



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO DO ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN 2-(3-HIDROXI-2-
OXOINDOLIN-3-IL)ACRILONITRILA (ISACN) NA INFLAMAÇÃO AGUDA**
EXPERIMENTAL: ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO*

JOÃO PESSOA – PB

2021

JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA

**EFEITO DO ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN 2-(3-HIDROXI-2-
OXOINDOLIN-3-IL)ACRILONITRILA (ISACN) NA INFLAMAÇÃO AGUDA
EXPERIMENTAL: ABORDAGENS *IN VIVO* E *IN VITRO***

Tese 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 obtenção do título de Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Juliane Santos de França da.

Efeito do aduto de Morita-Baylis-Hillman

2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN) na
inflamação aguda experimental : abordagens in vivo e in
vitro / Juliane Santos de França da Silva. - João
Pessoa, 2021.

143 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Inflamação. 2. ISACN. 3. LPA. 4. Macrófagos. 5. LPS.
I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-002(043)



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 327ª (trecentésima vigésima sétima) Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Juliane Santos de França da Silva**, candidata ao Título de “Doutora” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia dezessete de agosto do ano dois mil e vinte e um (17/08/2021), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/aim-sgyg-vhe>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Juliane Santos de França da Silva**, candidata ao Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Banca Examinadora os pesquisadores Janeusa Trindade de Souto, Ph.D em Imunologia Básica e Aplicada, Márcia Rosa de Oliveira, Ph.D em Parasitologia, Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia, Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia e Sandra Rodrigues Mascarenhas, Ph.D em Fisiologia. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Banca, professora Sandra Rodrigues Mascarenhas, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Juliane Santos de França da Silva**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Efeito do aduto de Morita-Baylis-Hillman 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN) na inflamação aguda experimental: abordagens *in vitro* e *in vivo*”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de cinquenta minutos, a candidata foi arguida pelos Examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADA**. Em face da aprovação, declarou a Presidente, achar-se a examinada **Juliane Santos de França da Silva**, legalmente habilitada a receber o Título de “DOUTORA” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na Área de Concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.^a Dr.^a Sandra Rodrigues Mascarenhas (Orientadora) *sandra.rodrigues.mascarenhas*

Prof.^a Dr.^a Janeusa Trindade de Souto (Examinadora) *Janeusa T. de Souto*

Prof.^a Dr.^a Márcia Rosa de Oliveira (Examinadora) *Márcia Rosa de Oliveira*

Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Piuvezam (Examinadora) *Marcia Regina Piuvezam*

Prof.^a Dr.^a Marianna Vieira Sobral (Examinadora) *Marianna Vieira Sobral*

Juliane Santos de França da Silva (Discente) *Juliane Santos de França da Silva*

*Dedico este trabalho a minha prima
Olga Cordeiro (In memoriam) que foi em
vida, o maior exemplo de fé e esperança
que eu pude ter.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por guiar meus passos e permitir mais essa conquista em minha vida.

A minha querida orientadora, **Sandra Mascarenhas** pela paciência, dedicação, compreensão, carinho e ensinamentos que vão além deste trabalho. Palavras não são suficientes para descrever o quanto eu me sinto feliz e lisonjeada em fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Aos meus irmãos científicos **Marreiro, Dayse, Essia e Luiz** pelo apoio e ajuda constante na realização desse trabalho. Vocês foram essenciais para que este projeto fosse finalizado. Serei eternamente grata por todos os momentos em que dividimos a bancada e compartilhamos conhecimentos.

Ao Professor **Dr. Cláudio Gabriel** por ter doado o composto testado nesse estudo e por sempre se mostrar disponível e disposto a ajudar.

A professora **Dra. Ana Votto** e a **Dra. Aline Portaniolo** pela colaboração essencial para a realização dos experimentos de reação em cadeia polimerase quantitativa.

A **Dra. Fátima Azevedo** e ao professor **Dr. Isaac Almeida** por possibilitarem o uso do citômetro de fluxo.

Ao Professor **Dr. Demétrius** pelo empréstimo de equipamentos necessários para a cultura de células.

A **Ma. Larissa Adiles** pela ajuda e colaboração durante a realização do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda.

Ao **Dr. Lucas Rannnier** pelo apoio prestado no processamento histológico e confecção das lâminas.

Ao **Me. Alysson Gadelha** pela ajuda e dicas de como melhorar a apresentação das fotos da histologia.

A todos que compõe o Laboratório de Imunofarmacologia em especial a professora **Dra. Márcia Piuvezam** por contribuir direta ou indiretamente na minha formação acadêmica e científica.

A todo o "**Team Mascarenhas**": **Marreiro, Essia, Dayse, Luiz, José Guilherme, Ana e Mariana** por sempre estarem dispostos a ajudar de forma incondicional. Acho incrível a forma de colaboração que conseguimos desenvolver dentro do nosso grupo de pesquisa, sempre se ajudando sem esperar nada em troca.

Ao meu marido **Ednno Almeida** pela dedicação, carinho, cuidado, compreensão e ajuda necessárias para que esse trabalho fosse finalizado. Tenho muita sorte em tê-lo como companheiro de vida.

Aos meus **pais, irmãos** e a toda a minha **família** pela torcida, palavras de incentivo e orações feitas em prol dessa conquista.

Aos **colegas** da minha turma de doutorado pela amizade, conversas e conhecimentos compartilhados.

Aos **amigos** que sempre estiveram na torcida pela finalização desse projeto.

Aos queridos professores: **Dra. Márcia Piuvezam, Dra. Márcia Rosa, Dra. Mariana, Dra. Janeusa, Dr. Abrahão e Dr. Reinaldo** por terem aceitado fazer parte da banca examinadora colaborando com a melhoria desse trabalho.

A todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pelos ensinamentos e por terem contribuído diretamente na minha formação.

A **Caroline Medeiros** pela excelência no trabalho na secretaria e por sempre está disponível para ajudar independente do problema e do horário.

A **Universidade Federal da Paraíba** pela infraestrutura e a **CAPES** e ao **CNPq** pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

“O sucesso é ser feliz”.

Roberto Shinyashik

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica do sistema imunológico, essencialmente benéfica. Entretanto, quando exacerbada, a inflamação está envolvida na patogênese de inúmeras doenças. Os anti-inflamatórios disponíveis no mercado apresentam inúmeros efeitos adversos quando utilizados a longo prazo. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas estratégias terapêuticas com fármacos anti-inflamatórios mais seguros. O 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN) é um aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da isatina que apresenta ação anti-tumoral e antibacteriana além de baixa toxicidade aguda, baixo risco de genotoxicidade e boa biodisponibilidade teórica por via oral. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório do ISACN e determinar o seu mecanismo de ação. Para isso utilizamos a peritonite induzida por zimosan, a lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan ou com LPS como modelos experimentais. Inicialmente, camundongos *Swiss* fêmeas foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com diferentes doses de ISACN (1,5 mg/kg; 6mg/kg e 24 mg/kg) e submetidos a peritonite experimental através do desafio (i.p) com zimosan (2mg/mL). O tratamento com ISACN reduziu a migração de neutrófilos e a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Camundongos *Balb/c* machos foram tratados com 24 mg/kg de ISACN (i.p.) e submetidos a LPA experimental através do desafio intranasal (i.n) com LPS (2,5 mg/kg). O tratamento com ISACN reduziu a migração de neutrófilos, a formação de edema pulmonar e produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e reverteu as alterações histopatológicas características da LPA. Para os experimentos *in vitro*, macrófagos peritoneais murinos foram cultivados na presença de diferentes concentrações de ISACN (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M) e estimulados com zimosan (0,2 mg/mL) ou com LPS (1 μ g/mL). A concentração de 20 μ M se mostrou citotóxica enquanto as concentrações de 10 μ M e 5 μ M não promoveram alterações consideráveis na viabilidade dos macrófagos. Durante a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan, o ISACN reduziu consideravelmente a produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Na cultura de macrófagos estimulados com LPS, o ISACN reduziu a produção de óxido nítrico, das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10. Para explorar o mecanismo de ação do ISACN, foram realizados experimentos para determinar a expressão das moléculas CD69, receptor *toll-like* 4 (TLR4), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da forma ativa das proteínas quinases ativadas por mitógeno ERK 1/2, JNK1/2 e p38 por citometria de fluxo, além de experimentos com reação em cadeia polimerase quantitativa onde foram determinados a expressão gênica do CD69 e da iNOS em macrófagos estimulados com LPS. O tratamento de macrófagos com ISACN (10 μ M) reduziu a expressão de todas as moléculas analisadas por citometria e reduziu a expressão gênica do CD69 e da iNOS. Considerando os resultados obtidos podemos sugerir que ISACN apresentou efeito anti-inflamatório e que esse efeito está associado a regulação negativa da via TLR4/MAPK-ERK-JNK-p38.

Palavras-chave: ISACN; Inflamação; LPA; macrófagos; LPS

ABSTRACT

Inflammation is a physiological response of the body, essentially beneficial. However, when exacerbated, inflammation is involved in the pathogenesis of numerous diseases, and drugs with anti-inflammatory properties are routinely used in the clinic. Currently, anti-inflammatory drugs available on the market have numerous adverse effects. Thus, it is necessary to search for new therapeutic strategies with safer anti-inflammatory drugs. 2- (3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (ISACN) is a Morita-Baylis-Hillman's adduct derived from isatin that has anti-tumor and antibacterial action in addition to low acute toxicity, low risk of genotoxicity and good theoretical bioavailability by the oral route. Therefore, the aim of this work was to investigate the anti-inflammatory effect of ISACN and to determine its mechanism of action. For that, we used zimosan-induced peritonitis, acute lung injury (ALI) induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) and the culture of murine peritoneal macrophages stimulated with zimosan or LPS as experimental models. Initially, female Swiss mice were treated intraperitoneally (i.p.) with different doses of ISACN (1.5 mg/kg; 6mg/kg and 24 mg/kg) and subjected to experimental peritonitis through the challenge (ip) with zimosan (2mg/mL). The treatment with ISACN reduced the migration of neutrophils and the production of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . Male *Balb/c* mice were treated with 24 mg/kg of ISACN (i.p.) and subjected to experimental ALI through intranasal challenge (i.n) with LPS (2.5 mg/kg). The treatment with ISACN reduced the migration of neutrophils, the formation of pulmonary edema and the production of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and reversed the histopathological changes characteristic of ALI. For in vitro experiments, murine peritoneal macrophages were cultured in the presence of different concentrations of ISACN (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M) and stimulated with zimosan (0.2 mg/mL) or with LPS (1 μ g / mL). The concentration of 20 μ M was shown to be cytotoxic while the concentrations of 10 μ M and 5 μ M did not promote considerable changes in the viability of macrophages. During the culture of zimosan-stimulated murine peritoneal macrophages, ISACN considerably reduced the production of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . In the culture of macrophages stimulated with LPS, ISACN was effective in reducing the production of nitric oxide, the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α and the anti-inflammatory cytokine IL-10. To explore the mechanism of action of ISACN, experiments were performed with flow cytometry in which the expression of the CD69 molecules, *toll-like* receptor 4 (TLR4), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the active form of the protein kinases activated by mitogen ERK 1/2, JNK1/2 and p38, in addition to experiments with quantitative polymerase chain reaction where the gene expression of and iNOS in macrophages stimulated with LPS were determined. The treatment of macrophages with ISACN (10 μ M) reduced the expression of all analyzed molecules and reduced the gene expression of CD69 and iNOS. Considering the results obtained, we can suggest that ISACN had an anti-inflammatory effect and that this effect is associated with negative regulation of the TLR4/MAPK-ERK-JNK-p38 pathway.

Keywords: ISACN; Inflammation; ALI; macrophages; LPS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização TLRs/MAPKs dependente de MyD88.....	23
Figura 2. Macrófagos e neutrófilos durante a resposta inflamatória aguda.....	31
Figura 3. Resposta inflamatória durante a lesão pulmonar aguda induzida por LPS.	34
Figura 4. Estrutura química do ISACN.	37
Figura 5. Esquema geral da síntese do ISACN.....	42
Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.....	44
Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.	47
Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental de cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan.	52
Figura 9. Esquema representativo do protocolo experimental de cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.....	54
Figura 10. Esquema representativo da estratégia de análise dos dados de citometria de fluxo.....	56
Figura 11. Efeito do ISACN nas alterações histopatológicas pulmonares durante a LPA induzida por LPS.	72
Figura 12 Esquema representativo dos efeitos anti-inflamatórios e do mecanismo de ação do ISACN.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos durante o protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.	43
Tabela 2. Distribuição dos grupos durante o protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.	47
Tabela 3. Escore histológico	50
Tabela 4. Distribuição dos grupos experimentais durante a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan.	51
Tabela 5. Distribuição dos grupos experimentais durante a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.....	53
Tabela 6. Iniciadores usados na RT-qPCR.	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do ISACN na migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal durante peritonite induzida por zimosan.	61
Gráfico 2. Efeito do ISACN no influxo de proteínas para a cavidade peritoneal e consequente formação de edema.	63
Gráfico 3. Efeito do ISACN na produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α durante a peritonite induzida por zimosan.	64
Gráfico 4. Efeito do ISACN na migração de células inflamatórias para a região bronco-alveolar durante a LPA induzida por LPS.	66
Gráfico 5. Efeito do ISACN no influxo de proteínas para a região broncoalveolar durante a LPA induzida por LPS.	68
Gráfico 6. Efeito do ISACN na produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da quimiocina CXCL-1 durante a LPA.	69
Gráfico 7. Escore histológico do efeito do ISACN nas alterações histopatológicas durante a LPA induzida por LPS.	73
Gráfico 8. Efeito do ISACN sobre viabilidade de macrófagos em cultura estimulados com zimosan.	75
Gráfico 9. Efeito do ISACN na produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por macrófagos em cultura estimulados com zimosan.	76
Gráfico 10. Efeito do ISACN sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em cultura estimulados com LPS.	78
Gráfico 11. Efeito do ISACN sobre os níveis de NO produzidos por macrófagos estimulados com LPS.	79
Gráfico 12. Efeito do ISACN na produção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS.	80
Gráfico 13. Efeito do ISACN na expressão do TLR4 e do CD69 em macrófagos estimulados com LPS.	82
Gráfico 14. Efeito do ISACN na expressão da iNOS em macrófagos estimulados com LPS.	86
Gráfico 15. Efeito do ISACN na expressão de P-ERK, P-JNK e P-p38 em macrófagos estimulados com LPS.	87
Gráfico 16. Efeito do ISACN na expressão gênica de CD69 e iNOS em macrófagos estimulados com LPS.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBH	Aduto de Morita-Baylis-Hillman
AMBHs	Adutos de Morita-Baylis-Hillman
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
CD69	Do inglês <i>Cluster of differentiation</i> 69
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética no uso animal
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CREBS	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
DABCO	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DEXA	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
e.p.m.	Erro Padrão da Média
FSC	Do inglês <i>Forward Scatter</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
INF-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
i.n.	Intranasal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
IRAK 1	Quinase 1 associada ao receptor de IL-1
IRAK 4	Quinase 4 associada ao receptor de IL-1
ISACN	2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKK	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
MAPKKK	Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno
MKK3	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno 3
MKK6	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno 6

MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
MYD88	Fator de diferenciação mieloide 88
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Fator de transcrição nuclear κB
NOSs	Sintases do óxido nítrico
Nnos	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução fosfato tamponado
PBST	Solução fosfato tamponado contendo tween
PGE2	Prostaglandina E2
p38	Proteína quinase p38
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura do inglês <i>Roswell Park Memorial</i>
RRPs	Receptores de reconhecimento de padrão molecular
RT	Transcrição reversa
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Do inglês <i>Side Scatter</i>
TAK1	Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β
THF	Tetraidrofurano
TGF-β	Fator transformador de crescimento β
TLRs	Receptores do tipo <i>toll</i> do inglês <i>toll- like receptors</i>
TLR2	Receptor <i>Tooll-like</i> 2
TLR4	Receptor <i>Tooll-like</i> 4
TLR6	Receptor <i>Tooll-like</i> 6
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TpL2	Lócus de progressão tumoral 2
TRAF-6	Fator 6 associado ao receptor de TNF

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Inflamação.....	19
1.2 Inflamação e vias de sinalização através de receptores <i>toll-like</i> e proteínas quinases ativadas por mitógenos.....	20
1.3 Papel dos mediadores na inflamação.....	23
1.4 CD69 e inflamação.....	28
1.5 Macrófagos e neutrófilos na inflamação	29
1.6 Modelos experimentais de inflamação	32
1.7 Adutos de Morita-Baylis-Hillman e 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN)	35
2. OBJETIVOS	39
2.1 Geral	39
2.2 Específicos.....	39
2.2.1 <i>In vivo</i> :.....	39
2.2.2 <i>In vitro</i> :	39
3. METODOLOGIA.....	41
3.1 Animais	41
3.2 Obtenção e preparo do ISACN	41
3.3 Experimentos <i>in vivo</i>	42
3.3.1 Protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.....	42
3.3.2 Tratamento dos animais durante o modelo experimental de peritonite.....	43
3.3.3 Coleta do lavado peritoneal e determinação da migração de células totais e diferenciais	44
3.3.4 Determinação do influxo de proteínas na região peritoneal.....	45
3.3.5 Quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α no lavado peritoneal.....	45
3.3.6 Protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS	46
3.3.7 Tratamento dos animais durante o modelo experimental de LPA.....	46
3.3.8 Coleta do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e determinação da migração de células totais e diferenciais para o pulmão.....	48
3.3.9 Determinação do influxo de proteínas na região broncoalveolar	48

3.3.10	Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da quimiocina CXCL-1 no BALF	49
3.3.11	Avaliação histopatológica pulmonar	49
3.4	Experimentos <i>in vitro</i>	50
3.4.1	Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais murinos	50
3.4.2	Cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan	51
3.4.3	Determinação da viabilidade celular	52
3.4.4	Quantificação das citocinas IL1- β , IL-6 e TNF- α	53
3.4.5	Cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS	53
3.4.6	Quantificação dos níveis de NO	54
3.4.7	Avaliação da expressão de CD69, TLR4, iNOS, P-ERK, P-JNK e P-p38	54
3.4.8	Avaliação da expressão gênica de CD69 e iNOS	56
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4.	RESULTADOS	60
4.1	Efeito anti-inflamatório do ISACN <i>in vivo</i>	60
4.1.1	Efeito do ISACN na migração de células inflamatórias em modelo experimental de peritonite	60
4.1.2	Efeito do ISACN na formação de edema peritoneal	62
4.1.3	Efeito do ISACN na produção de citocinas inflamatórias na cavidade peritoneal	63
4.1.4	Efeito do ISACN na migração de células totais e diferenciais durante a lesão pulmonar aguda induzida por LPS	65
4.1.5	Efeito do ISACN na formação de edema pulmonar	67
4.1.6	Efeito do ISACN na produção de citocinas inflamatórias e da quimiocina CXCL-1 na região broncoalveolar	68
4.1.7	Efeito do ISACN nas alterações histopatológicas características da LPA	71
4.2	Efeito anti-inflamatório do ISACN <i>in vitro</i>	74
4.2.1	Citotoxicidade de ISACN em macrófagos estimulados com zimosan	74
4.2.2	Efeito do ISACN na produção de citocinas inflamatórias por macrófagos estimulados com zimosan	75
4.2.3	Citotoxicidade do ISACN em macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS	78
4.2.4	Efeito do ISACN na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais em cultura estimulados com LPS	79
4.2.5	Efeito do ISACN na produção de citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS	80
4.2.6	Efeito do ISACN na expressão do TLR4 e do CD69	82
4.2.7	Efeito do ISACN na expressão da enzima iNOS	85
4.2.8	Efeito do ISACN na expressão de P-ERK, P-JNK e P-p38	87
4.2.9	Efeito do ISACN na expressão gênica de CD69 e iNOS	91
5.	DISCUSSÃO	94

6. CONCLUSÃO.....	109
7. REFERÊNCIAS	111
8. APÊNDICE	137
9. ANEXO	144

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação pode ser definida como uma resposta fisiológica do sistema imune a estímulos potencialmente prejudiciais como patógenos invasores, dano celular, compostos tóxicos e estresse metabólico (ANTONELLI; KUSHNER, 2017). Os principais objetivos dessa resposta, que pode ser local ou sistêmica, estão relacionados a eliminação dos estímulos danosos e a reparação e cicatrização tecidual, reestabelecendo a homeostase do tecido ou órgão afetado (NATHAN; DING, 2010).

O processo inflamatório agudo representa uma série de eventos coordenados envolvendo interações celulares e moleculares. Ele se inicia quando as células imunes inatas do hospedeiro reconhecem o estímulo lesivo (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; NETEA et al., 2017). Esse reconhecimento leva a ativação de células residentes e a consequente produção de mediadores solúveis, incluindo: citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aminas vasoativas, prostaglandinas e moléculas do sistema complemento (FULLERTON; GILROY, 2016).

À medida que os mediadores vão sendo liberados pelas células residentes, várias alterações vasculares ocorrem de maneira concomitante (POBER; SESSA, 2015). O endotélio vascular é ativado e a expressão de moléculas de adesão celular é regulada positivamente. Esse evento, somado ao aumento da permeabilidade vascular, favorece a migração de leucócitos e o influxo de proteínas do sangue para o sítio inflamado (POBER; SESSA, 2007; NOURSHARGH; ALON, 2014; KAMERITSCH; RENKAWITZ, 2020). Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a migrarem para o local da inflamação (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016) e ao chegarem no sítio inflamado, essas células utilizam diversos mecanismos efetores na tentativa de eliminar o estímulo lesivo (NATHAN, 2006; APPELBERG, 2007; CASTANHEIRA; KUBES, 2019).

Após a eliminação do estímulo, ocorre a ativação de um processo regulatório que conduz o reestabelecimento da homeostase no tecido (HEADLAND; NORLING, 2015). Esse processo envolve mecanismos de modulação negativa da resposta inflamatória e está relacionado a inibição da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, ao estímulo da síntese de mediadores anti-inflamatórios, a suspensão

do recrutamento de leucócitos e a eliminação dos neutrófilos infiltrados (REVILLE et al., 2006; MEDZHITOV, 2008). Todos esses eventos contribuem para a restauração da homeostase e resolução da inflamação instaurada (SERHAN; SAVILL, 2005; FULLERTON; GILROY, 2016).

Em condições normais, a resposta inflamatória aguda é prontamente resolvida pelos processos de regulação fisiológicos da inflamação. Entretanto, quando esses processos apresentam algum tipo de falha ou quando o sistema imune se depara com um patógeno persistente, a inflamação não consegue ser minimizada, se torna exacerbada e evolui para inflamação crônica representando um risco inerente a saúde do hospedeiro (GABER; STREHL; BUTTGEREIT, 2017; DUAN; RAO; SIGDEL, 2019; ZHONG; SHI, 2019). Já é bem estabelecido que a inflamação não resolvida contribui para a patogênese de várias doenças como asma (BANTULÀ et al., 2021), artrite reumatoide (FANG; ZHOU; NANDAKUMAR, 2020), lesão pulmonar aguda (ABEDI et al., 2020), diabetes (DIEDISHEIM et al., 2020), câncer (HOU; KARIN; SUN, 2021), depressão (BEUREL; TOUPS; NEMEROFF, 2020), esquizofrenia (MÜLLER et al., 2015), obesidade (ELLULU et al., 2016) e covid-19 (TAY et al., 2020; CAVALCANTE-SILVA et al., 2021), dentre outras.

Nesse contexto, fármacos com propriedades anti-inflamatórias têm sido rotineiramente utilizados no tratamento de estados inflamatórios agudos e crônicos. Entretanto, a maioria desses fármacos apresenta baixa eficácia ou efeitos colaterais graves quando usados a longo prazo, o que tem encorajado o desenvolvimento de fármacos mais seletivos, toleráveis e eficazes (UNGPRASERT et al., 2015).

1.2 Inflamação e vias de sinalização através de receptores *toll-like* e proteínas quinases ativadas por mitógenos

A resposta inflamatória é resultante da ativação simultânea de vias de sinalização intracelular que regulam a produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento de células imunes para o tecido afetado (LIU et al., 2017). Os processos dessa resposta dependem da natureza do estímulo e do órgão em que ela ocorre. Entretanto, todos eles compartilham o mesmo mecanismo inicial que pode ser resumido em quatro eventos principais: 1. reconhecimento dos estímulos pelas células residentes; 2. ativação subsequente de vias de sinalização inflamatórias; 3. liberação

de mediadores inflamatórios e 4. recrutamento de leucócitos para o tecido (CHEN et al., 2018b).

O reconhecimento dos estímulos pelas células residentes ocorre através dos receptores de reconhecimento de padrão molecular (RRPs) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Esses receptores, detectam a presença de microorganismos ou de injúrias teciduais através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são estruturas conservadas em agentes microbianos (AMARANTE-MENDES et al., 2018), ou de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que são moléculas endógenas liberadas por células danificadas (GONG et al., 2020).

Dentre os vários RRP existentes, os receptores do tipo toll (TLRs) representam os mais estudados e atualmente os mais bem caracterizados (KAWAI; AKIRA, 2007; KESHAVARZ et al., 2021; PATRA; CHANDRA DAS; MUKHERJEE, 2021). Mais de dez TLRs já foram identificados em mamíferos e cada um reconhece ligantes específicos derivados de fontes distintas, sendo classificados de acordo com a sua localização na célula e com o tipo de PAMP que reconhecem (KAWASAKI; KAWAI, 2014). O TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 são receptores de superfície celular e reconhecem preferencialmente estímulos de natureza proteica e lipídica. Enquanto o TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 são receptores intracelulares e tem predileção pelo reconhecimento de material genético (KAWAI; AKIRA, 2010; CELHAR; MAGALHÃES; FAIRHURST, 2012; VIJAY, 2018).

Independente da natureza do estímulo, o reconhecimento de PAMPs por TLRs promove a ativação desses receptores e induz consequentemente a estimulação de vias inflamatórias como a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e a via do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001; CZERKIES; KWIATKOWSKA; PŁYTYCZ, 2014; CHISTYAKOV et al., 2019).

As MAPKs são uma família de serina/treonina quinases que regulam uma grande variedade de processos celulares como crescimento, senescência, diferenciação celular, apoptose e inflamação (PEARSON et al., 2001; ANERILLAS; ABDELMOHSEN; GOROSPE, 2020). Em mamíferos, as MAPKs são representadas por três proteínas principais: quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N -terminal (JNK) e quinase p38 (p38). A via de sinalização de cada MAPK contém pelo menos três componentes ativados sequencialmente: uma MAP3K

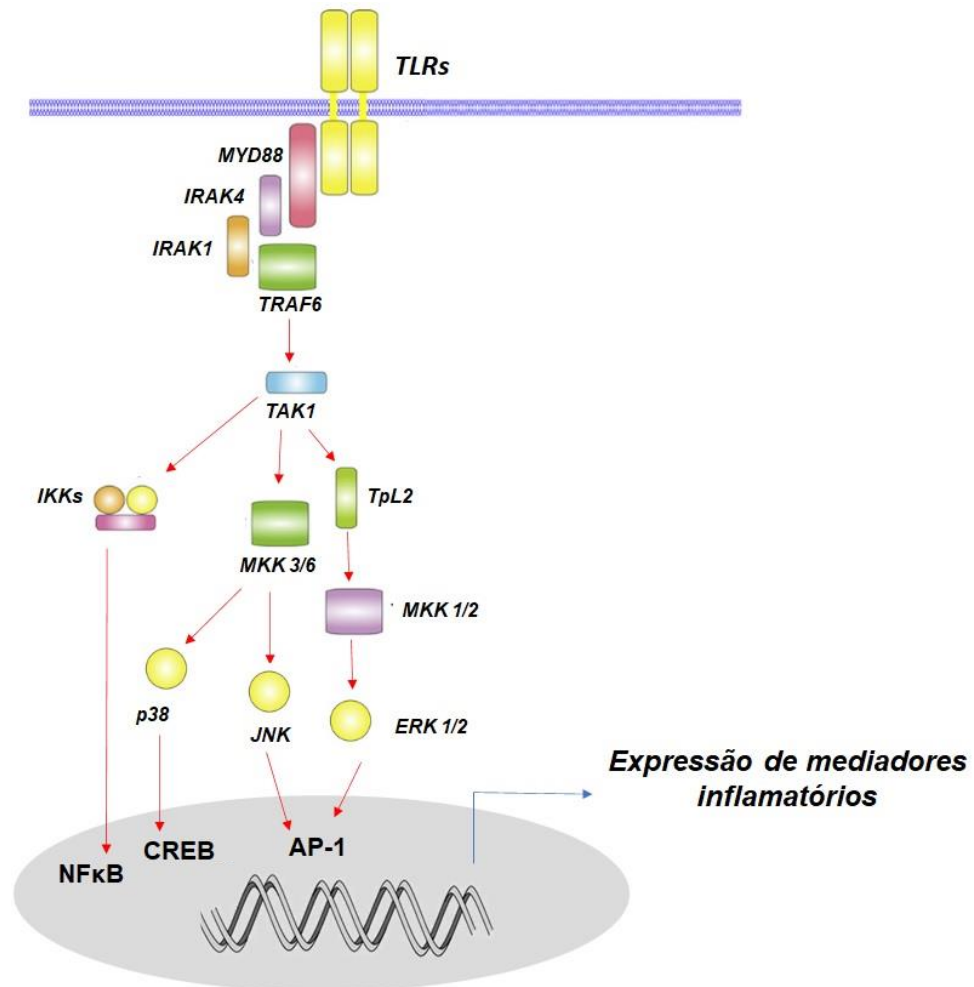
(MAPKKK), uma MAP2K (MAPKK) e uma MAPK, que é a quinase efetora (CHEN et al., 2018b).

A etapa inicial na ativação das MAPks induzida pela maioria dos TLRs envolve o recrutamento da proteína adaptadora MyD88, que quando recrutada, promove a formação de um complexo de sinalização constituído pela associação das quinases IRAK1 e IRAK4 a proteína citoplasmática TRAF6. Esse complexo, ativa a MAP3K TAK1 que por sua vez fosforila duas MAP2Ks: MKK3 e MKK6 que induzem a ativação das quinases efetoras p38 e JNK, respectivamente (WANG et al., 2001; ZHENG et al., 2020). Além da TAK1, outra MAP3K que também é ativada nesse processo é a Tpl2. A Tpl2 quando ativada, induz a fosforilação subsequente das quinases intermediárias (MAP2Ks) MEK1 e MEK2 que promovem a ativação da ERK (BANERJEE; GERONDAKIS, 2007; ROUSSEAU et al., 2008).

Além de ativar as MAP2Ks, a TAK1 bifurca a via de sinalização mediada pelo adaptador MyD88 e ativa a via das IKKs, um complexo específico de quinases que fosforilam o I κ B favorecendo a sua degradação e consequente ativação do fator de transcrição NF- κ B que regula a expressão de mediadores inflamatórios (BANERJEE; GERONDAKIS, 2007).

As MAPKs p38, JNK e ERK, uma vez ativas, induzem a ativação de fatores de transcrição como a proteína ativadora -1 (AP-1) e a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) (Figura 1) (KARIN, 1995; ELIOPOULOS et al., 2002) que juntamente com o NF- κ B orquestram a resposta inflamatória através da modulação da expressão gênica de citocinas, quimiocinas e enzimas (BANERJEE; GERONDAKIS, 2007; WEN; SAKAMOTO; MILLER, 2010; SCHONTHALER; GUINEA-VINIEGRA; WAGNER, 2011; HANNEMANN et al., 2017).

Figura 1. Via de sinalização TLRs/MAPKs dependente de MyD88



Nota: MyD88 -Fator de diferenciação mieloide 88; IRAK4- quinase 4 associada ao receptor de IL-1; IRAK1- quinase 1 associada ao receptor de IL-1; TRAF-6- fator 6 associado ao receptor de TNF; TAK1- quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β ; MKK3- proteína quinase quinase ativada por mitógeno 3 ; MKK6- proteína quinase quinase ativada por mitógeno 6; JNK-quinase c-Jun N-terminal; p38- quinase p38; Tpl2- lócus de progressão tumoral 2; MEK1- proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno 1 ; MEK2- proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno 2; ERK- quinase regulada por sinal extracelular; IKKs: quinases de I κ B; NF- κ B: fator nuclear κ B; AP-1- proteína ativadora-1; CREB- proteína de ligação responsiva ao AMPc. Fonte: Elaborada pela autora com base em (BANERJEE; GERONDAKIS, 2007; LU; YEH; OHASHI, 2008).

1.3 Papel dos mediadores na inflamação

Uma série de mediadores químicos contribuem ativamente para ajustar a resposta inflamatória (ABDULKHALEQ et al., 2018). As citocinas são um grupo de mediadores representado por pequenas proteínas (~30 kD) que atuam como moléculas imunomoduladoras através de mecanismos de sinalização autócrinos,

parácrinos ou endócrinos (BERRAONDO et al., 2019). Os efeitos das citocinas dependem da célula-alvo e diferentes citocinas podem ter o mesmo efeito, assim como, apresentar um efeito sinérgico (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

Para exercerem sua atividade, as citocinas se ligam a receptores específicos e disparam cascatas de sinalização intracelular que levam a modificações na transcrição gênica. Assim, esses mediadores interferem na proliferação e diferenciação celular e influenciam ativamente a resposta imune (O'SHEA; MURRAY, 2008; MORRIS; KERSHAW; BABON, 2018).

A interleucina 1 β (IL-1 β) foi uma das primeiras citocinas descritas e até hoje é considerada um dos principais mediadores da inflamação, cuja principal função é coordenar os eventos pró-inflamatórios (DINARELLO; GOLDIN; WOLFF, 1974; GALOZZI et al., 2021). As fontes primárias de IL-1 β são as células sentinelas do sistema imunológico inato como macrófagos e monócitos (DINARELLO, 2009). A IL-1 β é secretada no citosol como uma proteína precursora inativa (pró- IL-1 β) e sua ativação requer uma etapa proteolítica que envolve a ação de proteases e ocorre por mecanismos dependentes ou independentes do inflamassoma, um complexo multiprotéico citosólico que detecta PAMPs ou DAMPs e ativa a caspase-1, enzima que atua clivando a pró-IL-1 β e levando a formação de IL-1 β biologicamente ativa. (AFONINA et al., 2015).

Após a liberação da sua forma ativa, a IL-1 β induz rapidamente a expressão de vários genes em diferentes tipos de células como células epiteliais, monócitos ou macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, exercendo tanto efeitos locais quanto sistêmicos (BANDMAN et al., 2002; JEONG et al., 2004; JURA et al., 2008). Durante a resposta inflamatória aguda, a IL-1 β promove a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e induz a liberação de quimiocinas, promovendo o recrutamento de leucócitos, para o sítio inflamado. Além disso, essa citocina promove a liberação de outros mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2 (PGE2) e o óxido nítrico (NO) através da indução das enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), o que contribui para fenômenos como hipotensão, febre e aumento da sensibilidade a dor (DINARELLO, 2018). Adicionalmente, a IL-1 β estimula a liberação de outras citocinas a exemplo da interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α) o que intensifica e mantém a resposta inflamatória (SIRONI et al., 1989; IKEJIMA et al., 1990).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que desempenha papéis importantes durante o processo inflamatório (UCIECHOWSKI; DEMPKE, 2020). Essa citocina, é um glicopeptídeo de 25 kDa secretado por quase todas as células do sistema imune, em especial macrófagos e monócitos. A liberação de IL-6 durante condições inflamatórias é induzida pela estimulação das células pelas citocinas IL-1 β e TNF- α ou pela ativação de TLRs (KANG et al., 2019). Esse mediador regula vários eventos, incluindo a produção de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) e a indução de moléculas de adesão (CHALARIS et al., 2011).

Os estágios iniciais do processo inflamatório são caracterizados pela presença de infiltrado neutrofílico. Entretanto, os estados posteriores são dominados pela presença de células mononucleares (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2021). A IL-6 exerce papel essencial nessa etapa de troca de leucócitos, uma vez que as vias de sinalização celular induzidas por ela levam a supressão da liberação de quimiocinas que atraem neutrófilos e indução da liberação de quimiocinas que atraem monócitos (HURST et al., 2001; MCLOUGHLIN et al., 2004). Essa citocina também se mostrou necessária para o recrutamento e migração de linfócitos T para o sítio inflamado, indicando que exerce um papel central na cronificação da inflamação (MCLOUGHLIN et al., 2005).

O TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes e atua como regulador chave em vários aspectos da resposta imune (WALLACH, 2016). Inicialmente, essa citocina foi caracterizada pela sua atividade citotóxica em células tumorais (CARSWELL et al., 1975). Entretanto, a esperança de que o TNF- α pudesse ser aproveitado como uma citocina anticâncer foi logo substituída pela compreensão de que ele é um mediador essencial na indução da inflamação (ANNIBALDI; MEIER, 2018).

O lipopolissacarídeo bacteriano, antígenos virais, micóticos e parasitários, assim como, moléculas do complemento e a citocina IL-1 β são os principais estimuladores da síntese de TNF- α (CAIRNS et al., 2000). Muitos tipos celulares como células B, células NK, neutrófilos, células endoteliais, mastócitos e fibroblastos podem produzi-lo. Entretanto, macrófagos e linfócitos T são considerados suas fontes majoritárias (ZELOVÁ; HOŠEK, 2013). O papel do TNF- α na inflamação é amplo, ele pode: ativar a cascata de coagulação sanguínea (REIKERAS; BORGÉN, 2014), regular positivamente a expressão das enzimas COX-2 e iNOS induzindo a produção

de prostanóides e NO (MARK; TRICKLER; MILLER, 2001; VALLANCE; CHAN, 2001), promover a formação de edema pela desestabilização do citoesqueleto das células endoteliais e aumento consequente da permeabilidade vascular (GOLDBLUM; SUN, 1990), induzir a expressão de moléculas de adesão favorecendo a migração de neutrófilos e monócitos para o sitio inflamado (BEVILACQUA, 1993; CHANDRASEKHARAN et al., 2007) e aumentar a atividade da NADPH oxidase induzindo de forma potente a formação de espécies reativas de oxigênio (YOSHIDA; TSUNAWAKI, 2008).

As quimiocinas são uma grande família de citocinas que medeiam vários processos biológicos incluindo hematopoiese e angiogênese (KAPLAN, 2001; BERNARDINI et al., 2003). Entretanto, são mais conhecidas pela sua capacidade de estimular a migração de leucócitos (MILLER; MAYO, 2017). Algumas quimiocinas são produzidas em condições homeostáticas e estão envolvidas em eventos como a vigilância imunológica, enquanto outras são produzidas apenas sob estímulo inflamatório e estão relacionadas a direção específica de células para o local da inflamação (FERNANDEZ; LOLIS, 2002; CHEN et al., 2018a).

Dentre as quimiocinas existentes, a quimiocina CXCL-1 é considerada um dos maiores quimioatraentes de neutrófilos e desempenha, portanto, um papel fundamental na resposta inflamatória aguda (FRINK et al., 2007; DE FILIPPO et al., 2008; SAWANT et al., 2016). A liberação de CXCL-1 pode ocorrer por macrófagos e por células endoteliais e essa quimiocina medeia suas atividades quimioatrativas por meio da interação com os receptores CXCR1 e CXCR2 (SAWANT et al., 2015). A ativação desses receptores leva a indução de uma série de vias de sinalização nos neutrófilos que orquestram sua adesão e rolamento através da matriz extracelular favorecendo a transmigração através do endotélio e a consequente passagem para o lúmen (RAJARATHNAM et al., 2019). Uma vez infiltrados no tecido, os neutrófilos exercem suas funções efetoras e contribuem para as fases sequenciais da inflamação (LEHMAN; SEGAL, 2020).

De maneira diferente das citocinas mencionadas anteriormente, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que se caracteriza por exercer funções imunossupressoras e limitar os danos teciduais causados por respostas inflamatórias exageradas, sendo essencial para a fase de resolução da inflamação e retorno da homeostase (OUYANG; O'GARRA, 2019). Quase todos os leucócitos incluindo macrófagos, células NK,

linfócitos e células dendríticas produzem IL-10 sob estímulos inflamatórios como ligantes de TLRs ou citocinas (SARAIVA; O'GARRA, 2010; GABRYŠOVÁ et al., 2014).

O número de genes que pode ser regulado pela IL-10 é muito grande, e nas células inatas a IL-10 exerce efeitos imunossupressores principalmente através da inibição da liberação de mediadores inflamatórios e da supressão da apresentação de antígenos (JUNG et al., 2004; SABAT, 2010; SARAIVA et al., 2020). Já foi visto que essa citocina, inibe a liberação de TNF- α e impede a ativação de células polimorfonucleares, assim como, atenua a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a indução de moléculas de adesão, bloqueando tanto os eventos que levam a migração de células para o sítio inflamado, quanto a produção de moléculas efetoras (HUET et al., 2013; MARTIRE-GRECO et al., 2013). Adicionalmente, a IL-10 também exerce papel importante na supressão da COX-2 e na indução da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como antagonistas do receptor da IL-1 β e receptores solúveis do TNF- α (JENKINS; MALYAK; AREND, 1994; JOYCE et al., 1994; HART et al., 1996; SIKKA et al., 2013). Dessa forma, as ações da IL-10 reduzem consideravelmente o efeito de mediadores importantes para a manutenção do processo inflamatório (WANG et al., 2019).

Além das citocinas, o óxido nítrico também é considerado um importante mediador inflamatório e desempenha papel fundamental na patogênese da inflamação (BOGDAN, 2015; GUO et al., 2020). Essa molécula é um radical livre cuja produção é mediada pelas sintases do óxido nítrico (NOSs), enzimas que convertem arginina em citrulina e liberam NO durante esse processo (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; CINELLI et al., 2020). Já foram caracterizadas e nomeadas três isoformas distintas de NOS: sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) e sintase do óxido nítrico induzível (iNOS). Enquanto a eNOS e nNOS são enzimas constitutivas, a iNOS só é expressa nas células sob condições de estímulo (LIND et al., 2017). Citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α e PAMPs a exemplo do LPS, estimulam a expressão de iNOS em macrófagos através da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; CINELLI et al., 2020).

Durante o processo inflamatório agudo, o óxido nítrico é capaz de aumentar a ação efetora dos fagócitos e contribuir para a eliminação de micro-organismos

invasores, o que é possível devido as suas ações citotóxicas (CHAKRAVORTTY; HENSEL, 2003). A citotoxicidade do NO está relacionada principalmente a capacidade dessa molécula de se ligar com o ferro promovendo a inativação de enzimas que contenham o grupo heme, e de formar espécies reativas de nitrogênio, que podem causar danos diretos ao DNA microbiano (BURNEY et al., 1999; SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007). Além disso, já é bem estabelecido que o NO participa do processo inflamatório através de efeitos vasculares diretos como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (CLANCY; ABRAMSON, 1995).

1.4 CD69 e inflamação

O CD69 é uma proteína receptora transmembrana definida como uma molécula cujos níveis estão aumentados durante ativação precoce de leucócitos (SANCHO; GÓMEZ; SÁNCHEZ-MADRID, 2005). A expressão do gene de CD69 é regulada por fatores de transcrição induzíveis incluindo NF- κ B e AP-1 (LOPEZ-CABRERA et al., 1995; CASTELLANOS et al., 1997). Essa molécula é expressa constitutivamente em plaquetas e monócitos e pode ser induzida em neutrófilos e macrófagos ativados (GAVIOLI et al., 1992; MARZIO et al., 1997). A expressão elevada de CD69 é observada em doenças inflamatórias crônicas, em especial nas doenças auto-imunes, o que indica que esse receptor é capaz de mediar a ativação de células imunes e exercer efeitos pró-inflamatórios (GORABI et al., 2020).

A estimulação de CD69 pode promover a ativação da MAPK ERK que está relacionada a indução da transcrição de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (ZINGONI et al., 2000). Estudos com anticorpos anti-CD69 sugerem que ele desempenha diversas funções em vários aspectos da resposta imune, incluindo a ativação de células T, a produção de óxido nítrico por macrófagos, a agregação plaquetária e a degranulação de neutrófilos (TESTI et al., 1990; ZIEGLER; RAMSDELL; ALDERSON, 1994; MARZIO et al., 1997; ISHIZAKI et al., 2012). Adicionalmente, trabalhos com modelos experimentais *in vivo* mostram que o CD69 exerce papel importante no processo inflamatório característico de algumas doenças como asma e artrite reumatóide (SANCHO et al., 2006; ISHIZAKI et al., 2012; GORABI et al., 2020; YUN et al., 2020).

1.5 Macrófagos e neutrófilos na inflamação

Neutrófilos e macrófagos são dois grupos de células do sistema imune inato que surgem de precursores comuns e compartilham algumas características (PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018). Essas células fazem parte do sistema fagocítico mieloide e exercem funções essenciais no processo inflamatório e na defesa do hospedeiro (SILVA; CORREIA-NEVES, 2012). Ambas são células granulares com capacidade de liberar mediadores como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio. Embora compartilhem muitas características, neutrófilos e macrófagos têm papéis distintos na imunidade inata e atuam de forma cooperativa durante a inflamação (BUTTERFIELD; BEST; MERRICK, 2006; SILVA; CORREIA-NEVES, 2012; PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018; BOUCHERY; HARRIS, 2019).

Os macrófagos são células residentes encontrados em todos os órgãos e exercem pelo menos três funções principais: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação (GORDON; PLÜDDEMANN, 2017). Sendo responsáveis por eventos como a iniciação da resposta inflamatória, interação entre o sistema imune inato e adaptativo e ativação do processo de resolução da inflamação (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Já os neutrófilos, devido a sua elevada reatividade, não residem em tecidos (são encontrados principalmente na medula óssea e na circulação), representam o primeiro grupo de células a serem recrutadas durante a resposta inflamatória aguda, possuem atividade microbicida e imunoreguladora, pela produção das NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos) e citocinas (LEHMAN; SEGAL, 2020).

Durante o desencadeamento do processo inflamatório, os macrófagos que patrulham os tecidos reconhecem sinais de perigo e liberam vários mediadores pró-inflamatórios como as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e a quimiocina CXCL-1. Esses mediadores agem em conjunto para iniciar o processo inflamatório e estimulam o extravasamento de neutrófilos da corrente sanguínea para o local da injúria através de um processo de várias etapas conhecido como cascata de recrutamento de neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; NOURSHARGH; ALON, 2014).

A etapa inicial da cascata de recrutamento de neutrófilos consiste no estabelecimento de interações fracas e transitórias entre os neutrófilos e as células endoteliais das vênulas pós-capilares localizadas nas proximidades dos tecidos inflamados (LEY et al., 2007; NOURSHARGH; ALON, 2014). Esse evento é mediado

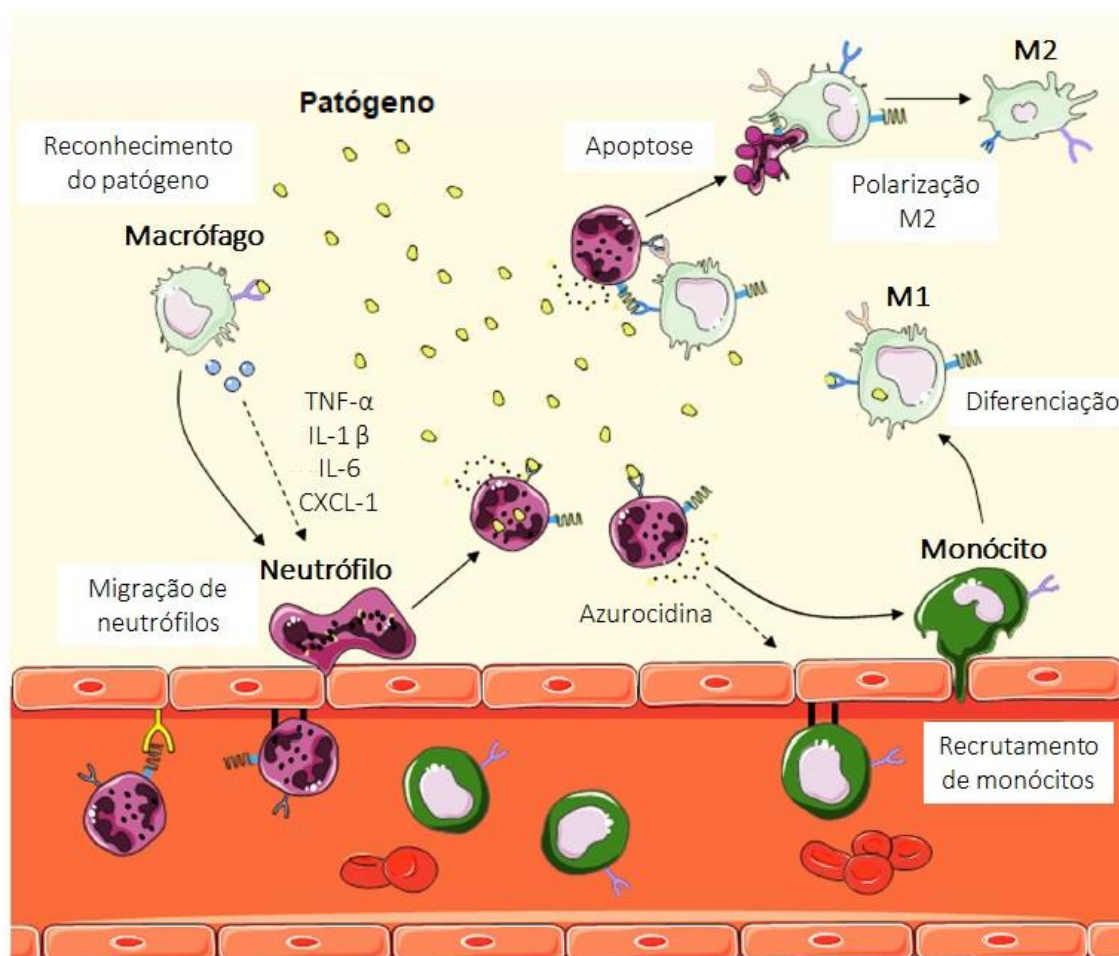
pelas integrinas, presentes na superfície dos neutrófilos, e pelas selectinas (P-selectina e E-selectina) que tem expressão induzida na superfície endotelial. A interação das selectinas com proteínas ligantes de selectina, induz a ancoragem dos neutrófilos ao endotélio e seu rolamento subsequente na mesma direção do fluxo sanguíneo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Uma vez rolando ao longo do vaso, os neutrófilos são ativados por quimiocinas e essa ativação promove o aumento da afinidade das integrinas com seus ligantes induzindo a adesão firme dos neutrófilos ao endotélio. Após essa etapa, os neutrófilos iniciam o processo de transmigração e deixam o sistema vascular através da camada de células endoteliais, chegando ao sítio inflamado (SCHIMMEL; HEEMSKERK; VAN BUUL, 2017).

Ao chegarem no tecido, os neutrófilos exercem ações microbidas e podem eliminar patógenos tanto por mecanismos intracelulares como extracelulares. Esses mecanismos estão relacionados principalmente a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos e de grânulos ricos em enzimas citotóxicas como mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica e defensinas, colaborando com os macrófagos residentes na resposta inflamatória inicial (SILVA; CORREIA-NEVES, 2012; BOUCHERY; HARRIS, 2019; LEHMAN; SEGAL, 2020). Além disso, os neutrófilos induzem uma resposta inflamatória de segunda onda, onde regulam a liberação de moléculas quimioatraentes como catepsina G e azurocidina que atraem monócitos da circulação para o sítio inflamado. Uma vez no local da inflamação, os monócitos são então induzidos a se diferenciarem em macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (M1) e liberam grandes quantidades de NO e citocinas inflamatórias potencializando a inflamação (Figura 2) (PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018).

Para evitar respostas inflamatórias exacerbadas o sistema imune conta com uma série de mecanismos homeostáticos que visam a resolução da inflamação (ORTEGA-GÓMEZ; PERRETTI; SOEHNLEIN, 2013). As primeiras fases desse mecanismo têm como objetivo diminuir o acúmulo de leucócitos no tecido. Já é bem estabelecido que a apoptose dos neutrófilos infiltrados é um evento chave nesse processo (EL KEBIR; FILEP, 2010). Os neutrófilos podem ter apoptose induzida através da interação com proteínas de superfície presente em macrófagos vizinhos (ALLENBACH et al., 2006). Esses neutrófilos apoptóticos são então eliminados por macrófagos residentes através da fagocitose (LEMKE, 2019). O processo de fagocitose de neutrófilos induz a polarização dos macrófagos para um fenótipo anti-

inflamatório (M2) que se caracteriza por secretar grandes quantidades de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolução como as citocinas TGF- β e IL-10 (Figura 2). Além disso, em macrófagos M2 a produção de mediadores inflamatórios é inibida induzindo regulação negativa da migração de neutrófilos para o tecido o que contribui para a resolução da inflamação e reestabelece a homeostase (FADOK et al., 1998; TAN; WENINGER, 2017; PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018).

Figura 2. Macrófagos e neutrófilos durante a resposta inflamatória aguda.



Fonte: Adaptado de (PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018).

Em geral, as ações de macrófagos e neutrófilos permitem que o hospedeiro se defenda e elimine com eficácia os insultos teciduais. Entretanto, se a atividade dessas células não for rigidamente regulada pode se tornar prejudicial e causar sérios danos ao organismo através do estabelecimento de um processo inflamatório sustentado (PRAME KUMAR; NICHOLLS; WONG, 2018).

1.6 Modelos experimentais de inflamação

Os modelos experimentais representam uma importante fonte de informação sobre os sistemas biológicos e cada vez mais se mostram clinicamente relevantes para as doenças humanas, incluindo as doenças inflamatórias. Uma vez que permitem o melhor entendimento da patogênese do processo inflamatório e são críticos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (FERREIRA; FERREIRA, 2003; GOYAL et al., 2014; HARMS et al., 2021).

Dentre os modelos propostos para o estudo da inflamação, os modelos experimentais de peritonite estéril têm se mostrado uma ferramenta útil para a explicação de processos inflamatórios agudos e para a avaliação do mecanismo de ação de drogas anti-inflamatórias (CASH; WHITE; GREAVES, 2009; BELLAVITA et al., 2020; DE FARIAS SILVA et al., 2021; NGAMSRI et al., 2021). Esses modelos são largamente utilizados na literatura, uma vez que são relativamente simples de serem executados e tem elevado índice de reprodutibilidade, garantindo de forma rápida a quantificação de parâmetros inflamatórios específicos (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

A peritonite induzida por zimosan, um componente da parede celular de fungos, é um modelo experimental de peritonite estéril cuja descrição data de 1985 e desde então é utilizado (DOHERTY et al., 1985). A injeção intraperitoneal desse composto em animais é capaz de ativar, via heterodímero TLR2/TLR6, células residentes como macrófagos peritoneais e induzir de maneira coordenada todos os eventos do processo inflamatório agudo, incluindo infiltração de leucócitos, dor e produção de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas e prostanóides dentre outros), mimetizando a resposta inflamatória normal de um indivíduo imunocompetente (ROUZER et al., 1980; DOHERTY et al., 1985; UNDERHILL, 2003; CASH; WHITE; GREAVES, 2009). Além disso, existem várias vantagens na utilização do zimosan em relação a outros insultos e na utilização da peritonite em relação a outros modelos de inflamação aguda. Dentre as principais vantagens desse modelo podemos destacar: o manejo da gravidade do insulto inflamatório (gravidade pode ser variada mudando a dose de zimosan administrada); a grande quantidade de exsudato que pode ser obtido na cavidade peritoneal, viabilizando a análise de muitos parâmetros numa mesma amostra; e o fato dos níveis máximos da migração de neutrófilos ocorrerem

com 4 horas após o desafio, o que permite uma experimentação rápida (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

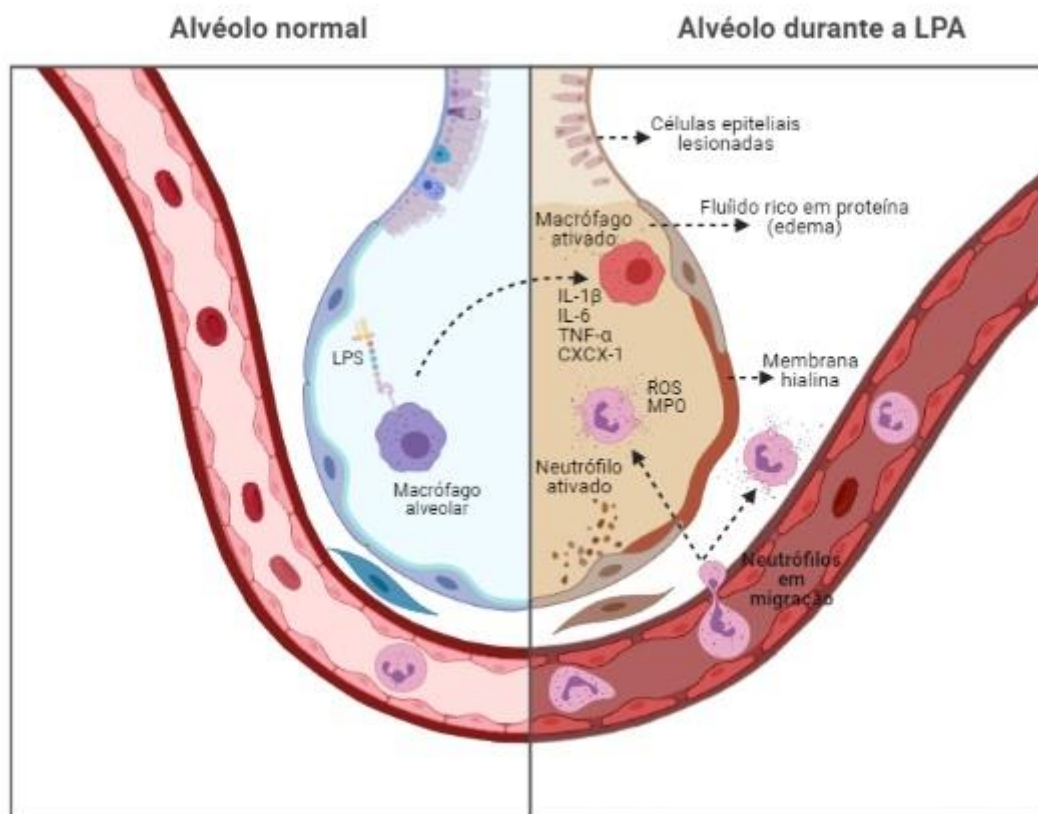
Além dos modelos de peritonite, que avaliam os aspectos gerais da inflamação, modelos experimentais mais complexos e específicos que mimetizam em animais doenças humanas como sepse, asma e lesão pulmonar aguda são essenciais para avaliar mecanismos inflamatórios característicos de cada doença e para testar novos fármacos candidatos a ensaios clínicos (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008; STORTZ et al., 2017; AUN et al., 2018).

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma doença inflamatória pulmonar frequentemente seguida pela síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), condição grave associada a elevadas taxas de mortalidade (GOSS et al., 2003; BELLANI et al., 2016; PHAM; RUBENFELD, 2017). A LPA/SDRA se manifesta através da instalação de um processo inflamatório exagerado no espaço aéreo pulmonar, caracterizado clinicamente por infiltrado pulmonar bilateral, edema pulmonar e quadros severos de hipoxemia (GOUDA; BHANDARY, 2019; ZHOU; FAN; FAN, 2021).

Para simular a LPA em humanos os modelos animais devem reproduzir a resposta inflamatória aguda nos espaços aéreos e nessa perspectiva, vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos (MARTIN; MATUTE-BELLO, 2011). A indução da LPA pela administração intranasal ou intratraqueal de endotoxinas tem sido uma estratégia bastante utilizada, sendo a LPA induzida por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) um dos modelos experimentais mais usados em pesquisas dessa área. A instilação nasal ou intratraqueal de LPS é capaz de induzir em animais sintomas muito semelhantes a LPA em humanos (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Esse lipopolissacarídeo, ativa os macrófagos alveolares por meio do receptor TLR4 e induz a secreção de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α e CXCL-1 que promovem, dentre outras atividades, o recrutamento de neutrófilos para o espaço alveolar (LU et al., 2018; LASKIN; MALAVIYA; LASKIN, 2019). Ao chegarem nos espaços aéreos, os neutrófilos são completamente ativados, liberam mediadores citotóxicos (MPO e ROS) e causam graves danos epiteliais e endoteliais culminando com a quebra da barreira alvéolo-capilar, formação de edema e deposição de membrana hialina na parede do alvéolo (Figura 3.), levando as alterações

histopatológicas características da doença (ABRAHAM, 2003; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; ZHOU; DAI; HUANG, 2012).

Figura 3. Resposta inflamatória durante a lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



Fonte: Elaborada pela autora com base em (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017). Criado com BioRender.com

A utilização do LPS como insulto pulmonar direto para indução de LPA apresenta uma série de vantagens que incluem o fornecimento de respostas inflamatórias parecidas com as obtidas em hospedeiros com infecções bacterianas, a reprodutibilidade do modelo, e a rapidez com que a lesão pulmonar consegue ser estabelecida (24 horas após a administração de LPS) (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

Somado aos modelos de experimentação *in vivo*, os modelos *in vitro* como a cultura de células, também são bastante utilizados no estudo da inflamação. Esses modelos, fornecem informações importantes sobre o comportamento molecular e bioquímico individual das células imunes em condições normais e em condições patológicas e permitem a avaliação de processos celulares particulares (BERMUDEZ-BRITO et al., 2013; CAVALCANTE-SILVA et al., 2019; KAKINOKI et al., 2020).

Os macrófagos são células imunes inatas que desempenham papel importante na resposta inflamatória sendo imprescindíveis para eventos como iniciação, perpetuação e reparação da inflamação (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; GORDON; PLÜDDEMANN, 2017). Diante disso, os modelos experimentais de cultura dessas células têm sido largamente utilizados (CAI et al., 2013; JIN; KRUTH, 2016; JI et al., 2020). Macrófagos em cultura podem ser ativados por uma grande variedade de estímulos, inclusive zimosan ou LPS, e quando ativados passam por alterações metabólicas e morfológicas e secretam muitos mediadores, gerando uma resposta inflamatória coordenada, bem caracterizada e facilmente reproduzível (MØRLAND; KAPLAN, 1977; ADEREM, 2001; UNDERHILL, 2003). Pode-se dizer que dentre as aplicações dos modelos experimentais de cultura de macrófagos, uma de suas principais utilidades é a avaliação da atividade farmacológica e dos mecanismos de ação molecular de drogas com potencial anti-inflamatório (CARVALHO et al., 2019; MARREIRO DE SALES-NETO et al., 2019; LIMA et al., 2020).

1.7 Adutos de Morita-Baylis-Hillman e 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN)

Na busca por novas fontes de moléculas bioativas com potencial anti-inflamatório, os fármacos sintéticos têm desempenhado papel significativo no processo de descoberta e desenvolvimento de drogas (MARK; TRICKLER; MILLER, 2001; HU et al., 2020; TANG et al., 2020). Nesse sentido, um grupo de moléculas sintéticas conhecidas como adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) têm chamado a atenção (FAHEINA-MARTINS et al., 2017; BRITO et al., 2020).

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBHs) representam uma classe nova de compostos bioativos, obtidos a partir da reação Morita-Baylis-Hillman, uma das metodologias mais recentes na química orgânica para a formação de ligações entre carbonos (MORITA; SUZUKI; HIROSE, 1968; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). De maneira geral, essa reação consiste basicamente no acoplamento entre aldeídos ou cetonas com alcenos ligados a grupos elétron-atraentes, na presença de uma amina terciária como catalisador nucleofílico (BASAVAIAH; RAO; SATYANARAYANA, 2003; ZHONG et al., 2018).

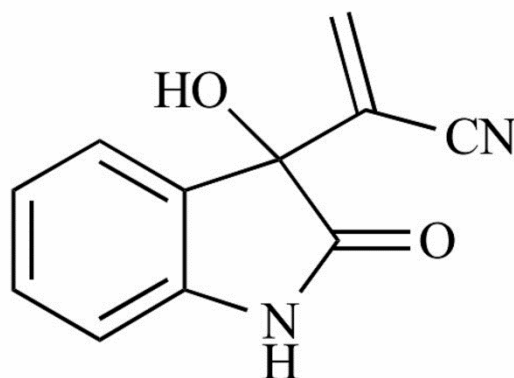
Desde que foi descrita, a reação de Morita-Baylis-Hillman têm se destacado e ganhando importância na química orgânica e medicinal devido ao seu potencial para

a síntese de novos fármacos de forma mais barata e eficiente, apresentando como principais vantagens: a economia de átomos (todos os átomos dos reagentes são incorporados no produto) e a possibilidade de execução em meio aquoso. Além disso, a maioria dos AMBH pode ser preparada usando protocolos sintéticos rápidos, ecológicos e que forneçam altos rendimentos, o que viabiliza as pesquisas com esses produtos (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012; BRITO et al., 2020).

Inicialmente, os AMBHs foram utilizados como intermediários na síntese de produtos naturais, e apesar de ainda serem largamente empregados com essa finalidade, a comunidade científica vêm demonstrando interesse em avaliar biologicamente a ação desses compostos frente a patologias (BASAVIAH; RAO; REDDY, 2007). Várias atividades biológicas já foram descritas para essas moléculas das quais podemos citar: ação antimalárica (KUNDU et al., 1999; DE SOUZA et al., 2004), moluscicida (VASCONCELLOS et al., 2006), leishmanicida (DE SOUZA et al., 2007; KAUR et al., 2011; DA SILVA et al., 2016; XAVIER et al., 2016; DA CÂMARA ROCHA et al., 2019), antitumoral (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016), hipolipidêmica (PATRA et al., 2003) e mais recentemente ação anti-inflamatória (FAHEINA-MARTINS et al., 2017; LACERDA, 2017) e antibacteriana (DIAS, 2020)

O 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN) (Figura 4) é um AMBH cuja síntese orgânica é realizada com cetonas e usando como substrato a isatina, um produto natural comercial. Nessas condições, o ISACN é obtido em excelentes rendimentos e em curto tempo reacional (99% de rendimento/20 minutos) (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016; BRITO et al., 2020). Um estudo recente mostra que o ISACN possui baixa toxicidade aguda em ensaios não clínicos e não é capaz de induzir genotoxicidade, sendo assim, um ótimo candidato a fármaco do ponto de vista toxicológico (DIAS, 2020). Adicionalmente, o ISACN já demonstrou ação anti-leucêmica em células HL-60 apresentando potencial anticancerígeno (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016).

Figura 4. Estrutura química do ISACN.



Fonte: (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016)

Nesse contexto, o potencial anticancerígeno exibido pelo ISACN justifica a investigação de sua ação anti-inflamatória, tendo em vista que existe uma estreita relação entre o câncer e a inflamação não controlada, e que o estado inflamatório é essencial para manutenção e progressão de tumores (MURATA, 2018; KINOSHITA; GOTO, 2021). Além disso, outros AMBHs com estrutura semelhante à do ISACN demonstraram efeito anti-inflamatório tanto *in vitro* como *in vivo* em diferentes modelos experimentais, o que também direciona o nosso estudo nessa perspectiva (LACERDA, 2017; FAHEINA-MARTINS et al., 2017).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório do AMBH ISACN investigando a sua interferência em processos inflamatórios agudos e seu mecanismo de ação.

2.2 Específicos

2.2.1 *In vivo*:

- Determinar o potencial anti-inflamatório do ISACN em modelo experimental de peritonite induzida por zimosan e de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

2.2.2 *In vitro*:

- Determinar o efeito imunomodulador do ISACN em macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan ou com LPS.
- Determinar o mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória de ISACN em macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas provenientes do biotério Prof. Thomas George alocado na Universidade Federal da Paraíba em João Pessoa-PB e camundongos *BALB/c* machos provenientes do do biotério central do Instituto Aggeu Magalhães alocado na Universidade Federal de Pernambuco em Recife-PE. Ambos com 6 – 8 semanas de idade, pesando entre 25 - 30 g. Esses animais foram mantidos sob controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (25 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Todos os procedimentos experimentais desse trabalho foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob a certidão N°2921050818 (Anexo A).

3.2 Obtenção e preparo do ISACN

O AMBH 2-(3-Hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN) utilizado nesse estudo foi doado pelo Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior do Laboratório de síntese orgânica medicinal da Paraíba, alocado no Centro de Ciências Exatas e Naturais da UFPB. A síntese do ISACN foi realizada em uma única etapa na qual a isatina e a acrilonitrila foram utilizadas como substratos, o tetraidrofurano (THF) como solvente e o 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO) serviu como catalizador (Figura 5.). Após a reação, realizou-se a remoção do solvente orgânico e o ISACN foi obtido na forma de pó (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016).

As doses de ISACN utilizadas *in vivo* foram estabelecidas de acordo com um estudo anterior que avaliou a ação anti-inflamatória da isatina (RABELO SOCCA et al., 2014). Já as concentrações de ISACN utilizadas *in vitro* foram escolhidas de acordo com o trabalho de Faheina-Martins (2017) onde foi avaliado a ação anti-inflamatória de outros AMBH.

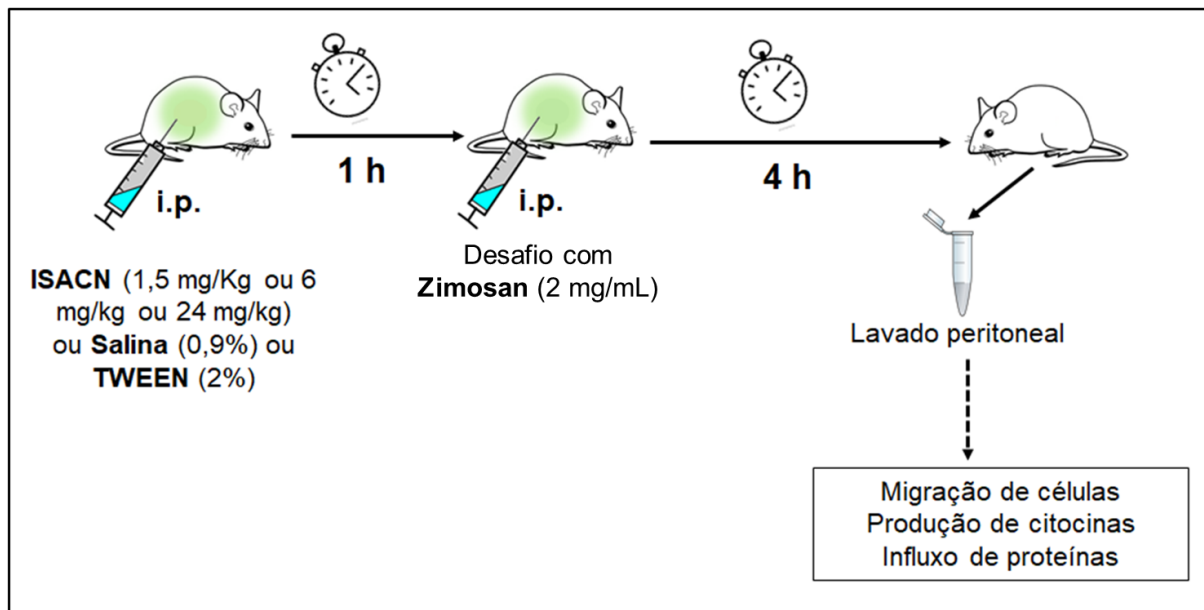
3.3.2 Tratamento dos animais durante o modelo experimental de peritonite

Os animais foram separados aleatoriamente em seis grupos experimentais (n=6): CONTROLE, TWEEN, ZIM, ISACN 1,5 mg/kg + ZIM, ISACN 6mg/kg + ZIM e ISACN 24 mg/kg + ZIM. Os animais do grupo CONTROLE e do grupo TWEEN representam animais saudáveis que receberam apenas salina (0,9%) ou tween 80 (2%), respectivamente. Os animais do grupo ZYM representam animais que foram apenas desafiados com zimosan (2 mg/mL), e os animais dos grupos ISACN 1,5 mg/kg + ZIM, ISACN 6mg/kg + ZIM e ISACN 24 mg/kg + ZIM representam animais que foram tratados com ISACN nas doses 1,5 mg/kg, 6 mg/kg ou 24 mg/kg e em seguida desafiados com zimosan (conforme tabela 1). Todos os tratamentos foram realizados em dose única e via intraperitoneal 1 hora antes do desafio. Quatro horas após o desafio com zimosan, os animais foram eutanasiados e foi então coletado o lavado peritoneal. A partir do lavado peritoneal foram determinados os parâmetros: migração de células, influxo de proteínas e produção de citocinas. O esquema de tratamento e indução da peritonite pode ser visualizado na figura 6.

Tabela 1. Distribuição dos grupos durante o protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.

GRUPOS	TRATAMENTOS	DESAFIO
CONTROLE	Salina 0,9 %	-
TWEEN	Tween 80 2%	-
ZIM	-	Zimosan 2 mg/mL
ISACN 1,5 mg/kg + ZIM	ISACN 1,5 mg/kg	Zimosan 2 mg/mL
ISACN 6 mg/kg + ZIM	ISACN 6 mg/kg	Zimosan 2 mg/mL
ISACN 24 mg/kg + ZIM	ISACN 24 mg/kg	Zimosan 2 mg/mL

Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.



Fonte: Adaptada de (Carvalho, 2018)

3.3.3 Coleta do lavado peritoneal e determinação da migração de células totais e diferenciais

A coleta do lavado peritoneal foi realizada 4 horas após o desafio com zimosan. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o lavado foi obtido através da injeção de 3 ml de PBS (tampão fosfato salino) gelado na cavidade peritoneal, que foi recuperado via punção após realização de massagem no peritônio por um período de 30 segundos. O exsudato coletado foi transferido para tubos tipo eppendorf e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Após o período de centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20 °C.

As células presentes nos *pellets* foram ressuspensas em PBS e uma alíquota foi diluída em azul de Turk (0,01% de cristal violeta em 3% de ácido acético) na proporção de 1:10. A contagem de células totais foi feita com auxílio da câmara de Neubauer e de microscópio óptico utilizando objetiva de 10x ou 40X (BX40, OLYMPUS).

Para contagem diferencial das células, 50 µL da suspensão de células do lavado peritoneal foram centrifugados na citocentrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400) a 1500 rpm por 10 minutos. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem

diferencial de células foi realizada por microscopia óptica, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X). Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células. Mononucleares e neutrófilos foram identificados segundo coloração e características morfológicas.

3.3.4 Determinação do influxo de proteínas na região peritoneal

A avaliação do influxo de proteínas no exsudato peritoneal foi realizada pela determinação dos níveis de proteínas totais presentes no sobrenadante do lavado peritoneal. Para essa quantificação, foi utilizado o método colorimétrico do reativo do biureto, que é uma solução de sulfato de cobre (CuSO_4) e tartarato duplo de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$). Os íons cobre (Cu^{+2}) em meio alcalino presentes no Reagente de Biureto reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura. De forma que, quanto maior for a quantidade de proteínas na amostra maior será a intensidade de cor no meio. As amostras dos diferentes grupos experimentais foram então, colocadas na presença do reativo de biureto de acordo com as recomendações e procedimentos indicados pelo kit de determinação de proteínas totais da Biotécnica®, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectramax 190 – Molecular Device) a 600 nm.

3.3.5 Quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α no lavado peritoneal

O sobrenadante do lavado peritoneal foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α . Para isso, foi utilizado o Teste Imunoenzimático ELISA direto ou sanduíche, que se baseia nas interações antígeno-anticorpo. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante de cada citocina (eBIOSCIENCE).

Placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para cada citocina, e incubadas por 18 h a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de soro fetal bovino) por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes para a realização da curva. As placas

foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C. Terminado o período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas e incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado. As placas foram incubadas por meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico e a leitura realizada em leitor de microplaca (BioTek ELx800™, Thermo Fisher Scientific) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

3.3.6 Protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Após a triagem farmacológica e escolha da melhor dose, com o intuito de avaliar o efeito do ISACN em uma doença anti-inflamatória, foi realizado o modelo murino de lesão pulmonar aguda. Para o protocolo de LPA foram utilizados camundongos *BALB/c* machos. Esses animais foram inicialmente anestesiados pela administração intra-muscular (i.m.) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de cetamina e 1,91 mg/mL de xilasina, e receberam via instilação nasal (i.n.) 50 µL de uma solução contendo LPS (2,5 mg/kg) (*Escherichia coli* - Sigma-Aldrich), conforme protocolo já descrito na literatura (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015; MÁRCIA et al., 2019).

3.3.7 Tratamento dos animais durante o modelo experimental de LPA

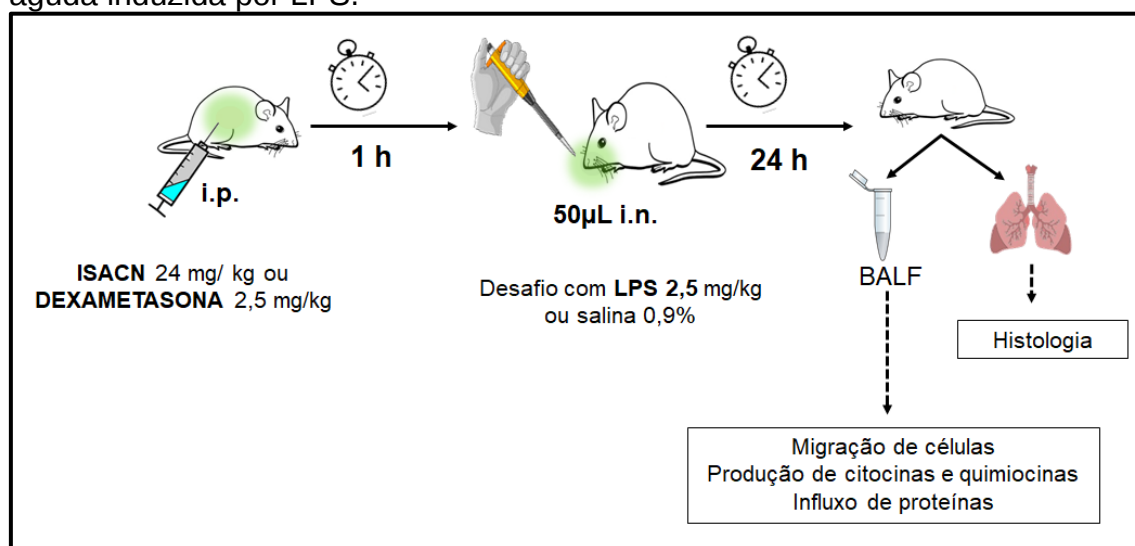
Durante o protocolo murino de LPA, os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=6): CONTROLE, LPS, ISACN + LPS e DEXA + LPS. O grupo CONTROLE representa animais saudáveis que receberam apenas o veículo estéril (salina 0,9%); o grupo LPS representa animais apenas desafiados com LPS; o grupo ISACN + LPS representa animais que foram tratados com ISACN na dose de 24 mg/kg e posteriormente desafiados com LPS; e o grupo DEXA+LPS representa animais que foram tratados com a droga padrão dexametasona (DECADRON® - injetável) na dose de 2,5 mg/kg e em seguida

desafiado com LPS (conforme tabela 2). Os tratamentos com ISACN ou com dexametasona foram realizados em dose única e via intraperitoneal uma hora antes do desafio. Os animais do grupo controle receberam o veículo (salina estéril) via intranasal, no mesmo momento em que os outros grupos foram tratados. Uma hora após os tratamentos, os animais foram desafiados com 2,5 mg/kg de LPS via intranasal, através da administração de uma solução que foi gotejada nas narinas até a total absorção. Vinte e quatro horas após o desafio, os animais foram submetidos a eutanásia por overdose anestésica e foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e o pulmão. O BALF foi utilizado para a determinação da migração de células totais e diferenciais, influxo de proteínas e produção de citocinas e quimiocinas e o tecido pulmonar foi utilizado para a avaliação histopatológica. O esquema de tratamento e indução da LPA pode ser visualizado na figura 7.

Tabela 2. Distribuição dos grupos durante o protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

GRUPOS	TRATAMENTOS	DESAFIO
CONTROLE	-	Salina 0,9%
LPS	-	LPS 2,5 mg/kg
ISACN 24 mg/kg + LPS	ISACN 24 mg/kg	LPS 2,5 mg/kg
DEXA 2,5 mg/kg + LPS	Dexametasona 2,5 mg/kg	LPS 2,5 mg/kg

Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



Fonte: Adaptada de (Silva,2016).

3.3.8 Coleta do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e determinação da migração de células totais e diferenciais para o pulmão

Vinte e quatro horas após o desafio com LPS, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica e tiveram a traqueia cirurgicamente exposta. A coleta do BALF foi realizada através de um processo de lavagem das vias aéreas. Para isso, foi inserido um cateter na traqueia do animal no qual foi conectada uma seringa contendo 0,5 mL de PBS gelado que foi administrado na traqueia e direcionado para o pulmão e em seguida recuperado (após 10 seg). Esse procedimento de lavagem foi realizado três vezes para cada animal totalizando uma amostra de 1,5 mL de BALF por animal. O BALF obtido era transferido para tubos do tipo *ependorf* e colocado no gelo para processamento imediato.

Para determinação das células totais, uma alíquota do BALF foi retirada e adicionada a solução de Turk na proporção de 1:4 e os leucócitos foram contados com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico (BX40, OLYMPUS).

Para a determinação das células diferenciais, o BALF foi centrifugado (1500 rpm por 5 minutos a 4 °C), o sobrenadante obtido foi armazenado (-20°C) e o *pellet* foi ressuspenso em PBS. Em seguida, 200 µL da suspensão de células do BALF foram centrifugados na citocentrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400) a 1500 rpm por 10 minutos. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X). Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células. Neutrófilos e mononucleares foram identificados segundo coloração e características morfológicas.

3.3.9 Determinação do influxo de proteínas na região broncoalveolar

O influxo de proteínas na região broncoalveolar foi determinado através da avaliação dos níveis de proteínas totais no BALF dos animais dos diferentes grupos. A concentração de proteína foi mensurada no sobrenadante do BALF pelo método do reagente biureto de acordo com as instruções do fabricante (Biotécnica®), conforme descrito anteriormente (item 3.3.4).

3.3.10 Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da quimiocina CXCL-1 no BALF

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e quimiocina CXCL-1 foram quantificadas em amostras do sobrenadante do BALF dos diferentes grupos experimentais pelo ensaio imunoenzimático ELISA direto ou sanduíche, de acordo com as recomendações do fabricante (eBIOSCIENCE), conforme descrito anteriormente no item 3.3.5.

3.3.11 Avaliação histopatológica pulmonar

Para avaliar as características histológicas do tecido pulmonar, ambos os lóbulos direito e esquerdo do pulmão dos animais foi coletado. Após a coleta, o órgão foi embebido em fixador (formalina tamponada) até o momento do processamento histológico. Para o processamento, os pulmões fixados foram inicialmente hidratados por imersão em água corrente (24 horas). Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100% -1 hora em cada concentração) e em seguida imersas em xilol (2 horas), e por fim em parafina líquida (parafina histológica- ERVIEGAS). Os “blocos” obtidos com a solidificação da parafina foram submetidos a cortes histológicos com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Os cortes obtidos foram colocados em banho-maria (38 – 39°C), e posteriormente depositados em lâminas e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E), onde a hematoxilina é um corante básico que cora os componentes ácidos como os núcleos das células e a eosina é um corante ácido que cora os componentes básicos como o citoplasma. A utilização desses corantes permite, portanto, uma observação geral de todas as estruturas pulmonares.

A análise morfológica do tecido pulmonar foi realizada através de escore histológico. No qual, foi atribuída uma pontuação de 0-4 de acordo com o grau de alterações histológicas observadas. O campo microscópico foi pontuado como 0,1,2,3 ou 4, o que corresponde a normal (sem alterações), leve (alterações em menos de 25% do campo microscópico), moderado (alterações entre 25% - 50% do campo microscópico), grave (alterações entre 50% - 75% do campo microscópico) ou extremamente grave (alterações em mais de 75% do campo microscópico), respectivamente (conforme tabela 3). Cada lâmina teve um total de 10 campos observados e a pontuação final foi obtida a partir do cálculo da média desses dos

campos. Os parâmetros avaliados foram: infiltrado celular, edema e hemorragia (WEI et al., 2019).

Tabela 3. Escore histológico

ESCORE	GRAU DE ALTERAÇÕES
0	Sem alterações
1	Leve : < 25% do campo
2	Moderado: entre 25% e 50% do campo
3	Grave: entre 50% e 75% do campo
4	Extremamente grave: > 75% do campo

3.4 Experimentos *in vitro*

Para verificar o efeito imunomodulador do ISACN em macrófagos foi realizado o modelo experimental de cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan ou com LPS.

3.4.1 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais murinos

Os macrófagos utilizados nesse estudo foram obtidos a partir de camundongos *Swiss* fêmeas. Para isso, esses animais foram elicitados (via i.p.) com 2 mL de tioglicolato de sódio e quatro dias após esse estímulo foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizada a lavagem peritoneal com 5 mL de PBS gelado, que foi injetado no peritônio e em seguida recuperado (após 30 segundos de massagem). O lavado peritoneal foi centrifugado (1500 rpm por 5 minutos e a 4 °C) e as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo (estreptomicina: 10 mg/mL, penicilina: 100 U.I./ml e soro fetal bovino:10%) (Sigma Aldrich). O número de células viáveis foi determinado com o auxílio de câmara de Neubauer e do corante azul de tripan.

Os leucócitos peritoneais obtidos foram cultivados em meio RPMI completo em placas de 96 poços a uma concentração de 2×10^5 células/poço em um volume final de 200 μ L e incubadas em estufa de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C) por 2 horas (período necessário para a adesão dos macrófagos). Em seguida, as células não

aderentes foram removidas por aspiração e os macrófagos aderidos as placas foram então submetidos a diferentes protocolos experimentais.

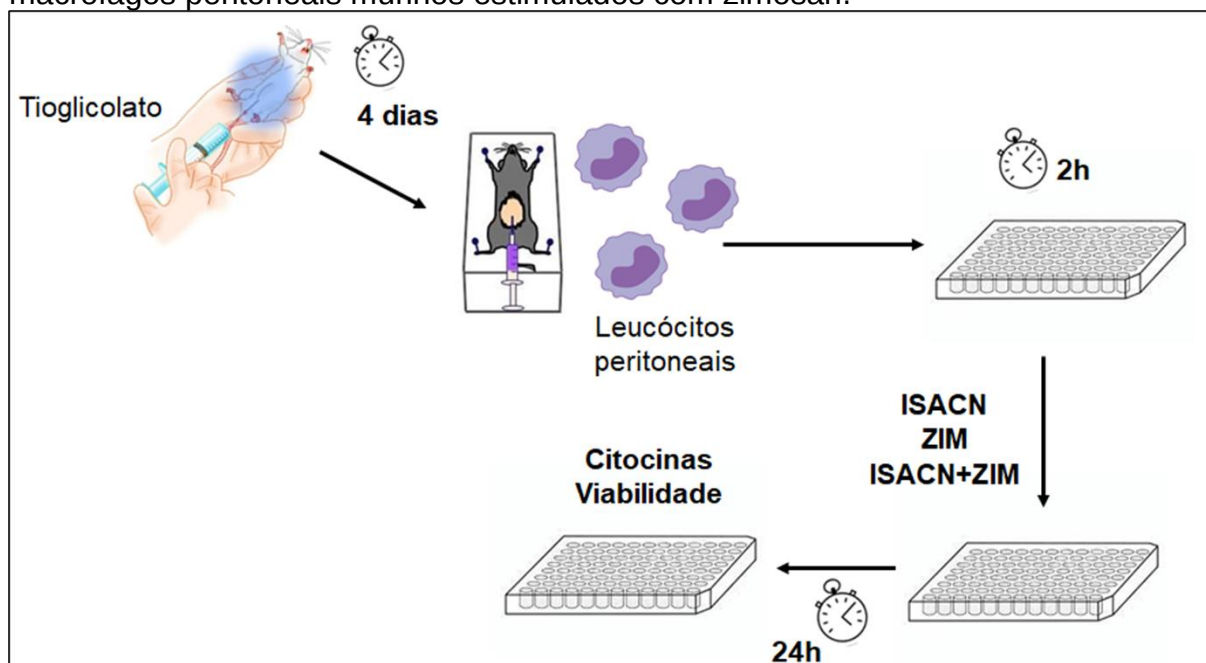
3.4.2 Cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan

Com a finalidade de avaliar a ação imunomoduladora de ISACN em macrófagos foi realizado primeiramente o modelo experimental de macrófagos estimulados com zimosan (Figura 8). Macrófagos peritoneais murinos foram obtidos como descrito anteriormente (item 3.4.1) e após a etapa de adesão, foram incubados durante 24 horas com meio RPMI completo com adição ou não de zimosan (Sigma Aldrich) na concentração de 0,2 mg/mL, na presença ou ausência de diferentes concentrações de ISACN (20 μ M, 10 μ M e 5 μ M) e do DMSO (0,06%). Após 24 horas de cultura, o sobrenadante foi coletado para posterior dosagem das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e foi determinada a viabilidade celular. A tabela 4 representa a distribuição dos grupos experimentais de acordo com os tratamentos.

Tabela 4. Distribuição dos grupos experimentais durante a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan.

GRUPOS	TRATAMENTOS	ESTÍMULO
CONTROLE	-	-
DMSO	DMSO 0,06%	-
ISACN 5 μ M	ISACN 5 μ M	-
ISACN 10 μ M	ISACN 10 μ M	-
ISACN 20 μ M	ISACN 20 μ M	-
ZIM	-	Zimosan 0,2 mg/mL
ISACN 5 μ M + ZIM	ISACN 5 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL
ISACN 10 μ M + ZIM	ISACN 10 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL
ISACN 20 μ M + ZIM	ISACN 20 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL

Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental de cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com zimosan.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.3 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular dos macrófagos em cultura foi realizada através do ensaio de MTT (brometo de 3-metil-[4-5dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio). Esse método, é um método colorimétrico que se baseia na capacidade das células viáveis em reduzir o MTT, um sal amarelo, a cristais de formazan, seu derivado de coloração violeta. De forma que, quanto maior a intensidade da cor violeta, maior será a viabilidade (MOSMANN, 1983).

Para determinar a viabilidade, após 24 horas de incubação o sobrenadante da cultura foi coletado e as células receberam meio RPMI completo suplementado com 10% de MTT (Sigma-Aldrich) a 5 mg/mL, e foram incubadas novamente por um período de 4 horas. Após esse período, o meio foi removido por aspiração e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com 100µL/poço de DMSO (Sigma-Aldrich). As placas foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm (BioTek ELx800™, Thermo Fisher Scientific) e a viabilidade celular foi então quantificada pela medida da densidade óptica.

3.4.4 Quantificação das citocinas IL1- β , IL-6 e TNF- α

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram quantificadas no sobrenadante obtido da cultura de macrófagos peritoneais pelo ensaio imunoenzimático ELISA direto ou sanduíche, de acordo com as recomendações do fabricante (eBIOSCIENCE), conforme descrito anteriormente no item 3.3.5.

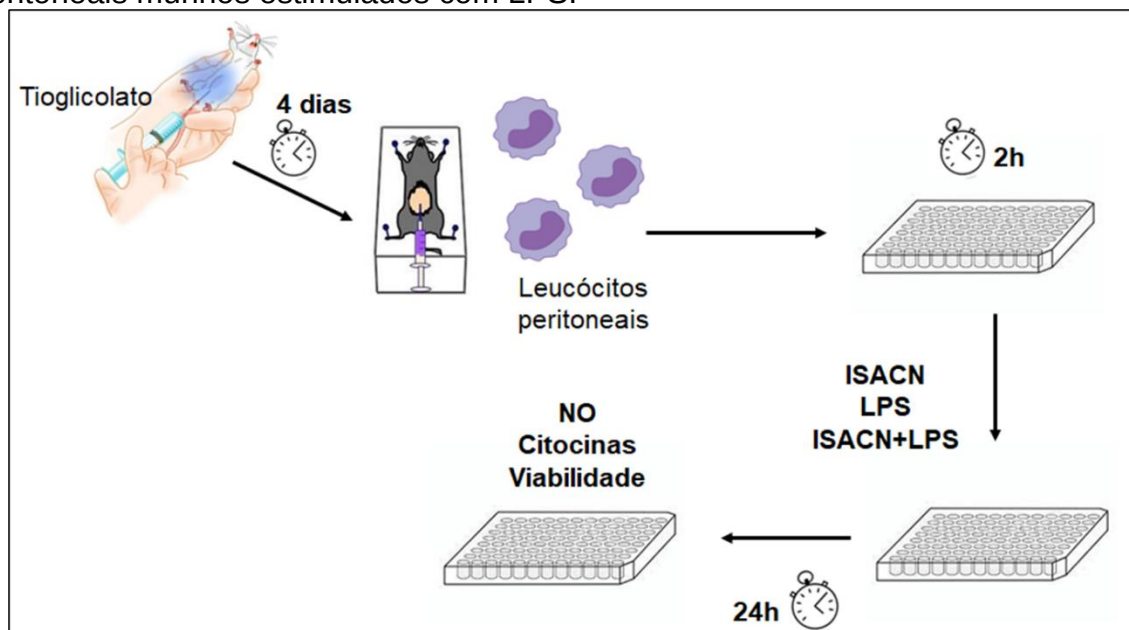
3.4.5 Cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS

Para a realização desse protocolo experimental, os macrófagos peritoneais foram obtidos como detalhado no item 3.4.1, e após a etapa de adesão, foram incubados durante 24 horas com meio RPMI completo com adição ou não de LPS (*Escherichia coli* – Thermo Fisher Scientific) na concentração de 1 μ g/mL, na presença ou ausência de ISACN nas concentrações 10 μ M ou 5 μ M. Após 24 horas de cultura, o sobrenadante foi coletado e foi determinada a viabilidade celular pelo ensaio do MTT conforme metodologia descrita anteriormente (item 3.4.3). O sobrenadante foi utilizado para a determinação dos níveis de óxido nítrico e das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 que foram mensuradas pelo ensaio imunoenzimático ELISA direto ou sanduíche conforme metodologia já especificada (item 3.3.5). Os grupos experimentais podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos grupos experimentais durante a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.

GRUPOS	TRATAMENTOS	ESTÍMULO
CONTROLE	-	-
ISACN 5 μ M	ISACN 5 μ M	-
ISACN 10 μ M	ISACN 10 μ M	-
LPS	-	LPS 1 μ g/mL
ISACN 5 μ M + LPS	ISACN 5 μ M	LPS 1 μ g/mL
ISACN 10 μ M + LPS	ISACN 10 μ M	LPS 1 μ g/mL

Figura 9. Esquema representativo do protocolo experimental de cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.6 Quantificação dos níveis de NO

A produção de NO foi quantificada indiretamente pela dosagem do nitrito, seu produto de degradação mais estável. Para isso, foi utilizado o método colorimétrico de Griess, baseado no princípio de que o nitrito em meio ácido reage com a sulfonamina p-aminobenzeno formando um sal diazônio que reage com a N-afil-etilenodiamina levando a obtenção final de um composto estável de coloração púrpura. De forma que a concentração de nitrito na amostra está diretamente relacionada a concentração de NO e quanto maior essa concentração, maior será a intensidade da cor púrpura (GREEN et al., 1982).

Para realizar essa quantificação, 50 µL do reagente de Griess (0,1% N-afil-etilenodiamina e 1% sulfonamina p-aminobenzeno em ácido orto-fosfórico 5%) foram adicionados a 50 µL dos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS. Após 10 minutos de reação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura das placas em 540 nm (BioTek ELx800™, Thermo Fisher Scientific). Os resultados foram determinados por comparação com uma curva padrão realizada com nitrito de sódio em diferentes concentrações.

3.4.7 Avaliação da expressão de CD69, TLR4, iNOS, P-ERK, P-JNK e P-p38

Buscando determinar o mecanismo de ação molecular do ISACN relacionado a sua atividade anti-inflamatória, foi determinado por citometria de fluxo o efeito desse AMBH na expressão das moléculas CD69, TLR4, iNOS, P-ERK, P-JNK e P-p38. Para isso, macrófagos peritoneais murinos (obtidos como descrito no item 3.4.1) foram cultivados em placas de 6 poços a uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço em um volume final de 2 mL, e incubados em estufa de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C) por 2 horas. Em seguida, as células em suspensão foram removidas por aspiração, os macrófagos aderidos foram tratados com 10µM de ISACN, estimulados ou não com LPS na concentração de 1 µg/mL e incubados por um período de 24 horas. Após 24 horas de cultura, o sobrenadante foi descartado, foi adicionado 1,5 mL de PBS gelado em cada poço e as células foram soltas das placas com o auxílio de um raspador de células. As células obtidas após a raspagem foram plaqueadas em placas de 96 poços (fundo U). Posteriormente, as placas foram centrifugadas (300 g, 6 min a 4 °C) e foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com a adição do anticorpo anti-CD16/32 (Thermo Fisher Scientific).

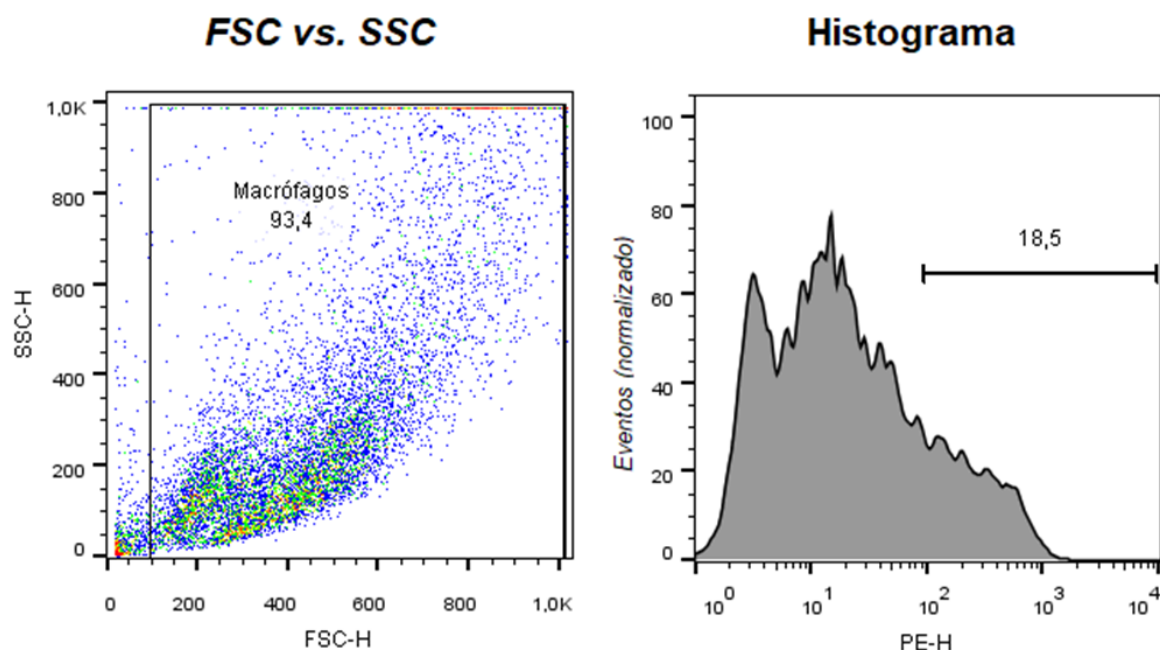
Para a marcação das proteínas de superfície CD69 e TLR4, após a etapa de bloqueio com o CD16/32, as células foram incubadas separadamente com os anticorpos anti-CD69 (FITC) (Thermo Fisher Scientific) ou anti-TLR4 (PE) (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções de cada fabricante. Posteriormente, as células foram lavadas e suspensas em PBS para leitura em citômetro de fluxo.

Já para a marcação das proteínas intracelulares iNOS, P-ERK, P-p38 e P-JNK, após o bloqueio, as células foram fixadas com 100µL/poço de *Cytofix Buffer* (BD Biosciences), lavadas com PBS, permeabilizadas com 150µL/poço de *Perm Buffer* (BD Biosciences) e em seguida incubadas separadamente sob condições específicas com os anticorpos anti-iNOS (PE) (Santa Cruz Biotechnology), anti- P-ERK 1/2 (PE) (BD Biosciences), anti-P-p38 (PE-Cy7) (BD Biosciences) ou anti-P-JNK 1/2 (PE) (BD Biosciences). Após a incubação, as células foram lavadas e preparadas para a leitura em citômetro de fluxo.

As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) e os dados foram gerados a partir da coleta de 10.000 eventos. A análise foi baseada na obtenção de um gráfico de tamanho (FSC) vs. granulosidade (SSC) no qual foi feito um *gate* na população de macrófagos excluindo os debris. Posteriormente, a análise foi realizada de acordo com a porcentagem de células

marcadas e com a intensidade de fluorescência emitida, através da geração de um gráfico do tipo histograma (Figura 10). Esses dados foram avaliados pelo *software FlowJo* versão 10.

Figura 10. Esquema representativo da estratégia de análise dos dados de citometria de fluxo.



Fonte: Fonte: Elaborada pela autora. Histograma representativo de células do grupo LPS marcadas com o anticorpo anti-TLR4.

3.4.8 Avaliação da expressão gênica de CD69 e iNOS

Ainda para determinar o mecanismo de ação do ISACN, foi realizado por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) a avaliação da expressão gênica do CD69 e da iNOS. Para esse experimento, macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em placas de 6 poços, estimulados ou não com LPS (1µg/mL), tratados com ISACN na concentração de 10 µM e incubados por 24 horas, conforme descrito anteriormente (item 3.4.5). Após a incubação, o RNA (ácido ribonucléico) total foi extraído de seis amostras de cada grupo experimental com a utilização do reagente TRIzol™ (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA foram medidas por espectrofotômetro (BioDrop µLite, SERVA Electrophoresis GmbH) e a integridade foi confirmada por eletroforese em gel (1,5% de agarose e brometo de etídio: 0,5 µg / ml). Para a síntese de DNA complementar

(cDNA) foi realizada a transcrição reversa (RT) de 1 µg de RNA utilizando um kit específico (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase quantitativa foi realizada conforme o protocolo do kit master mix de qPCR GoTaq® usando um termociclador 7300 *Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Os iniciadores específicos para cada gene (Tabela 1) foram projetados baseados em sequências genéticas disponíveis no banco de dados GenBank® usando a ferramenta Primer-BLAST® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as características dos iniciadores foram avaliadas usando a ferramenta OligoAnalyzer® (<https://www.idtdna.com>). A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi avaliada por reações de diluições seriadas. Os genes *Actb* e *Gapdh*, que codificam a β -actina e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), respectivamente, foram usados como genes de referência após apresentarem estabilidade quando testados com a ferramenta geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). O fator de normalização foi calculado como a média geométrica dos valores da expressão dos genes de referência testados usando a ferramenta geNorm. Os níveis de expressão relativa dos genes alvo foram calculados como a razão do valor da expressão de cada gene alvo pelo fator de normalização.

Tabela 6. Iniciadores usados na RT-qPCR.

Gene	Sequência do iniciador (5'-3')	Tamanho do produto	Eficiência de amplificação	GenBank
<i>Cd69</i>	F: AGCTACATCTCTCCGTGGACC	148 pb	97.7%	NM_001033122.4
	R: GTATACTGGTGCCATGGTCCTTC			
<i>Nos2</i>	F: TCTAGTGAAGCAAAGCCCAAC	142 pb	106.2%	NM_001313921.1
	R: CACATACTGTGGACGGGTCTG			
<i>Actb</i>	F: CAGTCCGGGTACAGTCACAC	89 pb	100.6%	NM_007393.5
	R: CACTGTCGAGTCGCGTCC			
<i>Gapdh</i>	F: TCATCCATGGCGAACTGGTG	136 pb	105.8%	NM_001289726.1
	R: GGAGAGTGTTTCCTCGTCCC			
	R: ATGAAGGGGTCTTGATGGC			

Cd69: CD69; *Nos2*: iNOS; *Actb*: β -actina; e *Gapdh*: GAPDH

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) e analisados pelo software GraphPad Prism 9.0. Os resultados foram submetidos à análise de variância (*ANOVA one-way*) seguida do teste de Tukey. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito anti-inflamatório do ISACN *in vivo*

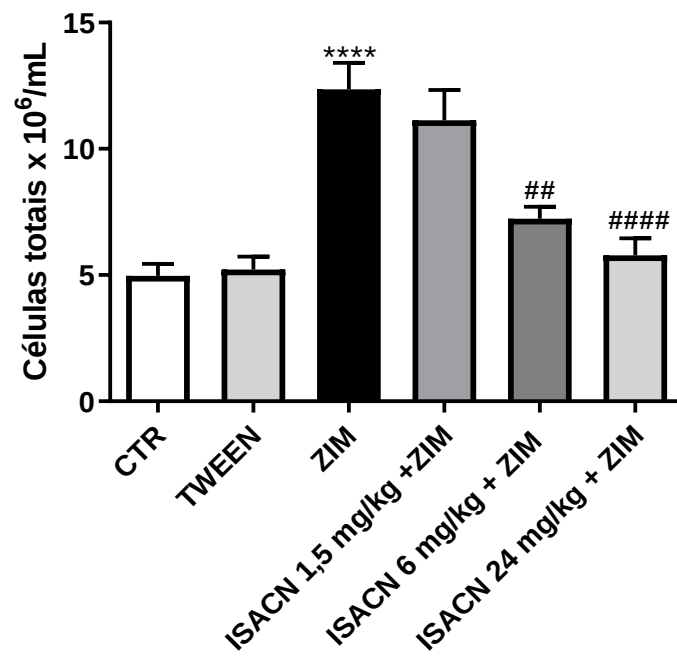
4.1.1 Efeito do ISACN na migração de células inflamatórias em modelo experimental de peritonite

A administração de zimosan induziu extensa migração de células para a cavidade peritoneal dos camundongos confirmando a efetividade do modelo experimental, como pode ser observado no gráfico 1a. Essa migração foi reduzida significativamente pelo tratamento dos animais com ISACN nas doses de 6 mg/kg (reduziu 41%) e de 24 mg/kg (reduziu 53,23%), reestabelecendo os níveis celulares basais em ambos os casos. Em contrapartida, o ISACN na dose de 1,5 mg/kg não promoveu nenhuma alteração nesse parâmetro. Adicionalmente, o tween, veículo utilizado para a dissolução do ISACN, não promoveu nenhuma alteração nos níveis celulares basais. Como a dose de 1,5 mg/kg não demonstrou efeito nessa avaliação inicial, sua utilização foi excluída dos experimentos subsequentes.

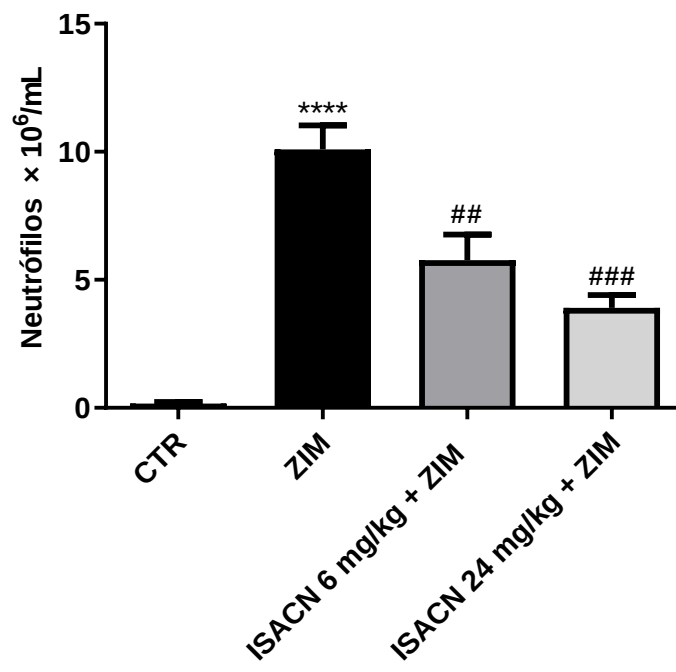
Em relação as células diferenciais, observou-se que a administração de zimosan, induziu aumento no número de neutrófilos (Gráfico 1b) e diminuição no número de mononucleares (Gráfico 1c) na cavidade peritoneal dos animais. O tratamento com ISACN nas doses de 6 mg/kg e de 24 mg/kg reduziu a migração de neutrófilos em 42,87% e 61,38%, respectivamente, mas não promoveu alteração no número de mononucleares, o que pode ser observado quando comparamos os animais tratados com ISACN aos animais do grupo zimosan.

Gráfico 1. Efeito do ISACN na migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal durante peritonite induzida por zimosan.

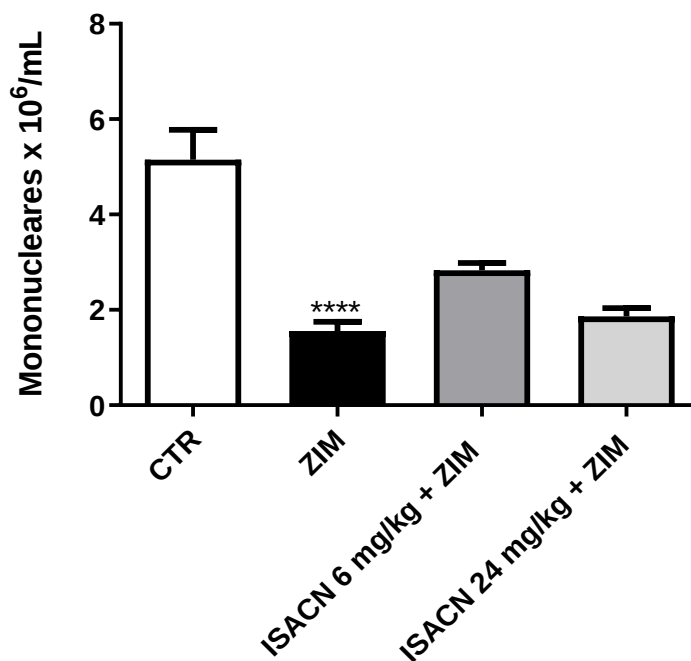
a)



b)



c)

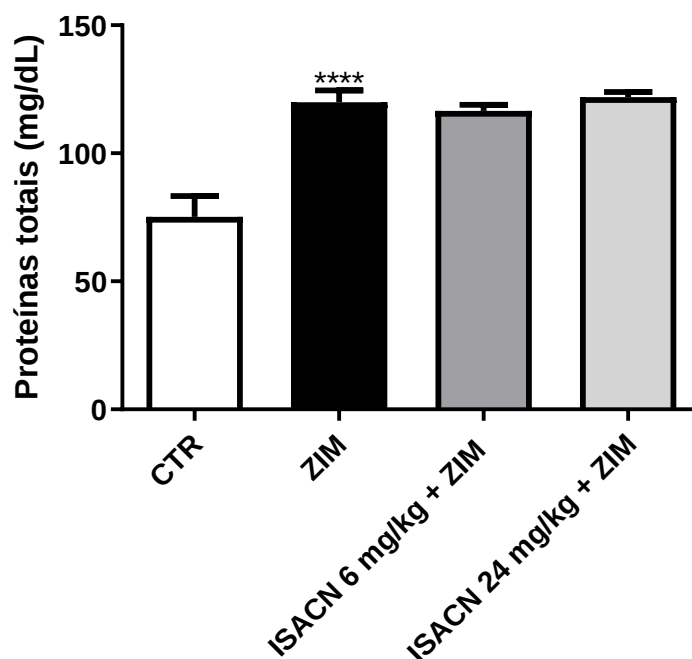


Camundongos Swiss (n = 6) foram tratados com ISACN em diferentes doses (1,5 mg/kg; 6 mg/kg ou 24 mg/kg) ou com os veículos tween ou salina via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com zimosan na concentração de 2 mg/mL (via i.p). Após um período de 4 horas o lavado peritoneal foi coletado e foi determinado o número de leucócitos totais e diferenciais. (a) número de células totais. (b) número de neutrófilos. (c) número de mononucleares. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. ****p < 0,0001 quando comparado ao grupo controle; ##p<0,01; ###p<0,001 e ####p<0,0001 quando comparado ao grupo zimosan. CTR: Controle; TWEEN: Tween 80; ZIM: Zimosan; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.1.2 Efeito do ISACN na formação de edema peritoneal

Nesse experimento, foi avaliado o efeito do ISACN na concentração de proteínas no exsudato peritoneal como um indicativo do seu efeito na formação do edema induzido por zimosan. Pôde-se observar que os animais que sofreram desafio com zimosan apresentaram aumento significativo na concentração de proteínas no lavado peritoneal (59%), indicando que houve formação de edema no peritônio. O tratamento com ISACN não promoveu nenhuma alteração nesse parâmetro em nenhuma das doses utilizadas, como mostra o gráfico 2.

Gráfico 2. Efeito do ISACN no influxo de proteínas para a cavidade peritoneal e consequente formação de edema.



Camundongos Swiss ($n = 6$) foram tratados com ISACN em diferentes doses (6 mg/kg ou 24 mg/kg) ou com salina via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com zimosan na concentração de 2 mg/mL (via i.p). Após um período de 4 horas o lavado peritoneal foi coletado e foi determinada a concentração de proteínas totais pelo método do reagente de biureto. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle. CTR: Controle; ZYM: Zimosan; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

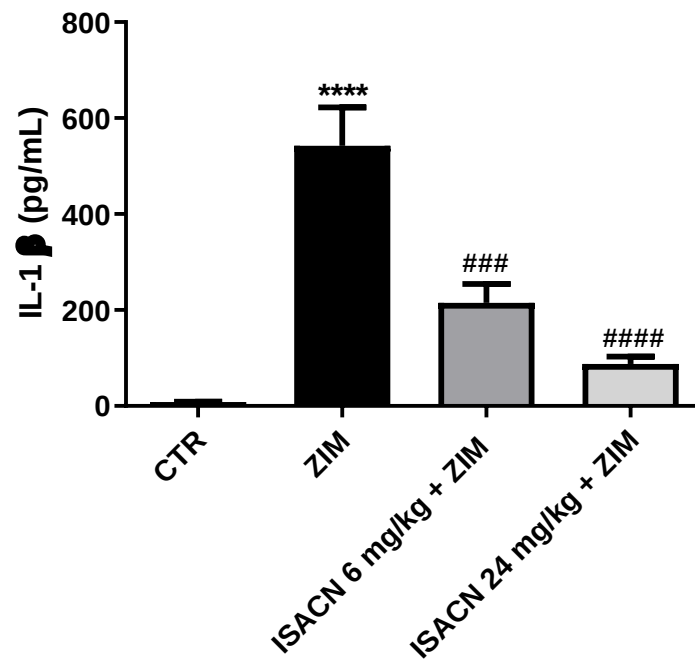
4.1.3 Efeito do ISACN na produção de citocinas inflamatórias na cavidade peritoneal

A administração de zimosan estimulou a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Gráfico 3a, 3b e 3c). O tratamento com ISACN tanto na dose de 6 mg/kg como na dose de 24 mg/kg foi capaz de reduzir de maneira significativa a produção desses três mediadores. A dose de 6 mg/kg reduziu 60%, 40% e 76% e a dose de 24 mg/kg reduziu 80%, 85% e 84% a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , respectivamente. Não houve diferença estatística significativa nos níveis das citocinas IL-1 β e IL-6 entre os animais do grupo controle e os animais do grupo tratado com 24 mg/kg de ISACN, mostrando que a maior dose de ISACN é capaz de reestabelecer os níveis basais dessas citocinas. A partir dessa observação, a dose de 24 mg/kg foi escolhida para

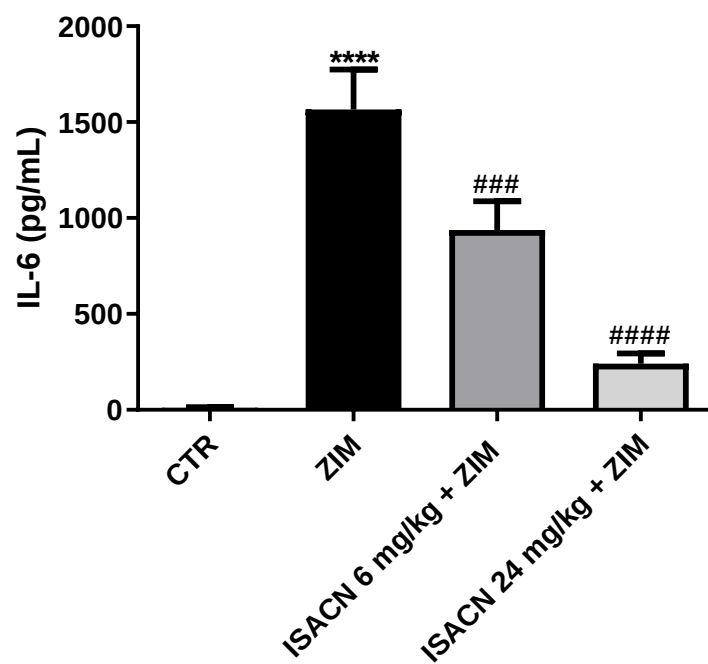
ser utilizada nos próximos experimentos *in vivo* com o modelo de lesão pulmonar aguda.

Gráfico 3. Efeito do ISACN na produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α durante a peritonite induzida por zimosan.

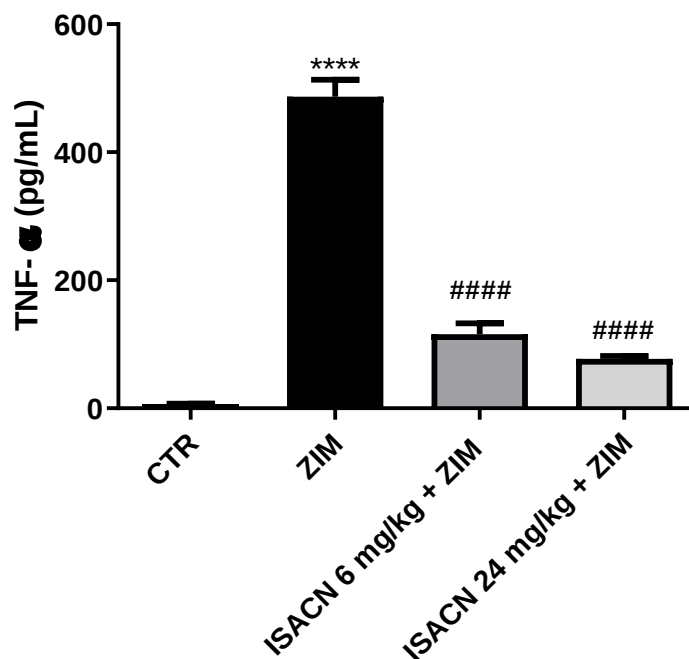
a)



b)



c)



Camundongos Swiss ($n = 6$) foram tratados com ISACN em diferentes doses (6 mg/kg ou 24 mg/kg) ou com salina via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com zimosan na concentração de 2 mg/mL (via i.p). Após um período de 4 horas o lavado peritoneal foi coletado e foi determinada a concentração das citocinas inflamatórias IL-1 β (a), IL-6 (b) e TNF- α (c) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle. #### $p < 0,001$ e ##### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo zimosan. CTR: Controle; ZIM: Zimosan; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.1.4 Efeito do ISACN na migração de células totais e diferenciais durante a lesão pulmonar aguda induzida por LPS

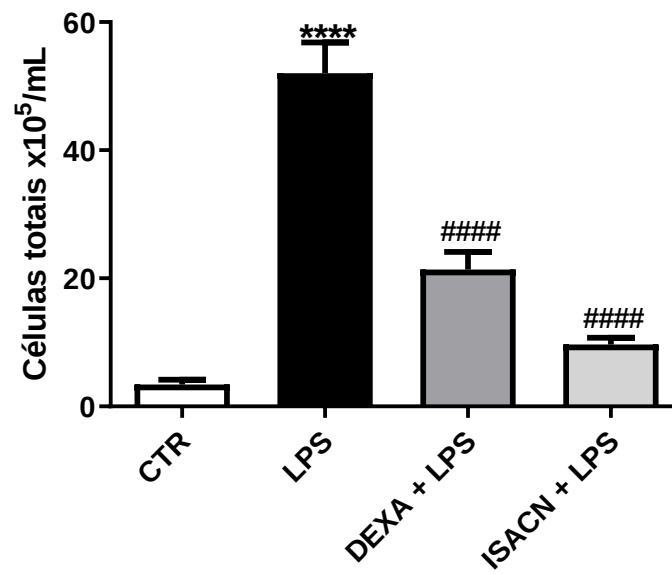
A administração de LPS promoveu aumento considerável no número de leucócitos totais no BALF, o que pode ser observado quando comparamos os animais do grupo LPS aos animais do grupo controle. O tratamento com ISACN (24 mg/kg) foi capaz de reduzir esse parâmetro, reduzindo 81,41% essa migração (Gráfico 4a). Os animais tratados com dexametasona tiveram um perfil de resposta semelhante e apresentaram redução de 58,81 % na migração celular induzida pelo LPS.

Em relação as células diferenciais, foi observado que o LPS promove a migração tanto de neutrófilos como de mononucleares para a região bronco- alveolar e que o tratamento com ISACN é capaz de reduzir de maneira significativa a migração

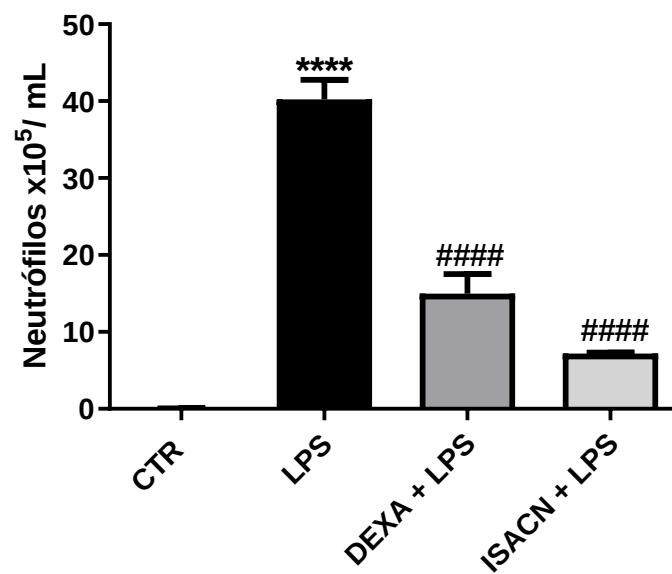
de neutrófilos (redução de 82,15%) (Gráfico 4b). Entretanto, não promove nenhuma alteração na migração de mononucleares (Gráfico 4c). Resultado semelhante foi obtido para o grupo tratado com dexametasona.

Gráfico 4. Efeito do ISACN na migração de células inflamatórias para a região bronco-alveolar durante a LPA induzida por LPS.

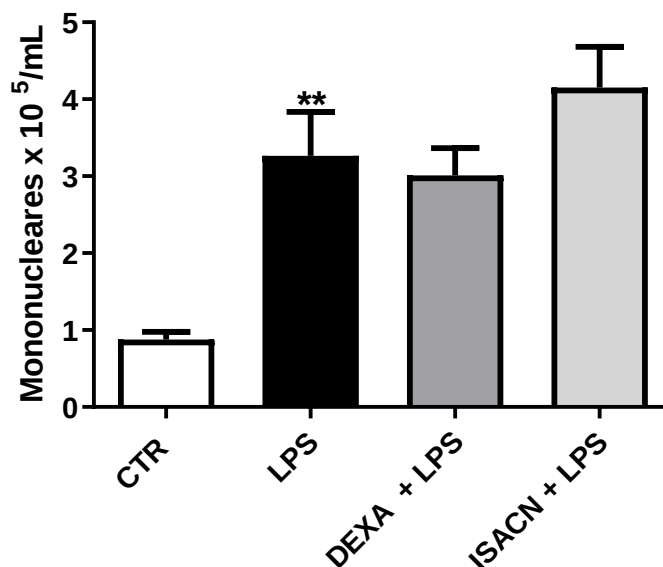
a)



b)



c)

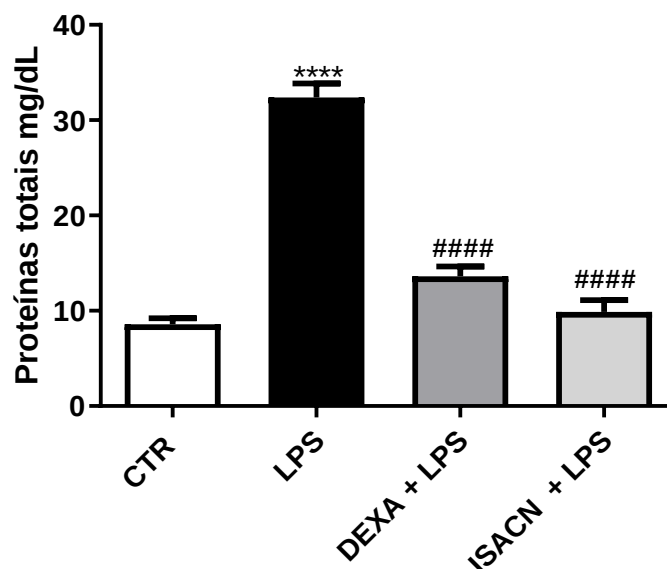


Camundongos *Balb/c* (n = 6) foram tratados com ISACN na dose de 24 mg/kg ou com dexametasona (2,5 mg/ kg) via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg) via instilação nasal. Após um período de 24 horas o BALF foi coletado e foi determinado o número de leucócitos totais e diferenciais. (a) número de células totais. (b) número de neutrófilos. (c) número de mononucleares. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. ****p < 0,0001 e **p<0,01 quando comparado ao grupo controle. #####p<0,0001 quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; DEXA: Dexametasona; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.1.5 Efeito do ISACN na formação de edema pulmonar

O desafio intranasal com LPS promoveu aumento significativo na concentração de proteínas na região broncoalveolar dos animais, indicando que a administração de LPS induziu a formação de edema pulmonar. O tratamento com ISACN reduziu de maneira significativa o extravasamento proteico, reduzindo 69,48% a concentração de proteínas no BALF e reestabelecendo os níveis proteicos basais. Esse resultado foi semelhante ao obtido com a droga padrão dexametasona, que reduziu 57,90 % a concentração de proteínas no BALF, e indica que o tratamento com ISACN inibe a formação de edema pulmonar durante a LPA induzida por LPS (Gráfico 5).

Gráfico 5. Efeito do ISACN no influxo de proteínas para a região broncoalveolar durante a LPA induzida por LPS.



Camundongos *Balb/c* ($n = 6$) foram tratados com ISACN na dose de 24 mg/kg ou com dexametasona (2,5 mg/ kg) via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg) via instilação nasal. Após um período de 24 horas o BALF foi coletado e foi determinada a concentração de proteínas totais pelo método do reagente de biureto. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle. ##### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; DEXA: Dexametasona; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.1.6 Efeito do ISACN na produção de citocinas inflamatórias e da quimiocina CXCL-1 na região broncoalveolar

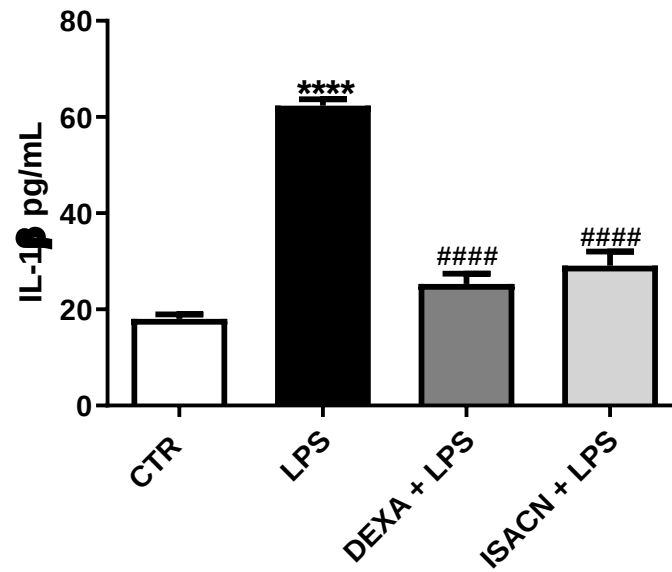
O LPS aumentou significativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α na região broncoalveolar dos animais desafiados. O tratamento com ISACN reduziu consideravelmente a produção dessas citocinas. A redução observada foi de: 53,32% para a IL-1 β (Gráfico. 6a), 70,65% para a IL-6 (Gráfico. 6b) e 30,78% para o TNF- α (Gráfico. 6c). O grupo de animais tratado com dexametasona também apresentou redução nos níveis desses mediadores. Essa droga padrão, induziu redução de 59,44%; 88,56% e 81,59% na concentração de IL-1 β , IL-6 e TNF- α respectivamente.

O desafio com LPS também promoveu aumento significativo nos níveis da quimiocina CXCL-1 no BALF dos animais. Entretanto, o ISACN não foi capaz de

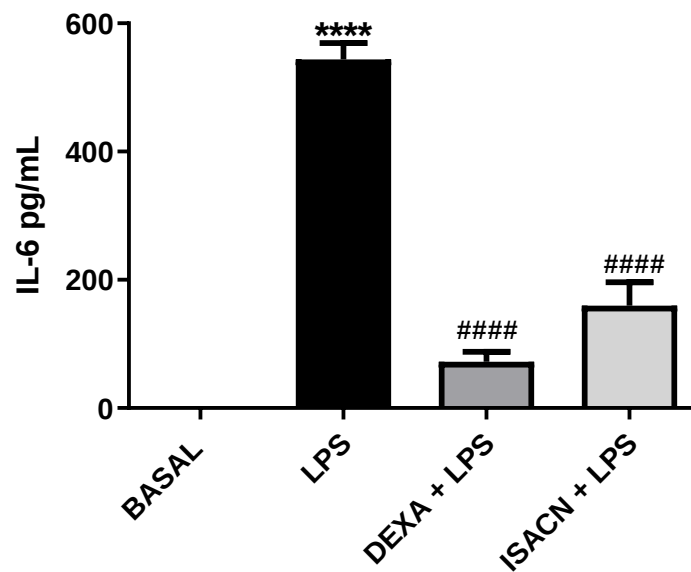
reduzir a produção dessa quimiocina, de maneira diferente do que foi observado com a dexametasona que reduziu 45,32% a produção de CXCL-1 (Gráfico 6d).

Gráfico 6. Efeito do ISACN na produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da quimiocina CXCL-1 durante a LPA.

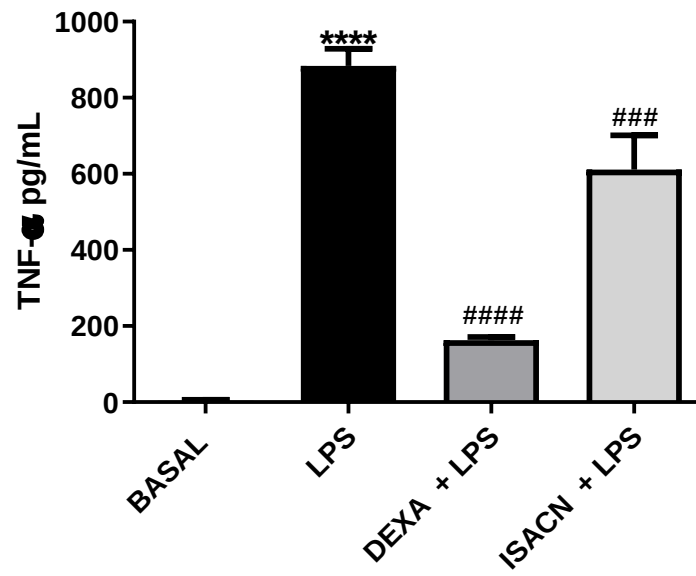
a)



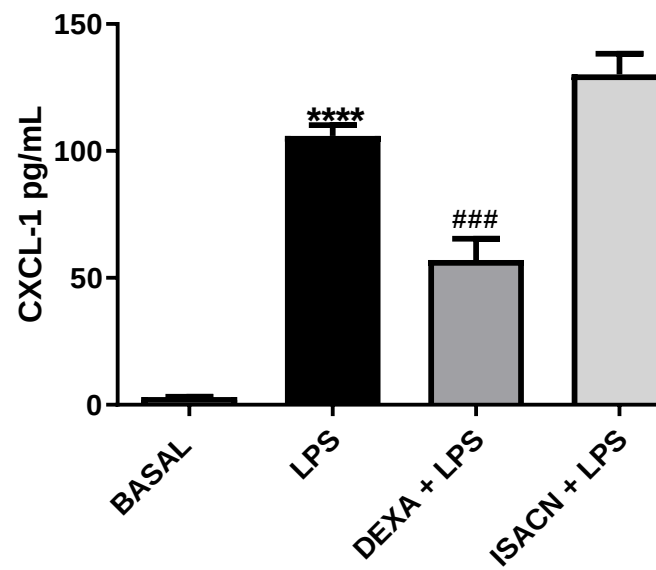
b)



c)



d)



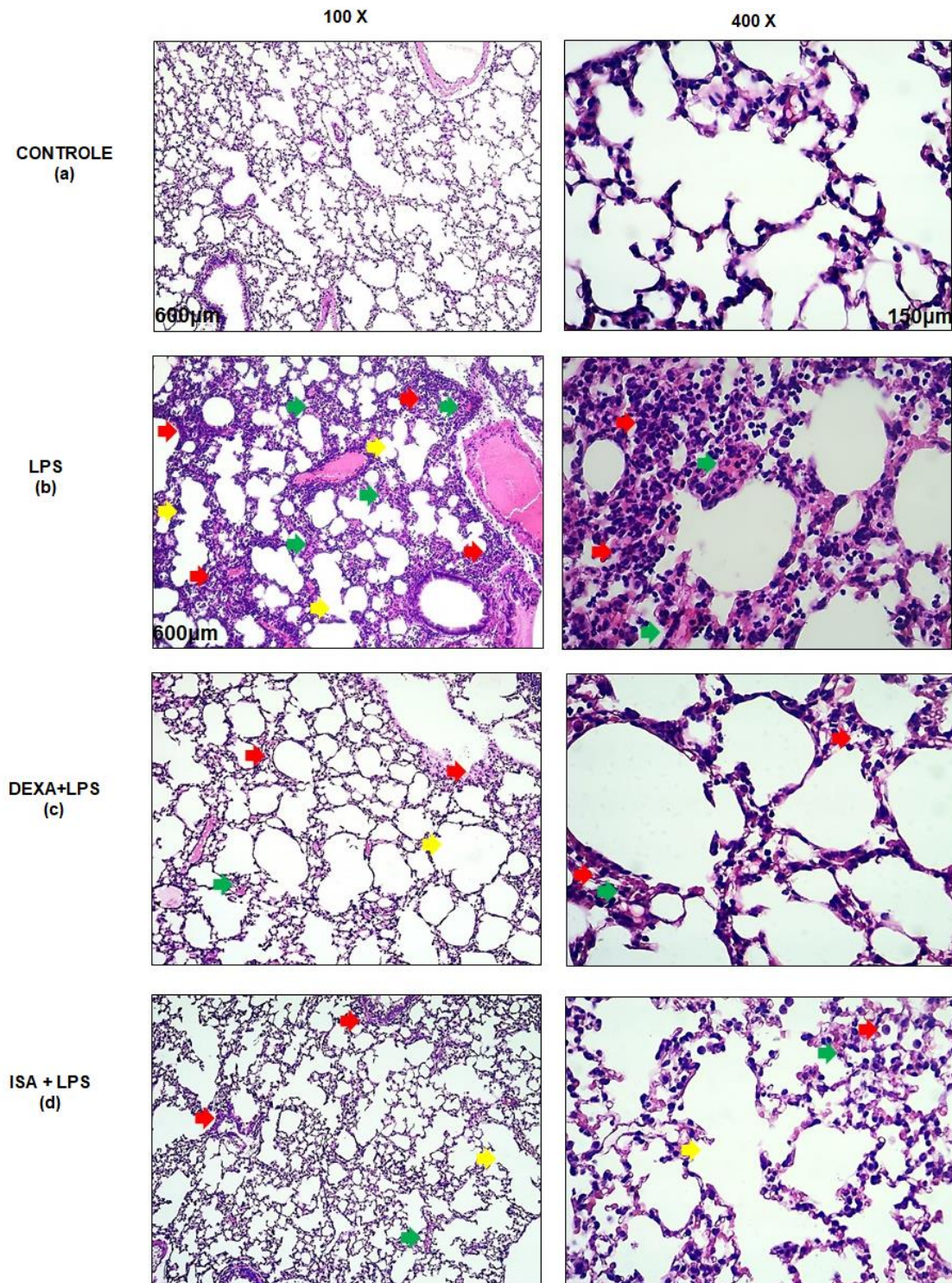
Camundongos *Balb/c* ($n = 6$) foram tratados com ISACN na dose de 24 mg/kg ou com dexametasona (2,5 mg/ kg) via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg) via instilação nasal. Após um período de 24 horas o BALF foi coletado e foi determinada concentração das citocinas inflamatórias IL-1 β (a), IL-6 (b) e TNF- α (c) e da quimiocina CXCL-1 (d) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle. ##### $p < 0,0001$ e #### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; DEXA: Dexametasona; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.1.7 Efeito do ISACN nas alterações histopatológicas características da LPA

A figura 11 demonstra as fotomicrografias do tecido pulmonar dos animais dos diferentes grupos experimentais. Onde podemos observar que os animais do grupo LPS apresentaram intenso processo inflamatório, caracterizado por dano alveolar difuso, edema intersticial, infiltrado leucocitário e hemorragia (Figura 11b), quando comparamos esses animais aos animais do grupo controle (Figura 11a). Os animais tratados com ISACN obtiveram redução considerável de todo o processo inflamatório e do dano alveolar difuso induzido pelo LPS, apresentando reestabelecimento do aspecto histológico normal (Figura 11d). Um padrão semelhante foi observado nos animais tratados com dexametasona (Figura. 11c).

Os resultados são mais bem observados no gráfico que representa os escores histológicos (Gráfico 7a, 7b e 7c) dos parâmetros inflamatórios avaliados. Onde podemos constatar que o LPS promoveu intenso infiltrado neutrofílico, formação de edema e indução de hemorragia no tecido pulmonar e que o tratamento com o ISACN reduziu de maneira significativa todos esses parâmetros: reduziu 70% o infiltrado celular, 73% o edema pulmonar e 78% a hemorragia. Em relação aos resultados obtidos com a dexametasona, o tratamento com essa droga padrão promoveu resultados semelhantes aos obtidos com o ISACN reduzindo 61%, 80% e 73% o infiltrado celular o edema e a hemorragia, respectivamente.

Figura 11. Efeito do ISACN nas alterações histopatológicas pulmonares durante a LPA induzida por LPS.

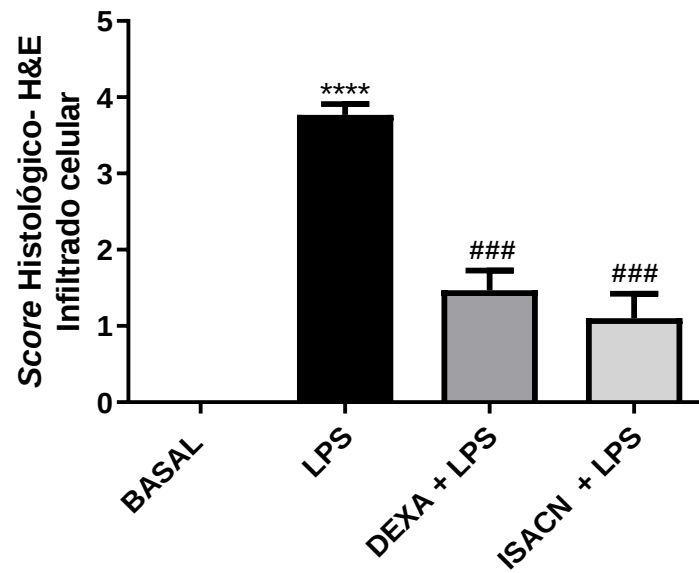


Camundongos *Balb/c* ($n = 6$) foram tratados com ISACN na dose de 24 mg/kg ou com dexametasona (2,5 mg/ kg) via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg) via instilação nasal. Após um período de 24 horas o tecido pulmonar foi coletado, processado histologicamente, corado pela técnica H&E e analisado. As figuras representam fotomicrografias obtidas a partir de cortes histológicos dos animais dos diferentes grupos experimentais nos aumentos de 100x ou 400x. Setas vermelhas indicam presença de infiltrado celular, setas amarelas indicam presença de edema e setas verdes indicam presença de hemorragia. CTR: Controle; LPS:

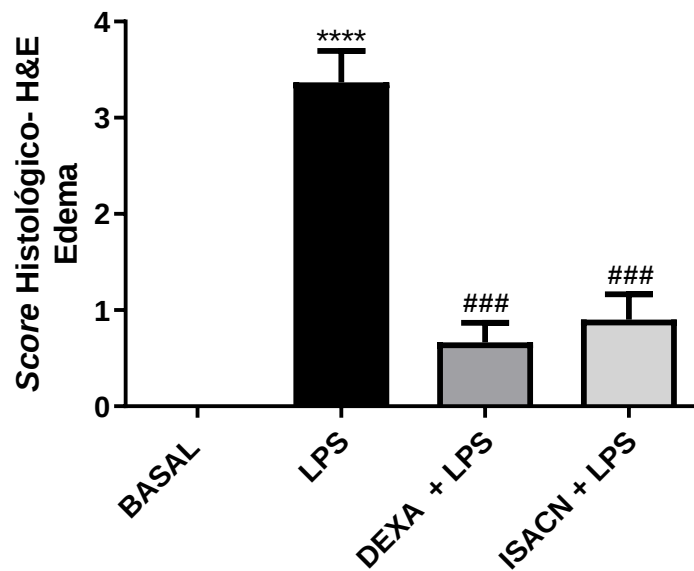
Lipopolissacarídeo bacteriano; DEXA: Dexametasona; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

Gráfico 7. Escore histológico do efeito do ISACN nas alterações histopatológicas durante a LPA induzida por LPS.

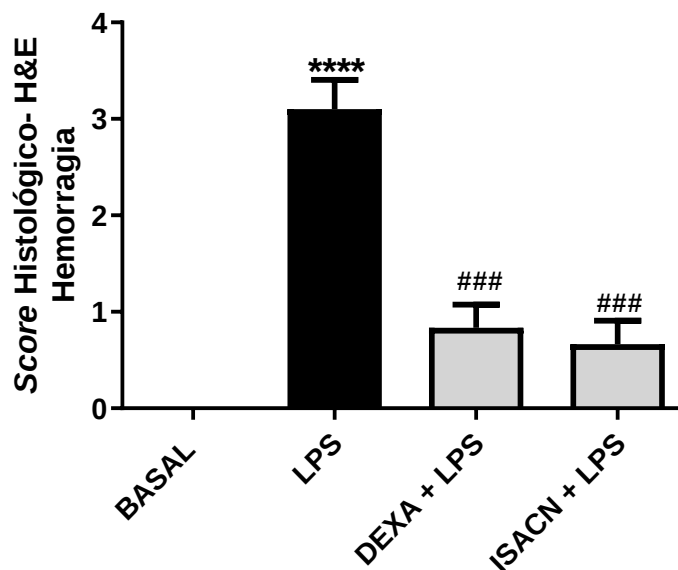
a)



b)



c)



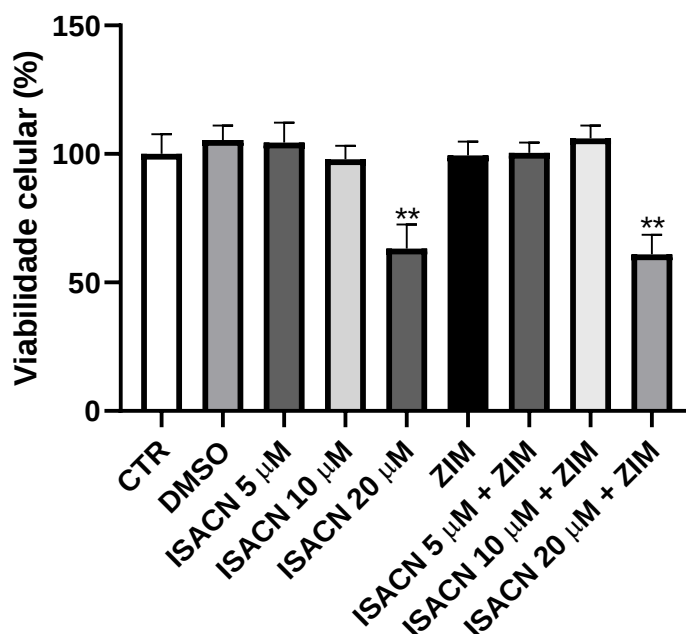
Camundongos *Balb/c* ($n = 6$) foram tratados com ISACN na dose de 24 mg/kg ou com dexametasona (2,5 mg/ kg) via intraperitoneal. Uma hora após o tratamento os animais foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg) via instilação nasal. Após um período de 24 horas o tecido pulmonar foi coletado, processado histologicamente, corado pela técnica H&E e analisado. Os gráficos representam os escores histológicos obtidos para os parâmetros: (a) infiltrado celular, (b) edema e (c) hemorragia. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; DEXA: Dexametasona; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2 Efeito anti-inflamatório do ISACN *in vitro*

4.2.1 Citotoxicidade de ISACN em macrófagos estimulados com zimosan

O ISACN nas concentrações de 5 μ M e de 10 μ M tanto na presença como na ausência do zimosan não promoveu alteração na viabilidade dos macrófagos em cultura, o mesmo padrão foi observado com o veículo (DMSO) e com o zimosan quando administrados de maneira isolada. Em contraste, a concentração de 20 μ M do ISACN reduziu a viabilidade dos macrófagos em 37%, tanto nos macrófagos estimulados com zimosan como naqueles não estimulados, mostrando-se citotóxica (Gráfico 8).

Gráfico 8. Efeito do ISACN sobre viabilidade de macrófagos em cultura estimulados com zimosan.



Macrófagos peritoneais murinos ($n = 6$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de zimosan na concentração de 0,2 mg/mL com a adição de ISACN nas concentrações de 20 μ M, 10 μ M ou 5 μ M. Após o período de incubação a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle. CTR: Controle; DMSO: Dimetilsufóxido; ZIM: Zimosan; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.2 Efeito do ISACN na produção de citocinas inflamatórias por macrófagos estimulados com zimosan

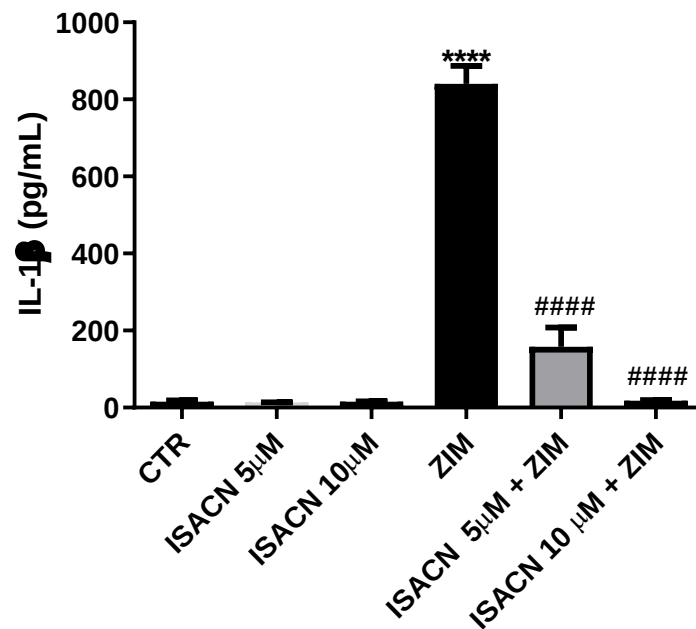
Após estabelecida a citotoxicidade do ISACN, usou-se as concentrações não tóxicas (5 μ M e 10 μ M) para avaliar a ação desse AMBH frente a produção das citocinas inflamatórias IL-1 β (Gráfico 9a), IL-6 (Gráfico 9b) e TNF- α (Gráfico 9c). Foi observado que os macrófagos estimulados com zimosan, apresentaram aumento significativo na produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α quando comparados ao grupo controle e que o tratamento das células com o ISACN promoveu redução nos níveis dessas três citocinas.

A concentração de ISACN de 5 μ M promoveu redução de 81% e de 23% na produção de IL-1 e TNF- α (respectivamente) induzida por zimosan. Entretanto, essa

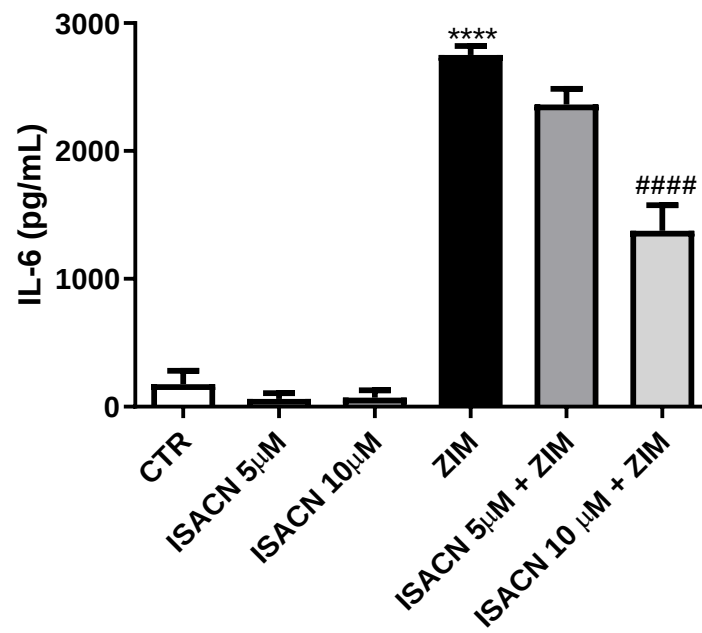
concentração não foi capaz de alterar de maneira significativa a produção de IL-6. Já a concentração de 10 μ M reduziu de maneira considerável os níveis de todas as citocinas analisadas: reduziu 50% a produção de IL-6; 64,72% a produção de TNF- α e 97,83% a produção de IL-1 β , inibindo completamente a produção induzida pelo zimosan e reestabelecendo os níveis basais dessa citocina. Adicionalmente, o tratamento com ISACN em diferentes concentrações (5 μ M e 10 μ M) na ausência do zimosan, não alterou os níveis de produção basal das citocinas avaliadas.

Gráfico 9. Efeito do ISACN na produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por macrófagos em cultura estimulados com zimosan.

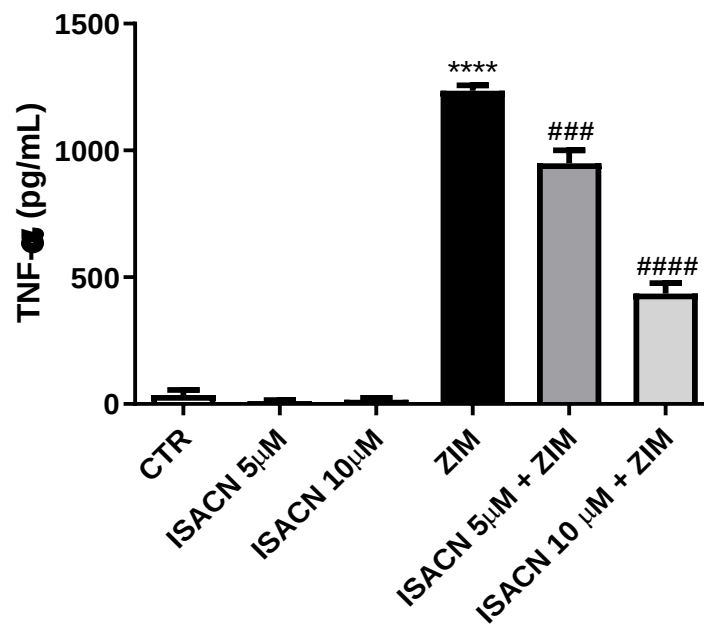
a)



b)



c)

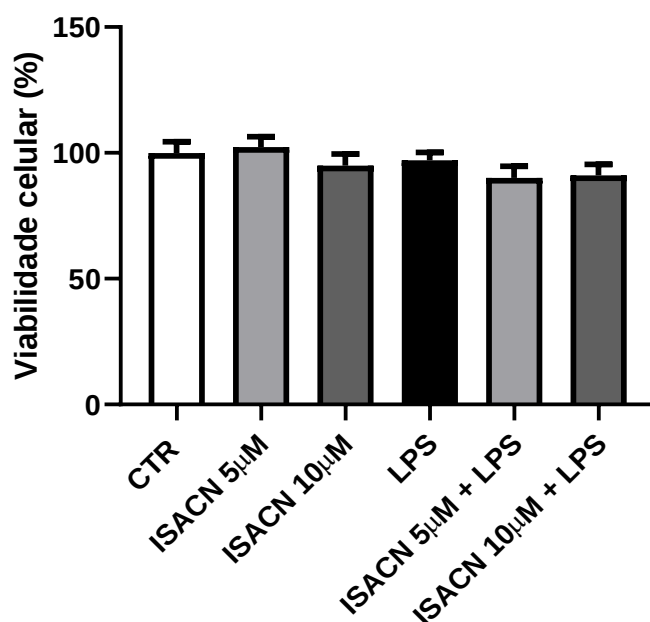


Macrófagos peritoneais murinos ($n = 6$) foram tratados com ISACN em diferentes concentrações (10 μM ou 5 μM) na ausência ou na presença do zimosan e incubados por 24 horas. Após o período de incubação a concentração das citocinas inflamatórias IL-1 β (a), IL-6 (b) e TNF- α (c) foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle; ### $p < 0,001$ e #### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo zimosan. CTR: Controle; DMSO: Dimetilsulfóxido; ZIM: zimosan; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.3 Citotoxicidade do ISACN em macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS

O tratamento de macrófagos peritoneais murinos com ISACN nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M não promoveu alterações significativas na viabilidade dessas células, tanto na presença como na ausência do LPS. Mostrando que a associação do ISACN, nessas concentrações, com o LPS não induz citotoxicidade de macrófagos peritoneais murinos em cultura (Gráfico 10).

Gráfico 10. Efeito do ISACN sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais murinos em cultura estimulados com LPS

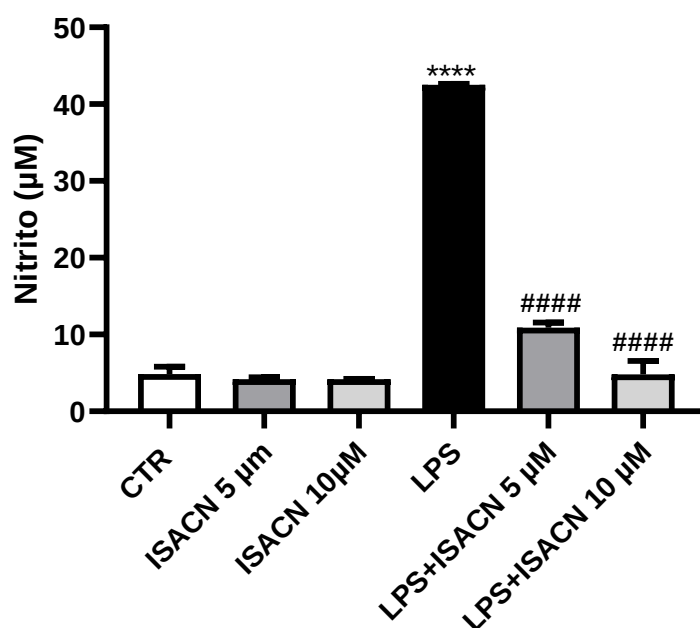


Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de 1 μ g/mL com a adição de ISACN nas concentrações de 10 μ M ou 5 μ M. Após o período de incubação a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.4 Efeito do ISACN na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais em cultura estimulados com LPS

Para a determinação dos níveis de óxido nítrico na cultura de macrófagos, foi realizada a dosagem do nitrito, que representa o produto de degradação mais estável do NO. Foi observado que o LPS promoveu estimulação dos macrófagos e induziu aumento significativo na produção de NO. O tratamento dos macrófagos com ISACN nas concentrações de 10 μ M e de 5 μ M reduziu 88,65% e 74,33% (respectivamente) essa produção. Vale destacar que a concentração de 10 μ M reestabeleceu os níveis basais de óxido nítrico, inibindo completamente a produção desse mediador induzida por LPS. Adicionalmente, o ISACN quando administrado na ausência do LPS não promoveu nenhuma alteração nos níveis basais de NO (Gráfico 11).

Gráfico 11. Efeito do ISACN sobre os níveis de NO produzidos por macrófagos estimulados com LPS.



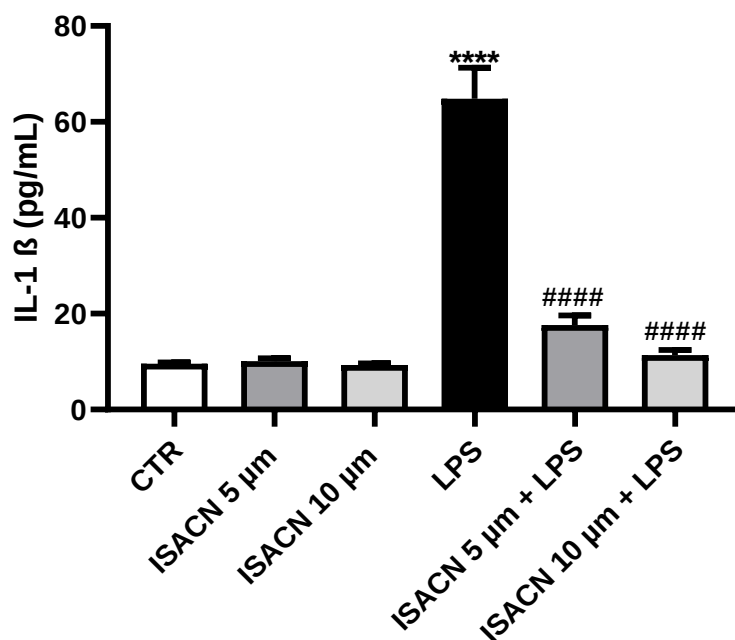
Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de 1 μ g/mL com a adição de ISACN nas concentrações de 10 μ M ou 5 μ M. Após o período de incubação os níveis de NO foram determinados pela reação de Griess. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle e ##### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.5 Efeito do ISACN na produção de citocinas por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS

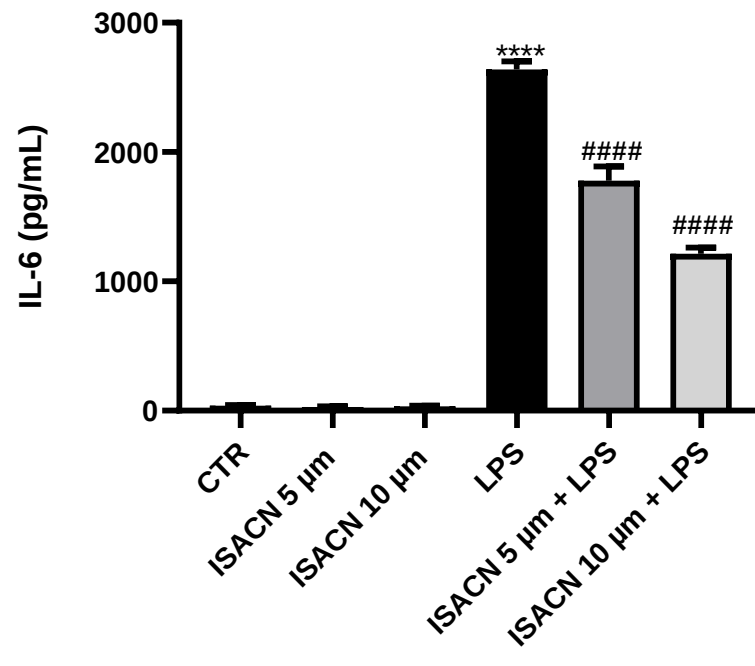
A estimulação dos macrófagos com o LPS induziu aumento significativo na produção das citocinas inflamatórias IL-1 β (Gráfico 12a), IL-6 (Gráfico 12b) e TNF- α (Gráfico 12c), e da citocina anti-inflamatória IL-10 (Gráfico 12d) o que pode ser observado quando comparamos o grupo estimulado ao grupo controle. A administração de ISACN na concentração de 5 μ M reduziu 72% os níveis de IL-1 β , 32,57% os de IL-6, 17% os de TNF- α e 47,66% os de IL-10. Já a concentração de 10 μ M reduziu 84,41%, 54%, 20% e 58,42% a produção respectiva dessas citocinas. Apresentando, para a citocina IL-6 efeito melhor em relação ao observado com a concentração de 5 μ M. De uma maneira geral, os resultados obtidos até aqui indicam que a concentração de 10 μ M aparentemente exerce um efeito melhor que a de 5 μ M. Diante disso, ela foi escolhida para ser utilizada nos experimentos subsequentes.

Gráfico 12. Efeito do ISACN na produção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IL-10 em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS

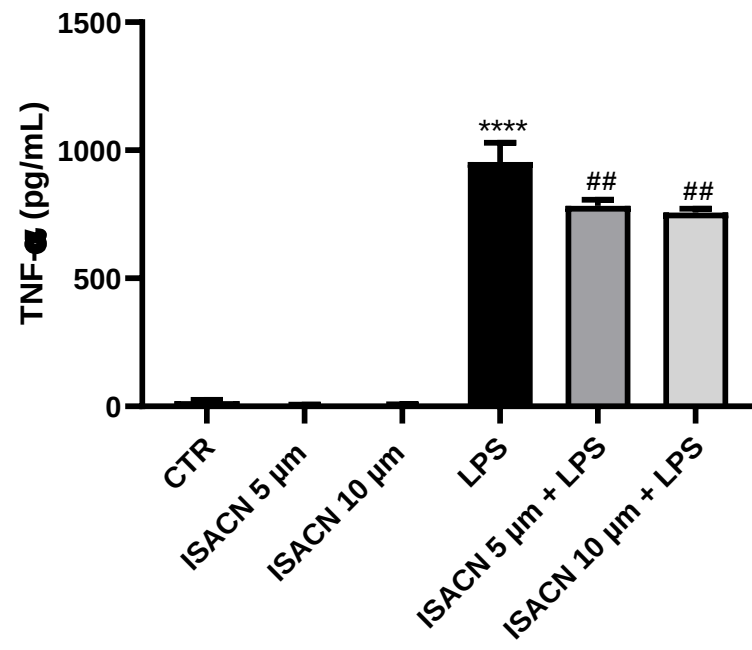
a)



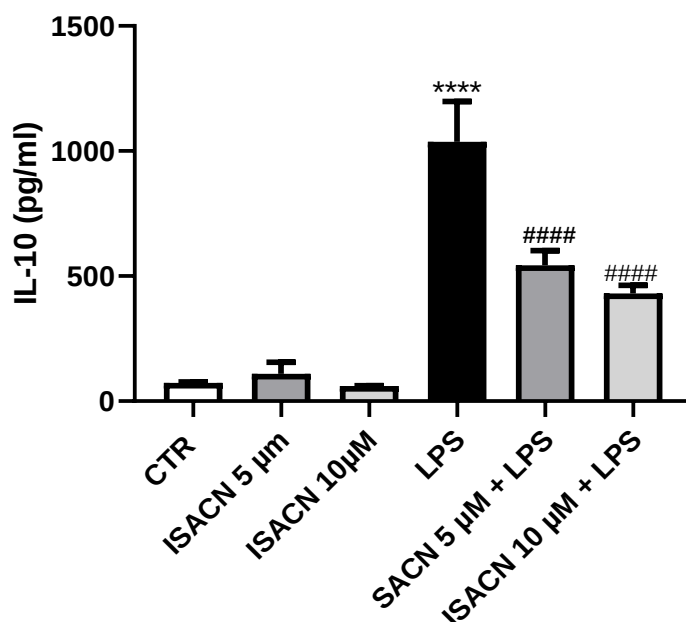
b)



c)



d)



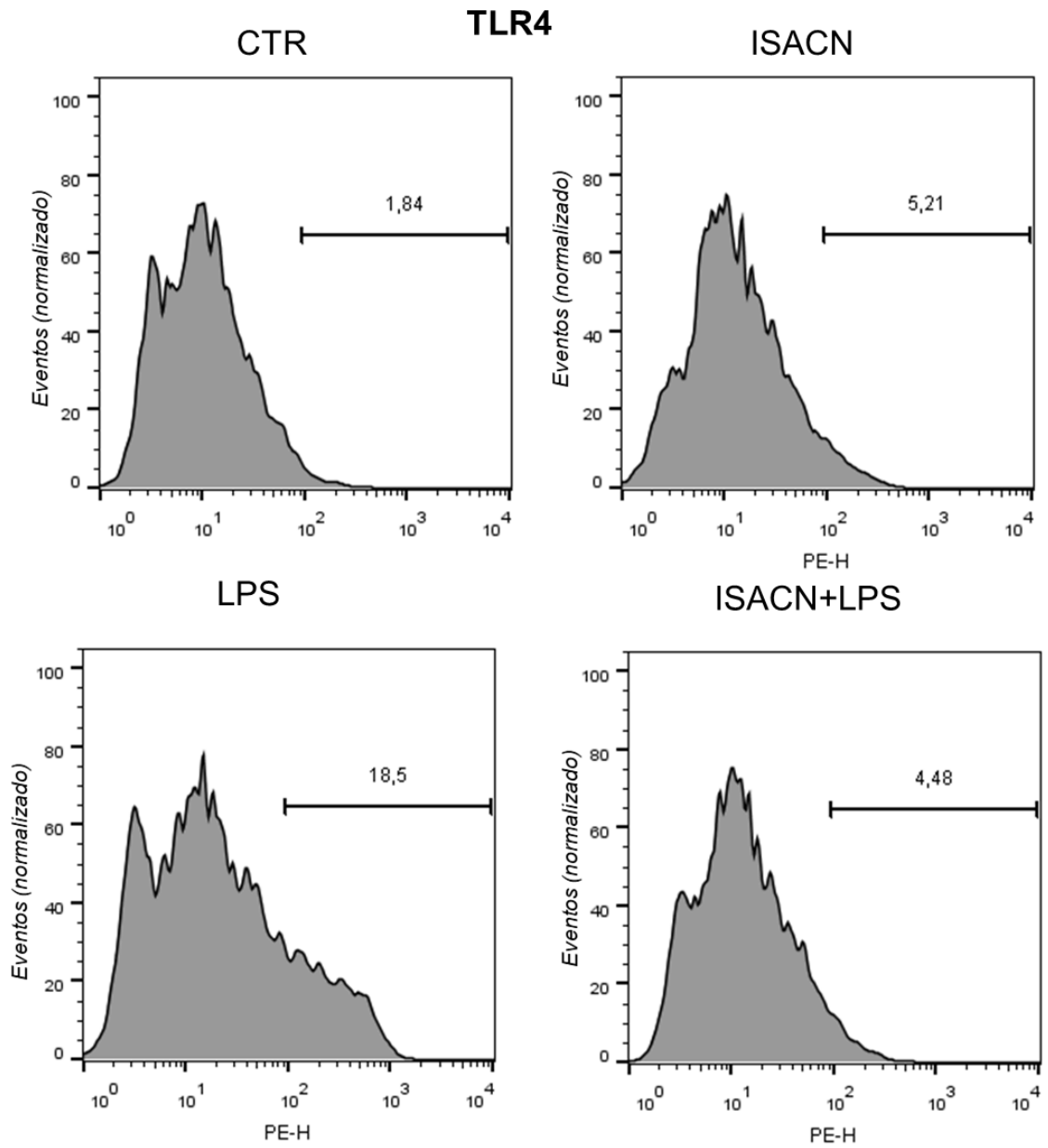
Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ com a adição de ISACN nas concentrações de $10 \mu\text{M}$ ou $5 \mu\text{M}$. Após o período de incubação a concentração das citocinas IL-1 β (a), IL-6 (b), TNF- α (c) e IL-10 (d) foi determinada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) one way seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle; ### $p < 0,01$ e #### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.6 Efeito do ISACN na expressão do TLR4 e do CD69

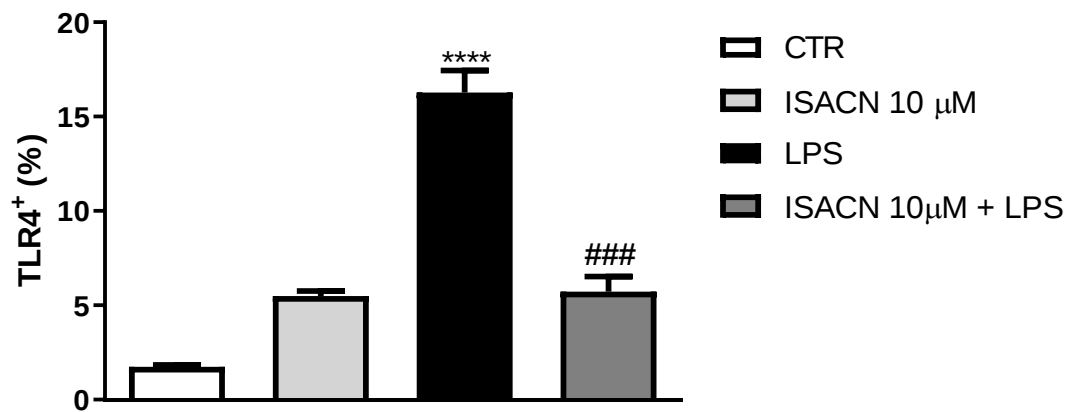
As células estimuladas com LPS apresentaram aumento significativo na expressão do TLR4 e do CD69 quando comparadas as células do grupo controle (Gráfico 13). O tratamento com ISACN ($10 \mu\text{M}$) promoveu redução significativa nessa expressão induzida pelo LPS, reduzindo 64% a expressão de TLR4 (Gráficos 13a e 13b) e 67,28% a de CD69 (Gráficos 13c e 13d). Adicionalmente, o tratamento com ISACN na ausência de LPS não promoveu alteração na expressão basal dessas proteínas.

Gráfico 13. Efeito do ISACN na expressão do TLR4 e do CD69 em macrófagos estimulados com LPS.

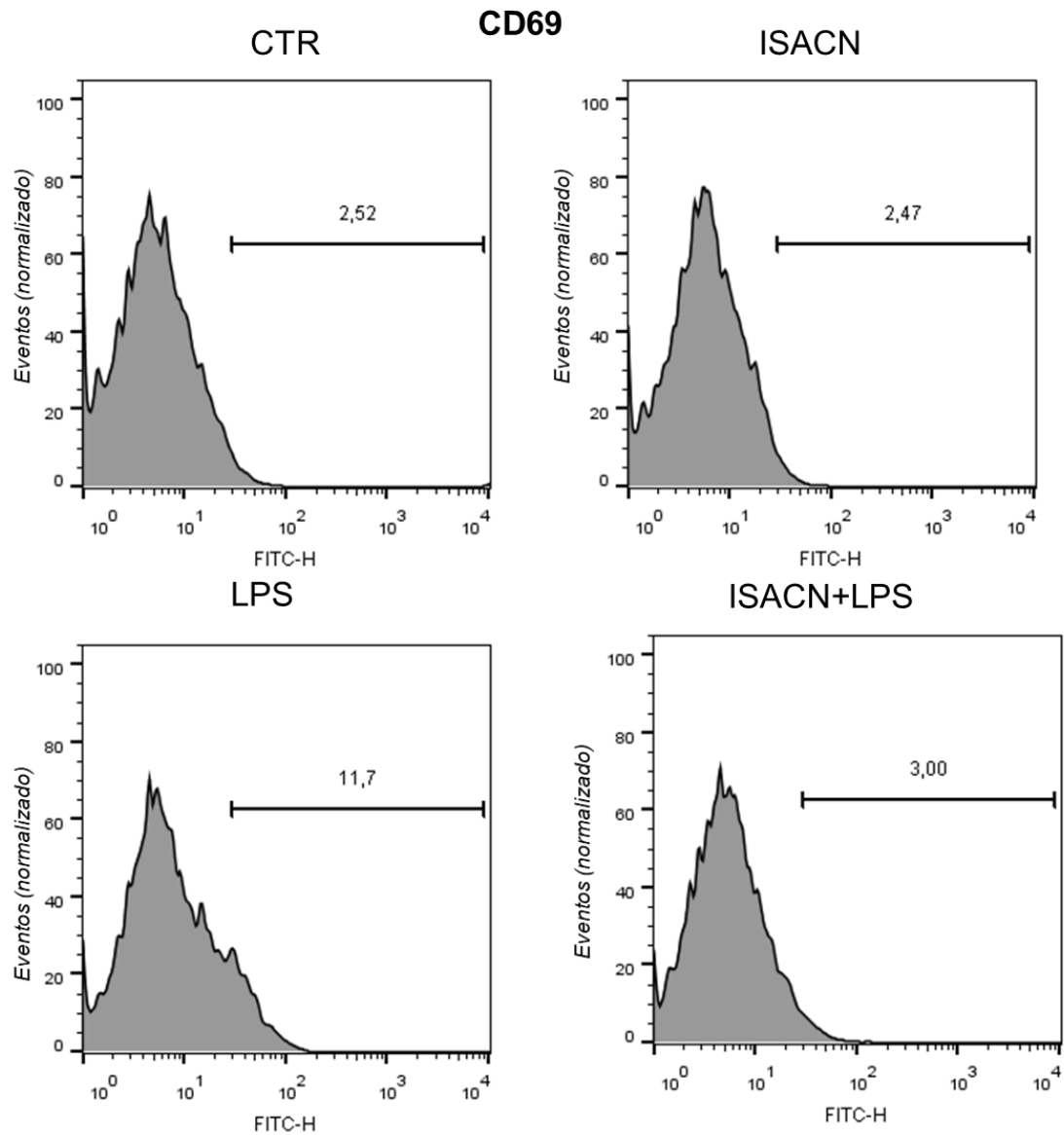
a)



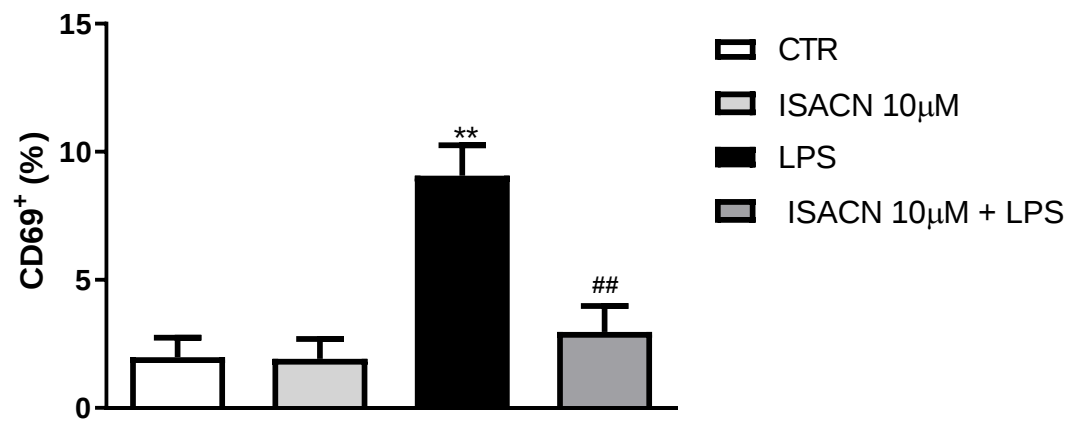
b)



c)



d)



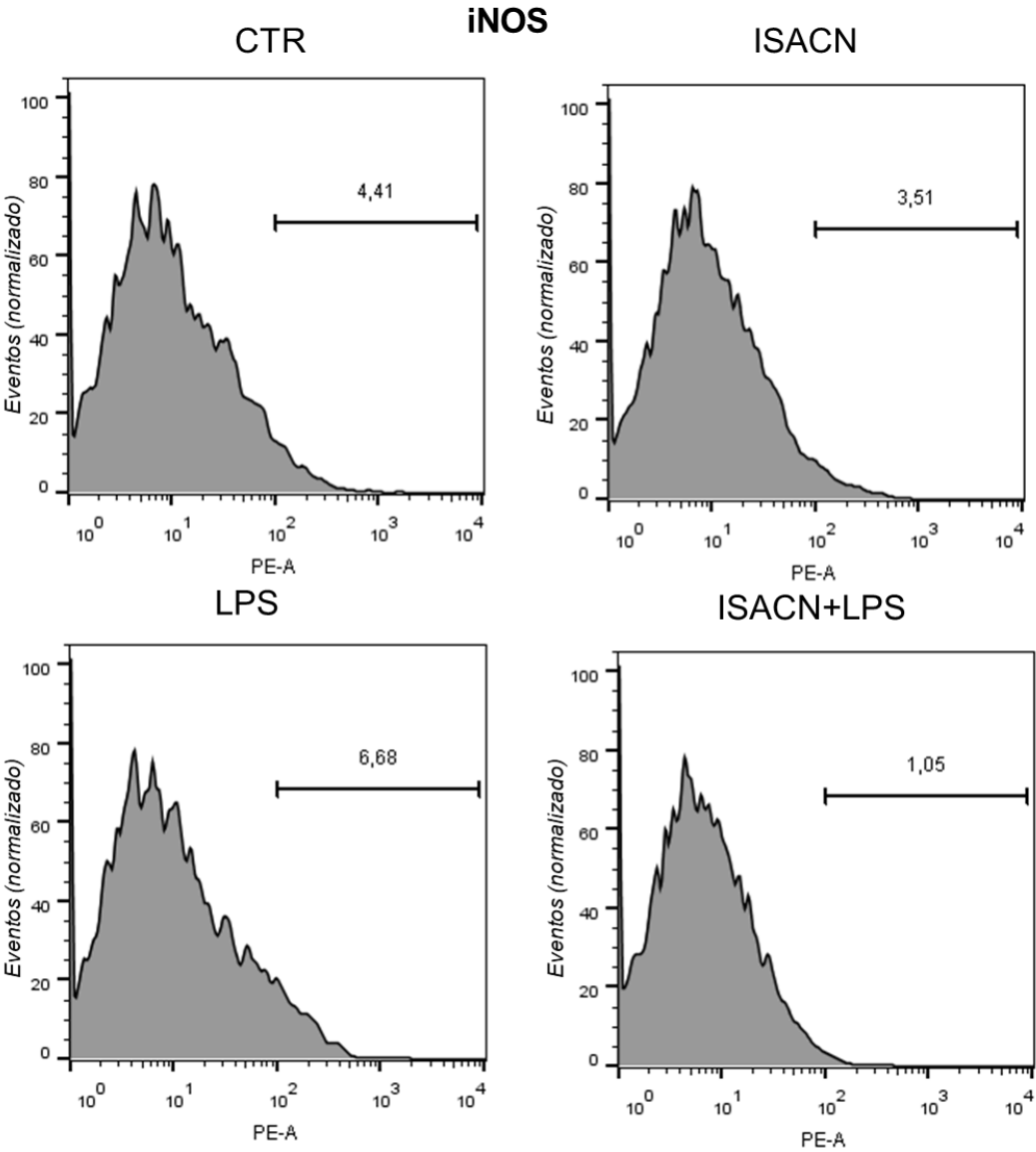
Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ com a adição de ISACN na concentração de $10 \mu\text{M}$. Após o período de incubação a expressão do CD69 e do TLR4 foram avaliadas por citometria de fluxo. (a) e (c): histogramas representativos das células marcadas com anti-TLR4 e anti-CD69, respectivamente. (b) e (d): gráficos representativos dos resultados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. $**p < 0,01$ e $****p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle; $##p < 0,01$ e $###p < 0,001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.7 Efeito do ISACN na expressão da enzima iNOS

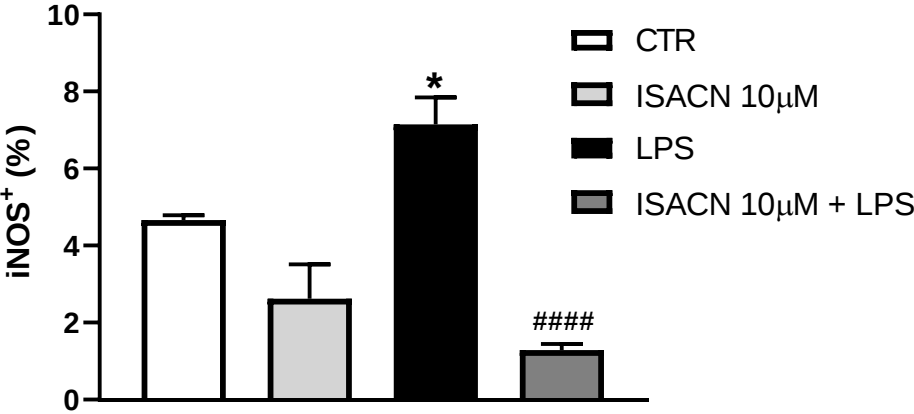
Como pode ser visualizado no gráfico 14, o LPS promoveu aumento significativo na expressão da enzima iNOS em macrófagos peritoneais murinos. O que pode ser constatado quando comparamos as células estimuladas as não estimuladas (controle). O tratamento com ISACN ($10 \mu\text{M}$) na ausência do LPS não promoveu alteração considerável no nível de expressão basal dessa enzima. Entretanto, o tratamento com ISACN foi capaz de reduzir a expressão da iNOS nas células estimuladas pelo LPS (redução de 82 %).

Gráfico 14. Efeito do ISACN na expressão da iNOS em macrófagos estimulados com LPS.

a)



b)



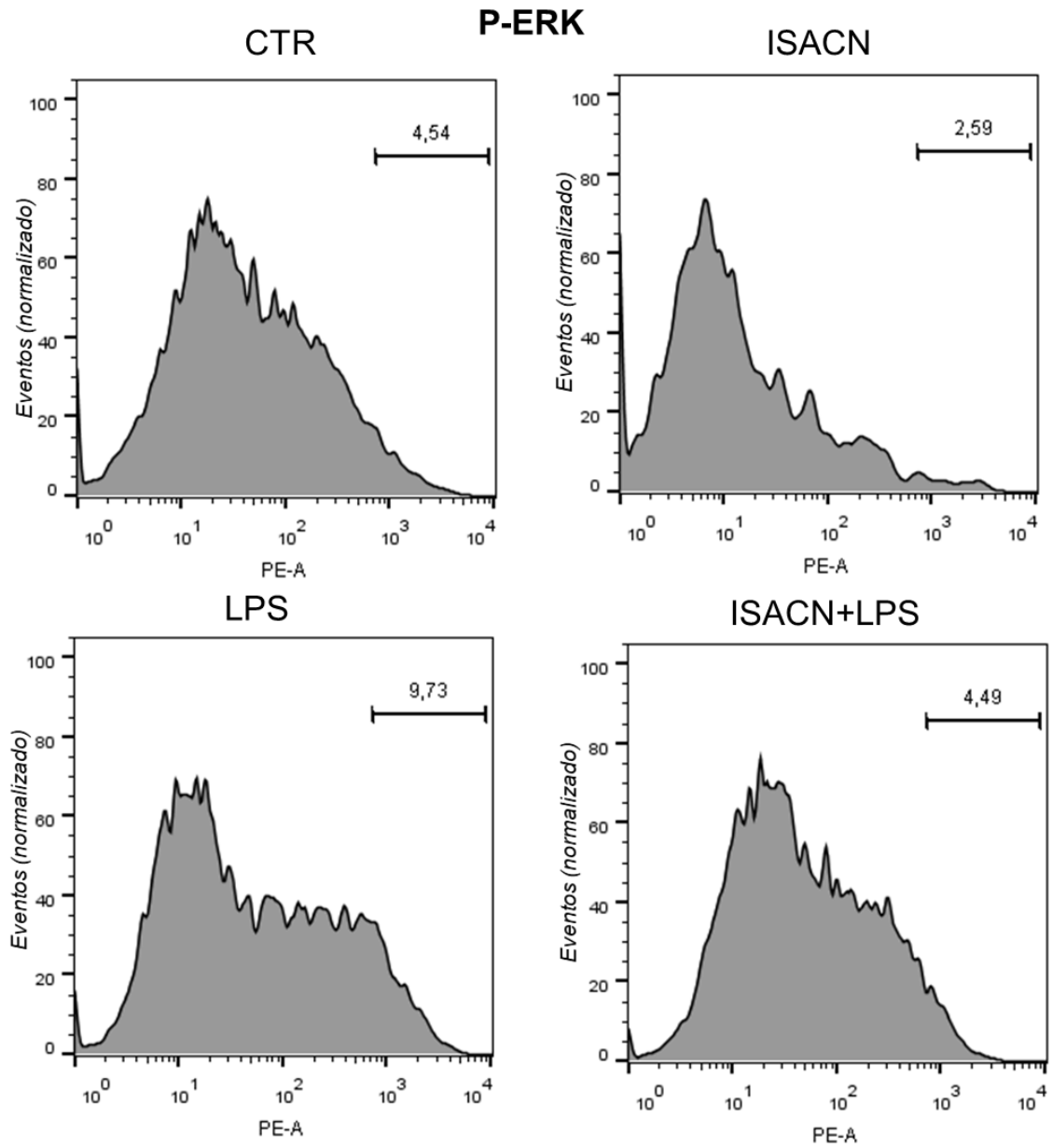
Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ com a adição de ISACN na concentração de $10 \mu\text{M}$. Após o período de incubação a expressão da iNOS foi avaliada por citometria de fluxo. (a) histograma representativo das células marcadas com anti-iNOS (b) gráfico representativo dos resultados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. $*p < 0,5$ quando comparado ao grupo controle e $####p < 0,0001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.8 Efeito do ISACN na expressão de P-ERK, P-JNK e P-p38

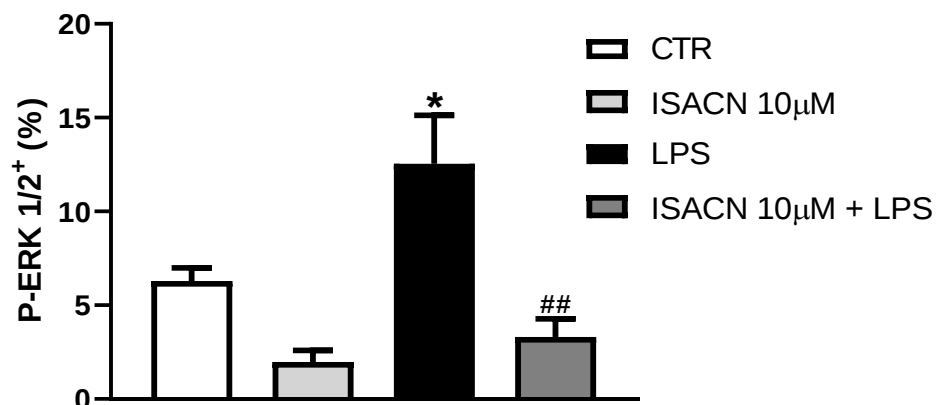
O LPS promoveu aumento significativo na ativação da ERK, JNK e p38 (Gráfico 15). Uma vez que nas células estimuladas foi observado um aumento considerável na forma fosforilada dessas MAPKs (P-ERK, P-JNK- e P-p38), quando comparamos essas células as células do grupo controle. O tratamento com ISACN ($10 \mu\text{M}$) reduziu 73,60% a expressão da P-ERK (Gráficos 15a e 15b), 53,30% a expressão da P-JNK (Gráficos 15c e 15d) e 70,32% a expressão da P-p38 (Gráficos 15e e 15f), reestabelecendo os níveis de expressão basal dessas três proteínas. Além disso, quando administrado na ausência de estímulo inflamatório, o ISACN não promove nenhuma alteração na expressão basal das proteínas analisadas.

Gráfico 15. Efeito do ISACN na expressão de P-ERK, P-JNK e P-p38 em macrófagos estimulados com LPS

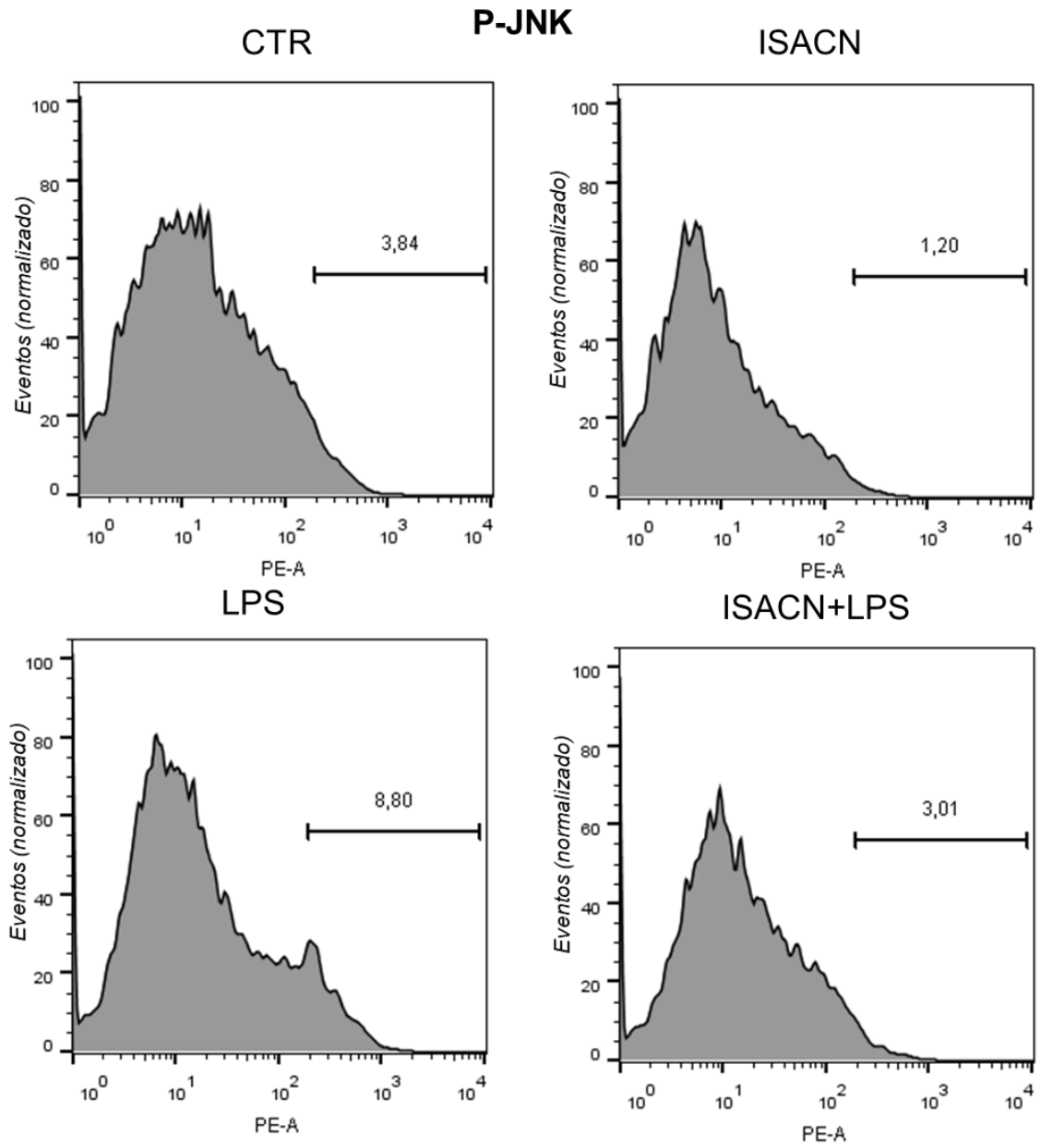
a)



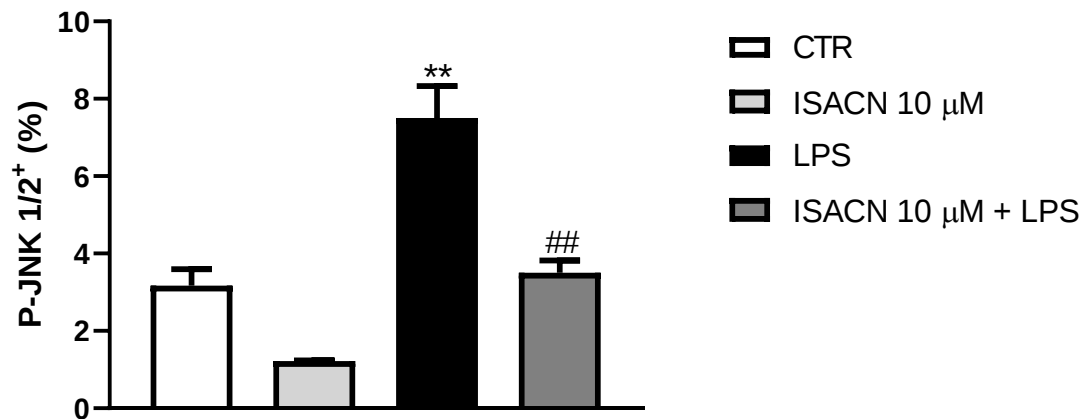
b)



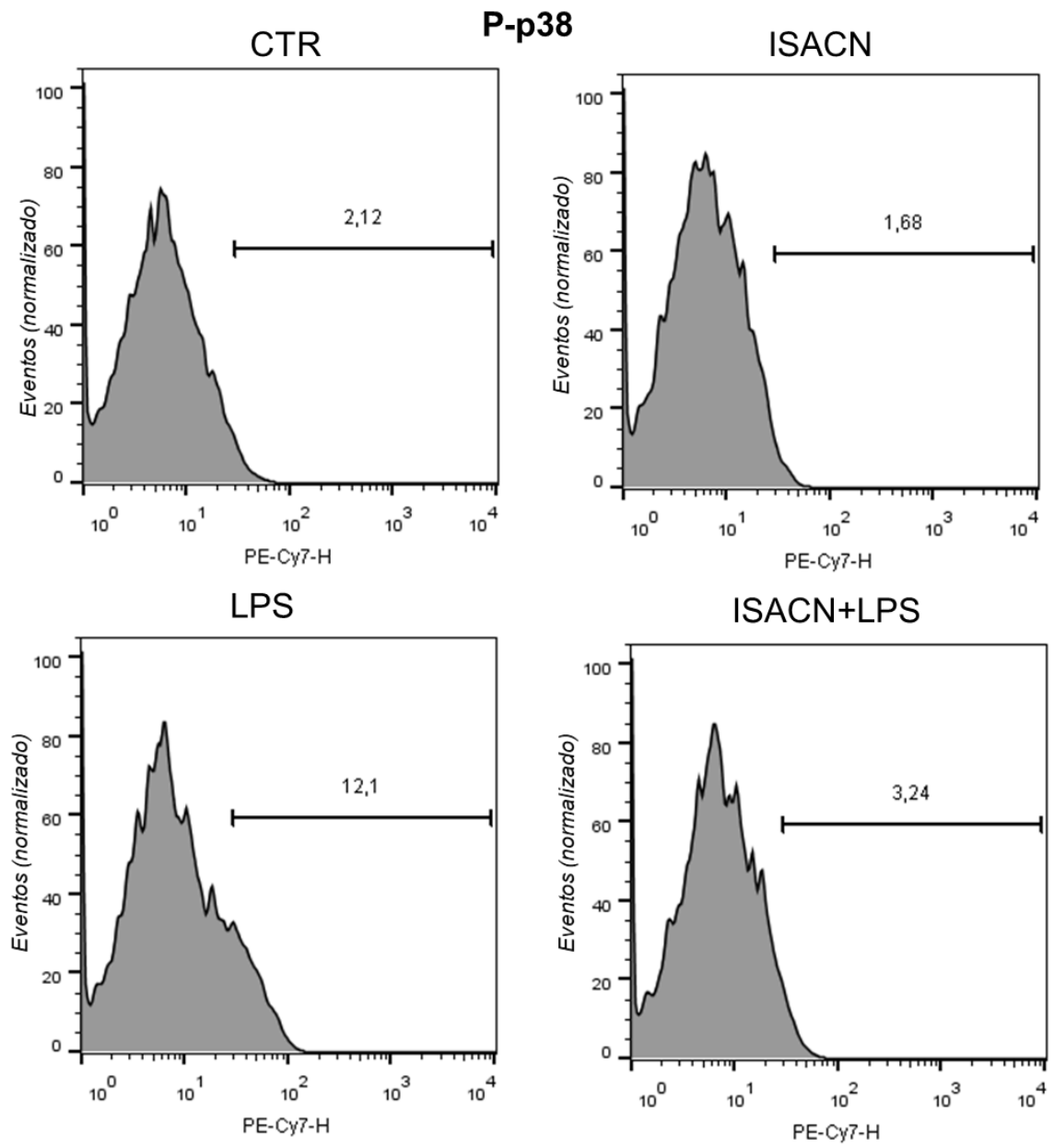
c)



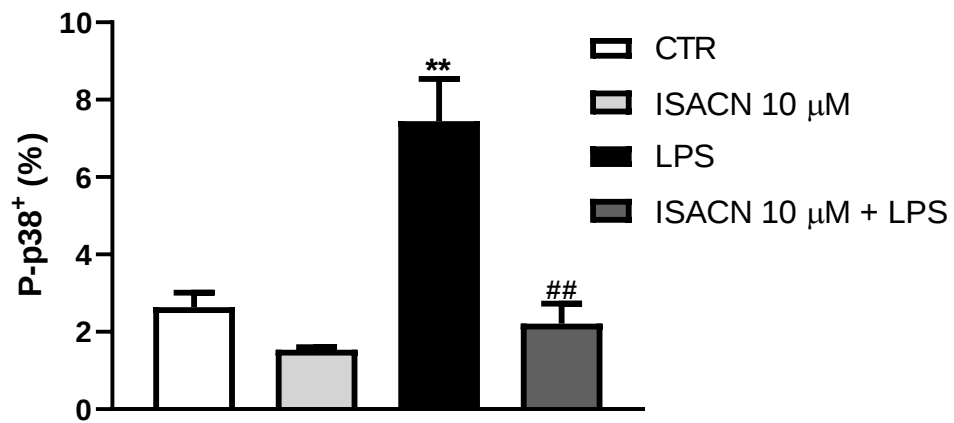
d)



e)



f)



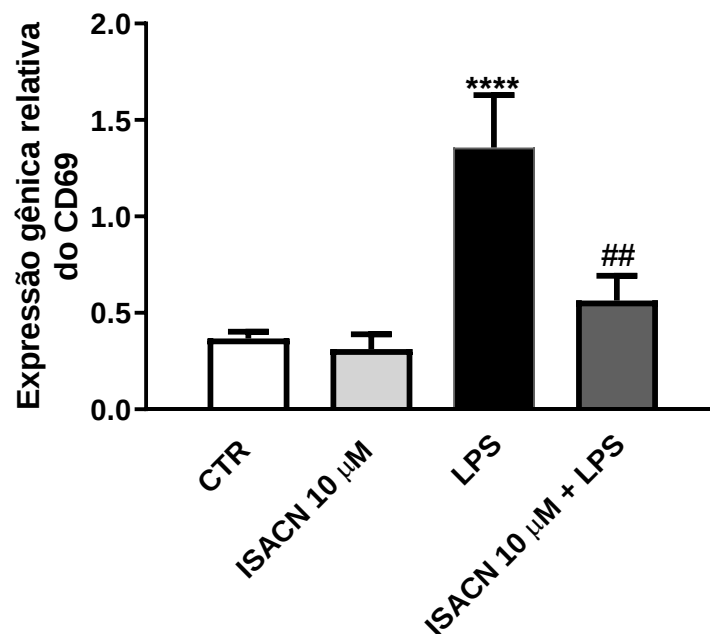
Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ com a adição de ISACN na concentração de $10 \mu\text{M}$. Após o período de incubação a expressão de P-ERK, P-JNK e P-p38 foi avaliada por citometria de fluxo. (a),(c) e (e): histogramas representativos das células marcadas com anti-P-ERK, anti-P-JNK e anti-P-p38, respectivamente (b), (d) e (f): gráficos representativos dos resultados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. * $p < 0,5$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle; ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

4.2.9 Efeito do ISACN na expressão gênica de CD69 e iNOS

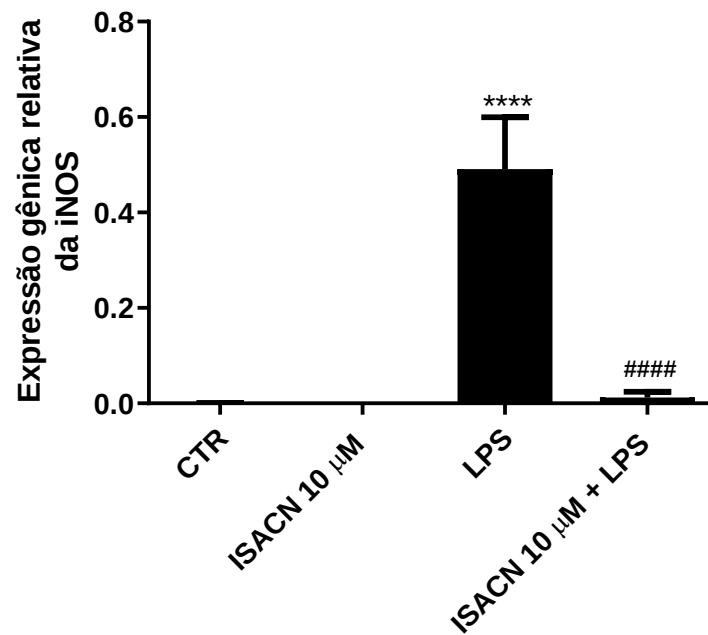
Macrófagos peritoneais murinos quando desafiados com LPS apresentaram superexpressão do gene da iNOS e do CD69. O tratamento com $10 \mu\text{M}$ de ISACN reduziu 58,48% a expressão gênica do CD69 (gráfico 16a) e 100% a da iNOS (Gráfico 16b). Adicionalmente, o tratamento dos macrófagos com ISACN na ausência de LPS não promoveu nenhuma alteração na expressão basal de nenhum dos genes avaliados.

Gráfico 16. Efeito do ISACN na expressão gênica de CD69 e iNOS em macrófagos estimulados com LPS.

a)



b)



Macrófagos peritoneais murinos ($n = 4$) foram cultivados por 24 horas na presença ou na ausência de LPS na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ com a adição de ISACN na concentração de $10 \mu\text{M}$. Após o período de incubação a expressão gênica do CD69, e da iNOS foram quantificadas por RT-qPCR. (a) CD69, (b) iNOS. Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m. e análise de variância (ANOVA) *one way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para analisar a diferença estatística entre os grupos. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle; ## $p < 0,01$ e #### $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo LPS. CTR: Controle; LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano; ISACN: 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila.

5. DISCUSSÃO

A inflamação é a resposta do sistema imunológico a estímulos infecciosos ou não-infecciosos. Ela atua removendo estímulos prejudiciais e coordenando os processos de cicatrização e reparação tecidual, sendo, portanto, um processo essencial para a manutenção da homeostase e saúde do organismo. Embora a inflamação seja fundamentalmente benéfica, quando excessiva ou desregulada pode levar a alterações fisiológicas, danos teciduais, disfunção orgânica e contribuir para a fisiopatologia de muitas doenças. Assim, medicamentos anti-inflamatórios são constantemente utilizados para o controle de estados inflamatórios patológicos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; CHEN et al., 2018b).

Os anti-inflamatórios representam uma das classes de medicamentos mais usadas em todo o mundo (HE et al., 2017). Entretanto, os fármacos disponíveis atualmente no mercado têm sido rotineiramente associados a importantes efeitos colaterais, o que estimula o estudo e desenvolvimento de novas moléculas com propriedades anti-inflamatórias (WILLIAMS, 2018; CLAVÉ et al., 2019).

Os AMBH são moléculas sintéticas com várias ações biológicas descritas (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). O potencial bioativo desses compostos vem sendo estudado há aproximadamente vinte anos e várias moléculas dessa classe são consideradas fortes candidatas a fármacos, tendo em vista que demonstraram atividade frente a diferentes patologias em diversos modelos experimentais (KUNDU et al., 1999; PATRA et al., 2003; DE SOUZA et al., 2004, 2007; VASCONCELLOS et al., 2006; DA SILVA et al., 2016; XAVIER et al., 2016; FAHEINA-MARTINS et al., 2017).

O ISACN é um AMBH derivado da isatina que possui ação anti-tumoral e recentemente apresentou atividade anti-bacteriana, baixa toxicidade aguda em ratos e baixo risco de genotoxicidade, além de demonstrar boa biodisponibilidade teórica quando administrado por via oral, sendo, então, considerado um composto farmacologicamente promissor (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016; DIAS, 2020). O ISACN é quimicamente semelhante à isatina, sua molécula precursora, cuja ação anti-inflamatória já foi descrita na literatura (KANDASAMY et al., 2010a; RABELO SOCCA et al., 2014). Adicionalmente, diferentes AMBH, assim como diferentes derivados de isatina, já demonstraram atividade anti-inflamatória em diversos estudos (JARAPULA

et al., 2016; FAHEINA-MARTINS et al., 2017; LACERDA, 2017; IBRAHIM; ELSAMAN; AL-NOUR, 2018; DANTAS et al., 2020).

Diante disso, foi avaliado no presente trabalho o efeito anti-inflamatório e o mecanismo de ação do ISACN na inflamação aguda experimental, utilizando abordagens *in vivo* e *in vitro*.

A inflamação aguda possui duração relativamente curta e se caracteriza por vasodilatação, formação de edema, liberação de mediadores inflamatórios e migração de células, majoritariamente neutrófilos, para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Inicialmente, para avaliar o possível efeito anti-inflamatório do ISACN e para guiar os experimentos posteriores, realizou-se uma triagem farmacológica utilizando o modelo experimental de peritonite induzida por zimosan, um modelo largamente utilizado na literatura e capaz de reproduzir todos os eventos gerais do processo inflamatório agudo (DOHERTY et al., 1985; CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

O zimosan é um polissacarídeo insolúvel da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. A administração intraperitoneal de zimosan, em camundongos, induz inflamação com extravasamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal detectável com pelo menos duas horas após o estímulo e com pico máximo observado após quatro horas (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

Neste modelo, observou-se que o tratamento de camundongos com ISACN nas doses de 6 mg/kg ou 24 mg/kg foi capaz de reduzir a migração de leucócitos, especificamente de neutrófilos, para o peritônio inflamado, enquanto a dose de 1,5 mg/kg não demonstrou efeito. Esse resultado, corrobora com resultados já descritos em um trabalho realizado com a isatina, onde o pré-tratamento com essa molécula nas doses de 6 mg/kg ou de 25 mg/kg promoveu redução significativa da migração de neutrófilos durante a colite experimental (RABELO SOCCA et al., 2014). Além disso, resultado semelhante também foi recentemente relatado por Dantas e colaboradores que observaram que o composto COPTCH, um derivado da isatina, reduziu a migração de neutrófilos para a região inflamada em modelo de bolsa de ar induzida por zimosan (DANTAS et al., 2020).

Há muito tempo se conhece que o acúmulo e a ativação desregulada de neutrófilos representa uma das principais causas de danos teciduais e comprometimento de órgãos em várias doenças inflamatórias (LEHMAN; SEGAL,

2020). Essas células, representam uma fonte significativa de mediadores incluindo enzimas produtoras de espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, que ao serem liberadas em excesso causam citotoxicidade direta aos tecidos (NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020). Já foi visto que o estresse oxidativo provocado pela liberação desordenada de ROS por neutrófilos está diretamente relacionado a fisiopatologia de doenças autoimunes como a artrite reumatoide, o que torna esses leucócitos um alvo promissor para intervenções terapêuticas (HITCHON; EL-GABALAWY, 2004).

Quando administrado na cavidade peritoneal, o zimosan é fagocitado principalmente por macrófagos residentes (UNDERHILL, 2003). Esse processo é acompanhado pela ativação do heterodímero TLR2/TLR6, que reconhece as partículas de zimosan, e induz uma sinalização intracelular culminando em respostas como a ativação do fator de transcrição NFκ-B e a produção de mediadores inflamatórios (OZINSKY et al., 2000). Vários mediadores são liberados no peritônio em resposta ao zimosan, dos quais podemos destacar: componentes do sistema complemento, prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas. A maioria dessas moléculas pode ser detectada no lavado peritoneal com até quatro horas após o estímulo com zimosan, e a medição dos níveis desses mediadores, em especial de citocinas inflamatórias, é importante ao testar o efeito anti-inflamatório de um novo composto (DOHERTY et al., 1985; CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

Ao investigar a produção de citocinas durante a peritonite experimental, constatou-se que o tratamento com ISACN reduziu a produção das citocinas inflamatórias IL-1β, IL-6 e TNF-α induzida por zimosan e que a dose de 24 mg/kg apresentou um resultado melhor do que a dose de 6mg/kg, uma vez que restaurou os níveis basais da maioria das citocinas avaliadas. Esse resultado é a primeira evidência do efeito inibitório de um AMBH na produção de citocinas *in vivo* e diverge de um trabalho anterior onde o AMBH 4Br não promoveu redução na produção de citocinas inflamatórias durante o edema de orelha induzido por óleo de cróton (LACERDA, 2017). Entretanto, nossos dados são condizentes com resultados descritos para a isatina e para os derivados de isatina N-Pirazoloil e N-tiofeneacetil que reduziram a liberação das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α em modelos experimentais de inflamação aguda (GAO et al., 2018; ZEESHAN et al., 2019).

As citocinas são mediadores que exercem função central na iniciação, manutenção e perpetuação da resposta inflamatória (O'SHEA; MURRAY, 2008). A IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α são citocinas pró-inflamatórias clássicas e possuem capacidade de estimular a expressão de vários genes relacionados a inflamação. Em conjunto esses mediadores desempenham inúmeras funções essenciais para o processo inflamatório e para a defesa do organismo (DINARELLO, 2000). Entretanto, o desequilíbrio na produção dessas citocinas ou no seu perfil de liberação desempenham um papel importante em várias condições fisiopatológicas incluindo sepse, artrite reumatoide, câncer e covid-19, dentre outras (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; HU; HUANG; YIN, 2021). Assim, o controle farmacológico desses mediadores pode ser essencial para o tratamento de muitas doenças (COMINELLI, 2004; CHEN et al., 2019).

Os resultados obtidos com a triagem farmacológica utilizando o modelo experimental de peritonite induzida por zimosan indicam que ISACN possui atividade anti-inflamatória através da inibição da migração de neutrófilos e da produção de citocinas, e que essa atividade é melhor observada na dose de 24 mg/kg. Considerando que a infiltração e a ação efetora dos neutrófilos está frequentemente associada a severidade de doenças pulmonares e considerando ainda que moléculas capazes de atenuar ou inibir o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamado podem tornar-se ferramentas farmacológicas eficazes para o tratamento de condições inflamatórias (LEFRANÇAIS et al., 2018; PANETTIERI, 2018; NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020), decidiu-se avaliar o efeito anti-inflamatório do ISACN frente a uma doença inflamatória pulmonar através da utilização de um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

A lesão pulmonar aguda é uma doença inflamatória com elevadas taxas de mortalidade (PHAM; RUBENFELD, 2017), que se caracteriza fisiopatologicamente pela presença de uma resposta inflamatória exacerbada no espaço aéreo pulmonar (MASON; DOOLEY; GRIFFITHS, 2016). A primeira descrição da LPA data de mais de 50 anos atrás (ASHBAUGH et al., 1967). Entretanto, embora já tenha se passado muito tempo, ainda não há uma terapia farmacológica completamente estabelecida e efetiva direcionada para essa enfermidade (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018). Muitos modelos experimentais têm sido desenvolvidos com o intuito de mimetizar, em animais, os aspectos fisiopatológicos da LPA e assim, permitir o estudo de moléculas

capazes de inibir ou atenuar a resposta inflamatória característica dessa doença (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008; MARTIN; MATUTE-BELLO, 2011).

O modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS é um dos modelos experimentais mais utilizados em estudos com LPA. O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas e é um forte indutor da imunidade inata. A exposição ao LPS (via intranasal) induz em animais as principais características da LPA em humanos, incluindo o acúmulo de leucócitos no tecido pulmonar, a formação de edema e as alterações histopatológicas (CHEN; BAI; WANG, 2010).

O recrutamento de leucócitos desempenha papel crítico no desenvolvimento da LPA e os neutrófilos em especial, têm função de destaque na manutenção dessa enfermidade, pois são as células imunes efetoras responsáveis pelos danos teciduais característicos da doença (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; ZHOU; DAI; HUANG, 2012).

Um crescente número de evidências mostra que a inibição da migração de neutrófilos é um ponto decisivo para o controle e resolução da LPA (ZARBOCK; ALLEGRETTI; LEY, 2008; FALLER et al., 2018). Diversos estudos com diferentes modelos experimentais de LPA mostram os benefícios relacionados a inibição da migração dessas células para o pulmão (KAMOCHI et al., 1999; KAWABATA et al., 2000; BELPERIO et al., 2002; BAUDISS et al., 2016), indicando que moléculas capazes de inibir a ação efetora dos neutrófilos no tecido pulmonar são promissoras (CHEN et al., 2017; QIN et al., 2019).

No presente estudo, observou-se que o tratamento com ISACN atenuou a migração de neutrófilos para a região broncoalveolar dos animais durante a LPA experimental, o que indica uma possível ação protetora do ISACN na lesão pulmonar aguda. Esses achados são semelhantes aos obtidos para a isatina que demonstrou diminuir a migração de leucócitos específicos para a região broncoalveolar em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica (KANDASAMY et al., 2010b). Além disso, esses resultados são similares aos obtidos nos nossos experimentos anteriores, indicando que a ação anti-inflamatória de ISACN observada durante a peritonite parece se estender a lesão pulmonar aguda.

O processo inflamatório característico da lesão pulmonar aguda provoca quebra da barreira alvéolo-capilar através da indução de morte celular, degradação

de junções intercelulares e alterações nos componentes da matriz extracelular e no seu contato com as células epiteliais (MOKRA; KOSUTOVA, 2015; HERRERO; SANCHEZ; LORENTE, 2018). O que resulta em aumento da permeabilidade vascular, formação de edema pulmonar com elevado teor de proteínas, e consequente comprometimento das trocas gasosas. O edema pulmonar é uma das principais características clínicas da LPA e representa um dos fatores que mais contribuem para a hipoxemia e, portanto, para o agravamento da doença (HERRERO; SANCHEZ; LORENTE, 2018). Em estudos com animais a formação de edema pode ser avaliada diretamente a partir da determinação dos níveis de proteínas no compartimento alveolar (MOKRA; KOSUTOVA, 2015).

Ao avaliar a formação de edema no modelo de lesão pulmonar aguda, observou-se que o tratamento com ISACN reduziu de forma marcante a concentração de proteínas no fluído do lavado broncoalveolar de animais acometidos por LPA, sendo capaz de reestabelecer os níveis proteicos basais. O que mostra que esse AMBH parece possuir ação antiedematogênica e pode inibir a formação de edema pulmonar durante a lesão pulmonar aguda. Esse resultado diverge do nosso achado no modelo de peritonite onde o ISACN não promoveu diminuição do edema peritoneal induzido pelo zimosan. Essa divergência pode ser atribuída a diferenças nos mecanismos de formação e manutenção do edema nos dois modelos experimentais, uma vez que na peritonite induzida pelo zimosan o edema é causado principalmente pelo processo de desgranulação de mastócitos e liberação de mediadores como histamina e serotonina, enquanto na LPA induzida por LPS o edema ocorre majoritariamente pela ação efetora dos neutrófilos que liberam mediadores citotóxicos e causam danos alveolares e quebra da barreira alvéolo-capilar (DAMAS; REMACLE-VOLON, 1986; KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001; HERRERO; SANCHEZ; LORENTE, 2018). Diante dos achados obtidos na avaliação da formação de edema, pode-se sugerir que o efeito antiedematogênico de ISACN na lesão pulmonar aguda provavelmente está relacionado a sua ação inibitória na migração de neutrófilos para o espaço alveolar, observado anteriormente.

A ação antiedematogênica de derivados de isatina já foi relatada por Jarapula e colaboradores (2016), por Ibrahim e colaboradores (2018) e por Dantas e colaboradores (2020), que mostraram que os compostos avaliados, em seus respectivos trabalhos, foram capazes de reduzir o edema durante o modelo

experimental de edema de pata induzido por carragenina (JARAPULA et al., 2016; IBRAHIM; ELSAMAN; AL-NOUR, 2018; DANTAS et al., 2020). Além disso, o AMBH 4Br também demonstrou atividade antiedematogênica em um modelo experimental de edema de orelha (LACERDA, 2017).

Durante a LPA há um processo inflamatório característico com a participação de um conjunto de mediadores que ampliam e propagam a resposta inflamatória no pulmão (DENG; STANDIFORD, 2011). Esses mediadores são produzidos principalmente por macrófagos alveolares ativados e são liberados em resposta ao estímulo inflamatório. Dentre os mediadores que participam da LPA, destacam-se as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e a quimiocina CXCL-1 (BHATIA; MOOCHHALA, 2004; BHATIA; ZEMANS; JEYASEELAN, 2012). A liberação excessiva dessas moléculas desencadeia efeitos prejudiciais como citotoxicidade direta, recrutamento e ativação de neutrófilos, formação de edema, indução da produção de espécies reativas de oxigênio e ativação da cascata de coagulação intravascular e intra-alveolar, dentre outros, contribuindo para o início e manutenção da lesão pulmonar aguda (DENG; STANDIFORD, 2011).

Vários estudos clínicos mostram a relação existente entre a presença das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no lavado broncoalveolar de pacientes com LPA e o agravamento da doença (GOODMAN et al., 1996; PARK et al., 2001; BHATIA; MOOCHHALA, 2004). De forma que a presença de altos níveis dessas citocinas no espaço aéreo pulmonar de indivíduos acometidos por LPA está associado a um prognóstico desfavorável e a mortalidade (MEDURI et al., 1995; MOKRA; KOSUTOVA, 2015). Sendo assim, moléculas que possam durante o curso da LPA, reduzir a produção desses mediadores podem se tornar benéficas para o manejo farmacológico dessa enfermidade.

Constatou-se nesse estudo, que o LPS estimulou aumento considerável da produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da quimiocina CXCL-1 na região broncoalveolar dos animais durante a LPA, e que o tratamento com ISACN reduziu os níveis das três citocinas avaliadas. Entretanto, não promoveu alteração nos níveis da quimiocina CXCL-1. A ação de AMBHs na redução da produção de quimiocinas *in vivo* ainda não foi relatada na literatura e esse resultado obtido para a CXCL-1 corrobora com os dados descritos por Lacerda (2017) ao avaliar os níveis da quimiocina CCL-2 (químioatraente de monócitos) durante um modelo experimental de

inflamação aguda, onde o AMBH 4Br não promoveu alteração na produção desse mediador (LACERDA, 2017). Esses resultados nos permitem sugerir que ISACN exerce efeito anti-inflamatório na lesão pulmonar aguda e que esse efeito pode ser atribuído, pelo menos em parte, a sua ação inibitória na produção de citocinas inflamatórias importantes para a patogênese da LPA, enquanto independe de efeito específico na produção do quimioatraente de neutrófilos CXCL-1.

Uma das principais características clínicas da LPA são as alterações histopatológicas (HUGHES; BEASLEY, 2016). A maioria dos pacientes com LPA exibe durante o início da doença uma lesão específica no tecido pulmonar conhecida como dano alveolar difuso que se caracteriza por infiltrado celular, edema, congestão alveolar, hemorragia e deposição de membranas hialinas na parede do alvéolo (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016). A presença desses achados histopatológicos em biópsias pulmonares representa o padrão-ouro de diagnóstico para a LPA e geralmente biópsias são realizadas nos casos em que a apresentação clínica da LPA não está clara ou quando a resposta terapêutica é insatisfatória (MORELL, 2013). Durante a experimentação com animais, a avaliação histopatológica é uma ferramenta útil para investigar o efeito anti-inflamatório de fármacos na lesão pulmonar aguda (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

Na avaliação dos padrões histopatológicos de animais com LPA experimental, constatou-se que o tratamento com ISACN reverteu o dano alveolar difuso e todas as alterações induzidas pelo LPS. Esse tratamento reduziu todos os parâmetros inflamatórios avaliados incluindo infiltrado celular, edema intersticial e hemorragia o que corrobora com os nossos resultados anteriores, referentes a migração de células e a formação de edema, e mostra que o ISACN regula negativamente a resposta inflamatória no pulmão podendo exercer ação protetora na LPA.

O efeito do ISACN em reverter os aspectos histopatológicos característicos da LPA provavelmente se deve a sua ação inibitória na liberação das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α demonstrada anteriormente. Uma vez que essas citocinas são mediadores essenciais para a coordenação da resposta inflamatória no pulmão (DENG; STANDIFORD, 2011). Um efeito similar foi descrito para a isatina que promoveu redução de aspectos fisiopatológicos pulmonares, durante um modelo de inflamação pulmonar crônica (KANDASAMY et al., 2010).

Considerando os resultados obtidos até agora que mostram que o ISACN modula simultaneamente vários aspectos do processo inflamatório agudo tanto no modelo experimental de peritonite induzida por zimosan quanto no modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS, confirmando assim a atividade anti-inflamatória dessa molécula, decidiu-se avaliar se essa atividade estaria relacionada a um efeito imunomodulador em macrófagos. Essas células são células residentes, detectam e respondem a estímulos nocivos, e iniciam a resposta inflamatória através da liberação coordenada de mediadores, que por sua vez promovem a infiltração e ativação de outros tipos de células imunes, incluindo neutrófilos (LEE; CHOI, 2018).

Os macrófagos apresentam grande diversidade funcional e orquestram uma variedade de funções incluindo inflamação, imunorregulação e remodelamento de tecidos (ZHANG; YANG; ERICSSON, 2021). A contribuição dos macrófagos na inflamação é uma de suas funções mais documentadas. Embora essas células desempenhem papel importante na defesa do organismo, sua ativação excessiva está relacionada a grande parte da patologia das doenças inflamatórias e infecciosas (BISWAS et al., 2012). Assim, a resposta de macrófagos a insultos deve ser adequada e rigidamente controlada, e drogas que têm os macrófagos como alvo podem se tornar uma estratégia terapêutica relevante para o tratamento de doenças inflamatórias (HE et al., 2020).

Nessa perspectiva, utilizamos como modelo experimental a cultura de macrófagos peritoneais murinos ativados por zimosan, modelo utilizado a mais de 50 anos para o estudo da resposta imune inata e para a avaliação *in vitro* da ação imunomoduladora e anti-inflamatória de novas droga. A estimulação de macrófagos com zimosan provoca diferentes eventos de sinalização intracelular que culminam na ativação das suas funções efetoras, incluindo a produção de citocinas, quimiocinas e outros sinais de comunicação importantes para a coordenação da resposta inflamatória (UNDERHILL, 2003).

Inicialmente, determinamos a citotoxicidade do ISACN frente aos macrófagos peritoneais em cultura, e constatou-se que esse AMBH na concentração de 20 μ M reduziu a viabilidade das células, enquanto as concentrações de 10 μ M e de 5 μ M não se mostraram citotóxicas. Resultado semelhante foi observado por Lima-Junior e colaboradores (2016) em um trabalho com células leucêmicas HL-60, onde

concentrações de ISACN maiores que 10 μ M promoveram diminuição significativa da viabilidade celular (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016).

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α são mediadores clássicos produzidos por macrófagos ativados (CAVAILLON, 1994; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Diante disso, após estabelecer a citotoxicidade do ISACN avaliamos seu efeito na produção de citocinas pelos macrófagos estimulados com zimosan, e observou-se que o tratamento dessas células com ISACN reduziu a produção das citocinas inflamatórias IL-6, TNF- α e em especial da IL-1 β que teve seus níveis basais reestabelecidos. Essa redução foi melhor observada com a concentração de 10 μ M, de forma semelhante ao que foi observado anteriormente nos nossos experimentos *in vivo*, onde a maior dose de ISACN apresentou um efeito melhor na redução da produção de citocinas durante o modelo experimental de peritonite. O que indica que o ISACN pode modular o conjunto de citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos ativados. Esses resultados são condizentes a relatos da literatura que mostram que outros dez AMBH promoveram redução na produção de citocinas inflamatórias por macrófagos J774A.1 ou RAW 264.7 e que essa redução, na maioria das vezes, foi melhor observada nas maiores concentrações utilizadas (LACERDA, 2017).

Os dados obtidos com o modelo de cultura de macrófagos estimulados com zimosan indicam que o efeito anti-inflamatório do ISACN observado nesse estudo pode estar relacionado, pelo menos em parte, a modulação negativa da atividade de macrófagos. Para fortalecer essa hipótese e para melhor entender o mecanismo de ação anti-inflamatório do ISACN, avaliamos o seu efeito na atividade de macrófagos em cultura utilizando também o LPS como estímulo inflamatório. Uma vez que, quando comparado ao zimosan, o LPS é mais potente em ativar os macrófagos e quando utilizado, mesmo em baixas concentrações, promove uma ativação robusta dessas células (WU; LEE; HANCOCK, 2017). Além disso, diferente de agonistas de TLR2, como o zimosan, o LPS promove de forma eficiente a produção de óxido nítrico por macrófagos em cultura, o que permite um estudo mais amplo da resposta inflamatória dessas células (JONES et al., 2001; CORREA et al., 2016).

A estimulação de macrófagos com LPS resulta em uma ampla gama de respostas incluindo a expressão de moléculas de adesão e fatores de coagulação, fagocitose, rearranjo do citoesqueleto e secreção de mediadores como citocinas e óxido nítrico (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; ROSSOL et al., 2011).

O óxido nítrico é um gás que atua como molécula mensageira em vários sistemas biológicos e participa de diferentes eventos fisiológicos no organismo como controle do tônus vascular, neurotransmissão, relaxamento do músculo liso e resposta imune (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018; PAPI; AHMADIZAR; HASANVAND, 2019; PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019; CINELLI et al., 2020). Durante a inflamação, o NO é produzido pela enzima iNOS cuja expressão em macrófagos é controlada por citocinas inflamatórias e por LPS. Quando induzida, a iNOS é capaz de produzir grandes quantidades de NO que auxiliam nos mecanismos de defesa contra patógenos invasores, sendo uma molécula essencial para a resposta inflamatória (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Entretanto, elevadas concentrações de NO ou desregulação e superexpressão da iNOS estão associados a danos teciduais e a fisiopatologia de doenças inflamatórias como asma, artrite, colite e lesão pulmonar aguda (MEHTA, 2005; SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007; CINELLI et al., 2020).

Nesse trabalho, constatou-se que o ISACN reduziu a produção de NO induzida por LPS, sendo capaz de reestabelecer os níveis basais desse mediador. O que está de acordo com dados obtidos por Faheina-Martins e colaboradores que mostraram que os AMBH A2CN e A4CN inibiram completamente a produção de NO por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (FAHEINA-MARTINS et al., 2017). Resultado semelhante também foi relatado por Lacerda (2017) que testou dez AMBHs diferentes e observou que todos promoveram redução da produção de NO por macrófagos em cultura (LACERDA, 2017). Adicionalmente, constatou-se através de experimentos com citometria de fluxo e com reação em cadeia da polimerase quantitativa que o efeito do ISACN em reduzir a produção de NO está relacionado não só a redução da expressão da enzima iNOS como também a redução da expressão gênica da iNOS, o que confirma que o ISACN pode atuar na via de indução do óxido nítrico e modular negativamente a produção dessa molécula.

Até o momento não há relatos na literatura que demonstrem o ISACN ou outros AMBHs promovendo inibição na expressão da iNOS. Entretanto, já foi visto que a isatina assim como alguns de seus derivados podem reduzir a produção de NO através desse mecanismo, o que condiz com nossos achados (MATHEUS et al., 2007).

O principal resultado da sinalização induzida por LPS em macrófagos é a expressão e liberação regulada de um conjunto de citocinas envolvidas na inflamação, nas respostas antimicrobianas diretas e na sobrevivência, proliferação ou morte celular (ROSSOL et al., 2011). Observou-se nos nossos experimentos, que o LPS promoveu a produção das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10 pelos macrófagos em cultura, e que o ISACN foi capaz de reduzir a produção de todos esses mediadores. Esses resultados corroboram com os achados anteriores descritos nesse trabalho, onde ISACN promoveu redução da produção de citocinas em distintos modelos experimentais tanto *in vivo* como *in vitro*. Essa ação inibitória do ISACN na produção de citocinas por macrófagos ativados pelo LPS pode estar relacionada a algum tipo de interferência do ISACN na via do TLR4, receptor que reconhece e medeia os efeitos do LPS (LU; YEH; OHASHI, 2008).

A interação de TLR4 com o LPS desencadeia uma cascata de sinais intracelulares que levam a ativação do fator de transcrição NF- κ B e a ativação da via das MAPKs induzindo consequentemente a expressão de importantes genes inflamatórios (LU; YEH; OHASHI, 2008). Embora a família dos TLRs normalmente contribuam para a defesa do organismo, o excesso da sinalização mediada por TLRs tem sido implicada em muitas doenças inflamatórias (OSPELT; GAY, 2010). Já foi visto que a ativação excessiva de TLR4, por exemplo, está diretamente associada a condições inflamatórias patológicas como a aterosclerose e o câncer intestinal (KIECHL et al., 2002; EDFELDT et al., 2004; FUKATA et al., 2011). Dessa forma, drogas capazes de modular a sinalização de TLRs são promissoras e podem se mostrar úteis para evitar respostas inflamatórias exacerbadas (GAO et al., 2017).

No presente trabalho, ISACN reduziu a expressão do TLR4 em macrófagos estimulados com LPS. Diante desse achado, podemos sugerir que a redução da expressão do TLR4 reduz consequentemente os seus mecanismos de sinalização intracelular e que isso pode estar diretamente envolvido no efeito do ISACN na inibição da expressão proteica e gênica da iNOS e na diminuição da produção de óxido nítrico e de citocinas observada anteriormente.

A ativação de macrófagos mediada pelo LPS além de induzir a produção de mediadores influencia mudanças na expressão de muitas moléculas de superfície celular incluindo o CD69 (MARZIO et al., 1997), uma glicoproteína transmembrana expressa transitoriamente sob estímulos inflamatórios, sendo classicamente definida

como um marcador precoce da ativação de leucócitos (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). Trabalhos com modelos experimentais *in vivo* indicam que o CD69 está envolvido na patogênese de doenças inflamatórias como asma, colite, artrite reumatoide e lesão pulmonar aguda sugerindo que essa molécula pode ser um importante alvo terapêutico para o controle da inflamação (MURATA et al., 2003; YAMAUCHI et al., 2011; ISHIZAKI et al., 2012; WANG et al., 2015).

Avaliamos o efeito de ISACN na expressão do CD69 em macrófagos estimulados com LPS e observou-se que o tratamento de macrófagos com ISACN inibiu a expressão proteica e gênica do CD69, o que indica que ISACN foi capaz de reduzir o estado de ativação dessas células. A expressão do CD69 pode ser regulada positivamente pelo fator de transcrição AP-1 que é classicamente induzido por MAPKs. Assim, sugerimos que o efeito inibitório do ISACN na expressão do CD69 pode estar relacionado a uma ação inibitória na via das MAPKs, uma das principais vias ativadas pelo TLR4 (KARIN, 1995; CASTELLANOS et al., 1997).

As MAPKs ERK, JNK e p38 são serina/treonina quinases que regulam diferentes processos em organismos eucariotos, incluindo a inflamação (PEARSON et al., 2001; LU; YEH; OHASHI, 2008). Dados de muitos estudos mostram a participação dessas MAPKs na indução das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 (LEE et al., 1994; SCHERLE et al., 1998; DIAZ; LOPEZ-BERESTEIN, 2000; SARAIVA; O'GARRA, 2010; BODE; EHLTING; HÄUSSINGER, 2012) e na indução da iNOS em macrófagos (AJIZIAN; ENGLISH; MEALS, 1999; CHAN; RICHES, 2001). Já é bem estabelecido na literatura que essas MAPKs são capazes de ativar diferentes fatores de transcrição como o AP-1 e CREB, e assim contribuem positivamente para o processo inflamatório (BANERJEE; GERONDAKIS, 2007).

Nesse contexto, considerando os resultados anteriores que mostram uma ação inibitória do ISACN na produção de citocinas e de óxido nítrico e na expressão do TLR4, da iNOS e do CD69 em macrófagos, decidiu-se avaliar se o ISACN poderia interferir na ativação das MAPKs. Determinamos então, por citometria de fluxo, a expressão da forma ativa da ERK 1/2, JNK1/2 e da p38 (P-ERK 1/2, P-JNK 1/2 e P-p38) em macrófagos tratados com ISACN e estimulados com LPS. Foi constatado, que o tratamento de macrófagos em cultura com ISACN reduziu a expressão da forma ativa dessas três MAPKs, o que mostra que o ISACN regula negativamente a ativação dessas proteínas. Trabalhos recentes relataram que a isatina e dois compostos

derivados de isatina foram capazes de reduzir a inflamação em diferentes modelos experimentais através da inibição da ativação das MAPKs (GAO et al., 2018; ZEESHAN et al., 2019), o que corrobora com nossos resultados e indica que durante a inflamação mediada pelo LPS, os efeitos anti-inflamatórios desencadeados pelo ISACN podem ser atribuídos a inibição da via TLR4/MAPK ERK-JNK-p38.

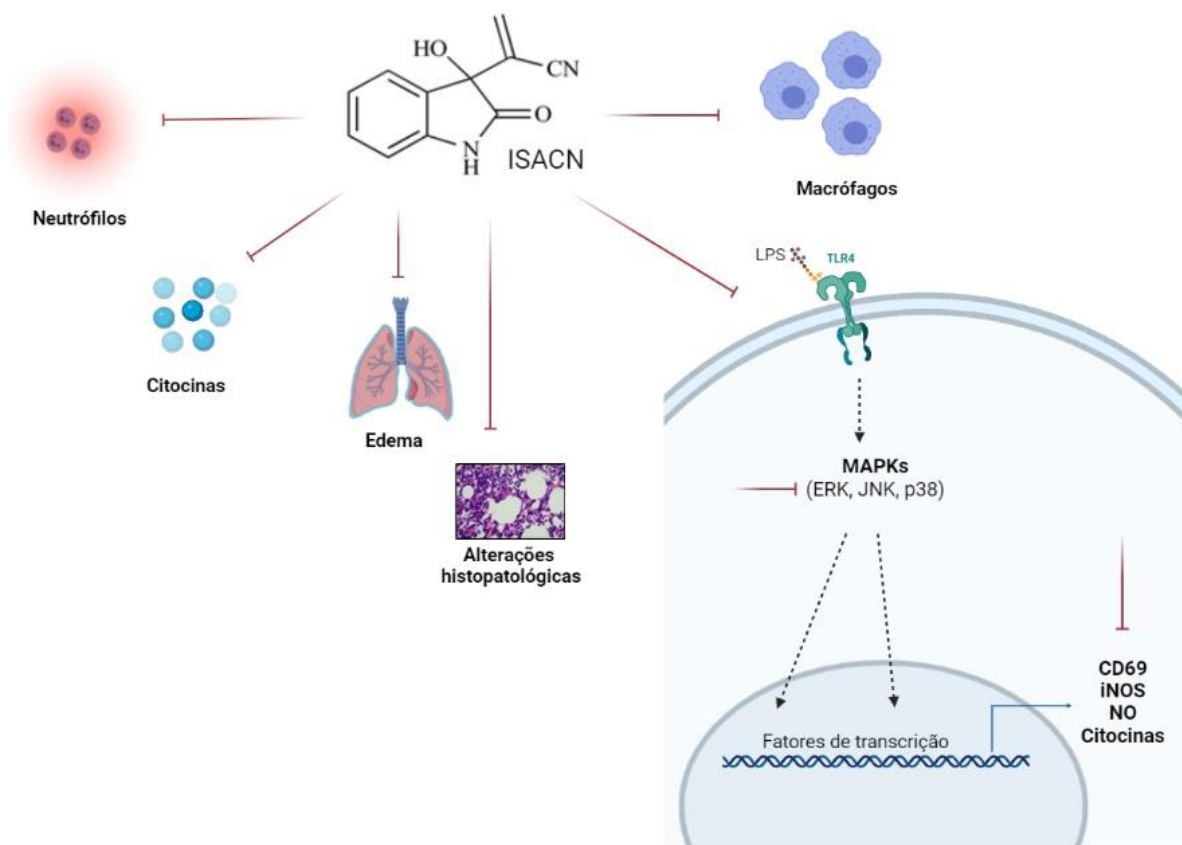
Considerando todos esses achados, o presente trabalho descreve pela primeira vez a ação anti-inflamatória do aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da isatina ISACN, mostrando seu efeito no processo inflamatório agudo em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Os resultados encontrados respaldam a ideia de que o ISACN é uma molécula farmacologicamente promissora e pode ser avaliada futuramente em estudos clínicos direcionados para o tratamento de condições inflamatórias patológicas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Concluimos nesse trabalho que o AMBH ISACN possui atividade anti-inflamatória durante a inflamação aguda demonstrada pela redução simultânea de parâmetros como migração de neutrófilos e produção de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), além da redução do edema pulmonar e das alterações histopatológicas, características da lesão pulmonar aguda. Essa atividade anti-inflamatória está relacionada a modulação negativa da atividade de macrófagos e na inflamação mediada pelo LPS, pode ser atribuída a regulação negativa da via TLR4/MAPK-ERK-JNK-p38, o que suprime a expressão da molécula de superfície CD69, da enzima iNOS e a produção de mediadores inflamatórios como óxido nítrico e citocinas (Figura 12). Esse composto pode, portanto, ser considerado um candidato promissor a estudos clínicos posteriores direcionados ao tratamento farmacológico da inflamação.

Figura 12 Esquema representativo dos efeitos anti-inflamatórios e do mecanismo de ação do ISACN



Fonte: Elaborada pela autora. Criada com BioRender.com

7. REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627–635, 2018.
- ABEDI, F. et al. Acute lung injury: The therapeutic role of Rho kinase inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 155, n. February, p. 104736, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104736>>.
- ABRAHAM, E. Neutrophils and acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4 SUPPL., p. 1–5, 2003.
- ADEREM, A. LPS : A Prototype for. **Critical Care Medicine**, p. 16–18, 2001.
- AFONINA, I. S. et al. **Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme** ImmunityCell Press, , 16 jun. 2015. .
- AJIZIAN, S. J.; ENGLISH, B. K.; MEALS, E. A. Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interf. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 4, p. 939–944, 1999.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- ALLENBACH, C. et al. Macrophages Induce Neutrophil Apoptosis through Membrane TNF, a Process Amplified by Leishmania major . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 6656–6664, 2006.
- AMARANTE-MENDES, G. P. et al. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, p. 1–19, 2018.
- ANERILLAS, C.; ABDELMOHSEN, K.; GOROSPE, M. Regulation of senescence traits by MAPKs. **GeroScience**, v. 42, n. 2, p. 397–408, 2020.
- ANNIBALDI, A.; MEIER, P. **Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer** Trends in Molecular MedicineElsevier Ltd, , 1 jan. 2018. .
- ANTONELLI, M.; KUSHNER, I. It's time to redefine inflammation. **FASEB Journal**, v.

31, n. 5, p. 1787–1791, 2017.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87–92, 2007.

ASHBAUGH, D. et al. Acute Respiratory Distress in Adults. **The Lancet**, v. 290, n. 7511, p. 319–323, 1967.

AUN, M. V. et al. Animal models of asthma: Utility and limitations. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 10, p. 293–301, 2018.

BANDMAN, O. et al. Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 975, p. 77–90, 2002.

BANERJEE, A.; GERONDAKIS, S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 6, p. 420–424, 2007.

BANTULÀ, M. et al. Asthma and Obesity: Two Diseases on the Rise and Bridged by Inflammation. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 2, p. 169, 2021.

BASAVAIAH, D.; RAO, A. J.; SATYANARAYANA, T. Recent advances in the Baylis - Hillman reaction and applications. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 811–891, 2003.

BASAVAIAH, D.; RAO, K. V.; REDDY, R. J. The Baylis–Hillman reaction: A novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 10, p. 1581–1588, 2007.

BAUDISS, K. et al. C1P Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Preventing NF- κ B Activation in Neutrophils. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 5, p. 2319–2326, 2016.

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, 2016.

BELLAVITA, R. et al. Temporin L-derived peptide as a regulator of the acute inflammatory response in zymosan-induced peritonitis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 123, n. November 2019, p. 109788, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109788>>.

BELPERIO, J. A. et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. **Journal of Clinical Investigation**, v.

110, n. 11, p. 1703–1716, 2002.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Cell-Free Culture Supernatant of Bifidobacterium breve CNCM I-4035 Decreases Pro-Inflammatory Cytokines in Human Dendritic Cells Challenged with Salmonella typhi through TLR Activation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 3–10, 2013.

BERNARDINI, G. et al. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. **Journal of Immunological Methods**, v. 273, n. 1–2, p. 83–101, 1 fev. 2003.

BERRAONDO, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 6–15, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41416-018-0328-y>>.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. **Neuron**, v. 107, n. 2, p. 234–256, 2020.

BEVILACQUA, M. P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. 1993.

BHATIA, M.; MOOCHHALA, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **Journal of Pathology**, v. 202, n. 2, p. 145–156, 2004.

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**, v. 46, n. 5, p. 566–572, 2012.

BISWAS, S. K. et al. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 11–24, 2012.

BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38 MAPK-STAT3 axis. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1185–1194, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.018>>.

BOGDAN, C. **Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update** **Trends in Immunology** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2015. .

BOUCHERY, T.; HARRIS, N. Neutrophil–macrophage cooperation and its impact on tissue repair. **Immunology and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 289–298, 2019.

BRITO, V. B. M. et al. Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and 1H NMR experimental studies of Morita–Baylis–Hillman adducts from isatin derivatives. **Molecular Diversity**, v. 24, n. 1, p. 265–281, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/s11030-019-09950-7>>.

BURNEY, S. et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1–2, p. 37–49, 8 mar. 1999.

BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 140, n. 4, p. 345–350, 2016. Disponível em:

<<http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2015-0519-RA>>.

BUTTERFIELD, T. a; BEST, T. M.; MERRICK, M. a. The Dual Roles of Neutrophils and. **Journal of athletic training**, v. 41, n. 4, p. 457–465, 2006.

CAI, M. et al. CCL18 in serum, BAL fluid and alveolar macrophage culture supernatant in interstitial lung diseases. **Respiratory Medicine**, v. 107, n. 9, p. 1444–1452, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2013.06.004>>.

CAIRNS, C. B. et al. Bench to bedside tumor necrosis factor-alpha: From inflammation to resuscitation. **Academic Emergency Medicine**, v. 7, n. 8, p. 930–941, 2000.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage). **Immunology**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CARVALHO, D. C. M. et al. Marinobufagenin inhibits neutrophil migration and proinflammatory cytokines. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

Carvalho, D.C.M **Atividade anti-inflamatória da marinobufagina em modelos in vivo e in vitro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)- Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 97. 2018.

CASH, J. L.; WHITE, G. E.; GREAVES, D. R. Chapter 17 Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the Study of Inflammation. **Methods in Enzymology**, v. 461, n. B, p. 379–396, 2009.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178–2185, 2019.

CASTELLANOS, M. C. et al. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 11, p. 5463 LP – 5473, 1 dez. 1997. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/content/159/11/5463.abstract>>.

- CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 48, n. 10, p. 445–453, 1 jan. 1994.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. **Inflammopharmacology**, n. 0123456789, 2019.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International Immunopharmacology**, v. 90, p. 107233, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107233>>.
- CELHAR, T.; MAGALHÃES, R.; FAIRHURST, A. M. TLR7 and TLR9 in SLE: When sensing self goes wrong. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 58–77, 2012.
- CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 621–627, 2003.
- CHALARIS, A. et al. **The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer** *European Journal of Cell Biology* Urban & Fischer, , 1 jun. 2011. .
- CHAN, E. D.; RICHES, D. W. H. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38mapk in a mouse macrophage cell line. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 280, n. 3 49-3, 2001.
- CHANDRASEKHARAN, U. M. et al. Tumor necrosis factor α (TNF- α) receptor-II is required for TNF- α -induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 1938–1944, 2007.
- CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 4, n. 6, p. 773–783, 2010.
- CHEN, J. J. et al. Scutellaria baicalensis Ameliorates Acute Lung Injury by Suppressing Inflammation in Vitro and in Vivo. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 1, p. 137–157, 2017.
- CHEN, K. et al. Chemokines in homeostasis and diseases. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, p. 324–334, 2018a.
- CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018b.
- CHEN, Z. et al. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid

- arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 1, p. 9–17, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41584-018-0109-2>>.
- CHISTYAKOV, D. V. et al. Toll-like receptors control p38 and JNK MAPK signaling pathways in rat astrocytes differently, when cultured in normal or high glucose concentrations. **Neurochemistry International**, v. 131, n. March, p. 104513, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104513>>.
- CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 946–953, 2017.
- CINELLI, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 40, n. 1, p. 158–189, 2020.
- CLANCY, R. M.; ABRAMSON, S. B. Nitric Oxide: A Novel Mediator of Inflammation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 210, n. 2, p. 93–101, 1 nov. 1995. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-210-43927AA>>.
- CLAVÉ, S. et al. The Invisible Threat of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs for Kidneys. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. December, p. 1–6, 2019.
- COMINELLI, F. Cytokine-Based Therapies for Crohn ' s Disease —. **Cytokines**, p. 2045–2048, 2004.
- CORREA, L. B. et al. Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 6, p. 1554–1566, 2016.
- COSTA MACEDO, G. Letícia Moroni Lacerda Avaliação Da Atividade Anti-Inflamatória E Antitumoral De Novos Adutos Da Reação De Morita- Baylis-Hillman. 2017.
- CZERKIES, M.; KWIATKOWSKA, K.; PŁYTYCZ, B. Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: Focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–23, 2014.
- DA CÂMARA ROCHA, J. et al. Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-Leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 3067–3076, 2019.
- DA SILVA, W. A. V. et al. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita–Baylis–Hillman adducts against *Leishmania donovani*: A twin drug approach. **Bioorganic and**

Medicinal Chemistry Letters, v. 26, n. 18, p. 4523–4526, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.022>>.

DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G. Mast cell amines and the oedema induced by zymosan and carrageenans in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 121, n. 3, p. 367–376, 4 mar. 1986.

DANTAS, L. L. S. F. R. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the isatin derivative (Z)-2-(5-chloro-2-oxoindolin-3-ylidene)-n-phenylhydrazinecarbothioamide in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 10, p. 1–8, 2020.

DE FARIAS SILVA, D. et al. Costus spiralis (Jacq.) Roscoe leaves fractions have potential to reduce effects of inflammatory diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, p. 113607, 25 mar. 2021.

DE FILIPPO, K. et al. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 4308 LP – 4315, 15 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/180/6/4308.abstract>>.

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 6, p. 378–391, 2016.

DE SOUZA, R. O. M. A. et al. Hexamethylenetetramine as a cheap and convenient alternative catalyst in the Baylis-Hillman reaction: Synthesis of aromatic compounds with anti-malarial activity. **Synthesis**, n. 10, p. 1595–1600, 2004.

DE SOUZA, R. O. M. A. et al. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)propanenitrile and analogous compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 99–102, 2007.

DENG, J. C.; STANDIFORD, T. J. Growth factors and cytokines in acute lung injury. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 1, p. 81–104, 2011.

DIAS, G.T. **Avaliação da atividade antibacteriana, antiproliferativa e toxicológica in silico, in vitro, in vivo, ex vivo de um derivado da n-metil isatina**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)-Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p.106. 2020.

- DIAZ, B.; LOPEZ-BERESTEIN, G. A distinct element involved in lipopolysaccharide activation of the tumor necrosis factor- α promoter in monocytes. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 20, n. 8, p. 741–748, 2000.
- DIEDISHEIM, M. et al. Regulation of inflammation in diabetes: From genetics to epigenomics evidence. **Molecular Metabolism**, v. 41, n. June, p. 101041, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101041>>.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.118.2.503>>.
- DINARELLO, C. A. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. 2009.
- DINARELLO, C. A. Overview of the IL- 1 family in innate inflammation and acquired immunity. p. 8–27, 2018.
- DINARELLO, C. A.; GOLDIN, N. P.; WOLFF, S. M. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 139, n. 6, p. 1369–1381, 1974.
- DOHERTY, N. S. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, n. 5, p. 769–789, 1 nov. 1985.
- DUAN, L.; RAO, X.; SIGDEL, K. R. Regulation of inflammation in autoimmune disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 17–19, 2019.
- EDFELDT, K. et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. **European Heart Journal**, v. 25, n. 16, p. 1447–1453, 2004.
- EL KEBIR, D.; FILEP, J. G. Role of Neutrophil Apoptosis in the Resolution of Inflammation. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 10, p. 213691, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1100/tsw.2010.169>>.
- ELIOPOULOS, A. G. et al. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. **EMBO Journal**, v. 21, n. 18, p. 4831–4840, 2002.
- ELLULU, M. S. et al. Obesity and Inflammation : The Linking Mechanism and the Complications. **Archives of Medical Science**, p. 851–863, 2016.
- FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms

- involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI11112>>.
- FAHEINA-MARTINS, G. V et al. Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory RAW264 . 7 Cells. v. 2017, 2017.
- FALLER, S. et al. Hydrogen sulfide limits neutrophil transmigration, inflammation, and oxidative burst in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 319, n. 7, p. 698–710, 2018.
- FANG, Q.; ZHOU, C.; NANDAKUMAR, K. S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020.
- FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292–316, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224>>.
- FERNANDEZ, E. J.; LOLIS, E. S. Structure, Function, and Inhibition. n. 1, 2002.
- FERREIRA, L. M.; FERREIRA, L. R. K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. spe, p. 01–03, 2003.
- FRINK, M. et al. Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. **Shock**, v. 28, n. 5, p. 576–581, 2007.
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–286, 2005.
- FUKATA, M. et al. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1464–1473, 2011.
- FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, 2016.
- G. LIMA-JUNIOR, C. et al. Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 602–612, 2016.
- GABER, T.; STREHL, C.; BUTTGEREIT, F. Metabolic regulation of inflammation.

Nature Reviews Rheumatology, v. 13, n. 5, p. 267–279, 2017.

GABRYŠOVÁ, L. et al. The Regulation of IL-10 Expression. In: FILLATREAU, S.; O'GARRA, A. (Ed.). **Interleukin-10 in Health and Disease**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 157–190.

GALOZZI, P. et al. **The revisited role of interleukin-1 alpha and beta in autoimmune and inflammatory disorders and in comorbidities** **Autoimmunity Reviews** Elsevier B.V., , 20 fev. 2021. .

GAO, W. et al. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from molecular to nano therapeutics. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JUL, 2017.

GAO, W. et al. The combination of indirubin and isatin attenuates dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis in mice. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 96, n. 5, p. 636–645, 2018.

GAVIOLI, R. et al. CD69 molecule in human neutrophils: Its expression and role in signal-transducing mechanisms. **Cellular Immunology**, v. 142, n. 1, p. 186–196, 1992.

GOLDBLUM, S. E.; SUN, W. L. Tumor necrosis factor- α augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 258, n. 2 2–1, p. 57–67, 1990.

GONG, T. et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 95–112, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>>.

GOODMAN, R. B. et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 154, n. 3 Pt 1, p. 602–611, 1996.

GORABI, A. M. et al. The pivotal role of CD69 in autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 111, n. February, p. 102453, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102453>>.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: Heterogeneity and functions. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2017.

GOSS, C. H. et al. Incidence of acute lung injury in the United States. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1607–1611, 2003.

GOUDA, M. M.; BHANDARY, Y. P. Acute Lung Injury: IL-17A-Mediated Inflammatory

Pathway and Its Regulation by Curcumin. **Inflammation**, v. 42, n. 4, p. 1160–1169, 2019.

GOYAL, N. et al. Animal models of inflammatory bowel disease: A review.

Inflammopharmacology, v. 22, n. 4, p. 219–233, 2014.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids.

Analytical Biochemistry, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 out. 1982.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury.

Molecular Medicine, v. 17, n. 3–4, p. 293–307, 2011.

GUO, H. et al. Nitric Oxide Mediates Inflammation in Type II Diabetes Mellitus

through the PPAR γ /eNOS Signaling Pathway. **PPAR Research**, v. 2020, p. 1–7, 2020.

HANNEMANN, N. et al. The AP-1 Transcription Factor c-Jun Promotes Arthritis by

Regulating Cyclooxygenase-2 and Arginase-1 Expression in Macrophages. **The**

Journal of Immunology, v. 198, n. 9, p. 3605–3614, 2017.

HANNOODEE, S.; NASURUDDIN, D. N. Acute Inflammatory Response. In: [s.l: s.n.]

HARMS, A. S. et al. Inflammation in Experimental Models of α -Synucleinopathies.

Movement Disorders, v. 36, n. 1, p. 37–49, 2021.

HART, P. H. et al. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on

human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. **The Journal of**

Immunology, v. 157, n. 8, p. 3672 LP – 3680, 15 out. 1996. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/content/157/8/3672.abstract>>.

HE, B. shu et al. Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs:

Necessity and opportunities. **Chemosphere**, v. 181, p. 178–189, 2017. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.084>>.

HE, W. et al. Drug delivery to macrophages: A review of targeting drugs and drug

carriers to macrophages for inflammatory diseases. **Advanced Drug Delivery**

Reviews, v. 165–166, p. 15–40, 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.12.001>>.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and

challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>>.

HERRERO, R.; SANCHEZ, G.; LORENTE, J. A. New insights into the mechanisms

of pulmonary edema in acute lung injury. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n.

2, p. 32–32, 2018.

HITCHON, C. A.; EL-GABALAWY, H. S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 6, n. 6, p. 265–278, 2004.

HOU, J.; KARIN, M.; SUN, B. Targeting cancer-promoting inflammation — have anti-inflammatory therapies come of age? **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2021.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-00459-9>>.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250–256, 2021.

HU, Y. S. et al. Novel paeonol derivatives: Design, synthesis and anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. **Bioorganic Chemistry**, v. 98, p. 103735, 1 maio 2020.

HUET, O. et al. Interleukin 10 Antioxidant Effect Decreases Leukocytes/Endothelial Interaction Induced by Tumor Necrosis Factor α . **Shock**, v. 39, n. 1, 2013. Disponível em:

<https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2013/01000/Interleukin_10_Antioxidant_Effect_Decreases.13.aspx>.

HUGHES, K. T.; BEASLEY, M. B. Pulmonary Manifestations of Acute Lung Injury: More Than Just Diffuse Alveolar Damage. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. July, p. arpa.2016-0342-RA, 2016. Disponível em:

<<http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2016-0342-RA>>.

HURST, S. M. et al. IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation. v. 14, p. 705–714, 2001.

IBRAHIM, M. M.; ELSAMAN, T.; AL-NOUR, M. Y. Synthesis, Anti-Inflammatory Activity, and In Silico Study of Novel Diclofenac and Isatin Conjugates. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2018, p. 1–11, 2018.

IKEJIMA, T. et al. Interleukin-1 Induces Tumor Necrosis Factor (TNF) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro and a Circulating TNF-like Activity in Rabbits. v. 15614, p. 215–223, 1990.

ISHIZAKI, S. et al. Role of CD69 in acute lung injury. **Life Sciences**, v. 90, n. 17–18, p. 657–665, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.03.018>>.

JARAPULA, R. et al. Synthesis, in Vivo Anti-Inflammatory Activity, and Molecular Docking Studies of New Isatin Derivatives. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2016, 2016.

- JENKINS, J. K.; MALYAK, M.; AREND, W. P. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. **Lymphokine and cytokine research**, v. 13, n. 1, p. 47—54, 1994. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/8186324>>.
- JEONG, J. et al. Effects of IL-1. v. 324, p. 3–7, 2004.
- JI, D. et al. Effects of inflammatory and anti-inflammatory environments on the macrophage mitochondrial function. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77370-x>>.
- JIN, X.; KRUTH, H. S. Culture of macrophage colony-stimulating factor differentiated human monocyte-derived macrophages. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 112, p. 6–11, 2016.
- JONES, B. W. et al. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, n. SUPPL. 3, p. 6–12, 2001.
- JOYCE, D. A. et al. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 11, p. 2699–2705, 1994.
- JUNG, M. et al. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 2, p. 481–493, 2004.
- JURA, J. et al. Biochimica et Biophysica Acta Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. v. 1779, p. 383–389, 2008.
- KAKINOKI, A. et al. Establishment and characterization of a murine mucosal mast cell culture model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, 2020.
- KAMERITSCH, P.; RENKAWITZ, J. Principles of Leukocyte Migration Strategies. **Trends in Cell Biology**, v. 30, n. 10, p. 818–832, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.007>>.
- KAMOCHI, M. et al. P-selectin and ICAM-1 mediate endotoxin-induced neutrophil recruitment and injury to the lung and liver. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 2 Pt 1, p. L310–L319, 1999.
- KANDASAMY, R. et al. Isatin down-regulates expression of atrial natriuretic peptide

receptor A and inhibits airway inflammation in a mouse model of allergic asthma.

International Immunopharmacology, v. 10, n. 2, p. 218–225, 2010a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2009.11.003>>.

KANDASAMY, R. et al. Isatin down-regulates expression of atrial natriuretic peptide receptor A and inhibits airway inflammation in a mouse model of allergic asthma.

International Immunopharmacology, v. 10, n. 2, p. 218–225, 1 fev. 2010b.

KANG, S. et al. 25 Review Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 1007–1023, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>>.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease.

International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 23, p. 1–31, 2019.

KAPLAN, A. P. Chemokines, chemokine receptors and allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 124, n. 4, p. 423–431, 2001.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.

Journal of Biological Chemistry, v. 270, n. 28, p. 16483–16486, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.28.16483>>.

KAUR, J. et al. In silico screening, structure-activity relationship, and biologic evaluation of selective pteridine reductase inhibitors targeting visceral leishmaniasis.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 55, n. 2, p. 659–666, 2011.

KAWABATA, K. et al. Delayed neutrophil elastase inhibition prevents subsequent progression of acute lung injury induced by endotoxin inhalation in hamsters.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 161, n. 6, p. 2013–2018, 2000.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 24–32, 2007.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

KESHAVARZ, A. et al. Toll-like receptors (TLRs) in cancer; with an extensive focus on TLR agonists and antagonists. **IUBMB Life**, v. 73, n. 1, p. 10–25, 2021.

KIECHL, S. et al. Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and Atherogenesis. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 3, p. 185–192, 2002.

- KINOSHITA, T.; GOTO, T. Links between Inflammation and Postoperative Cancer Recurrence. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 2, p. 228, 2021.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
- KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 1, p. 33–42, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11200065>>.
- KUNDU, M. K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene- propionic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 5, p. 731–736, 1999.
- KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 807–869, 2001.
- LASKIN, D. L.; MALAVIYA, R.; LASKIN, J. D. Role of Macrophages in Acute Lung Injury and Chronic Fibrosis Induced by Pulmonary Toxicants. **Toxicological Sciences**, v. 168, n. 2, p. 287–301, 2019.
- LEE, C.-H.; CHOI, E. Y. Macrophages and Inflammation. **Journal of Rheumatic Diseases**, v. 25, n. 1, p. 11, 2018.
- LEE, J. C. et al. **A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis** *Nature*, 1994. .
- LEFRANÇAIS, E. et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. **JCI insight**, v. 3, n. 3, p. 1–15, 2018.
- LEHMAN, H. K.; SEGAL, B. H. The role of neutrophils in host defense and disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 145, n. 6, p. 1535–1544, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.02.038>>.
- LEMKE, G. How macrophages deal with death. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 9, p. 539–549, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0167-y>>.
- LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2007.
- LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs.

Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 20, n. 13, p. 3954–3971, 2012.

LIMA, É. de A. et al. The pterocarpanquinone LQB 118 inhibits inflammation triggered by zymosan in vivo and in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 83, n. October 2019, p. 106399, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106399>>.

LIND, M. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 370–375, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>>.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. April, 2017.

LOPEZ-CABRERA, M. et al. Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor- α -responsive elements. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21545–21551, 1995.

LU, H. L. et al. Activation of M1 macrophages plays a critical role in the initiation of acute lung injury. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, p. 1–13, 2018.

LU, Y. C.; YEH, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–151, 2008.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 323–350, 1997.

MÁRCIA, B. et al. ORIGINAL RESEARCH PAPER MHTP , a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid , attenuates lipopolysaccharide - induced acute lung injury via p38MAPK / p65NF - κ B signaling pathway - TLR4 dependent. n. 0123456789, 2019.

MARK, K. S.; TRICKLER, W. J.; MILLER, D. W. Tumor Necrosis Factor- α Induces Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin Release in Brain Microvessel Endothelial Cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 3, p. 1051 LP – 1058, 1 jun. 2001. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/297/3/1051.abstract>>.

MARREIRO DE SALES-NETO, J. et al. Anti-inflammatory potential of pyocyanin in LPS-stimulated murine macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 41, n. 1, p. 102–108, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1555845>>.

- MARTIN, T. R.; MATUTE-BELLO, G. Experimental Models and Emerging Hypotheses for Acute Lung Injury. **Critical Care Clinics**, v. 27, n. 3, p. 735–752, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2011.05.013>>.
- MARTIRE-GRECO, D. et al. Interleukin-10 controls human peripheral PMN activation triggered by lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 62, n. 3, p. 426–432, 1 jun. 2013.
- MARZIO, R. et al. Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. 3, p. 349–355, 1997.
- MASON, C.; DOOLEY, N.; GRIFFITHS, M. Acute respiratory distress syndrome. **Clinical medicine (London, England)**, v. 16, p. s66–s70, 2016.
- MATHEUS, M. E. et al. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. **European Journal of Pharmacology**, v. 556, n. 1–3, p. 200–206, 2007.
- MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, 2008.
- MCLOUGHLIN, R. M. et al. Differential Regulation of Neutrophil-Activating Chemokines by IL-6 and Its Soluble Receptor Isoforms. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 9, p. 5676 LP – 5683, 1 maio 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/172/9/5676.abstract>>.
- MCLOUGHLIN, R. M. et al. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9589 LP – 9594, 5 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/102/27/9589.abstract>>.
- 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. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.
- MEHTA, S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. **Vascular Pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 390–403, 2005.
- MILLER, M. C.; MAYO, K. H. Chemokines from a structural perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 1–16, 2017.
- MOKRA, D.; KOSUTOVA, P. Biomarkers in acute lung injury. **Respiratory**

Physiology and Neurobiology, v. 209, p. 52–58, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.10.006>>.

MORELL, F. The Berlin Definition of ARDS versus Pathological Evidence of Diffuse Alveolar Damage. n. 1, p. 675–677, 2013.

MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. SHORT COMMUNICATIONS A Tertiary Phosphine-catalyzed with Reaction Aldehydes of Acrylic Compounds Ken-ichi MORITA , Zennosuke SUZUKI and Hiromitsu HIROSE The Basic Research Laboratories , Toyo Rayon Company ,. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 41, n. 1949, p. 2815, 1968.

MØRLAND, B.; KAPLAN, G. Macrophage activation in vivo and in vitro.

Experimental Cell Research, v. 108, n. 2, p. 279–288, 1977.

MORRIS, R.; KERSHAW, N. J.; BABON, J. J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. **Protein Science**, v. 27, n. 12, p. 1984–2009, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MÜLLER, N. et al. The role of inflammation in schizophrenia. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. OCT, 2015.

MURATA, K. et al. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. **International Immunology**, v. 15, n. 8, p. 987–992, 2003.

MURATA, M. Inflammation and cancer. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 23, n. 1, 2018.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>>.

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 4, p. 253–275, 2020.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.3790>>.

NGAMSRI, K.-C. et al. CX3CR1 Depletion Promotes the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Aggravates Acute Peritonitis. **Shock (Augusta, Ga.)**,

2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001733>>.
- NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 694–707, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>>.
- O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477–487, 2008.
- ORTEGA-GÓMEZ, A.; PERRETTI, M.; SOEHNLEIN, O. Resolution of inflammation: An integrated view. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 5, p. 661–674, 2013.
- OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 4, p. 495–505, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.010>>.
- OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>>.
- OZINSKY, A. et al. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. **Journal of Endotoxin Research**, v. 6, n. 5, p. 393–396, 2000.
- 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, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84938897501&partnerID=40&md5=8f138389179b00bf34d44b90bb16d6f6>>.
- PANETTIERI, R. A. The Role of Neutrophils in Asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 38, n. 4, p. 629–638, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.06.005>>.
- PAPI, S.; AHMADIZAR, F.; HASANVAND, A. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. **Immunopathologia Persa**, v. 5, n. 1, p. e08–e08, 2019.
- PARK, W. Y. et al. Cytokine Balance in the Lungs of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. n. 17, p. 1896–1903, 2001.
- PATRA, A. et al. Isoxazole-based derivatives from Baylis-Hillman chemistry: Assessment of preliminary hypolipidemic activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 2269–2276, 2003.
- PATRA, R.; CHANDRA DAS, N.; MUKHERJEE, S. Targeting human TLRs to combat COVID-19: A solution? **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 2, p. 615–617, 2021.

- PEARSON, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, 2001.
- 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**, v. 195, n. 7, p. 860–870, 2017.
- PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 8, p. 1949–1967, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.007>>.
- POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007.
- POBER, J. S.; SESSA, W. C. Inflammation and the blood microvascular system. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2015.
- PRAME KUMAR, K.; NICHOLLS, A. J.; WONG, C. H. Y. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 551–565, 2018.
- QIN, X. et al. LL-37 and its analog FF/CAP18 attenuate neutrophil migration in sepsis-induced acute lung injury. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 4863–4871, 2019.
- RABELO SOCCA, E. A. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: A molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 209, n. 1, p. 48–55, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.019>>.
- RAJARATHNAM, K. et al. **How do chemokines navigate neutrophils to the target site: Dissecting the structural mechanisms and signaling pathways** Cellular Signalling Elsevier Inc., , 1 fev. 2019. .
- REIKERAS, O.; BORGÉN, P. Activation of markers of inflammation, coagulation and fibrinolysis in musculoskeletal trauma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 9–12, 2014.
- REVILLE, K. et al. Lipoxin A 4 Redistributes Myosin IIA and Cdc42 in Macrophages: Implications for Phagocytosis of Apoptotic Leukocytes . **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1878–1888, 2006.
- ROSSOL, M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379–446, 2011.

- ROUSSEAU, S. et al. TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF α in LPS-stimulated macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 2, p. 149–154, 2008.
- ROUZER, C. A. et al. Mouse peritoneal macrophages release leukotriene C in response to a phagocytic stimulus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 8 I, p. 4928–4932, 1980.
- SABAT, R. IL-10 family of cytokines. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 315–324, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.11.001>>.
- SANCHO, D. et al. CD69 targeting differentially affects the course of collagen-induced arthritis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 6, p. 1233–1241, 2006.
- SANCHO, D.; GÓMEZ, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 136–140, 2005.
- SARAIVA, M. et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. 1–19, 2020.
- SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.
- SAWANT, K. V. et al. Chemokine CXCL1-Mediated Neutrophil Trafficking in the Lung: Role of CXCR2 Activation. **Journal of Innate Immunity**, v. 7, n. 6, p. 647–658, 2015.
- SAWANT, K. V. et al. Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. **Scientific Reports**, v. 6, p. 4–11, 2016.
- SCHERLE, P. A. et al. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 10, p. 5681–6, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820549>>.
- SCHIMMEL, L.; HEEMSKERK, N.; VAN BUUL, J. D. Leukocyte transendothelial migration: A local affair. **Small GTPases**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1197872>>.
- SCHONTHALER, H. B.; GUINEA-VINIEGRA, J.; WAGNER, E. F. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. SUPPL. 1, 2011.

- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1191–1197, 2005.
- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 252–259, 2007.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.
- SIKKA, G. et al. Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 128–135, 1 fev. 2013.
- SILVA, M. T.; CORREIA-NEVES, M. Neutrophils and macrophages: The main partners of phagocyte cell systems. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUL, p. 2008–2013, 2012.
- SILVA, J.S.F **Efeito anti-inflamatório de ouabaína em modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. p.102. 2016.
- SIRONI, M. et al. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 2, p. 549 LP – 553, 15 jan. 1989. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/142/2/549.abstract>>.
- STORTZ, J. A. et al. Murine models of sepsis and trauma: Can We bridge the gap? **ILAR Journal**, v. 58, n. 1, p. 90–105, 2017.
- TAN, S. Y.; WENINGER, W. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. **Current Opinion in Immunology**, v. 44, p. 34–42, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2016.11.002>>.
- TANG, Y. L. et al. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of new chalcone derivatives bearing bispiperazine linker as IL-1 β inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 98, p. 103748, 1 maio 2020.
- TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-03111-8>>.
- TESTI, R. et al. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, n. 3, p. 701–707, 1990.

- THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 562–572, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMra1608077>>.
- UCIECHOWSKI, P.; DEMPKE, C. M. Interleukin-6 : A Masterplayer in the Cytokine Network. 2020.
- UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, n. 3, p. 176–180, 2003.
- UNGPRASERT, P. et al. Individual non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **European Journal of Internal Medicine**, v. 26, n. 4, p. 285–291, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.03.008>>.
- VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: Clinical relevance. **Heart**, v. 85, n. 3, p. 342–350, 2001.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034.1, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>>.
- VASCONCELLOS, M. L. A. A. et al. Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*. **Pest Management Science**, v. 62, n. 3, p. 288–292, 2006.
- VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, n. February, p. 391–412, 2018.
- WALLACH, D. The cybernetics of TNF: Old views and newer ones. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 50, p. 105–114, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.014>>.
- WANG, C. et al. 35085597. v. 412, n. July, 2001.
- WANG, H. Y. et al. Anti-CD69 monoclonal antibody treatment inhibits airway inflammation in a mouse model of asthma. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 16, n. 7, p. 622–631, 2015.
- WANG, X. et al. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 2, 2019.
- WEI, F. et al. Partial liquid ventilation–induced mild hypothermia improves the lung

- function and alleviates the inflammatory response during acute respiratory distress syndrome in canines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 118, n. May, p. 109344, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109344>>.
- WEN, A. Y.; SAKAMOTO, K. M.; MILLER, L. S. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 11, p. 6413–6419, 2010.
- WILLIAMS, D. M. Clinical pharmacology of corticosteroids. **Respiratory Care**, v. 63, n. 6, p. 655–670, 2018.
- WU, B. C.; LEE, A. H.-Y.; HANCOCK, R. E. W. Mechanisms of the Innate Defense Regulator Peptide-1002 Anti-Inflammatory Activity in a Sterile Inflammation Mouse Model. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 10, p. 3592–3603, 2017.
- XAVIER, F. J. S. et al. Synthesis and In Vitro Anti Leishmania amazonensis Biological Screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts Prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 11, p. 1–12, 2016.
- YAMAUCHI, K. et al. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in CD69-deficient mice after intratracheal bleomycin. **Respiratory Research**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2011.
- YOSHIDA, L. S.; TSUNAWAKI, S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- α . **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1377–1385, 1 out. 2008.
- YUN, Y. et al. Increased CD69 expression on activated eosinophils in eosinophilic chronic rhinosinusitis correlates with clinical findings. **Allergology International**, v. 69, n. 2, p. 232–238, 2020.
- ZARBOCK, A.; ALLEGRETTI, M.; LEY, K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 3, p. 357–364, 2008.
- ZEESHAN, S. et al. N-Pyrazoloyl and N-thiopheneacetyl hydrazone of isatin exhibited potent anti-inflammatory and anti-nociceptive properties through suppression of NF- κ B, MAPK and oxidative stress signaling in animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 68, n. 7, p. 613–632, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00011-019-01245-9>>.
- ZELOVÁ, H.; HOŠEK, J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 641–651, 2013.

ZHANG, C.; YANG, M.; ERICSSON, A. C. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–12, 2021.

ZHENG, C. et al. Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. January, p. 1–12, 2020.

ZHONG, J.; SHI, G. Editorial: Regulation of inflammation in chronic disease. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, p. 1–2, 2019.

ZHONG, N. J. et al. Recent advances in the annulation of Morita-Baylis-Hillman adducts. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 29, p. 5214–5227, 2018.

ZHOU, H.; FAN, E. K.; FAN, J. Cell-Cell Interaction Mechanisms in Acute Lung Injury. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 55, n. 2, p. 167–176, 2021.

ZHOU, X.; DAI, Q.; HUANG, X. Neutrophils in acute lung injury. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 17, p. 2278—2283, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.2741/4051>>.

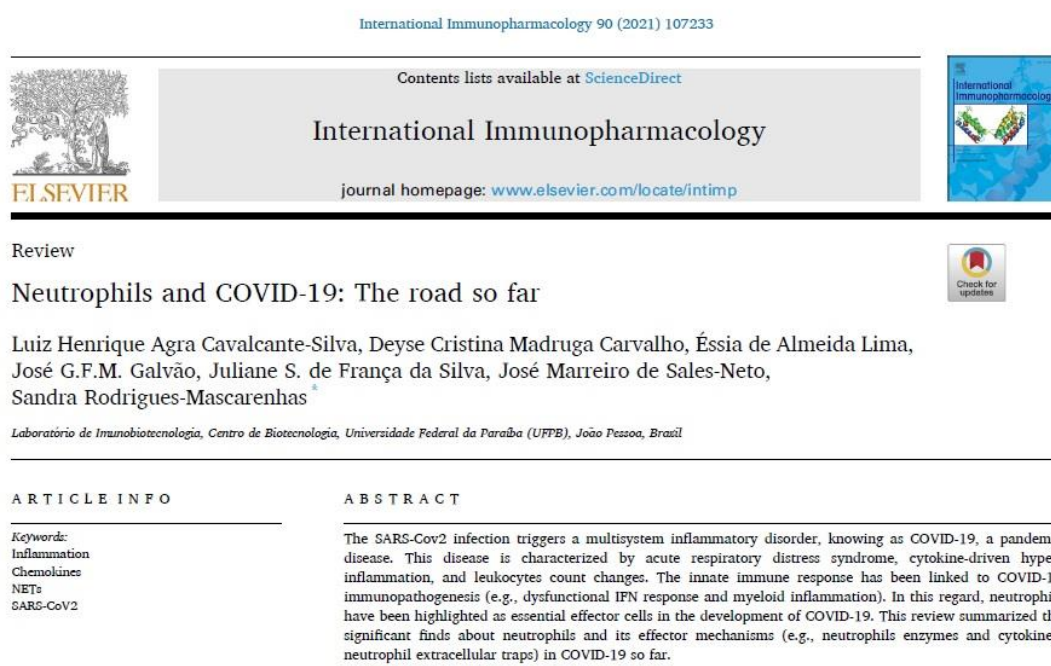
ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M. R. The activation antigen CD69. **Stem Cells**, v. 12, n. 5, p. 456–465, 1994.

ZINGONI, A. et al. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94/NKG2-A inhibitory receptor. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 2, p. 644–651, 2000.

8. APÊNDICE

A- Produção científica

1- Neutrophils and covid-19: The road so far. International Immunopharmacology (Fator de impacto:3,943). 2021 (artigo publicado).



1. Introduction: COVID-19

COVID-19 (Coronavirus disease 2019) is an infectious inflammatory disease caused by SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) [1], a new type of coronavirus identified in China in December 2019 after several patients were diagnosed with nonspecific pneumonia [2]. The coronavirus outbreak began in Wuhan, the capital of Hubei province, and quickly spread across continental dimensions, turning Covid-19 into a pandemic disease [3].

Coronaviruses are single-stranded RNA viruses that are characterized by having corona-like projections on their surface. There are four main proteins in the structure of these microorganisms, including the spike protein (S), which is related to the host cell mechanism of invasion [4]. The SARS-CoV-2 is the third virus of the β coronavirus group to demonstrate the capacity to infect humans with pandemic potential [5]. SARS-CoV and the MERS-CoV (Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus) were responsible for previous relevant outbreaks of respiratory disease in 2003 [6,7] and 2012 [8,9], respectively.

Human-to-human transmission occurs through direct contact or respiratory droplets from infected individuals, whether symptomatic or asymptomatic [10–12]. Several reports have suggested that other forms of transmission, such as the fecal-oral route [13–16] and intrauterine vertical transmission, may also happen [17,18]. However, more studies need to be carried out to confirm this form of transmission.

The clinical features of COVID-19 may appear after an incubation

period of around 5–14 days [19]. Some early symptoms resemble those of other viral respiratory infections, such as those caused by influenza viruses. However, dyspnea and high fever define the main clinical difference between COVID-19 and common cold [20]. Additionally, when compared to the influenza virus, SARS-CoV-2 infection presents greater chances of progressing to severe and critical infections, which require oxygen therapy and ventilatory support [21]. Elderly patients and those with chronic conditions have higher risks of rapid progression to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and multiple organ failure, often resulting in death. These features demonstrate a systemic aspect of this infection, which is accompanied by an intense inflammatory process [22–24].

2. COVID-19 and inflammation

The COVID-19 infection starts by exposure to microdroplets present in the exhalations of infected individuals. Then, the SARS-CoV-2 spreads to the bronchioles and alveolar spaces [25], entrancing into the host cells (e.g., endothelial, epithelial, and smooth muscle cells) by binding the angiotensin-converting enzyme (ACE)-2, a metalloproteinase present on the cell surface [26–29].

In the lung, SARS-CoV-2 infects the alveolar cells (type I and II pneumocytes and alveolar macrophages) and then starts intracellular replication in pulmonary tissues. Type I and III interferons (IFN) production is an early defense mechanism in the alveolar cells [25].

* Corresponding author.

E-mail address: sandra@cbiotec.ufpb.br (S. Rodrigues-Mascarenhas).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107233>

Received 17 September 2020; Received in revised form 13 November 2020; Accepted 22 November 2020

Available online 30 November 2020

1567-5769/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

2- Morita-Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) reduces the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury. Inflammation (Fator de impacto:3,212). 2021 (artigo submetido em 18/02/2021).

Inflammation

Morita-Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) reduces the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IFLA-D-21-00147	
Full Title:	Morita-Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) reduces the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury	
Article Type:	Original Article	
Keywords:	ALI; ARDS; immunomodulation; MBHA; isatin	
Corresponding Author:	Sandra Rodrigues-Mascarenhas Universidade Federal da Paraíba João Pessoa, BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal da Paraíba	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Juliane Santos de França da Silva	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Juliane Santos de França da Silva Deyse Cristina Madruga Carvalho Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira Tayná Rodrigues Olegário Rhuan Karlos Santos Mendes Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos Claudio Gabriel Lima-Junior Sandra Rodrigues-Mascarenhas	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (2951/2014)	Not applicable
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Not applicable
Abstract:	Acute lung injury is a multifactorial pulmonary inflammatory disease with a high mortality rate, where pharmacotherapy is not well established. Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) are a group of synthetic molecules with numerous described biological activities including anti-inflammatory action. Accordingly, the aim of this study was to assess whether ISACN, an MBHA, modulates the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury. In this study, BALB/c mice were intraperitoneally treated with 24 mg/kg ISACN and challenged with LPS. It was observed that this treatment reduced the number of total leukocytes and neutrophils, protein leakage and the production of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the bronchoalveolar space, without interfering with the production of chemokine CXCL1. In addition, ISACN also caused a significant reduction in the LPS-induced histopathological changes, such as cell infiltration, interstitial edema and hemorrhage, negatively regulating the inflammatory process in the lung. Thus, this work showed for the first time the immunomodulatory action of an MBHA in LPS-induced acute lung injury.	

3- DEPÓSITO DE PATENTE: “Utilização do aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da isatina ISACN para o tratamento da inflamação.” Depósito provado dia 10/08/2021.



10/08/2021 870210072790
11:23

29409161938568477

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 015691 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): UTILIZAÇÃO DO ADUTO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN DERIVADO DA ISATINA ISACN PARA O TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO

Resumo: A presente invenção trata da utilização de uma molécula obtida a partir da síntese de Morita-Baylis-Hillman para o tratamento da inflamação. A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo, que pode levar a eliminação de agentes lesivos e o retorno da homeostase. Entretanto, quando desregulada ou exacerbada a inflamação se torna responsável pela patogênese de inúmeras doenças, sendo os fármacos com propriedades anti-inflamatórias rotineiramente utilizados na clínica. Atualmente, os fármacos disponíveis pra tratar a inflamação apresentam inúmeros efeitos adversos e são potencialmente perigosos quando utilizados a longo prazo. Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas estratégias terapêuticas com fármacos antiinflamatórios mais seguros, toleráveis e eficazes. A invenção aqui descrita, reivindica o efeito farmacológico do aduto de Morita-Baylis-Hillman 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il)acrilonitrila (ISACN) na inflamação. Tendo em vista que os resultados experimentais mostraram que essa molécula apresentou efeito anti-inflamatório, reduzindo simultaneamente vários aspectos da resposta inflamatória aguda como a produção de citocinas inflamatórias e a migração de células imunes para o tecido inflamado.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: SANDRA RODRIGUES MASCARENHAS**CPF:** 05334211799**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Glaube Leite do Egito Reekers, Nº 168, Intermares.**Cidade:** Cabedelo**Estado:** PB**CEP:** 58102-337**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 991 427083**Fax:****Email:** sandra@cbiotec.ufpb.br

Inventor 2 de 10

Nome: JULIANE SANTOS DE FRANÇA DA SILVA**CPF:** 05178869443**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** Rua Rui Tavares da Costa, Nº 202, Apto. 302, Altiplano.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58046-100**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 935853**Fax:****Email:** juliane.franca@ltf.ufpb.br

Inventor 3 de 10

4- Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process *In vitro* and *In vivo*. Inflammation (Fator de impacto:3,212). 2020 (artigo publicado).

Inflammation (© 2020)
DOI: 10.1007/s10753-020-01385-9

ORIGINAL ARTICLE



Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process *In vitro* and *In vivo*

Juliane Santos de França,¹ José Marreiro de Sales-Neto,¹ Deyse Cristina Madruga Carvalho,² Éssia de Almeida Lima,² Tayná Rodrigues Olegário,³ Rhuan Karlos Santos Mendes,³ Claudio Gabriel Lima-Junior,³ Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos,³ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,4}

(Received May 29, 2020; accepted November 17, 2020)

Abstract—Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) are synthetic molecules with several biological actions already described in the literature. It has been previously described that adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) has anticancer potential in leukemic cells. Inflammation is often associated with the development and progression of cancer. Therefore, to better understand the effect of ISACN, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory potential of ISACN both *in vitro* and *in vivo*. Results demonstrated that ISACN negatively modulated the production of inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-6 by cultured macrophages. *In vivo*, ISACN 6 and 24 mg/kg treatment promoted reduced leukocyte migration, especially neutrophils, to the peritoneal cavity of zymosan-challenged animals. ISACN displays no anti-edematogenic activity, but it was able to promote a significant reduction in the production of inflammatory cytokines in the peritoneal cavity. These data show, for the first time, that MBHA ISACN negatively modulates several aspects of the inflammatory response, such as cell migration and cytokine production *in vivo* and *in vitro*, thus having an anti-inflammatory potential.

KEY WORDS: MBHA; inflammation; peritonitis; inflammatory process.

INTRODUCTION

MBH adducts represent a novel group of synthetic molecules that display a wide variety of potent biological activities being explored as drug candidates against several diseases [26, 42, 46, 47, 50]. These compounds are obtained from Morita-Baylis-Hillman (MBH) reaction [17, 35] and represent an important tool for development of new molecules [11]. ISACN (2-[3-hydroxy-2-oxoindolin-3-

¹ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-900, Brazil

² Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB CEP: 58051-900, Brazil

³ Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

⁴ To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB CEP: 58051-900, Brazil. E-mail: sandra@cbiotec.ufpb.br

1- Much more than a cardiotonic steroid: modulation of inflammation by ouabain. *Frontiers in physiology* (Fator de impacto: 3,367). 2017 (artigo publicado)



MINI REVIEW
published: 10 November 2017
doi: 10.3389/fphys.2017.00895



Much More than a Cardiotonic Steroid: Modulation of Inflammation by Ouabain

Luiz H. A. Cavalcante-Silva¹, Éssia de Almeida Lima², Deyse C. M. Carvalho³, José M. de Sales-Neto¹, Anne K. de Abreu Alves², José G. F. M. Galvão¹, Julliane S. de França da Silva¹ and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2,3*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ³ Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Carlos Rosales,
Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico

Reviewed by:

Bruno Vogt,
University of Bern, Switzerland
Timothy J. Moss,
Ritchie Centre, Australia

*Correspondence:

Sandra Rodrigues-Mascarenhas
sandra@cbiotec.ufpb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 06 September 2017

Accepted: 24 October 2017

Published: 10 November 2017

Citation:

Cavalcante-Silva LHA, Lima ÉA,
Carvalho DCM, Sales-Neto JM,
Alves AKA, Galvão JGFM, Silva JSF
and Rodrigues-Mascarenhas S (2017)
Much More than a Cardiotonic
Steroid: Modulation of Inflammation
by Ouabain. *Front. Physiol.* 8:895.
doi: 10.3389/fphys.2017.00895

Since the discovery of ouabain as a cardiotonic steroid hormone present in higher mammals, research about it has progressed rapidly and several of its physiological and pharmacological effects have been described. Ouabain can behave as a stress hormone and adrenal cortex is its main source. Direct effects of ouabain are originated due to the binding to its receptor, the Na⁺/K⁺-ATPase, on target cells. This interaction can promote Na⁺ transport blockade or even activation of signaling transduction pathways (e.g., EGFR/Src-Ras-ERK pathway activation), independent of ion transport. Besides the well-known effect of ouabain on the cardiovascular system and blood pressure control, compelling evidence indicates that ouabain regulates a number of immune functions. Inflammation is a tightly coordinated immunological function that is also affected by ouabain. Indeed, this hormone can modulate many inflammatory events such as cell migration, vascular permeability, and cytokine production. Moreover, ouabain also interferes on neuroinflammation. However, it is not clear how ouabain controls these events. In this brief review, we summarize the updates of ouabain effect on several aspects of peripheral and central inflammation, bringing new insights into ouabain functions on the immune system.

Keywords: ouabain, immune system, peripheral inflammation, cell migration, cytokines, neuroinflammation

INTRODUCTION

Although the cardiotonic steroid ouabain was originally identified as a plant secondary metabolite (e.g., from *Strophantus gratus* and *Acokanthera ouabaio*), it was later described as an endogenous mammalian substance (Hamlyn et al., 1991) such as other cardiotonic steroids (e.g., marinobufagenin and digoxin) (Bagrov et al., 2009). Ouabain was found in bovine adrenal gland (Laredo et al., 1994; Schneider et al., 1998), adrenal gland tumors (Blanco and Wallace, 2013), bovine hypothalamus (Tymiak et al., 1993), bovine hypophysis (Schoner, 2002), and human plasma (Hamlyn et al., 1991; Ferrandi et al., 1997). It is noteworthy that ouabain isolated from mammalian tissues and body fluids is structurally, biochemically, and immunologically indistinguishable to ouabain isolated from plants (Schoner, 2002).

9. ANEXO

Anexo A - Certidão CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da ação bioativa de produtos naturais e/ou sintéticos com potencial anti-inflamatório", protocolada sob o CEUA nº 2921050818 (ID 000422), sob a responsabilidade de **Sandra Rodrigues Mascarenhas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 01/11/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the bioactive action of natural and / or synthetic products with anti-inflammatory potential", utilizing 72 Heterogenics mice (72 females), 288 Isogenics mice (288 males), protocol number CEUA 2921050818 (ID 000422), under the responsibility of **Sandra Rodrigues Mascarenhas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 11/01/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 10/2018 a 03/2021

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Unidade de Produção Animal IPeFarM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [72](#)

Linhagem: [Mus musculus - Swiss](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Origem: [Unidade de Produção Animal IPeFarM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [288](#)

Linhagem: [Mus musculus - Balb/C](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Imunofarmacologia alocado na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

João Pessoa, 12 de novembro de 2018

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba