido por LPS sabe-se que o LPS ativa a via de sinalização do receptor TLR-4 presente em uma grande variedade de células do mecanismo imune inato, induzindo a ativação intracelular de NF- κ B e sua transferência para o núcleo celular levando a transcrição de uma grande variedade de genes, incluindo os de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6 (IMAI et al., 2008).

Estudos clínicos e não clínicos têm demonstrado que a via de sinalização mediada por TLR4 é responsável pelo reconhecimento de patógenos, que apresentam na sua superfície celular o LPS, e ativação do sistema imunológico inato e, por ser um evento molecular precoce, está envolvido na LPA.

O NF- κ B é reconhecido como um fator de transcrição crítico nas vias de sinalização mediadas por TLR4 (BADSHAH; ALI; KIM, 2016; WAN et al., 2016) desempenhando um papel vital na regulação dos genes responsáveis pelo estresse celular e pelas reações imunes (CAO et al., 2015; LUO; CHE; ZHAO, 2017). Nesse contexto, a sinalização via LPS envolve a interação de CD14, MD2 e TLR4 (FENTON; GOLENBOCK, 1998), sendo o TLR4 o complexo proteico responsável pela sinalização transmembranar e intracelular (AKASHI et al., 2000; HOSHINO et al., 1999).

O TLR4 é um dos subtipos dos receptores TLRs importante para identificar bactérias patogênicas. O domínio Toll/receptor de IL-1 (TIR) na região citoplasmática se liga, na extremidade carboxila da proteína adaptadora intracitoplasmática, MyD88, para formar um complexo que recruta a quinase relacionada ao receptor de IL-1 (IRAK) e ocorre a autofosforilação, em seguida ocorre a ligação ao fator 6 relacionado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) que ativa a IKB quinase (IKKs) que promove a ubiquitinação e a degradação do IKB ativando o NF- κ B pela fosforilação da p65. Esse processo

promove a transferência do NFκB do citoplasma para o núcleo, ocasionando o início e aumento na transcrição e tradução de muitos genes relacionados à inflamação (BIEGHS; TRAUTWEIN, 2014; YIN et al., 2018). Entre esses genes estão os das citocinas que, uma vez produzidas, mediam a inflamação e regulam via mecanismo de feedback positivo a atividade do NF-κB, amplificando, portanto, o processo inflamatório nos organismos (SHI et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Os resultados apresentados demonstram que o tratamento oral com a Curina de animais doentes promoveu a diminuição na expressão do TLR-4 com consequente diminuição na ativação da porção p65 do NFκB em neutrófilos do lavado broncoalveolar quando comparados com os de animais doentes não tratados. Esses resultados de mecanismos intracelulares envolvendo moléculas que levam a ativação de fatores de transcrição permitem inferir que a curina apresenta efeito protetor no desencadeamento da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS por diminuir a expressão do TLR-4 que regulou negativamente a ativação da p65NFκB e, consequentemente, a diminuição na produção de citocinas de perfil inflamatório, a migração de neutrófilos para o tecido pulmonar e o edema devido manutenção da barreira alvéolo-capilar.

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho, bem com os anteriormente publicados (DANTAS et al., 2015; DIAS et al., 2002; LEITE et al., 2014; MEDEIROS et al., 2011; RIBEIRO-FILHO et al., 2013, 2014, 2019; RIBEIRO-FILHO; PIUVEZAM; BOZZA, 2015) e aqui citados, pode-se inferir que a curina, um alcaloide do tipo bisbensilisoquinolínico, é uma molécula promissora para ser incluída, em uma formulação adequada, no arsenal de moléculas a ser testada clinicamente na síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram o efeito imunomodulador do alcaloide Curina decorrente de suas atividades anti-inflamatória e anti-edematogênica no modelo experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Os mecanismos imunomoduladores da Curina estão intimamente associados à inibição na expressão do receptor do tipo *Toll Like 4* (TLR4) com consequente diminuição no processo de fosforilação e ativação da porção p65 do fator de transcrição NF- κ B que levaram a diminuição na migração de células inflamatórias, majoritariamente neutrófilos, para o tecido pulmonar, decréscimo na permeabilidade vascular e formação do edema, além da diminuição na produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, essenciais para a patogênese e o agravamento da doença. Portanto, esses resultados conferem ao alcaloide Curina respaldo científico quanto a sua atividade protetora na lesão pulmonar aguda e torna-a promissora no sentido de ser testada em fases não-clínicas e, posteriormente, clínicas e potencialmente ser incluída no arsenal de condutas terapêuticas para o tratamento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) observada em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. **Neutrophils and acute lung injury**. Critical Care Medicine. **Anais...**1 abr. 2003
- AGGARWAL, N. R.; KING, L. S.; D'ALESSIO, F. R. **Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution****American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**American Physiological Society, , 15 abr. 2014.
- AKASHI, S. et al. Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling Via the Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex on Mouse Peritoneal Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3471–3475, 1 abr. 2000.
- AL-HARBI, N. O. et al. Dexamethasone Attenuates LPS-induced Acute Lung Injury through Inhibition of NF-κB, COX-2, and Pro-inflammatory Mediators. **Immunological Investigations**, v. 45, n. 4, p. 349–369, 18 maio 2016.
- ALBIGER, B. et al. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 6, p. 511–528, jun. 2007.
- ALESSIO, F. R. D. et al. Fyqfsjnfoubm Mvoh Jokvsz Jo Njdf Boe Bsf Qsftfou Jo Ivnbót Xjui Bdvuf Mvoh Jokvsz. v. 119, n. 10, 2009.
- ALTEMEIER, W. A.; HUNG, C. F.; MATUTE-BELLO, G. Mouse Models of Acute Lung Injury. In: [s.l: s.n.]. p. 5–23.
- ANGERHOFER, C. K. et al. Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Natural Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 59–66, jan. 1999.
- ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, n. 7511, p. 319–323, 12 ago. 1967.
- ASTI, C. et al. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 2, p. 61–69, 2000.
- AWUAH, E.; CAPRETTA, A. Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 16, p. 5627–5634, 20 ago. 2010.
- AZEVEDO, L. C. P. et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: A multicenter, prospective, cohort study. **Critical Care**, v. 17, n. 2, 4 abr. 2013.
- B. TAYLOR THOMPSON, M.D., RACHEL C. CHAMBERS, PH.D., AND KATHLEEN D. LIU, M.D., P. D. Ards Nejm 2017. **Nejm**, 2017.

- BADSHAH, H.; ALI, T.; KIM, M. O. Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NFκB signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 6, 20 abr. 2016.
- BAEUEERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 4 out. 1996.
- BARBOSA-FILHO, J.; VASCONCELOS LEITÃO DA-CUNHA, E.; GRAY, A. I. Alkaloids of the menispermaceae. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 54, n. C, p. 1–190, 2000.
- BASTARACHE, J. A.; BLACKWELL, T. S. **Development of animal models for the acute respiratory distress syndrome** **DMM Disease Models and Mechanisms**, maio 2009.
- BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting Edge: NF-κB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 787–791, 15 jul. 2009.
- BECK-SCHIMMER, B. et al. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. **Respiratory Research**, v. 6, 22 jun. 2005.
- BELLANI, G. et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 788–800, 23 fev. 2016.
- BERGER, J.; DELPHIN, E. Acute Lung Injury and Repair. **Anesthesia & Analgesia**, v. 125, n. 5, p. 1809, nov. 2017.
- BERNARD, G. R. et al. **The American-European Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination.** American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **Anais...**American Thoracic Society, 1994
- BERSTEN, A. D. et al. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 4, p. 443–448, 15 fev. 2002.
- BEUTLER, B.; RIETSCHER, E. T. **Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin** **Nature Reviews Immunology**, fev. 2003.
- BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 7, p. 1152–1160, jul. 2006.
- BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Effectiveness of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 148–155, 2012.
- BHADRA, K.; KUMAR, G. S. **Therapeutic potential of nucleic acid-binding**

- isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design***Medicinal Research Reviews*, nov. 2011.
- BHARGAVA, M.; WENDT, C. H. **Biomarkers in acute lung injury***Translational Research*Mosby Inc., , 2012.
- BHATIA, M.; ZEMANS, R. L.; JEYASEELAN, S. **Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury***American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, maio 2012.
- BHATTACHARYA, J.; MATTHAY, M. A. Regulation and Repair of the Alveolar-Capillary Barrier in Acute Lung Injury. **Annual Review of Physiology**, v. 75, n. 1, p. 593–615, 10 fev. 2013.
- BIEGHS, V.; TRAUTWEIN, C. Innate immune signaling and gut-liver interactions in non-alcoholic fatty liver disease. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 3, n. 6, p. 377–37785, 2014.
- BISSET, N. G. Curare - Botany, Chemistry, and Pharmacology. **Acta Amazonica**, v. 18, n. suppl 1-2, p. 255–290, 1988.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 5 mar. 2004.
- BRYANT, C. E. et al. **The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide***Nature Reviews Microbiology*, jan. 2010.
- BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. **Acute lung injury: A clinical and molecular review***Archives of Pathology and Laboratory Medicine*College of American Pathologists, , 1 abr. 2016.
- CALFEE, C. S. et al. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: Latent class analysis of data from two randomised controlled trials. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 8, p. 611–620, 2014.
- CAO, W. et al. Geranylgeranylacetone ameliorates lung ischemia/reperfusion injury by HSP70 and thioredoxin redox system: NF-kB pathway involved. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 32, p. 109–15, jun. 2015.
- CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: Prospective evaluation of 7,133 Patients. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 3, p. 574–582, mar. 2014.
- CAUDRILLIER, A. et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 7, p. 2661–2671, 2 jul. 2012.
- CETINKAYA, A. et al. Levels of malondialdehyde and superoxide dismutase in subclinical hyperthyroidism. **Mediators of Inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 57–59, 24 fev. 2005.

- CHABOT, F. et al. Reactive oxygen species in acute lung injury. **The European respiratory journal**, v. 11, n. 3, p. 745–57, mar. 1998.
- CHANG, Y.-W. et al. β -Nitrostyrene derivatives attenuate LPS-mediated acute lung injury via the inhibition of neutrophil-platelet interactions and NET release. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 314, n. 4, p. L654–L669, 1 abr. 2018.
- CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. **The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine**Expert Review of Respiratory Medicine, dez. 2010.
- CHEN, W. et al. Critical role for integrin- β 4 in the attenuation of murine acute lung injury by simvastatin. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 303, n. 4, 15 ago. 2012.
- CHEUNG, O. Y.; GRAZIANO, P.; SMITH, M. L. **Acute Lung Injury**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- CHIGNARD, M.; BALLOY, V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 279, n. 6, p. L1083-90, dez. 2000.
- CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute Lung Injury:Apoptosis and Signaling Mechanisms. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 4, p. 361–371, abr. 2009.
- CHOW, C. W. et al. **Oxidative stress and acute lung injury**American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1 out. 2003.
- COSTA, H. F. et al. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 4, p. 519–525, abr. 2008.
- CRUZ, F. F.; WEISS, D. J.; ROCCO, P. R. M. **Prospects and progress in cell therapy for acute respiratory distress syndrome**Expert Opinion on Biological TherapyTaylor and Francis Ltd, , 1 nov. 2016.
- DANTAS, B. B. et al. Effects of curine in HL-60 leukemic cells: Cell cycle arrest and apoptosis induction. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 2, p. 218–223, 2015.
- DE ARIAS, A. R. et al. In vitro activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones againstTrypanosoma cruzi trypomastigotes. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 3, p. 141–144, maio 1994.
- DE SOUZA XAVIER COSTA, N. et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0185474, 27 set. 2017.
- DENGLER, V. et al. Neutrophil Intercellular Communication in Acute Lung Injury.

- Emerging Roles of Microparticles and Gap Junctions. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 1–5, jul. 2013.
- DENIS, M. et al. A mouse model of lung injury induced by microbial products: implication of tumor necrosis factor. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 10, n. 6, p. 658–664, 1994.
- DIAS, C. S. et al. Mechanisms involved in the vasodilator effect of curine in rat resistance arteries. **Planta Medica**, v. 68, n. 11, p. 1049–1051, 1 nov. 2002.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 7 abr. 2011.
- DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. Suppl 1, p. S34–S45, 2007.
- DO NASCIMENTO XAVIER, B. M. et al. MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent. **Inflammation Research**, v. 68, n. 12, p. 1061–1070, 1 dez. 2019.
- DUSHIANTHAN, A. et al. **Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury** *Postgraduate Medical Journal*, set. 2011.
- EAPEN, M. S. et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- EL-AGAMY, D. S. Nilotinib ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 253, n. 2, p. 153–160, 1 jun. 2011.
- FAMOUS, K. R. et al. Acute respiratory distress syndrome subphenotypes respond differently to randomized fluid management strategy. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 195, n. 3, p. 331–338, 1 fev. 2017.
- FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. **Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment** *JAMA - Journal of the American Medical Association* American Medical Association, , 20 fev. 2018.
- FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. **LPS-binding proteins and receptors**. *Journal of Leukocyte Biology*. **Anais...** Federation of American Societies for Experimental Biology, 1998
- FERGUSON, N. D. et al. The Berlin definition of ARDS: An expanded rationale, justification, and supplementary material. **Intensive Care Medicine**, v. 38, n. 10, p. 1573–1582, 2012.
- FIALKOW, L. et al. Mechanical ventilation in patients in the intensive care unit of a general university hospital in southern Brazil: An epidemiological study. **Clinics**, v. 71, n. 3, p. 145–151, 1 mar. 2016.

- FOURNET, A. et al. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American Leishmania sp. in BALB/c mice. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 4, p. 281–284, jul. 1993.
- FRANCA, S. A. et al. The epidemiology of acute respiratory failure in hospitalized patients: A Brazilian prospective cohort study. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 3, p. 330.e1-330.e8, 2011.
- FUJISHIMA, S. **Pathophysiology and biomarkers of acute respiratory distress syndrome** **Journal of Intensive Care** BioMed Central Ltd., , 2014.
- GAO, M. et al. Diosgenin down-regulates NF- κ B p65/p50 and p38MAPK pathways and attenuates acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 240–245, fev. 2013.
- GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. **The Interleukin-1 Family: Back to the Future** **Immunity**, 12 dez. 2013.
- GE, Z.-J. et al. Systemic perfluorohexane attenuates lung injury induced by lipopolysaccharide in rats: the role of heme oxygenase-1. **Pharmacological Reports**, v. 62, n. 1, p. 170–177, jan. 2010.
- GROENEVELD, A. B. J. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Vascular pharmacology**, v. 39, n. 4–5, p. 247–56, nov. 2002.
- GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 3–4, p. 293–307, mar. 2011.
- GUEDES, D. N. et al. Mechanism of the vasodilator effect of 12- O -methylcurine in rat aortic rings. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 853–858, jun. 2002.
- HAN, S.; MALLAMPALLI, R. K. The Acute Respiratory Distress Syndrome: From Mechanism to Translation. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 3, p. 855–860, 1 fev. 2015.
- HENDERSON, W. R. et al. **Fifty years of research in ARDS: Respiratory mechanics in acute respiratory distress syndrome** **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** American Thoracic Society, , 1 out. 2017.
- HERRIDGE, M. S. et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 14, p. 1293–1304, 7 abr. 2011.
- HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 7, p. 3749–52, 1 abr. 1999.

- HUANG, X. et al. The role of macrophages in the pathogenesis of ali/ards. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- IMAI, Y. et al. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 235–249, 18 abr. 2008.
- JACQUES, F. M. B.; BERTOLINO, A. P. Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). [s.d.].
- JIA, Y. et al. Treatment of acute lung injury by targeting MG53-mediated cell membrane repair. **Nature Communications**, v. 5, 18 jul. 2014.
- JIANG, Q. et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF-κB pathway. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 370–376, 2015.
- JIANG, W. et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state. **Chemico-Biological Interactions**, v. 243, p. 127–134, 2016.
- JOHNSON, E. R.; MATTHAY, M. A. **Acute lung injury: Epidemiology, pathogenesis, and treatment** *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 1 ago. 2010.
- KATZENSTEIN, A. L. A.; BLOOR, C. M.; LEIBOW, A. A. Diffuse alveolar damage: the role of oxygen, shock, and related factors. A review. **American Journal of Pathology**, v. 85, n. 1, p. 210–228, 1976.
- KATZENSTEIN; ALA. Acute lung injury patterns : diffuse alveolar damage and bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia. **Katzenstein and Askin's surgical pathology of non-neoplastic lung disease**, p. 14–47, 1997.
- KIM, Y. Y. et al. Tyrosol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response and maintaining the alveolar capillary barrier. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 526–533, 1 nov. 2017.
- KLAFF, L. S. et al. Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury Is Independent of Serum Vitamin D Concentration. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49076, 19 nov. 2012.
- KNAPP, S. et al. Pulmonary Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein Inhibits the LPS-Induced Lung Inflammation In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3189–3195, 1 mar. 2006.
- KUZMICH, N. N. et al. **TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis** *Vaccines* MDPI AG, , 1 dez. 2017.
- LEITE, F. C. et al. Curine, an Alkaloid Isolated from Chondrodendron platyphyllum Inhibits Prostaglandin E2 in Experimental Models of Inflammation and Pain. **Planta Medica**, v. 80, n. 13, p. 1072–1078, 2014.
- LI, N. et al. Sodium butyrate alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via

- inhibiting HMGB1 release. **International Immunopharmacology**, v. 56, n. July 2017, p. 242–248, 2018.
- LI, Y. et al. B7H3 ameliorates LPS-induced acute lung injury via attenuation of neutrophil migration and infiltration. **Scientific Reports**, v. 6, 12 ago. 2016.
- LI, Y.; PENG, Z. Activation NF-KB PATHWAY. **Critical Care Medicine**, v. 47, p. 100–104, 2000.
- LIN, S. et al. **Regulatory T cells and acute lung injury: Cytokines, uncontrolled inflammation, and therapeutic implications** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 9 jul. 2018.
- LINKO, R. et al. Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALI: A prospective cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 35, n. 8, p. 1352–1361, ago. 2009.
- LIU, S. et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. **Scientific Reports**, v. 6, 16 nov. 2016.
- LUHR, O. R. et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 6, p. 1849–1861, 1999.
- LUO, Y.; CHE, W.; ZHAO, M. Ulinastatin post-treatment attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and human alveolar epithelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 2, p. 297–306, 1 fev. 2017.
- MA, C. et al. Anti-inflammatory effects of water extract of *Taraxacum mongolicum* hand.-Mazz on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 349–355, 2015.
- MACKAY, A.; AL-HADDAD, M. **Acute lung injury** *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* Elsevier Ltd, , 2010.
- MANZANO, F. et al. Incidence of acute respiratory distress syndrome and its relation to age. **Journal of Critical Care**, v. 20, n. 3, p. 274–280, set. 2005.
- MARIA, J. et al. **Alkaloids of the Menispermaceae**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/281969055>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- MARSHALL, R. P. et al. **Genetic polymorphisms associated with susceptibility and outcome in ARDS**. Chest. **Anais...**American College of Chest Physicians, 2002
- MARTIN, T. R. Lung cytokines and ARDS: Roger S. Mitchell Lecture. **Chest**, v. 116, n. 1 Suppl, p. 2S-8S, jul. 1999.
- MARTIN, T. R. **Interactions between mechanical and biological processes in acute lung injury**. Proceedings of the American Thoracic Society. **Anais...**abr. 2008
- MARTIN, T. R.; MATUTE-BELLO, G. **Experimental Models and Emerging**

- Hypotheses for Acute Lung Injury***Critical Care Clinics*, jul. 2011.
- MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. **The acute respiratory distress syndrome***Journal of Clinical Investigation*, 1 ago. 2012.
- MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 147–163, 28 fev. 2011.
- MATTHAY, M. A.; ZIMMERMAN, G. A. **Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: Four decades of inquiry into pathogenesis and rational management***American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, out. 2005.
- MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. **Animal models of acute lung injury***American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, set. 2008.
- MCCHESENEY, J. D. Natural products in drug discovery--organizing for success. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 21, n. 2, p. 91–5, jun. 2002.
- MEDEIROS, M. A. A. et al. Curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, blocks L-type Ca²⁺ channels and decreases intracellular Ca²⁺ transients in A7r5 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 669, n. 1–3, p. 100–107, 2011.
- Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach - Paul M. Dewick - Google Livros**. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=A4zptjOJfKQC&oi=fnd&pg=PA1&dq=DEWICK,+P.+M.+Medicinal+Natural+Products:+A+Biosynthetic+Approach,+Wiley,+Chichester,+p.+315,+2002.&ots=whjwKXNKRI&sig=brYMPYKWAo2x3xcC9mZnBAq-qTg#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- MEDURI, G. U. et al. Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS: Persistent elevation over time predicts poor outcome. **Chest**, v. 108, n. 5, p. 1303–1314, 1995.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. **Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition***Cell* Cell Press, , 31 out. 1997.
- MEI, S. H. J. et al. Prevention of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice by Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Angiopoietin 1. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 9, p. e269, 4 set. 2007.
- MENG, L. et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF-κB and PI3K/Akt/mTOR pathways. **Molecular Immunology**, v. 94, n. July 2017, p. 7–17, 2018.
- MOHAMMAD RIZWAN SIDDIQUI, M. T. M. S. K. M. T. S. MiR-144-3p não regulado atenua lesão pulmonar aguda induzida por LPS por inibição da via de sinalização

- ROCK1. **The FASEB Journal**, v. 33, n. No. 1_supplement, 2019.
- MOKRA, D.; KOSUTOVA, P. Biomarkers in acute lung injury. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 209, p. 52–58, 1 abr. 2015.
- MORRIS, M.; LI, L. **Molecular mechanisms and pathological consequences of endotoxin tolerance and priming** *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, fev. 2012.
- NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, jul. 2011.
- NASCIMENTO VIANA, W. **Síndrome de Angústia Respiratória Aguda após Berlim Acute Respiratory Distress Syndrome after Berlin**. [s.l: s.n.].
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014** *Journal of Natural Products* American Chemical Society, , 25 mar. 2016.
- NIEMAN, G. F. et al. **Prevention and treatment of acute lung injury with time-controlled adaptive ventilation: physiologically informed modification of airway pressure release ventilation** *Annals of Intensive Care* Springer, , 1 dez. 2020.
- OJIMA, I. **Modern natural products chemistry and drug discovery** *Journal of Medicinal Chemistry*, 8 maio 2008.
- OLIVEIRA MARI MANAUS, A. DE. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA-INPA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais **ASPECTOS ANATÔMICOS E ETNOFARMACOLÓGICOS DE *Abuta grandifolia* (Mart.) Sandwith (MENISPERMACEAE) COMO CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE PLANTAS DA AMAZÔNIA**. [s.l: s.n.].
- OLIVEIRA, R. H. R.; BASILLE FILHO, A. Incidência de lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda no centro de tratamento intensivo de um hospital universitário: Um estudo prospectivo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 1, p. 35–42, jan. 2006.
- PACHECO DE OLIVEIRA, M. T. et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 400–412, 2015a.
- PACHECO DE OLIVEIRA, M. T. et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 400–412, jul. 2015b.
- PÅLSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. **Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4** *Immunology*, out. 2004.
- PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the

- formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 1 nov. 2010.
- PAREKH, D.; DANCER, R. C.; THICKETT, D. R. **Acute lung injury****Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**Royal College of Physicians, , 2011.
- PARK, B. S.; LEE, J. O. **Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes****Experimental and Molecular Medicine**Nature Publishing Group, , 2013.
- PARK, W. Y. et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 10 I, p. 1896–1903, 15 nov. 2001.
- PETROVSKA, B. B. **Historical review of medicinal plants' usage****Pharmacognosy Reviews**, jan. 2012.
- PETTY, T. L. 41st Aspen Lung Conference: Overview. **Chest**, v. 116, p. 1S-2S, jul. 1999.
- PHAM, C. T. N. **Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation****Nature Reviews Immunology**, jul. 2006.
- PHAM, T.; RUBENFELD, G. D. **Fifty years of research in ards the epidemiology of acute respiratory distress syndrome a 50th birthday review****American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**American Thoracic Society, , 1 abr. 2017.
- PIERRAKOS. Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathophysiology and Therapeutic Options. **Journal of Clinical Medicine Research**, 2012.
- PUGIN, J. et al. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, n. 6 I, p. 1850–1856, 1996.
- PULJIC, R. et al. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, n. 2–3, p. 230–235, 2007.
- QU, L. et al. Glycyrrhizic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury by regulating autophagy through the PI3K/AKT/mTOR pathway. **American journal of translational research**, v. 11, n. 4, p. 2042–2055, 2019.
- RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **American journal of surgery**, v. 183, n. 3, p. 268–73, mar. 2002.
- RAGHAVENDRAN, K. et al. Pharmacotherapy of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 19, p. 1911–1924, 31 jul. 2008.
- RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 13 jun.

2012.

RAWAL, G.; YADAV, S.; KUMAR, R. Acute respiratory distress syndrome: An update and review. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 74–77, 5 dez.

2016.

REBETZ, J.; SEMPLE, J. W.; KAPUR, R. **The Pathogenic Involvement of Neutrophils in Acute Respiratory Distress Syndrome and Transfusion-Related Acute Lung Injury** *Transfusion Medicine and Hemotherapy* S. Karger AG, , 1 out. 2018.

REZOAGLI, E.; FUMAGALLI, R.; BELLANI, G. **Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome** *Annals of Translational Medicine* AME Publishing Company, , 1 jul. 2017.

RIBEIRO-FILHO, J. et al. Curine inhibits eosinophil activation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, n. 1, p. 19–26, 15 nov. 2013.

RIBEIRO-FILHO, J. et al. Curine inhibits mast cell-dependent responses in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1118–1124, 2014.

RIBEIRO-FILHO, J. et al. Curine Inhibits Macrophage Activation and Neutrophil Recruitment in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Toxins**, v. 11, n. 12, p. 705, 3 dez. 2019.

RIBEIRO-FILHO, J.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 4695–4707, 2015.

ROCCO, P. R. M.; NIEMAN, G. F. ARDS: what experimental models have taught us. **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 5, p. 806–810, 1 maio 2016.

ROTTA, A. T. et al. Progress and perspectives in pediatric acute respiratory distress syndrome. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 266–273, 2015.

RUBENFELD, G. D. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685–1693, 20 out. 2005.

SHAABAN, A. A. et al. Protective effect of pristimerin against LPS-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 59, n. April, p. 31–39, 2018a.

SHAABAN, A. A. et al. Protective effect of pristimerin against LPS-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 31–39, 1 jun. 2018b.

SHI, D. et al. Protective effects and mechanisms of mogroside v on LPS-induced acute lung injury in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 6, p. 729–734, 2014.

SHI, J. R. et al. Monoammonium glycyrrhizinate inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 10, p. 1235–1241, out. 2010.

SHORT, K. R. et al. **Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress**

- syndrome**The Lancet Infectious Diseases, jan. 2014.
- SIEGEL, M. D. Breathing in America: Diseases, Prognosis, and Hope. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 7, p. 1857, 2011.
- SOUTO, A. L. et al. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8515–8534, 11 out. 2011.
- STÖCKIGT, J. et al. The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 37, p. 8538–8564, 2011.
- SZARKA, R. J. et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **Journal of Immunological Methods**, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.
- TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. **NF-κB: A key role in inflammatory diseases**Journal of Clinical InvestigationThe American Society for Clinical Investigation, , 2001.
- TAKASHIMA, K. et al. Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Respiratory Research**, v. 15, n. 1, 21 nov. 2014.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. TOLL-LIKE RECEPTORS. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, abr. 2003.
- TILGNER, J. et al. Aspirin, but Not Tirofiban Displays Protective Effects in Endotoxin Induced Lung Injury. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0161218, 1 set. 2016.
- TOMASHEFSKI, J. F. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. **Clinics in Chest Medicine**, v. 21, n. 3, p. 435–466, 2000.
- TRACEY, D. et al. **Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review**Pharmacology and Therapeutics, fev. 2008.
- TSOYI, K. et al. HO-1 and JAK-2/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 lipopolysacchride. **Cellular Signalling**, v. 20, p. 1839–1847, 2008.
- UMBRELLO, M. et al. **Current concepts of ARDS: A narrative review**International Journal of Molecular SciencesMDPI AG, , 1 jan. 2017.
- UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Current opinion in immunology**, v. 14, n. 1, p. 103–10, fev. 2002.
- URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 668–676, abr. 2006.
- VAN DE VEERDONK, F. L. et al. **Inflammasome activation and IL-1β and IL-18 processing during infection**Trends in Immunology, mar. 2011.
- VAN RIJT, L. S. et al. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. **Journal**

- of Immunological Methods**, v. 288, n. 1–2, p. 111–121, maio 2004.
- WALKEY, A. J. et al. **Acute respiratory distress syndrome: Epidemiology and management approaches****Clinical Epidemiology**Dove Medical Press Ltd, , 13 jul. 2012.
- WAN, J. et al. NFB inhibition attenuates LPS-induced TLR4 activation in monocyte cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4505–4510, 1 nov. 2016.
- WANG, L. et al. Human Alveolar Epithelial Cells Attenuate Pulmonary Microvascular Endothelial Cell Permeability under Septic Conditions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 5 fev. 2013.
- WANG, R. et al. C5L2, the Second C5a anaphylatoxin receptor, suppresses LPS-induced acute lung injury. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, n. 5, p. 657–666, 2016.
- WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. **The acute respiratory distress syndrome****New England Journal of Medicine**, 4 maio 2000.
- WEBER, C.; OPATZ, T. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 81, p. 1–114, 2019.
- WHITEHOUSE, M. W.; FAIRLIE, D. P.; THONG, Y. H. Anti-inflammatory activity of the isoquinoline alkaloid, tetrandrine, against established adjuvant arthritis in rats. **Agents and actions**, v. 42, n. 3–4, p. 123–7, out. 1994.
- WILLIAMS, A. E.; CHAMBERS, R. C. **The mercurial nature of neutrophils: Still an enigma in ARDS?****American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, 1 fev. 2014.
- YANG, C. Y. et al. **New insights into the immune molecular regulation of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome****International Journal of Molecular Sciences**MDPI AG, , 16 fev. 2018.
- YANG, J. et al. **Serum levels of TNF- α , IL-1 β , IL-9, and IL-15 in acute respiratory distress syndrome****Int J Clin Exp Pathol**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ijcep.com/>. Acesso em: 19 jan. 2020.
- YEH, C. H. et al. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF- κ B pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 249–257, abr. 2014.
- YIN, H. et al. Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 55, p. 55–62, 1 fev. 2018.
- ZEMANS, R. L.; COLGAN, S. P.; DOWNEY, G. P. **Transepithelial migration of neutrophils: Mechanisms and implications for acute lung injury****American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 1 maio 2009.

ZHANG, A. et al. Protective effects of syringin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Journal of Surgical Research**, v. 209, p. 252–257, 2017.

ZHANG, G.; GHOSH, S. **Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: A phylogenetically conserved paradigm in innate immunity****Journal of Clinical Investigation**The American Society for Clinical Investigation, , 2001.

ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA



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



CERTIFICADO (2ª VIA)

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito anti-inflamatório do alcaloide Curina, de *Chondodendron platyphyllum* A. St. Hil (Miers) (Menispermaceae) em modelo experimental de Lesão Pulmonar Aguda (LPA)” protocolo nº 034/2016 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 10/06/2016. Com aprovação “ad referendum” de adendo em 24/07/2018.

Vigência do Projeto	2016 - 2021
Espécie/linhagem	Mus musculus - Balb/C
Número de animais	215
Idade/peso	5-8 semanas / 25-30 g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

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

ANEXO 2: PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

ARTIGOS PUBLICADOS

“MHTP, a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK / p65NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent” de autoria de Bianca Xavier, **Larissa Ferreira**, Laércia Ferreira, Francisco Gadelha, Talissa Monteiro, Luiz André Silva, Luís Cesar Rodrigues, Marcia Pivezam. Publicado na **Inflammation Research**, DOI: 10.1007/s00011-019-01291-3 . v. 68, n. 12, p. 1061–1070, 1 dez. 2019. Fator de Impacto: 2,939

Inflammation Research
<https://doi.org/10.1007/s00011-019-01291-3>

Inflammation Research

ORIGINAL RESEARCH PAPER



MHTP, a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent

Bianca Márcia do Nascimento Xavier¹ · Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira¹ · Laércia Karla Diega Paiva Ferreira¹ · Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha¹ · Talissa Mozzini Monteiro¹ · Luiz André de Araújo Silva² · Luís Cesar Rodrigues² · Marcia Regina Pivezam¹

Received: 24 March 2019 / Revised: 24 July 2019 / Accepted: 2 October 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Introduction This study investigated the mechanism of action of a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid, MHTP, in an experimental model of acute lung injury (ALI) in two distinct moments: 72 h and 10 days.

Methodology To realize this study, 2.5 mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) was intranasally administered in BALB/c mice, and nasal instillation of MHTP (1.25; 2.5; 5.0; 10 or 20 mg/kg) was administered at 1, 24, and 48 h after LPS challenge. The data were statistically analyzed and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results MHTP treatment (2.5, 5.0, 10 or 20 mg/kg) significantly decreased neutrophil migration into the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), tissue inflammatory cell infiltration, edema, and hemorrhage as well as collagen fiber deposition on the perialveolar regions at both moments. TNF- α and IL-6 levels were significantly diminished in the MHTP-treated animals at 72 h and maintained them, at a basal level, at 10-day observation. These effects of MHTP are due to downregulating p38MAPK/p65NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent. Also, the MHTP treatment promoted a survival rate at 100% and improved their body weights during the 10-day observation. Unlike, the LPS group (non-treated LPS challenged animals) presented less than 50% of surviving rate at 72 h and the animals that survived did not improve their physiological state at 10-day observation.

Conclusions These data showed for the first time the beneficial and effective activity of a nasal treatment with a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid on an experimental model of ALI and pointed out the molecular mechanism related to it.

Keywords MHTP · Alkaloid · Intranasal route · Toll-like receptor 4 · Cytokines · Signaling pathway

Introduction

Isoquinoline alkaloids are natural products present in several plant families and regulate biological systems [1]. For instance, typical isoquinoline alkaloids are the tetrahydroisoquinoline alkaloids commonly found in numerous structurally diverse natural products that exhibit a wide range of

biological and pharmacological activities such as blocking the NF- κ B signaling pathway [2], antitumor effect [3] and anti-inflammatory and analgesic activities [4, 5] among others. In addition, these natural chemical structures can be synthesized and used for pharmaceutical purpose, for instance, morphine, codeine, and thebaine, which have analgesic, cough suppressing and muscle relaxant effects, respectively, as well as papaverine and noscapine that present antitumor and antimicrobial activities [6–8].

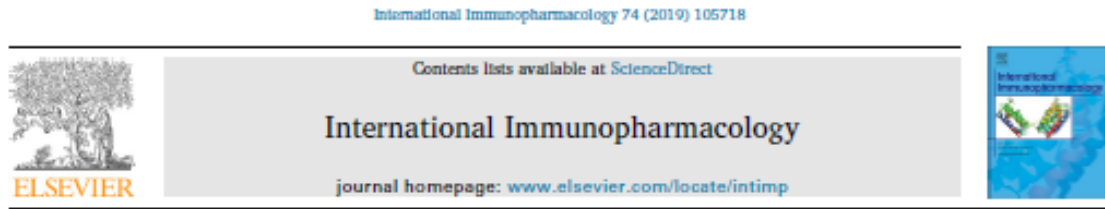
Two-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-1-yl) phenol, coded as MHTP (Fig. 1), is an unprecedented tetrahydroisoquinoline alkaloid, synthesized by our research group for prospecting new compounds with therapeutic purpose. MHTP is chemically similar to cryptostilines I, II and III isolated from *Cryptostylis fulva* (Orchidaceae) which have considerable biological effects by

✉ Marcia Regina Pivezam
mrpivezam@ufpb.br

¹ Department of Physiology and Pathology, Post-Graduation Program in Natural, Synthetic and Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

"Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS)" de autoria de Laércia K. D. Paiva Ferreira, **Larissa A. M. Paiva Ferreira**, Talissa M. Monteiro, Grasiela Costa Bezerra, Larissa Rodrigues Bernardo, Marcia Regina Piuvezam. Publicado na **International Immunopharmacology**, DOI: 10.1016/j.intimp.2019.105718. v. 74, p. 105718, 1 set. 2019. Fator de Impacto: 3,361



Review

Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS)

Laércia K.D. Paiva Ferreira^a, Larissa A.M. Paiva Ferreira^a, Talissa M. Monteiro^a, Grasiela Costa Bezerra^a, Larissa Rodrigues Bernardo^b, Marcia Regina Piuvezam^{a,b,*}

^a Department of Physiology and Pathology, Graduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^b Department of Physiology and Pathology, Graduate Program in Development and Technological Innovation of Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Asthma
Rhinitis
Allergic syndrome
Allergic inflammation
Disease of the airway

ABSTRACT

Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) is a concept of "one airway – one disease" or "unified airway disease". The upper and lower airway inflammation characterizes allergic rhinitis and asthma, respectively and both diseases have shown an intimate connection in their genesis, coexistence and similarities as triggered by the same etiological agents; the same inflammatory cell profile and share therapeutic treatment. This review highlights the concept of CARAS by its phenotype, endotype and biomarker classification. Indeed, rhinitis is divided into four major phenotypes: allergic rhinitis; infectious rhinitis; non-infective/non-allergic rhinitis and mixed rhinitis. On the other hand, asthma has no common consensus yet; however, the most accepted classification is based on the stage of life (early- or late-onset asthma) in which the clinical symptoms are presented. Experimental researches where animals develop a syndrome similar to CARAS have been contributed to better understand the pathogenesis of the syndrome. Therefore, the aim of this review is to clarify current terms related to CARAS as definition, phenotypes, endotypes/biomarkers, physiopathology and treatments.

1. Introduction

The upper and lower airways are classified as unified morphological and functional units. The nose, located at the entrance of the upper airway plays a fundamental role of protection for the lungs, acting in the selection of particles inhaled by the inspired air. The heating, filtration and humidification of the air promotes a cleaning of the air for its entrance to the lungs. In the breathing process most particles with an equivalent aerodynamic diameter (AED) > 15 µm are deposited in the upper respiratory tract. Particles with AED > 2.5 µm are deposited mainly in the trachea and bronchi, whereas those with lower AED penetrate the gas exchange region of the lungs. In this context the size and nature of the allergens directly interfere in promoting the immune response at the site of their deposition, promoting the clinical manifestation of the disease [1].

Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) is characterized, nowadays, as a single disease related with upper and lower airway inflammation. Allergic rhinitis and asthma have shown an intimate connection in their genesis, the concept of coexistence and similarities such as a. triggered by the same etiological agents; b. have the same inflammatory cell profile; c. present in the respiratory system and d. share therapeutic treatment. Experimental researches where

animals develop a syndrome similar to CARAS have been contributed to better understand the pathogenesis of the syndrome as well as to develop new pharmacological drugs to added to the arsenal therapeutic for the treatment of this allergic syndrome due to some patients have not respond to the conventional therapeutic strategy [2–5]. Therefore, the aim of this review is to clarify current terms related to CARAS as definition, phenotypes, endotypes and biomarkers, physiopathology and treatments.

2. Characterization and epidemiology of CARAS

Rhinitis is a general term that describes the appearance of nasal symptoms as nasal congestion, rhinorrhea, sneezing and pruritus (itching/nasal rubbing), resulting from an inflammatory process and/or dysfunction of the nasal mucosa. In addition, it causes sleep deficiency, behavioral and psychological changes, leading to compromise patient's quality of life and being considered a risk factor for traffic safety. This illness presents significant morbidity by interfering with social life, school and intellectual performance as well as work productivity [2,3,6]. Rhinitis is one of the most common diseases worldwide and it is estimated about 25% of the total world population suffer from allergic rhinitis (AR) [4,5] and, more important, is a risk factor for the

* Corresponding author at: Universidade Federal da Paraíba Campus I, PO 5009, João Pessoa, PB 58-051-970, Brazil.
E-mail address: mripiuvezam@ufpb.br (M.R. Piuvezam).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105718>

Received 18 February 2019; Received in revised form 30 May 2019; Accepted 21 June 2019
1567-5769/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

"MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid, Induces IFN- γ Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation" de autoria de Laércia K. D. Paiva Ferreira, **Larissa A. M. Paiva Ferreira**, Adriano Francisco Alves, Fagner Carvalho Leite, Luiz A. de Araújo Silva, Giciane Carvalho Vieira, Luís Cezar Rodrigues e Marcia Regina Piuvezam. Publicado na **Inflammation**, DOI: 10.1007/s10753-018-0855-y. v. 41 (6) p. 2116-2128, 2018. Fator de Impacto: 2,99

Inflammation (© 2018)
DOI: 10.1007/s10753-018-0855-y



ORIGINAL ARTICLE

MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid, Induces IFN- γ Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation

Laércia K. D. Paiva Ferreira,¹ Larissa A. M. Paiva Ferreira,¹ Adriano Francisco Alves,¹ Fagner Carvalho Leite,² Luiz A. de Araújo Silva,³ Giciane Carvalho Vieira,⁴ Luís Cezar Rodrigues,³ and Marcia Regina Piuvezam^{1,5,6}

Abstract— MHTP [2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol], a synthetic isoquinolinic alkaloid, presented anti-inflammatory activity in several experimental models of acute inflammation as lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury and phlogistic agent-induced edema and presented low preclinical toxicity. The aim of this study was to determine the MHTP effect on ovalbumin (OVA)-induced pulmonary allergic inflammation. In order to realize this study, female BALB/c mice were sensitized and challenged with OVA (OVA group) and treated with MHTP (MHTP group) by nasal instillation. Inflammatory, allergic, and immunomodulatory parameters such as migration of inflammatory cells to the lung tissue, pulmonary histological analysis, serum level of IgE-allergen specific, cytokine secretion, and lung T cell population characterization were analyzed and the data were considered statistically significant with $p < 0.05$. OVA-sensitized and OVA-challenged and MHTP (5.0 mg/kg)-treated mice presented reduction on total leukocyte migration into the bronchoalveolar lavage (BALF) dependent of lymphocyte and eosinophil migration ($p < 0.001$ and $p < 0.01$) as compared with the OVA group. Flow cytometric analysis showed that MHTP treatment decreased the percentage of granulocytes ($p < 0.001$) into the BALF and lung tissue histological analyzes demonstrated that the MHTP treatment decreased leukocyte migration and mucus production. In addition, treatment with MHTP decreased the number of CD3⁺CD4⁺ T cells independently of CD8⁺ T cell reduction into the BALF. The treatment also reduced significantly ($p < 0.05$) the serum level of IgE-OVA

¹Department of Physiology and Pathology, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

²São Francisco da Paraíba College, Cajazeiras, PB, Brazil

³Postgraduate Program in Development and Technological Innovation in Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁴Department of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁵Universidade Federal da Paraíba, Campus I, PO 5009, João Pessoa, PB 58-051-970, Brazil

⁶To whom correspondence should be addressed at Universidade Federal da Paraíba, Campus I, PO 5009, João Pessoa, PB 58-051-970, Brazil. E-mail: mrpiuvezam@f.ufpb.br

CAPÍTULO DE LIVRO COM ISBN

FERREIRA, L. A.M. P.; MONTEIRO, T. M.; FERREIRA, L. K. D. P.; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL QUANTO À PARÂMETROS DE ANSIEDADE. 3ed. v. 1, p. 245-263. ISBN: 978-85-53005-16-1, 2019.

AVALIAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL QUANTO À PARÂMETROS
DE ANSIEDADE

CAPÍTULO 12

AVALIAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL QUANTO À PARÂMETROS DE ANSIEDADE

Larissa Adilis Maria PAIVA FERREIRA ¹

Talissa Mozzini MONTEIRO ²

Laércia Karla Diega PAIVA FERREIRA ²

Grasiela Costa BEZERRA ¹

Marcia Regina PIUVEZAM ³

^{1,2} Alunas do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB
(¹ doutoranda, ² mestranda); larissaadilis@hotmail.com

³ Orientadora/Professora do Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB/ João Pessoa, PB,
Brasil, mrpiuvezam@tf.ufpb.br .

RESUMO: A asma afeta diretamente a qualidade de vida, apresentando uma prevalência significativamente maior de transtornos mentais como depressão e/ou ansiedade. Objetivamos implantar o modelo experimental de ansiedade nos animais desafiados com o alérgeno Ovalbumina (OVA), no laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA). Para isso utilizamos camundongos BALB/c que foram sensibilizadas e desafiadas com OVA. 1 h após o último desafio, foram feitos os testes comportamentais adequados. No último dia do protocolo foi

MONTEIRO, T. M.; FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A.M. P.**; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELO DESAFIO COM OVALBUMINA EM MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA. 3ed. v. 1, p. 20-38. ISBN: 978-85-53005-16-1, 2019.

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELO DESAFIO COM OVALBUMINA EM
MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELO DESAFIO COM OVALBUMINA EM MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA

Talissa Mozzini MONTEIRO ¹

Laércia Karla Diega PAIVA FERREIRA ¹

Larissa Adilis Maria PAIVA FERREIRA ²

Grasiela Costa BEZERRA ²

Marcia Regina PIUVEZAM ³

^{1,2} Alunas do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB
(¹ doutoranda, ² mestranda); talissa_mucini@hotmail.com

³ Orientadora/Professora do Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB/ João Pessoa, PB,
Brasil, mrpiuvezam@tf.ufpb.br .

RESUMO: A asma alérgica é uma doença com elevada prevalência mundial. As alterações estruturais nas vias aéreas de asmáticos envolvem hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes e musculatura lisa, espessamento da lâmina subepitelial brônquica, alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, aumento de glândulas e neoformação vascular e nervosa. Objetivamos analisar as alterações teciduais provocadas pelo processo fisiopatológico

FERREIRA, L. K. D. P.; MONTEIRO, T. M.; BEZERRA, G. C.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA. 3ed. v. 1, p. 1294-1311. ISBN: 978-85-53005-16-1, **2019**.

QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL
INDUZIDA POR OVALBUMINA

CAPÍTULO 65

QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA

Laércia Karla Diega PAIVA FERREIRA ¹

Talissa Mozzini MONTEIRO ¹

Grasiela Costa BEZERRA ²

Larissa Adilis Maria PAIVA FERREIRA ²

Marcia Regina PIUVEZAM ³

^{1,2} Alunas do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB

(¹ doutoranda, ² mestranda); laerciapaiva@gmail.com

³ Orientadora/Professora do Departamento de Fisiologia e Patologia/UFPB/ João Pessoa, PB, Brasil, mrpiuvezam@dfp.ufpb.br.

RESUMO: A asma afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo. As principais características fisiopatológicas da asma são a obstrução brônquica e a inflamação das vias aéreas, com presença de citocinas que caracterizam o fenótipo da asma. Objetivamos a caracterização do fenótipo de asma, a partir da quantificação das citocinas. O protocolo experimental de asma alérgica consistiu na sensibilização de camundongos BALB/c fêmeas via a injeção intraperitoneal (i.p.) de uma suspensão contendo 10 µg de OVA (grade V) e 0,2 g de hidróxido de alumínio, nos dias 0, 7 e 14. No período entre os dias 19 a 22 os animais foram desafiados com aerossol de OVA 5% durante 30 minutos. No 23º dia foi coletado o RAI F e quantificado as

DOS SANTOS, A. L.; DOMICIANO, F. L.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; DIAS, C. S.; MACEDO, L. L. A. CONCILIAÇÃO MEDICAMENTOSA EM PACIENTES DA CLÍNICA CIRÚRGICA EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO. 3ed. v. 1, p. 525-546. ISBN: 978-85-53005-16-1, **2019**.

CONTRIBUIÇÃO DE UMA FARMÁCIA ESCOLA, LOCALIZADA EM UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA NO ESTADO DA PARAIBA, NA PROMOÇÃO DO DESCARTE AMBIENTALMENTE CORRETO DE MEDICAMENTOS

CAPÍTULO 26

CONCILIAÇÃO MEDICAMENTOSA EM PACIENTES DA CLÍNICA CIRÚRGICA EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

Ana Luiza DOS SANTOS ¹

Fernanda de Lacerda DOMICIANO¹

Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA¹

Celidarque da Silva DIAS²

Luciana Lucena Aranha de MACEDO^{2,3}

¹ Graduada do curso de Farmácia, UFPB; ² Professora do DCF/ UFPB; ³ Orientadora/Professora do DFP/UFPA. santosanaluzas@gmail.com

RESUMO: A conciliação medicamentosa visa a prevenção de eventos adversos e erros relacionados a medicamentos, no intuito de melhorar a qualidade de vida do paciente. O objetivo deste trabalho é analisar a conciliação medicamentosa na clínica cirúrgica de um Hospital Universitário, no município de João Pessoa-PB. Trata-se de um estudo do tipo transversal e quantitativo, documental, retrospectivo, realizado com os pacientes conciliados entre os meses de fevereiro de 2017 a

FERREIRA, L. A. M. P.; FERREIRA, L. K. D. P.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB. 2ed. v. 3, p. 94-113. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA NO
LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB

CAPÍTULO 5

IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB

Larissa Adilis Maria PAIVA FERREIRA¹
Laércia Karla Diega PAIVA FERREIRA²
Talissa Mozzini MONTEIRO²
Adriano Francisco ALVES³
Marcia Regina PIUVEZAM⁴

¹ Graduanda do curso de Farmácia, UFPB; ² Doutoranda do PgPNSB/ UFPB; ³ Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Patologia/ UFMG; ⁴ Orientadora/Professora do DFP/UFPB.
larissaadilis@hotmail.com

RESUMO A rinite é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas superiores afetando cerca de 20% da população mundial. O objetivo deste trabalho foi implantar o modelo experimental de rinite alérgica, via avaliação dos parâmetros clínicos, inflamatórios e imunomoduladores característicos da doença. Camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA-alérgeno) foram tratados, por instilação nasal (i.n.), com a droga padrão (dexametasona) 1 h antes de cada desafio alérgico. Foram analisados os seguintes sinais clínicos: fricção nasal e espirros; título sérico de IgE- OVA específica; migração de leucócitos e parâmetros

FERREIRA, L. K. D. P.; XAVIER, B. M. N.; **FERREIRA, L. A. M. P.;** BARBOSA-FILHO, J. M.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ROLES OF ALKALOIDS. 1ed. v. 1, p. 415-54. ISBN: 978-85-237-1360-7, **2018**.

Chapter 11

Biological and Immunological roles of Alkaloids

Laércia Karla Diega Paiva Ferreira¹, Bianka Marcia do Nascimento Xavier¹,
Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira³, Jose Maria Barbosa-Filho²,
Claudio Roberto Bezerra-Santos³ and Marcia Regina Piuvezam^{1,3}

¹ Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Campus
Universitário s/n, João Pessoa, Paraíba, Brasil; E-mails: larciapaiva@gmail.com, xavierbianka@ltf.ufpb.br

² Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba,
Campus Universitário s/n, João Pessoa, Paraíba, Brasil; E-mail: jbarbosa@ltf.ufpb.br

³ Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba,
Campus Universitário s/n, João Pessoa, Paraíba, Brasil; E-mails: larissaadilis@hotmail.com;
crbezerra@ltf.ufpb.br; mrpiuvezam@ltf.ufpb.com.br

1. Introduction

Alkaloids are natural products able to regulate biological systems by interacting with micro- and macromolecules when inside the body [1]. These molecules are secondary metabolites produced by a variety of organisms, such as plants, marine animals, bacteria and fungi and they are widely distributed in nature with different structures, biosynthesis routes and many pharmacological activities [2–4].

Alkaloids are well defined as crystalline substances that bound with acids to form salts and they are derived from the amino acid biosynthesis or

FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA ALÉRGICA. 2ed., v. 3, p. 34-52. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE ASMA ALÉRGICA

CAPÍTULO 2

ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA ALÉRGICA

Laércia Karla Diega PAIVA FERREIRA¹
Larissa Adilis Maria PAIVA FERREIRA²
Talissa Mozzini MONTEIRO¹
Adriano Francisco ALVES³
Marcia Regina PIUVEZAM⁴

¹ Doutoranda do PgPNSB/ UFPB; ² Graduanda do curso de Farmácia, UFPB; ³ Doutorando do Programa de Pós Graduação em Patologia/ UFMG; ⁴ Orientadora/Professora do DFP/UFPB. laerciapaiva@gmail.com

RESUMO A asma afeta 300 milhões de pessoas em todo o mundo. Modelos experimentais que mimetizam o processo inflamatório da asma são essenciais no entendimento da fisiopatologia desta doença, tornando possível o estudo de novas moléculas no arsenal terapêutico para o tratamento da asma. O presente trabalho teve como objetivo analisar e comparar os parâmetros inflamatórios e alérgicos que caracterizam o modelo de asma alérgica em diferentes protocolos experimentais. Camundongos fêmeas BALB/c foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). Os parâmetros inflamatórios observados foram a migração de

MONTEIRO, T. M.; FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. RINITE: NOVAS ABORDAGENS E SEUS ENDOTIPOS. 2ed. v. 3, p. 254-268. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

RINITE: NOVAS ABORDAGENS E SEUS ENDOTIPOS

CAPÍTULO 13

RINITE: NOVAS ABORDAGENS E SEUS ENDOTIPOS

Talissa MOZZINI MONTEIRO ¹
Laércia Karla Diega PAIVA FERREIRA ¹
Larissa Adilis Maria PAIVA FERREIRA ²
Grasiela Costa BEZERRA ²
Marcia Regina PIUVEZAM³

¹Doutoranda do PgPNSB/ UFPB; ²Graduanda do curso de Farmácia, UFPB;
³Orientadora/Professora do DFP/UFPB.
talissa_muccini@hotmail.com

RESUMO: A rinite alérgica (RA) é definida como uma inflamação crônica da mucosa nasal, induzida pela exposição a alérgenos. Essa exposição leva a sensibilização de células como os mastócitos pela imunoglobulina E (IgE). Exposições subsequentes ao mesmo alérgeno desencadeiam uma resposta inflamatória mediada pela ligação cruzada do alérgeno à IgE, previamente ligada aos mastócitos. Esse processo resulta em sintomas crônicos e recorrentes. Os principais sintomas incluem rinorréia aquosa, obstrução/prurido nasais, espirros e sintomas oculares, tais como prurido e hiperemia conjuntival, os quais se resolvem espontaneamente ou via tratamento medicamentoso. Diante

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

LIMA, L. M.; DUVIRGENS, C. I.; OLIVEIRA, J. B.; SANTOS, R. C. S.; **FERREIRA, L. A. M. P.** IMUNOBIOLOGICOS COMO UMA NOVA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA NO TRATAMENTO DA ASMA. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA E ENSINO EM CIÊNCIAS (CONAPESC). ANAIS IV CONAPESC v.4, 2019, ISSN: 2525-3999, CAMPINA GRANDE - PB, 2019.



RESUMOS E COMUNICADOS EM CONGRESSOS OU TRABALHOS APRESENTADOS COMO PÔSTER

BEZERRA, G. C.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; FERREIRA, L. K. D. P.; MONTEIRO, T. M.; BERNARDO, L.; LIMA, L.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, C.; ALVES, A. F.; PEREIRA, R.; PIUVEZAM, M. R. 4-CARVOMENTENOL, A MONOTERPENE OF ESSENTIAL OILS, REDUCES AIRWAY INFLAMMATION BY INCREASING IL-10 LEVEL, IN EXPERIMENTAL MODEL OF COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS). In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, 2019.

BERNARDO, L.; FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; VIEIRA, C.; LIMA, L.; OLIVEIRA, J.; BEZERRA, G. C.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. 4-CARVOMENTHENOL, A MONOTERPENE OF ESSENTIAL OILS, ATTENUATES THE ANAPHYLACTIC SHOCK REACTION BY DECREASING THE MAST CELL DEGRANULATION PROCESS IN MICE. In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, 2019.

RODRIGUES, L.; PIUVEZAM, M.; FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; MONTEIRO, T.; BEZERRA, G. C.; BERNARDO, L.; SILVA, L.; PEREIRA, R.; LIMA, L.; OLIVEIRA, J.; ALVES, A. MHTP, SYNTHETIC TETRAHYDROISOQUINOLINE ALKALOID, INHIBITS EOSINOPHIL FUNCTION VIA MAP KINASES (P38 AND ERK1 / 2) PATHWAY IN EXPERIMENTAL COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS). In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, **2019**.

COMUNICAÇÕES ORAIS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

LIMA, L. M.; VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. INVESTIGAÇÃO DO EFEITO INFLAMATÓRIO DO LIPOPOLISSACARÍDEO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2019.

BEZERRA, G. C.; FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; BERNARDO, L.; MONTEIRO, T. M. FATORES DE TRANSCRIÇÃO E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES ENVOLVIDAS NA ASMA ALÉRGICA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2019

FERREIRA, L. A. M. P.; MONTEIRO, T. M.; FERREIRA, L. K. D. P.; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL QUANTO À PARÂMETROS DE ANSIEDADE. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2018

FERREIRA, L. K. D. P.; MONTEIRO, T. M.; BEZERRA, G. C.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2018.

MONTEIRO, T. M.; FERREIRA, L. K. D. P.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELO DESAFIO COM OVALBUMINA EM MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2018.