



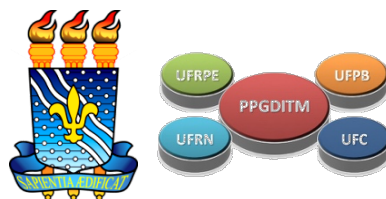
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
UFPB/UFRN/UFC/UFRPE

LARISSA RODRIGUES BERNARDO

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA MILONINA NO MODELO
MURINO DE LESÃO PULMONAR AGUDA E ESTUDOS *IN SILICO*

João Pessoa – PB

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
UFPB/UFRN/UFC/UFRPE

LARISSA RODRIGUES BERNARDO

AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA MILONINA NO MODELO
MURINO DE LESÃO PULMONAR AGUDA E ESTUDOS *IN SILICO*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de DOUTORA em DESENVOLVIMENTO e INOVAÇÃO TECNOLÓGICA em MEDICAMENTOS (Ensaio não-clínicos e clínicos)

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Marcia Regina Piuvezam

João Pessoa

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B523a Bernardo, Larissa Rodrigues.

Avaliação do mecanismo de ação da milonina no modelo murino de lesão pulmonar aguda e estudos in silico / Larissa Rodrigues Bernardo. – João Pessoa, 2022.
116 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS.

1. Terapêutica – Alcaloide morfinâmico. 2. Akt/NFkB.
3. Lesão pulmonar aguda. 4. Imunomodulação. 5. Estudos in silico. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
UFPB/UFRN/UFC/UFRPE

LARISSA RODRIGUES BERNARDO

Tese avaliada em 16/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Marcia Regina Piuvezam - UFPB
(presidente)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida - UFPB
(Examinador Interno)

Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
(Examinador Interno)

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

Prof.^a Dr.^a Glaucia Verissimo Faheina Martins

2022

*Dedico aos meus pais,
Rubens e **Rosemary**, pela
inspiração, força e amor que
me faz seguir em frente.*

*Meus irmãos **Erick**, **Lorena**
e **Raíssa** por me apoiarem.*

*Ao meu marido **Bertúlio**,
maior incentivador e
companheiro dessa fase.*

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

- Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Primeiramente **agradeço a Deus**, por ter propiciado a existência da vida e de tantos mistérios que instigam o ser humano na busca de sua compreensão.

Aos meus pais Rubens e Rosemary, a minha avó Raimunda e aos meus irmãos Erick, Raíssa e Lorenna pelo amor, carinho e apoio nos momentos bons e difíceis dessa caminhada. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu marido, Bertúlio, obrigada pelo companheirismo, amor, apoio, incentivo, pela força e paciência. Você acompanhou e me ajudou a superar todos os obstáculos e dificuldades. Você é uma inspiração! Obrigada a sua família que também se tornou a minha.

A minha orientadora Marcia Piuvezam por acreditar no meu potencial e depositar em mim sua confiança para a realização deste estudo. Obrigada pela lição e todo o aprendizado. Trabalhar com você antes de tudo foi uma lição de competência. Será para mim uma eterna mestra.

Aos colegas e amigos que laboratório me trouxe: Laércia, Larissa, Cosmo, João, Louise, Allysson, Raquel, Vinícius e Bruno muito obrigada pela amizade e aos momentos maravilhosos que compartilhamos juntos. Muito obrigada ao **‘teamblack’** pela disposição e dedicação às longas horas de experimento. Sou eternamente grata a vocês, muito obrigado por terem feito tudo parecer mais fácil, por terem me incentivado a conquistar e acreditar mesmo nas dificuldades, estarei na torcida por cada um, estarão sempre presentes em meu coração!

Aos professores e colaboradores desse trabalho: **Dr. Adriano Alves e Rubens Filho** pela análise histológica, **Dr. Marcus Tullius e Mayara Maia** pela análise *in silico* e **Dr. José Barbosa-Filho** pelo fornecimento da substância teste. Muito obrigada pela contribuição!

Aos amigos de mestrado e doutorado: Francielly, Vanessa, Angélica, Sarah, Laísa, Diana, Mayara, Giulian, Aleson, Poliane, Ana Laura, Humberto, seja pelo companheirismo, risadas e momentos icônicos que as disciplinas em outros estados proporcionaram, ou, pela palavra de apoio e incentivo que foram necessárias. São amigos que levarei comigo e que representam uma das melhores coisas que ganhei nessas fases.

As amigas que a graduação me deu: **Polyanna, Daiana, Jéssica** e seus cônjuges **Gustavo, Erick** e **José Nildo** que formam 'Os fechados' pelo laço de amizade que tornou esta jornada mais leve.

Agradeço à Universidade de Paraíba por essa longa estadia desde a graduação e toda infraestrutura a mim ofertada para que me tornasse uma profissional. **À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ)** pelo apoio financeiro, **a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos**, em especial a **Adriana**, pela atenção e paciência e **aos professores** pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

A todos os funcionários do Ipefarm, por todo o trabalho desenvolvido nos laboratórios!

A todos que, de alguma forma, tenham me ajudado em algum momento que precisei. Meu muito obrigada!

RESUMO

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma patologia de origem inflamatória com infiltrado de neutrófilos, lesão da barreira alvéolo-capilar, produção de citocinas levando a insuficiência respiratória aguda. A complexidade dos eventos fisiológico/imunológico, dificulta o desenvolvimento de uma farmacoterapia efetiva. Assim, estratégias terapêuticas que promovam a resolução da inflamação vêm sendo desenvolvidas, tendo os produtos naturais como fontes de novas moléculas anti-inflamatórias. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório e mecanismo de ação da milonina, alcaloide morfinâmico de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) no modelo murino a LPA. Para tal, camundongos BALB/c foram desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com milonina (2,0 mg/kg). Vinte e quatro horas após o desafio, os animais foram eutanasiados, e o lavado broncoalveolar (BAL), sangue e pulmões foram coletados para as análises celulares e moleculares. Para a predição de alvos moleculares e perfil farmacocinético e farmacodinâmico, foi realizado estudos *in silico* utilizando o software ADMET e Osiris. O tratamento com a milonina inibiu a migração de células inflamatórias para o pulmão, principalmente de neutrófilos, reduziu o exsudato proteico, edema pulmonar, e as citocinas, IL-1 β , IL-6 e TNF- α no BAL, apenas a IL-6 foi reduzida a nível sistêmico. As alterações histológicas foram atenuadas com o tratamento com a milonina, com redução de leucócitos e manutenção da arquitetura bronquicoalveolar, confirmadas por dados morfométricos. O efeito anti-inflamatório da milonina está associado à inibição da kinase B (ou Akt) e do fator nuclear κ B (NF κ B). Estudos *in silico* de docking molecular mostraram que o alcaloide apresentou energia de ligação de -43.96 kcal/mol e formou interações hidrofóbicas com os aminoácidos Ile124 e Phe126 no receptor MD-2 associado ao receptor *Toll Like*-4. O alcaloide apresentou um promissor perfil ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) relacionado aos parâmetros de segurança e boa disponibilidade. Portanto, a milonina apresentou efeito imunomodulador no processo inflamatório da lesão pulmonar aguda associado a fatores reguladores dos genes de citocinas inflamatórias, e com boa segurança e biodisponibilidade colocando-a como uma potencial molécula para o tratamento da inflamação pulmonar.

Palavras-chaves: Alcaloide morfinâmico; Akt/NF κ B; lesão pulmonar aguda; imunomodulação; estudos *in silico*.

ABSTRACT

Acute lung injury (ALI) is a pathology of inflammatory origin with neutrophil infiltration, damage to the alveolar-capillary barrier, production of cytokines leading to acute respiratory failure. The complexity of physiological/immunological events makes it difficult to develop an effective pharmacotherapy. Thus, therapeutic strategies that promote the resolution of inflammation have been developed, using natural products as sources of new anti-inflammatory molecules. In this context, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory potential and mechanism of action of milonine, a morphine alkaloid from *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) in the murine model of ALI. For this, BALB/c mice were challenged with lipopolysaccharide (LPS) and treated with milonine (2.0 mg/kg). Twenty-four hours after the challenge, the animals were euthanized, and bronchoalveolar lavage (BAL), blood and lungs were collected for cellular and molecular analysis. For the prediction of molecular targets and pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles, *in silico* studies were performed using ADMET and Osiris software. Treatment with milonine inhibited the migration of inflammatory cells to the lung, mainly neutrophils, reduced protein exudate, pulmonary edema, and cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in BAL, only IL-6 was reduced to a systemic level. The histological changes were attenuated with the treatment with milonine, with a reduction in leukocytes and maintenance of bronchial alveolar architecture, confirmed by morphometric data. The anti-inflammatory effect of milonine is associated with the inhibition of kinase B (or Akt) and nuclear factor κ B (NF κ B). *In silico* molecular docking studies showed that the alkaloid had a binding energy of -43.96 kcal/mol and formed hydrophobic interactions with the amino acids Ile124 and Phe126 at the MD-2 receptor associated with the Toll Like-4 receptor. The alkaloid showed a promising ADMET profile (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity) related to safety parameters and good availability. Therefore, milonine showed an immunomodulatory effect on the inflammatory process of acute lung injury associated with regulatory factors of inflammatory cytokine genes, and with good safety and bioavailability, placing it as a potential molecule for the treatment of lung inflammation.

Keywords: acute lung injury; Akt/NF κ B; immunomodulation; morphinamic alkaloid; *in silico* studies.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AP-1	Proteína ativadora 1
BAL	<i>Bronchoalveolar lavage</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CADD	<i>Computer Aided Drug Design</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CS	Corticosteroides
CYP	Citocromo
E.P.M	Erro padrão da média
IKK	Quinase I κ B
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
IL-23	Interleucina 23
i.n	Instilação nasal
IRF3	Interferon regulatório 3
LIMFA	Laboratório de Imunofarmacologia
LPA	Lesão pulmonar aguda
LPIVM	Lesão pulmonar aguda induzida por ventilação mecânica
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MD-2	Proteína de diferenciação mieloide 2
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88
NFκB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator nuclear eritróide-2 relacionado ao fator 2
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PaO₂/FiO₂	Pressão arterial de oxigênio/ fração inspirada de oxigênio

PEEP	Pressão positiva expiratória final
PD&I	Pesquisa, desenvolvimento e inovação
PGE₂	Prostaglandina E2
P-gp	Glicoproteína de permeabilidade
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
p65 NFκB	Porção 65 do NFκB
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SOCS	Supressor de sinalização de citocinas
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
Th17	Célula T <i>helper</i> 17
TLR4	<i>Toll Like receptors 4</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fator associado ao receptor TNF
TRAM	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	Proteína adaptadora Interferon-β contendo o domínio TIR
UTI	Unidade Terapia Intensiva
v.o	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão esquemática do processo patológico da lesão pulmonar aguda (LPA).

Figura 2. Fases patogênicas sequenciais: exsudativa (A), proliferativa (B) e fibrótica (C) na patogênese da lesão pulmonar aguda (LPA).

Figura 3. Visão esquemática do reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) com receptor Toll like-4 (TLR4).

Figura 4. Visão esquemática da cascata de sinalização pelo receptor Toll like-4 (TLR4) induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS).

Figura 5. Estrutura tridimensional da milonina.

Figura 6. Esquema de realização da técnica de docking molecular

Figura 7. Esquema utilizado do protocolo da lesão pulmonar aguda (LPA).

Figura 8. Representação esquemática do protocolo de contagem de células totais e diferenciais.

Figura 9. Representação esquemática do protocolo para quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar (BAL).

Figura 10. Representação do protocolo para obtenção do índice do edema (I_e) pela razão do peso úmido (P_u) e seco (P_s) do pulmão.

Figura 11. Representação do ensaio imunoenzimático de ELISA do tipo sanduíche.

Figura 12. Representação do protocolo de citometria de fluxo para obtenção da expressão Akt e p-65NF- κ B.

Figura 13. Histologia de pulmões de camundongos submetidos ao protocolo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzido por lipopolissacarídeo (LPS)

Figura 14. Estrutura do receptor Toll like-4 e proteína diferenciação mieloide 2 (TLR4/MD-2) complexado a milonina.

Figura 15. Radar de biodisponibilidade da milonina

Figura 16. Mapa conceitual dos estudos *in silico* e *in vivo* com alcaloide milonina na lesão pulmonar aguda

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais diferenças na classificação de lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) segundo a *American-European Consensus Conference (AECC)* e *Berlin*.

Quadro 2. Causas do desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA)

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Análise *in silico* das características físico-químicas da milonina

Tabela II – Predição do comportamento da milonina para absorção, interação BHE, P-gp e isoformas de CYP450

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento com milonina na migração de leucócitos total e diferencial para o espaço broncoalveolar no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Gráfico 2. Efeito do tratamento com milonina na permeabilidade pulmonar no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Gráfico 3. Efeito do tratamento com milonina no edema pulmonar avaliado pela razão úmido/seco (U/S) do pulmão após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS).

Gráfico 4. Efeito do tratamento com milonina sobre níveis de citocinas no lavado broncoalveolar e no soro na lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

Gráfico 5. Dados morfométricos dos pulmões de camundongos com lesão pulmonar aguda (LPA) induzido por lipopolissacarídeo (LPS).

Gráfico 6. Efeito do tratamento com a milonina na expressão da proteína Akt em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA).

Gráfico 7. Efeito do tratamento com a milonina na frequência e intensidade de ativação da proteína intracelular Akt em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA).

Gráfico 8. Efeito do tratamento com a milonina na expressão da porção p65 do fator de transcrição NFκB em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA).

Gráfico 9. Efeito do tratamento com a milonina na frequência de ativação da porção p65 do fator de transcrição NFκB(p65) em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1. A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) - Histórico e classificação.....	24
2.2. Etiologia.....	26
2.3. Epidemiologia - Incidência e Mortalidade.....	27
2.4. Fisiopatologia da LPA.....	29
2.4.1. Fase evolutiva da LPA.....	31
2.5. Vias de sinalização mediadas por fatores de transcrição que contribuem para patogênese da LPA.....	33
2.5.1. Vias de sinalização ativada pelo receptor tipo Toll-4 (TLR4) induzida pelo LPS.....	35
2.6. O modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	38
2.7. Estratégias terapêuticas empregados na LPA.....	40
2.8. Potencial anti-inflamatório de alcaloides.....	41
2.8.1. Considerações sobre o alcaloide milonina, um 8,14-dihidromorfinandeinona.....	42
2.9 Estudos <i>in silico</i> : Docking molecular e predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (ADMET).....	44
3. OBJETIVOS.....	49
3.1. Geral.....	49
3.2. Específicos.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 Animais.....	51
4.2 Obtenção e preparo da Milonina.....	51
4.3 Estudos <i>in vivo</i>	51
4.3.1. Tratamento dos animais.....	51
4.3.2. Protocolo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS.....	52
4.3.3 Contagem de células totais e diferencias do BAL.....	52
4.3.4. Proteína total do lavado broncoalveolar.....	53

4.3.5. Razão do peso úmido/seco.....	54
4.3.6. Coleta de sangue plexo braquial.....	54
4.3.7. Dosagens de citocinas do lavado broncoalveolar e soro.....	55
4.3.8. Análise histológica e morfométricas dos pulmões.....	56
4.3.9. Citometria de fluxo	56
4.4 Estudos <i>in silico</i>	57
4.4.1. Avaliação do docking molecular.....	57
4.4.2. Predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (ADMET).....	58
4.5. Análise estatística.....	58
5. RESULTADOS.....	60
5.1. Efeito do tratamento com a milonina na migração de células totais e diferenciais após 24 h do estímulo com o LPS no modelo de LPA.....	60
5.2. Efeito do tratamento com a milonina na permeabilidade pulmonar após 24h do estímulo com o LPS no modelo de LPA.....	62
5.3. Efeito do tratamento com a milonina sobre o edema pulmonar avaliado pela razão úmido/seco (U/S) do pulmão após 24h do estímulo com o LPS.....	63
5.4. Efeito do tratamento com a milonina sobre níveis de citocinas no lavado broncoalveolar e no soro após 24h do estímulo com o LPS	64
5.5. Efeito do tratamento com a milonina sobre tecido pulmonar após 24h do estímulo com o LPS.....	66
5.6. Efeito do tratamento com a milonina na frequência de expressão da proteína intracelular Akt a partir do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o LPS.....	68
5.7. Efeito do tratamento com a milonina na via de sinalização do NFκB (p65) a partir do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o LPS.....	71
5.8. Análise do resultado <i>in silico</i> : docking molecular.....	74
5.9. Predição de propriedades ADMET.....	76
6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÃO.....	89

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
9. ANEXOS.....	110
9.1 ANEXO I: Certificação do CEUA.....	110
9.2. ANEXO II: Dados gerados no SwissADME para o perfil ADMET da milonina.....	111
9.3. Produção científica (2018-2022).....	114

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A lesão pulmonar aguda (LPA) e seu agravamento, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), são patologias que causam insuficiência respiratória e se caracterizam pela perturbação de células epiteliais e endoteliais nos pulmões, aumento da permeabilidade alvéolo-capilar, formação de edema, influxo de células inflamatórias com predominância de neutrófilos e comprometimento da troca gasosa nos pulmões. A sua etiologia pode ser por diversos fatores, entre eles, infecções virais ou bacterianas que afetam diretamente os pulmões (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina bacteriana considerado um importante desencadeador da LPA, sendo amplamente utilizado em estudos com camundongos para induzir esta patologia (CHIMENTI et al., 2020; MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). Receptores como o *Toll-like 4* (TLR4) presentes em uma gama extensa de células presentes no pulmão reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o LPS, por meio de uma proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2) complexada com TLR4 (DE NARDO, 2015; MAZGAEEN; GURUNG, 2020). Esse reconhecimento estimula uma cascata de sinalização intracelular pró-inflamatória que culmina com a ativação do fator nuclear kappa B (NFκB). O produto dessa ativação induz a produção de grandes quantidades de citocinas, como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e IL-1β (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017) que promovem a progressão da LPA. Desta forma, estudos apontam que uma regulação negativa do NFκB pode ser um potencial alvo terapêutico no tratamento da LPA (YU et al., 2020).

Embora nas últimas décadas tenha havido um grande avanço no estudo da fisiopatologia da LPA/SDRA, a eficácia das abordagens terapêuticas ainda é limitada e o tratamento farmacológico ainda não foi definido. Em adição, a taxa de mortalidade dos pacientes com LPA permanece elevada (em torno de 40-60%) (BELLANI et al., 2016). Portanto, novos tratamentos devem ser desenvolvidos para melhorar os resultados clínicos e reduzir a mortalidade dos pacientes.

Estudos de compostos naturais derivados de plantas, como os alcaloides, vêm demonstrando seus efeitos imunossupressores e atuam melhorando o quadro de desordens inflamatórias (LI et al., 2020). A milonina, um alcaloide da classe dos morfinâmicos, foi isolada e identificada como componente majoritário das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl, planta utilizada na medicina popular do nordeste brasileiro para doenças do trato respiratório (BARBOSA FILHO; AGRA; THOMAS, 1997; DE FREITAS et al., 1995b). Em estudos *in vivo*, o alcaloide demonstrou atividade vasorelaxante (CAVALCANTE et al., 2011), antinociceptiva (SILVA et al., 2017) e anti-inflamatória. Essa última ocorre por inibir a degranulação de mastócitos teciduais, mediadores vasoativos e citocinas em modelos de inflamação aguda (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Entretanto, o desenvolvimento de um fitofármaco não está unicamente limitado à avaliação das atividades biológicas, mas também devem levar em conta os estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), dado que, em alguma dessas fases, existirá a reprovação de até 50% dos novos fármacos testados. Como principais pontos de reprovação podemos citar: baixa biodisponibilidade, efeitos tóxicos e colaterais que levam a perda de tempo e de milhões de reais para as indústrias farmacêuticas (HUGHES et al., 2011; KAR; LESZCZYNSKI, 2020; WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020).

Diante das informações acima mencionadas, e considerando a alta mortalidade na LPA pela falta de terapias específicas, este trabalho teve como objetivo a caracterização da atividade anti-inflamatória da milonina e seu mecanismo em modelo murino induzido por LPS, bem como avaliar o seu perfil preditivo farmacocinético e farmacodinâmico, utilizando ferramentas *in silico*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) – Histórico e Classificação

A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), são patologias inflamatórias pulmonares que ocasionam edema pulmonar não hidrostático (ou seja, edema causado por permeabilidade capilar aumentada), rico em proteínas, causando hipoxemia refratária, afetando a complacência pulmonar e comprometendo a eliminação do dióxido de carbono pelo pulmão (REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI, 2017; WILLIAMS et al., 2021).

Ashbaugh e colaboradores (1967) descreveram pela primeira vez como *Acute Respiratory Distress in Adults* (estresse respiratório agudo em adultos), sendo esse termo utilizado para descrever um grupo de 270 pacientes adultos que manifestavam uma forma específica de insuficiência respiratória. Esses pacientes estavam sendo tratados com ventilação mecânica, dos quais 12 apresentaram sintomas de dispneia grave, taquipneia, cianose, baixa complacência pulmonar, bem como infiltrados difusos no exame radiológico do tórax. Nesse grupo de 12 indivíduos, houveram 7 óbitos, e a partir da análise microscópica concluiu-se que 5 dessas mortes ocorreu como consequência da doença, apresentando um quadro histológico de microatelectasias. Estas são pequenos colapsos alveolares que geram complicações respiratórias, além de congestão vascular, hemorragia, edema pulmonar e formação de membranas hialinas que revestem a superfície alveolar.

Na Conferência de consenso Americana - Europeia (*American-European Consensus Conference - AECC*) de 1994 definiu-se duas classificações relacionadas à gravidade dos sintomas, que podem ser distinguidas a partir do índice de oxigenação – ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$). Os indivíduos com menor grau de hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg) são diagnosticados com LPA, já aqueles com maior grau ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg) são diagnosticados com SDRA (BERNARD et al., 1994). Dessa forma, todos os pacientes com SDRA manifestam LPA, mas nem todo paciente com LPA manifesta SDRA (AMATO et al., 2007).

Em seguida, a definição mais atualizada ocorreu em 2012, conhecida como definição de *Berlin*, sendo estabelecida pela *European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*, *Society Critical Care Medicine (SCCM)* e a *American Thoracic Society (ATS)*, que passou para sete dias o intervalo de tempo entre a LPA e o desenvolvimento da SDRA. Na ocasião, era importante estabelecer uma pressão positiva expiratória final (PEEP) mínima de 5 cmH₂O para melhor classificar a severidade da hipoxemia.

Assim, a LPA foi integrada como um subgrupo da SDRA de acordo com os níveis de oxigenação como: leve (PaO₂/FiO₂ entre 200 e 300 mmHg), moderada (PaO₂/FiO₂ entre 100 e 200 mmHg) e grave (PaO₂/FiO₂ menor que 100 mmHg) (ROTTA et al., 2015). Além disso, a classificação de *Berlin* esclareceu algumas dúvidas deixadas pela definição anterior como o início dos sinais clínicos (RANIERI et al., 2012). Atualmente, acredita-se que a definição de *Berlin* forneça maior validade preditiva para mortalidade do que a AECC (**Quadro 1**).

O termo LPA tem sido menos utilizado na prática clínica, pela dificuldade dos profissionais em distinguir a SDRA leve da LPA, considerando esta última como uma condição mais leve da síndrome. Assim, o termo LPA é usado quando a intenção é avaliar as mudanças morfológicas da enfermidade.

QUADRO 1. principais diferenças na classificação de lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) segundo a *American-European Consensus Conference (AECC)* e *Berlin*.

	Classificação AECC	Classificação Berlin
Início	Instalação aguda	Até uma semana da condição clínica determinante ou piora dos sintomas respiratórios.
Oxigenação	LPA: PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 300 mmHg SDRA: PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 200 mmHg	Leve: PaO ₂ /FiO ₂ 200-300 com PEEP ou CPAP > 5cmH ₂ O; Moderado: PaO ₂ /FiO ₂ 100-200 com PEEP ≥ 5cmH ₂ O. Grave: PaO ₂ /FiO ₂ ≤ 100 com PEEP ≥ 5cmH ₂ O LPA abolido.

Imagem do tórax	Infiltrados bilaterais consistentes com edema pulmonar.	Opacidades bilaterais - não totalmente explicadas por efusões, colapso lobar/pulmonar ou nódulos.
Origem do edema	Pressão de oclusão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg ou nenhuma suspeita clínica de hipertensão arterial esquerda.	Insuficiência respiratória não justificada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga de fluidos; Necessário avaliação objetiva (ex. ecocardiograma) para excluir edema hidrostático se não houver fator de risco presente.

Nota: PEEP, pressão expiratória final positiva; CPAP, pressão positiva contínua nas vias aéreas; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ em mmHg.

Fonte: Adaptado de RANIERI et al., 2012.

2.2. Etiologia

A origem etiológica da LPA pode ser classificada em causas diretas (pulmonar) ou indiretas (extrapulmonar) (**Quadro 2**). As lesões pulmonares diretas afetam os pulmões como uma infecção primária, levando a pneumonia, que pode ser bacteriana, viral ou fúngica. As lesões pulmonares indiretas acometem o pulmão de forma secundária, sendo mais comum na sepse grave, que pode estar relacionada a uma fonte infecciosa não pulmonar, por exemplo, a peritonite.

Em alguns casos, a distinção entre as lesões diretas ou indiretas não é tão simples. Isso devido à possibilidade de as duas injúrias coexistirem. Ademais, condições de predisposição de cada indivíduo, como fatores genéticos, podem ser um primeiro elemento de causa em pulmões saudáveis. Isso, juntamente com a combinação de várias outras causas como listadas no quadro 2 ou um tratamento inadequado, será um determinante para a gravidade da evolução da LPA (DE HARO et al., 2013; WARE, 2006).

Apesar da ventilação mecânica (VM) ser uma importante intervenção para garantir uma oxigenação adequada para o paciente com LPA, a mesma pode ocasionar lesão pulmonar; a chamada Lesão Pulmonar Induzida por Ventilação

Mecânica (LPIVM). Nesse caso, a ventilação gera uma força que tem impacto direto sobre o aparelho respiratório, podendo alterar propriedades funcionais e morfológicas (BIGATELLO; PESENTI, 2009). Isso pode levar à falência de órgãos como coração, rins e fígado, e a anormalidades hematológicas, incluindo anemia e trombocitopenia, ocasionando o óbito do paciente.

Segundo Garcia e Pelosi (2011), os pacientes com a LPA de origem direta e indireta não são idênticos, pois apresentam diferenças morfofuncionais e na resposta a estratégia terapêutica. No entanto, todos os pacientes são similarmente tratados. Considera-se fundamental uma melhor compreensão acerca da LPA para direcionar as estratégias terapêuticas. Assim, talvez seja necessário distinguir não somente entre LPA direta e indireta, mas também entre as diferentes etiologias de LPA.

QUADRO 2. Causas do desenvolvimento da lesão pulmonar aguda (LPA)

Lesão Pulmonar Aguda Direta	Lesão Pulmonar Aguda Indireta
Mais comum	
Pneumonia (bacteriana, fúngica ou viral) Aspiração de conteúdo gástrico	Sepse Trauma severo com choque e múltiplas contusões
Menos comum	
Contusão pulmonar Embolia gordurosa Quase afogamento Inalação de fumaça	Pancreatite Overdose de drogas Transfusão de sangue

Fonte: Adaptado de Thompson, Chambers e Liu (2017).

2.3. Epidemiologia - Incidência e Mortalidade

Um estudo global envolvendo mais de 50 países mostrou que de aproximadamente 30.000 casos de entrada em unidades de terapia intensiva (UTI), 3.022 (ou seja, 10,4%) atenderam aos critérios e foram diagnosticados com a doença, dentre os quais, ~40% vieram a óbito (BELLANI et al., 2016).

Neste mesmo estudo foi verificado também a taxa de mortalidade em UTI em relação ao nível da gravidade: 34,9% para aqueles com leve, 40,3% para aqueles com moderado, e 46,1% para aqueles com quadro grave.

A incidência da LPA tem sido difícil de identificar devido às diferenças demográficas, culturais, econômicas e do sistema de saúde (REZOAGLI; FUMAGALLI; BELLANI, 2017). Os métodos disponíveis para o diagnóstico, os recursos de saúde e a admissão hospitalar acabam gerando uma variação no reconhecimento da LPA. Um exemplo disso é que na cidade Kigali, Ruanda, África, nenhuma ocorrência dessa doença foi relatada quando estabeleceram os critérios em *Berlin* por falta de recursos para realizar o diagnóstico (RIVIELLO et al., 2016).

A ocorrência de LPA nos EUA está estimada em 75 casos por 100.000 habitantes/ano em média, com base em um relatório interno do *National Heart and Lung Institute*, o que é um número bastante elevado se comparado à Europa (5 a 8 casos/100.000 habitantes por ano) (VILLAR; BLANCO; KACMAREK, 2016). As causas dessa diferença no número de casos entre essas localidades podem estar vinculadas pelas diferenças culturais e pelo sistema de saúde.

Em âmbito nacional, um estudo observacional prospectivo, avaliou 14 UTIs em um período de 15 meses em Santa Catarina. Em 7.000 entradas em UTIs foram contabilizados 130 pacientes que atendiam às definições da AECC para LPA, o que equivale a 10,1 casos/100.000 habitantes por ano. Considerando uma média de 28 dias, a taxa de mortalidade correspondeu a 38,5% (CASER et al., 2014). Em um estudo epidemiológico observou-se que dos 2.430 pacientes que deram entrada na UTIs no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 15% foram diagnosticados com LPA/SDRA (FIALKOW et al., 2016).

Os pacientes com LPA/SDRA podem apresentar as mais variadas reações, e suas incapacidades são semelhantes às de outros sobreviventes de doenças críticas. O desfecho da doença depende do estado de saúde pré-mórbido subjacente, do tempo de internação na UTI e do tratamento. Nesse sentido, há relatos de pacientes críticos da forma mais grave, a SDRA, que sobrevivem a esse distúrbio, podendo apresentar problemas após a alta como:

diminuição da cognição, depressão ou estresse pós-traumático, e fraqueza persistente do músculo esquelético (HERRIDGE et al., 2011, 2016).

Outro ponto que está em atual destaque é a pandemia da COVID-19, no qual uma infecção viral respiratória causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) pode levar a pneumonia grave e a SDRA. Os anos de 2020/21 trouxeram novas estimativas na incidência e mortalidade da doença. Até o dia 17 de dezembro de 2021, foram confirmados no mundo mais de 273 milhões de casos de COVID-19 e mais de 5,3 milhões de mortes. No Brasil, até o mesmo dia, já haviam se confirmado mais de 22 milhões de casos e 617 mil óbitos [COVID-19 Map—Johns Hopkins Coronavirus Resource Center <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>].

Dados mostram que entre os pacientes hospitalizados, até 40% poderão desenvolver a LPA/SDRA, que é um fator considerável para causa de morte nessa população (WU et al., 2020; WU; MCGOOGAN, 2020). Apesar da vacinação ter iniciado, o aparecimento de novas cepas resistentes de SARS-CoV-2 podem retardar o avanço da imunidade coletiva e diminuir a eficácia das vacinas atuais. Embora existam esforços globais para o desenvolvimento de ensaios clínicos randomizados, as intervenções farmacêuticas são escassas (HORBY et al. 2021).

2.4. Fisiopatologia da LPA

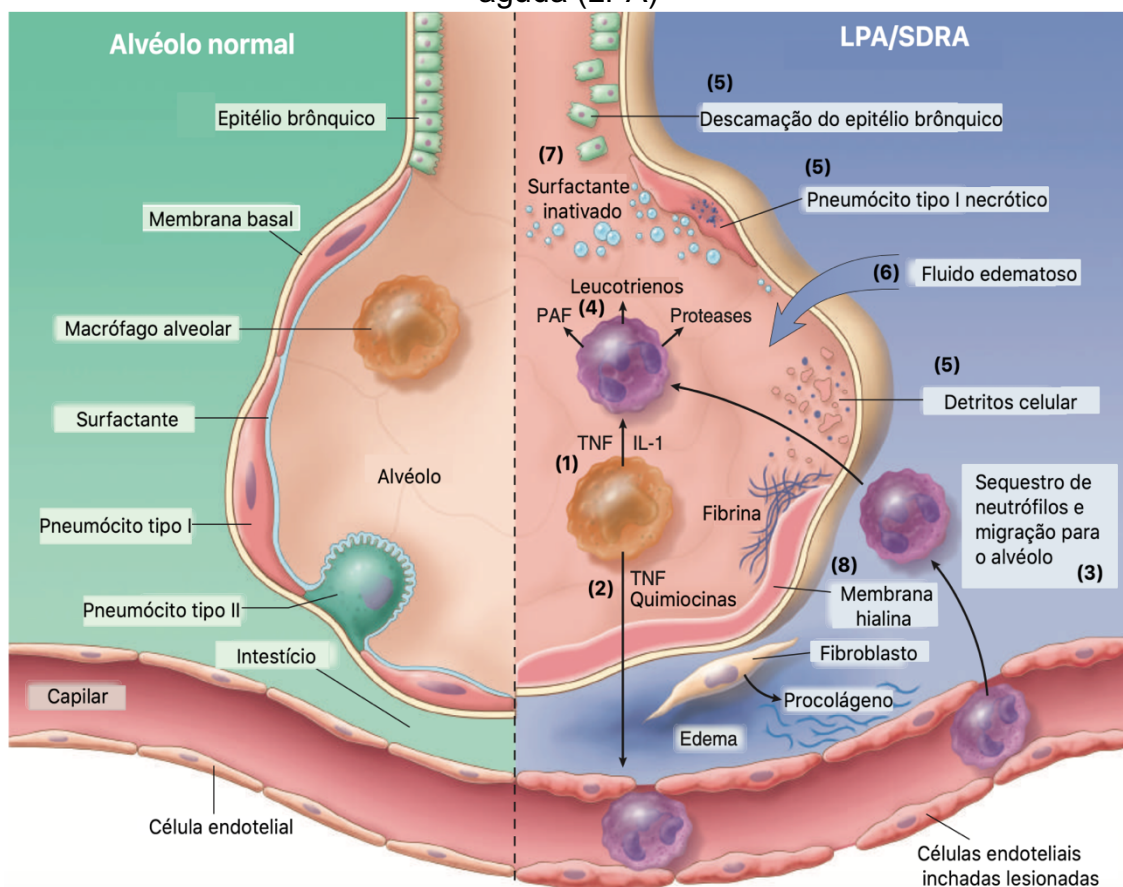
Com a agressão inicial dos pulmões, as células pulmonares, como macrófagos alveolares e pneumócitos, se ativam e são capazes de liberar diversos mediadores na fase inicial, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Essas citocinas atuam no endotélio vascular aumentando a expressão de moléculas de adesão como selectinas e integrinas, que permitem o influxo de leucócitos, principalmente de neutrófilos. Em adição, essas moléculas favorecem a permeabilidade vascular que irá levar a um quadro de exsudação proteica, culminando na formação do edema intersticial, sendo este parâmetro um marco fisiopatológico da LPA (MATTHAY; ZEMANS, 2011; THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017; YANG, et al. 2017).

Com o intenso influxo de neutrófilos no foco inflamatório, e sua degranulação com liberação de citocinas, proteinases, oxidantes, espécies reativas de oxigênio e polipeptídeos catiônicos levam ao aumento do estresse oxidativo local (ZEMANS; COLGAN; DOWNEY, 2009). Isso contribui ainda mais para a destruição da arquitetura dos alvéolos, promovendo mais danos nas células adjacentes, como os pneumócitos tipo I ou II (YANG et al. 2020).

Os pneumócitos tipo I formam a estrutura alveolar e são responsáveis pela troca gasosa nos alvéolos. Os pneumócitos tipo II atuam no transporte de íons e no reparo de células epiteliais, além de secretar o surfactante, substância responsável por diminuir a tensão superficial nos alvéolos e promover a estabilidade alveolar, evitando o seu fechamento (MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012).

Com a ruptura da barreira alvéolo-capilar, o influxo de líquido rico em proteínas e macromoléculas (edema intersticial) para a cavidade alveolar é facilitado, promovendo disfunção e diluição do surfactante. Consequentemente, há acúmulo de líquido nos alvéolos que se depositam em conjunto com restos celulares formando membranas hialinas. Isso gera o colapso alveolar, o que afeta as trocas gasosas e leva a um quadro de hipóxia, característico dessa doença (**Figura 1**) (SWEENEY; MCAULEY, 2016).

FIGURA 1. Visão esquemática do processo patológico da lesão pulmonar aguda (LPA)



Nota: O alvéolo normal (à esquerda), em comparação com o alvéolo lesado na fase inicial da LPA. Com ativação dos macrófagos, citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 β e TNF α) são liberados (1), e os neutrófilos são recrutados (2) e sofrem sequestro na microvasculatura pulmonar, seguido de marginação e saída para o espaço alveolar (3), onde eles sofrem ativação. Os neutrófilos ativados liberam uma variedade de fatores, como leucotrienos, oxidantes, proteases e fator ativador de plaquetas (PAF) (4), que contribuem para danos ao tecido local (5), acúmulo de fluido de edema nos espaços aéreos (6), inativação de surfactante (7) e formação de membrana hialina (8).

Fonte: Adaptado de KUMAR, ABBAS, ASTER, 2017.

2.4.1 Fase evolutiva da LPA/SDRA

Do ponto de vista patológico, a evolução da LPA/SDRA pode ser dividida em três estágios distintos, sendo eles:

(1) Fase exsudativa aguda ou precoce – Neste caso, uma lesão nos pulmões, direta ou indireta, leva a uma resposta inflamatória aguda, com duração de até uma semana. Esse estágio caracteriza-se pela presença de edema intersticial e alveolar, acúmulo de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos. É

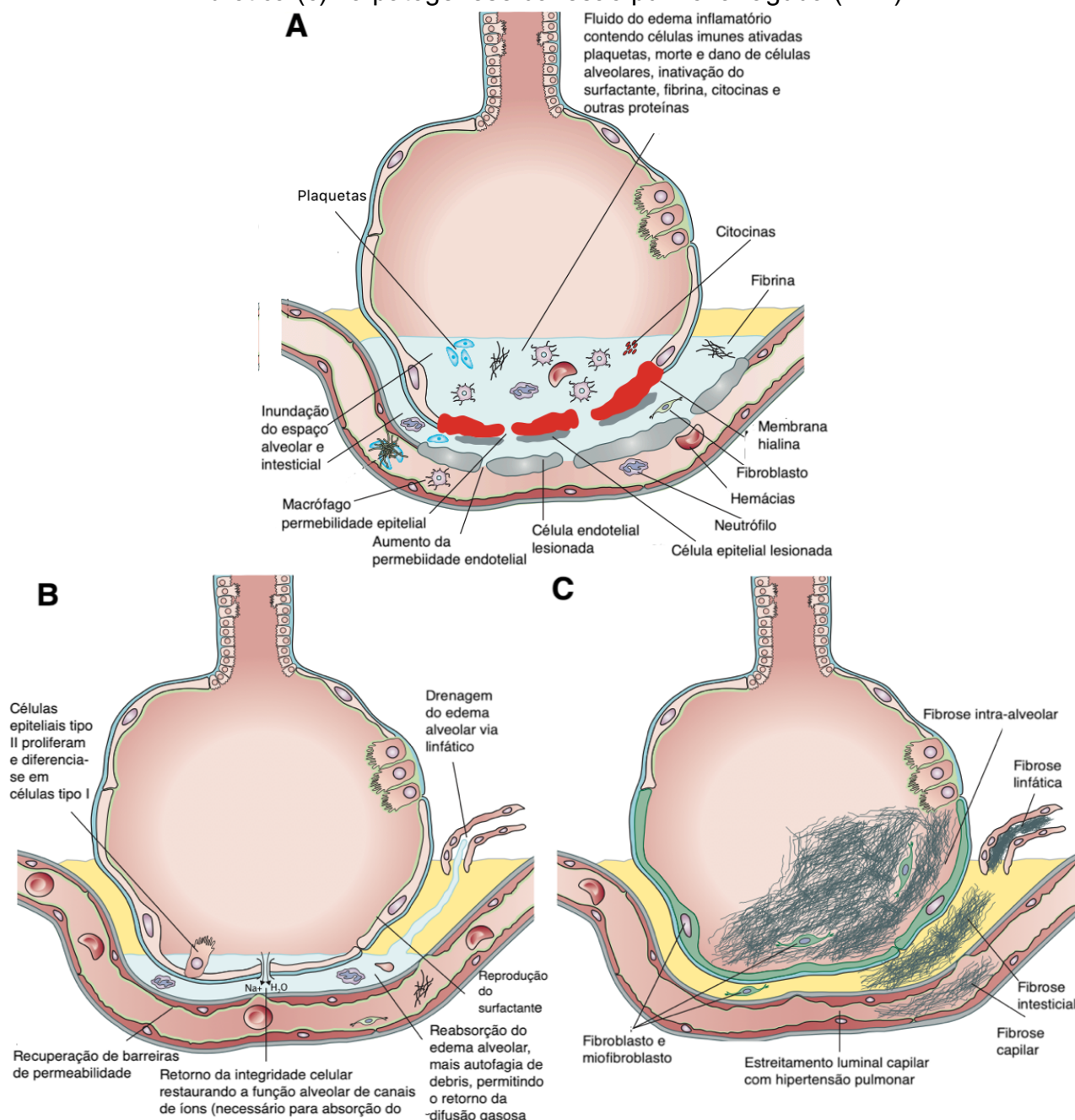
também acompanhado por evidências de lesão endotelial e epitelial, e formação inicial de membranas hialinas, que levam disfunção do surfactante pulmonar.

(2) Fase proliferativa ou fase fibroproliferativa - O edema alveolar começa a ser reabsorvido e há evidências de reparo com a proliferação de células epiteliais alveolares tipo II (pneumócitos tipo II - produtores de surfactante) para diferenciação em células do tipo I. Também pode haver infiltração de fibroblastos com evidência de deposição de fibras colágenas, e essa fase pode durar de uma a três semanas de evolução da doença.

(3) Fase fibrótica (fase de resolução ou recuperação) - Após 14 dias, esta fase apresenta restauração da barreira alvéolo-capilar e caracteriza-se por fibrose pulmonar difusa. A melhora gradual da complacência pulmonar pode ocorrer entre 6 e 12 meses, dependendo da severidade da lesão (BACHOFEN; WEIBEL, 1977; CHEUNG; GRAZIANO; SMITH, 2018; WARE; MATTHAY, 2000) (**Figura 2**).

É importante salientar que as três fases não necessariamente ocorrem em todos os pacientes com LPA/SDRA. Alguns pacientes podem se recuperar da agressão inicial, restabelecendo rapidamente a ruptura da barreira alvéolo-capilar. Em outros casos, o processo é mais lento, não sendo ao certo conhecidas as razões pelas quais duas pessoas expostas à mesma agressão podem ter diferentes progressões da doença, sendo que os fatores genéticos e comorbidades podem ser alguns dos motivos (BELLINGAN, 2002; MATTHAY; WARE; ZIMMERMAN, 2012; SWEENEY; MCAULEY, 2016).

FIGURA 2. Fases patogênicas sequenciais: exsudativa (a), proliferativa (b) e fibrótica (c) na patogênese da lesão pulmonar aguda (LPA)



Fonte: Adaptado de SWEENEY, MCAULEY, 2016.

2.5. Vias de sinalização mediadas por fatores de transcrição que contribuem para patogênese da LPA

Uma das principais causas da LPA é a inflamação generalizada nos pulmões. Muitas das vias de sinalização – especialmente vias dependentes de

fator de transcrição – são ativadas para induzir direta ou indiretamente a resposta inflamatória nesse processo.

Chen e Hua (2020) relataram as participações de algumas vias dependentes de fator de transcrição:

(1) Sinalização do eixo entre o receptor *Toll-like* do tipo 4 e o fator nuclear-kappa B (TLR4/NFκB): os receptores *Toll-like* (TLRs) desempenham papel crucial na imunidade inata. O TLR4 pertence a uma família de receptores transmembrana Tipo I que reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). O reconhecimento de um determinado PAMP pelo TLR4 leva à ativação NFκB, que controla a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e a regulação positiva de moléculas co-estimulatórias em células dendríticas essenciais para ativação de células T (DE NARDO, 2015).

(2) Sinalização do eixo TLR4/AP-1: Outro fator de transcrição que também é ativado pelo TLR4 é a proteína ativadora 1 (AP-1), que similar ao NFκB, induz a resposta imune inata e adaptativa por ativar genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF-α (ROY et al., 2016).

(3) Sinalização Wnt/β-catenin: Esta é uma via de sinalização conservada que funciona em vários processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, padronização de eixos de sinalizações, pluripotência de células-tronco, especificação de destino celular, proliferação, migração celular e inflamação (NUSSE, 2005). Em um modelo murino de LPA induzido por LPS, foi observado que o eixo Wnt/β-catenina contribuiu para a ocorrência de LPA via o desencadeamento da resposta imune do tipo Th17 (célula T *helper* 17), favorecendo a infiltração de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (CHENG et al., 2018). A sinalização Wnt/β-catenina tem ligação com a via de sinalização do NFκB na regulação da resposta à inflamação. Evidências sugerem que a sinalização Wnt/β-catenina desempenha um papel anti-inflamatório dominante ao reprimir a atividade do NFκB (MA; HOTTIGER, 2016).

(4) Sinalização entre fatores reguladores de interferon e transdutor de sinal e ativador de transcrição (IRFs/STATs): Essas moléculas funcionam principalmente na polarização de macrófagos (M1, inflamatório e M2, anti-inflamatório). Uma vez que a citocina IFN- γ se liga ao seu receptor, é induzida a ativação da STAT1 e a interação com IRF5 no citoplasma. Já no núcleo, induzem a ativação de IL-12, IL-23 e o supressor de sinalização de citocinas (SOCS). Essas duas citocinas promovem a polarização do macrófago M1, que por sua vez, dependendo dos estímulos e sinais do microambiente, podem gerar um feedback positivo para o NF κ B e AP-1. Quando há uma elevada quantidade de SOCS, estes se ligam aos resíduos de fosfotirosina do receptor do IFN- γ , inibindo a polarização de macrófagos M1 (CROKER; KIU; NICHOLSON, 2008; HUANG et al., 2018).

Algumas dessas vias de sinalização apresentam ligações em comum, como é o caso da sinalização de NF κ B e AP-1, que dependem da ativação de uma cascata de quinases pela iniciação de TLR4. Em adição, a ativação de NF κ B e AP-1 desempenha um papel dominante na indução da resposta inflamatória por meio da regulação positiva de genes de citocinas pró-inflamatórias nos níveis transcripcionais.

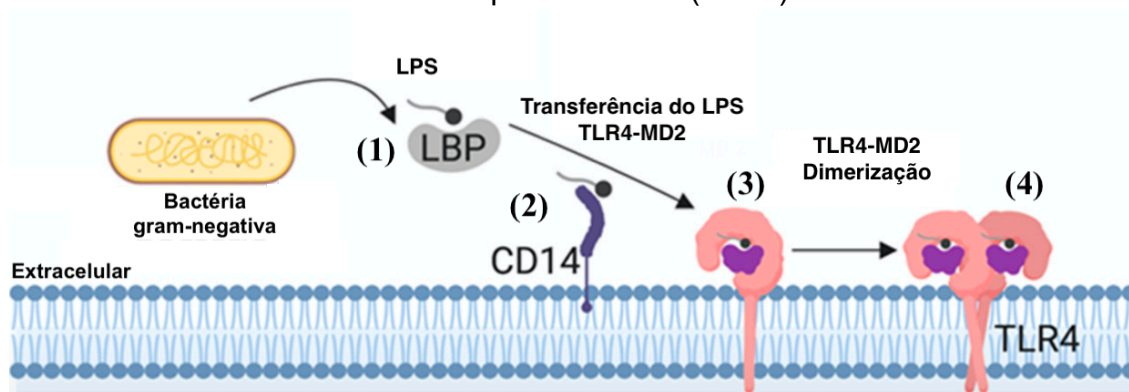
2.5.1 Vias de sinalização ativada pelo TLR4 induzidas pelo LPS

A imunidade inata é considerada a primeira linha de defesa no organismo vertebrado contra agentes agressores. Os TLRs são expressos em várias células da resposta imune, tais como: macrófagos e células dendríticas. Esses participam diretamente do reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, ativando moléculas intracelulares relacionadas aos eventos de sinalização celular que resultam em respostas imunes adequadas e essenciais para a sobrevivência do indivíduo (DE NARDO, 2015).

Um dos PAMPs classificados como clássico é o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina presente na parede de bactérias gram-negativas (SAMPATH, 2018) que promove a ativação de fagócitos. Inicialmente, o LPS interage com a proteína de ligação ao LPS (LBP) presente no sangue. Esse complexo

molecular, por sua vez, catalisa a formação do complexo LPS-CD14. O CD14 é uma proteína expressa na superfície de células imunes responsivas ao LPS, sendo incapaz sozinho de transduzir um sinal intracelularmente porque não possui um domínio transmembrana (KIELIAN; BLECHA, 1995). Nesse sentido, o complexo CD14-LPS percorre a membrana plasmática para interagir com a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2) complexada com o TLR4. Assim, o LPS é transferido para uma bolsa hidrofóbica do MD-2, que leva a uma homodimerização do TLR4, sendo este co-receptor essencial para ativação do sinal intracelular (**Figura 3**) (PARK et al., 2012).

FIGURA 3. Visão esquemática do reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS) com receptor toll like-4 (TLR4)



Nota: (1) Bactérias gram-negativas são cobertas por LPS, e atuam como PAMP no hospedeiro, levando a associação com a proteína de ligação ao LPS (LBP) (2). Em seguida, ocorre a transferência do LPS para proteína CD14 presente nas células imunes, e conduz (3) a uma segunda transferência do LPS para o sítio de ligação na cavidade da proteína acessória MD-2 complexada ao TLR4. (4) Após isso, este complexo TLR4/MD-2/LPS sofre homodimerização e ativação da via de sinalização intracelular.

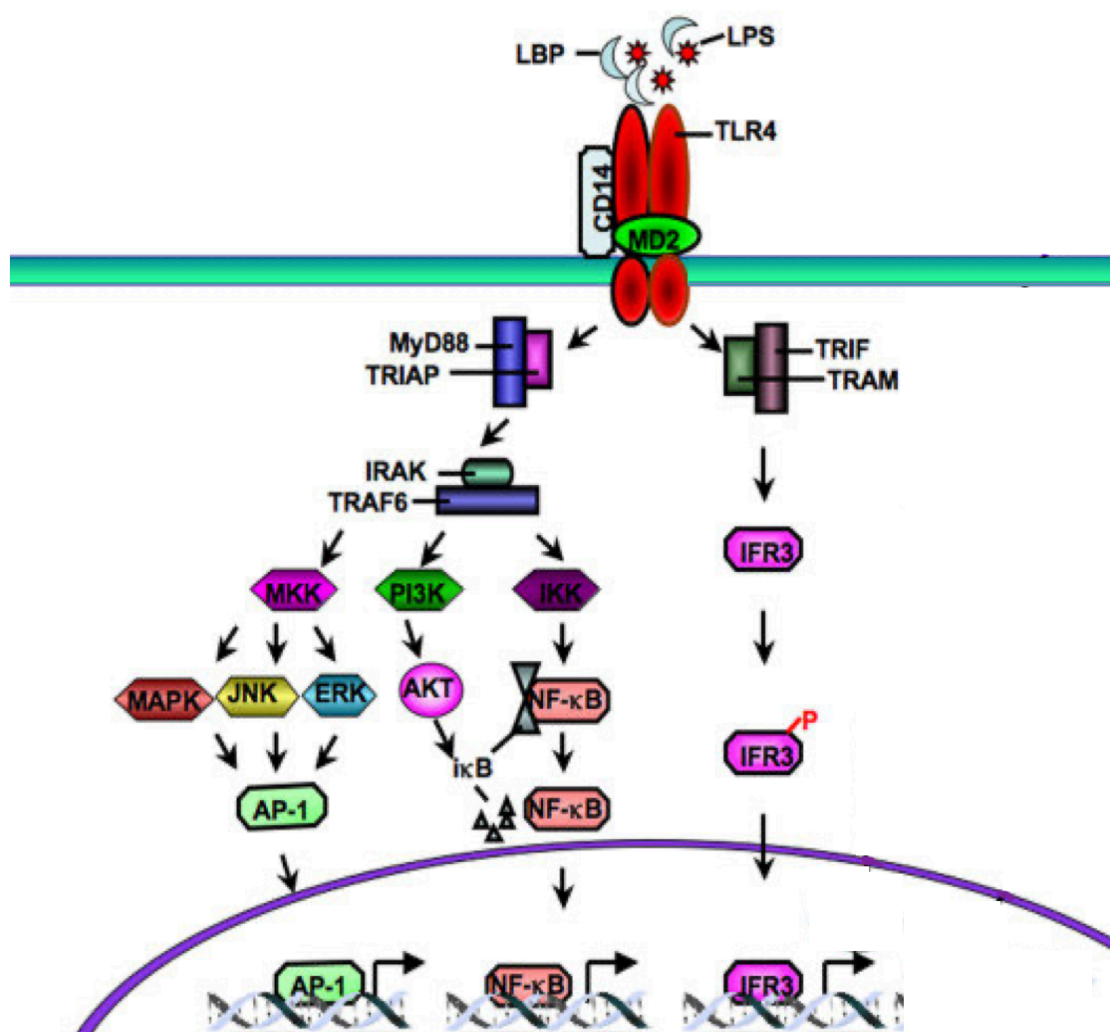
Fonte: Adaptado de MAZGAEEN, GURUNG, 2020.

O estímulo via TLR4/MD-2/LPS pode seguir vias dependentes ou independentes do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) por meio de proteínas adaptadoras diferentes (BAGCHI et al., 2007). Na via dependente de MyD88, é inicialmente requisitada a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP), que conecta o MyD88 ao TLR4. Em seguida, ocorre a sinalização para as proteínas quinases associadas ao receptor da interleucina (IRAK), e o fator associado ao receptor TNF (TRAF6). O sinal por sua vez ativa as proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK), quinase I κ B (IKK) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Em sequência, elas regulam a ativação de fatores de transcrição AP-1 e NF κ B na região promotora do DNA ativando genes responsáveis na expressão de mediadores pró-inflamatórios (BAGCHI et al., 2007).

A via independente de MyD88 é mediada pela proteína adaptadora Interferon- β contendo o domínio TIR (TRIF) e a molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM). Em seguida, ocorre a sinalização do interferon regulatório 3 (IRF3) fosforilado, que é conduzido ao núcleo para a ativação de genes responsivos do IFN (VOGEL; FENTON, 2003). Em adição, esta via independente de MyD88 também medeia a ativação da fase tardia de NF κ B e MAPK. A ativação de duas vias de sinalização *downstream* de TLR4 é específica da célula e dependente na concentração disponível dos ligantes (**Figura 4**) (MCGETTRICK; O'NEILL, 2010).

FIGURA 4. Visão esquemática da cascata de sinalização pelo receptor tipo toll4 (TLR4) induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS)



Nota: O LPS interage com o LBP circulante para formar o complexo LPS-LBP. Este se liga a CD14 e, em seguida, localiza-se juntamente com o complexo TLR4-MD2, ativando as vias dependente e independente do fator de diferenciação mieloide (MyD88) por meio de proteínas adaptadoras diferentes. Na via dependente de MyD88, as proteínas ikB quinase (IKK), proteína quinase ativada por mitôgênio (MAPK) e PI3K/AKT são ativadas e conduzem à ativação do fator nuclear kappa B (NFκB) e da proteína ativadora 1 (AP-1). A via independente de MyD88 é mediada pelo adaptador contendo domínio TIR induzindo interferon-β (TRIF), que ativa o interferon regulatório 3 (IRF3). Essas vias promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros genes relacionados com a imunidade.

Fonte: Adaptado de GUO, FRIEDMAN, 2010.

2.6. O Modelo de LPA induzida por LPS

Os modelos animais vêm sendo implementados e utilizados para estudos de doenças inflamatórias desde a década de 40. De fato, há distinções das respostas imunes relacionadas ao fenótipo humano como a anatomia, fisiologia

e também quanto ao cenário em que ocorre a patologia. Os modelos animais de doença buscam mimetizar a resposta inflamatória causada pela doença em humanos. Assim, o modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) experimental tem fornecido conhecimentos científicos dos mecanismos fundamentais da fisiopatologia da LPA para identificar marcadores de diagnóstico, testar intervenções terapêuticas, bem como analisar hipóteses já testadas por estudos *in vitro* (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008; WEBB, 2014).

A LPA gera lesões no tecido pulmonar do animal quando desafiado com o agente flogístico, a exemplo do LPS. Esse desafio pode ser feito de modo direto por instilação nasal ou intratraqueal, sendo estas as vias de administração mais utilizadas no modelo de LPA, uma vez que a administração intravenosa ou intraperitoneal não induz uma resposta tecido/específica ou de nível similar de dano pulmonar (CHEN; BAI; WANG, 2010; DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; SZARKA et al., 1997).

Portanto, um dos modelos animais de indução da LPA comumente utilizado é realizado com o LPS. A ação do LPS nos animais possui características altamente pró-inflamatórias, atuando como um forte ativador do sistema imunológico, e apresentam semelhanças fisiológicas e imunológicas com a LPA em humanos (CHEN; BAI; WANG, 2010; MAZGAEEEN; GURUNG, 2020).

Os danos no pulmão na LPA induzida por LPS induzem massivo influxo leucocitário para a cavidade pulmonar (principalmente neutrófilos), aumento da permeabilidade vascular com notável exsudação, liberação de enzimas proteolíticas, de mediadores envolvidos no estresse oxidativo e citocinas. O resultado da liberação desses fatores é a perda da arquitetura alveolar e, por conseguinte, perda da função pulmonar, quando o estímulo inflamatório não é controlado (CHEN; BAI; WANG, 2010; SZARKA et al., 1997; YILMAZ SIPAHI; ATALAY, 2014).

2.7 Estratégias terapêuticas empregadas na LPA

Apesar do crescente entendimento na fisiopatologia e na resposta imune da LPA, a eficácia das abordagens terapêuticas que contribuem para a redução dos níveis de mortalidade nessa doença ainda é limitada, e nenhum tratamento farmacológico definitivo foi estabelecido até o momento.

A principal meta para o tratamento desta enfermidade é controlar a inflamação e garantir uma adequada troca gasosa. Assim, o tratamento atual envolve cuidados gerais de suporte prescrito na condição subjacente do indivíduo, incluindo ventilação mecânica e administração de corticosteroides (CS) (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016; RAJASEKARAN et al., 2016). Embora a ventilação mecânica seja essencial no cuidado do paciente, é sabido que pode acarretar a lesão pulmonar (BATES; SMITH, 2018; BEITLER; MALHOTRA; THOMPSON, 2016). Neste contexto, estudos clínicos reportaram que a alta mortalidade da LPA pode ser agravada na presença de ventilação mecânica devido abordagens tradicionais com volume corrente (*tidal volume*), que corresponde a quantidade de ar ofertada pelo ventilador a cada ciclo ventilatório. Essas abordagens levam a perpetuar a lesão pulmonar em pacientes e aumentam o risco de falência de órgãos (ARDS NETWORK et al., 2000; AMATO et al., 1998).

Para o controle da inflamação, os CS são considerados os candidatos ideais para o tratamento, pois apresentam ações anti-inflamatória, antiedematosa e vasodilatadora pulmonar. No entanto, a utilização desses fármacos na LPA e SDRA apresenta controvérsias. Há relatos do uso de metilprednisolona apresentando efeito positivo na sobrevida (MEDURI et al., 2016). Porém, um ensaio multicêntrico corticoide/placebo para SDRA moderada a grave não constatou benefício na sobrevida (7–28 dias de duração) (STEINBERG et al., 2006).

Essas discordâncias podem estar ligadas a uma grande variedade nos critérios de seleção de pacientes, à escolha do CS utilizado, à gravidade da doença no momento do uso do CS, à dosagem, bem como à duração do tratamento. As decisões de tratamento envolvem uma compensação entre benefícios e riscos, como os efeitos colaterais gerados ao tratamento para LPA

ou SDRA, como o aumento do risco de infecção e disfunção neuromuscular. Dessa forma, nenhuma conclusão convincente sobre o uso de CS na LPA ou SDRA foi definida (MOKRA et al., 2019; MEDURI et al., 2011). Portanto, a farmacoterapia para essa patologia é uma necessidade médica não atendida, e novas terapias vêm sendo desenvolvidas para aprimorar os resultados clínicos, bem como reduzir a taxa de mortalidade dos pacientes.

2.8 Potencial anti-inflamatório de alcaloides

Os alcaloides compreendem uma classe de compostos orgânicos que são naturalmente produzidos por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (MANSKE; RODRIGO, 1965). Essas moléculas constituem uma das classes mais variadas de metabólitos secundários. Os alcaloides são biossintetizados por vias metabólicas únicas que envolvem precursores de aminoácidos e apresentam um vasto espectro de atividades farmacológicas, dentre elas o potencial anti-inflamatório (DEBNATH et al., 2018; SCHMELLER; WINK, 1998).

As classes dos alcaloides mais estudadas quanto a atividade anti-inflamatória são os indólicos, quinolizidínicos e isoquinolinas (SOUTO et al., 2011). Para os representantes da classe indol, tais como as riparinas, isoladas da *Aniba riparia* que permitiu posteriormente a síntese das riparinas A e B, verificou-se que esses alcaloides podem inibir as vias inflamatórias modulando a formação de sinais patológicos de inflamação, incluindo edema de pata induzido por vários agentes flogísticos, migração de neutrófilos, liberação de citocinas e estresse oxidativo (SANTIAGO et al., 2015).

Os alcaloides, que pertencem à classe dos quinolizidínicos tais como a matrinalina e a oximatrina, substâncias isoladas de *Sophora subprostrata*, apresentaram efeito anti-inflamatório na artrite reumatoide, na colite ulcerativa e pancreatite aguda. Esses alcaloides também exibem ação anti-pruriginosa em camundongos via regulação de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e fatores de transcrição (Akt/NF κ B), fornecendo suporte científico de seu uso na

medicina tradicional chinesa (GENG et al., 2018; MA et al., 2017; PU et al., 2016; XU et al., 2018; ZANG et al., 2019; ZHENG, 2005).

Dentre os representantes da classe isoquinolina, a berberina é uma das moléculas que se destacam. Os efeitos anti-inflamatórios foram observados em uma variedade de tecidos humanos e animais, incluindo o fígado (LOU et al., 2011), tecido adiposo (CHOI et al., 2006), células endoteliais vasculares (WU; WANG; LIU, 2010) e intestino (GU et al., 2011). Os mecanismos de ação associados às atividades envolvem múltiplas quinases celulares e vias de sinalização, como proteína quinase ativada por AMP (AMPK), MAPKs, fator nuclear eritróide-2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e via do NFκB (LI et al., 2014).

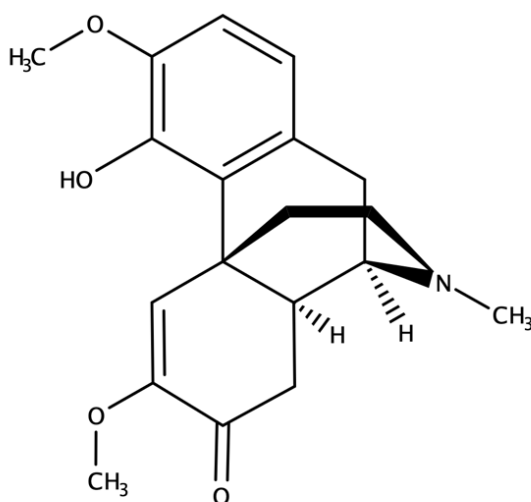
Os alcaloides isoquinolínicos com atividade anti-inflamatória, estudados pelo nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA)/UFPB/João Pessoa-PB, Brasil são: a warifteína, alcaloide isolado das raízes e folhas de *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) apresentou efeito inibitório na migração de neutrófilos em modelo de peritonite devido à diminuição na adesão celular, demonstrado *in vitro* (LIMA et al., 2014). O MHTP, alcaloide sintético, apresentou efeito anti-inflamatório ao inibir a função de PGE2 e a migração de células inflamatórias para o local inflamado no modelo de edema de pata e peritonite, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2015). Já a curina, alcaloide isolado de *Chandrodendron platyphyllum* (Menispermaceae) apresentou efeito anti-inflamatório associado à inibição da ativação de macrófagos e recrutamento de neutrófilos pela inibição da produção de citocinas inflamatórias, LTB4 e óxido nítrico (NO), possivelmente pela modulação negativa do influxo de Ca^{2+} em modelo de inflamação induzido por LPS (RIBEIRO-FILHO et al., 2019).

2.8.1. Considerações sobre o alcaloide milonina, um 8,14-dihidromorfinandeinona

Dentre centenas de alcaloides estudados com atividades biológicas, encontra-se a milonina (**Figura 5**), que pertence a uma família mais restrita denominada de alcaloides morfinâmicos, e com base na estrutura molecular

apresenta uma série de compostos semelhantes à morfina, mas sem o anel E, bem como a ligação 6-OH e a dupla ligação em 7 e 8 (FOSSATI et al., 2015).

FIGURA 5. Estrutura tridimensional da milonina



Fonte: Elaborado pela autora. BERNARDO, 2022.

A milonina foi identificada e isolada a partir das folhas da *Cissampelos sympodialis* Eichl, apresentando fórmula estrutural 5,6 dideidro-4-hidroxi-3,6,-dimetoxi-17-metil-morfinan-7-ona, fórmula molecular $C_{19}H_{23}NO_4$ e peso molecular 329 u (DE FREITAS et al., 1995). Estudos farmacológicos mostram que essa molécula possui efeito hipotensor e relaxante de vasos dependentes do endotélio via a ativação do óxido nítrico-cGMP e abertura do canal de K^+ (CAVALCANTE et al., 2011), porém independente das prostaglandinas e dos adrenoreceptores β_2 (CAVALCANTE, 2003).

Os estudos realizados em cultura de hepatócitos e fibroblastos, demonstraram que a milonina apresentara efeitos toxicológicos em concentração inibitória de 50% (IC₅₀), variando entre 100 e 400 μ M (MELO et al., 2003). Resultados recentes mostraram que o tratamento com a milonina em modelos experimentais de inflamação aguda induzida por agentes flogísticos inibiu a degranulação de mastócitos teciduais, mantendo a membrana estabilizada, porém, sem inibir a ação da histamina (ALVES et al., 2017). Além disso, foi capaz de inibir a formação do edema de pata e de nocicepção pela

ação do alcaloide diretamente relacionada a inibição de mediadores como PGE₂, bradicinina (BK), TNF- α e IL-1 β (SILVA et al., 2017). Esses resultados indicam que a milonina vem a ser um protótipo para um fitomedicamento a ser utilizado nos processos inflamatórios. No entanto, estudos adicionais relacionados aos mecanismos imunomoduladores desse alcaloide são necessários.

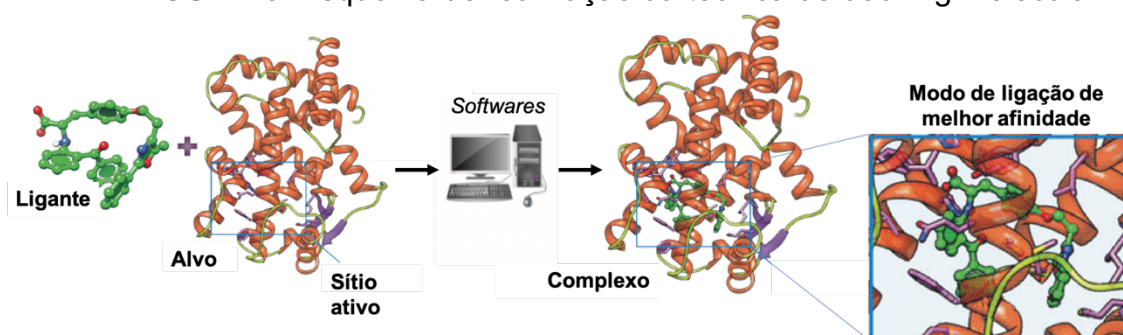
2.9 Estudos *in silico*: Docking molecular e predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (ADMET)

Em adição aos estudos *in vivo* e *in vitro*, os trabalhos *in silico* têm evoluído devido aos grandes avanços na predição por análise computacional quanto a simplificação e automatização no desenvolvimento de medicamentos. Os estudos *in silico* têm sido bastante difundidos no sentido de descobrir medicamentos em potencial, pois diminui o tempo de estudo e recursos financeiros em relação ao processo de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I). Portanto, esses estudos vêm sendo bastante úteis na eliminação inclusive de candidatos com propriedades inadequadas antes que sigam para estudos toxicológicos, não clínicos e/ou clínicos. Avalia-se que a percentagem de insucesso de novas substâncias químicas candidatas a determinadas ações farmacológicas, seja maior que 90%. As principais razões incluem perda de eficácia clínica, propriedades farmacocinéticas inadequadas, toxicidade, reações adversas, concorrência e limitações farmacotécnicas (HUGHES et al., 2011; LIMA, 2007).

Uma técnica bastante utilizada é o *docking* molecular, uma das principais metodologias aplicadas no CADD – *Computer Aided Drug Design* (Desenho de drogas assistido por computador) para identificar substâncias protótipos e preditivos de modos de ligação com receptores ou moléculas solúveis (BARREIRO et al., 1997; LILL; DANIELSON, 2011). Essa técnica baseia-se na estrutura molecular e é aplicada para análise das interações ligante-proteína entre um determinado receptor e seu ligante correspondente (**Figura 6**) (KITCHEN et al., 2004; PYRKOV et al., 2010). Os resultados são obtidos por amostragem conformacional de múltiplas conformações (PIERRI; PARISI; PORCELLI, 2010).

Dentre os softwares responsáveis pela modelagem molecular, destacamos o Molegro Virtual Docker (<https://molegrovirtualdocking.weebly.com/>) que se caracteriza por possuir um ambiente integrado e permite o estudo e a predição de como ligantes interagem com macromoléculas, o qual usa um algoritmo para realizar a pontuação do complexo: o *MOLDOCK Scoring Function*. A energia de pontuação (EScore) é obtida a partir da soma dos termos energéticos de interação ligante-proteína (E_{Inter}), bem como da energia interna do ligante (E_{Intra}) (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

FIGURA 6. Esquema de realização da técnica de docking molecular



FONTE: Adaptado de LIAO et al., 2013.

Outra técnica *in silico*, é conhecida por ADMET (derivado das iniciais conectando os termos absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), é um método preditivo amplamente utilizado para a descoberta de drogas, e tem como objetivo prever como uma droga pode se comportar no organismo. Nesse sentido, auxilia na eliminação de compostos que têm maior probabilidade de não produzir bons resultados em estudos subsequentes (KAR; LESZCZYNSKI, 2020). Os parâmetros analisados no estudo de ADMET para avaliar a eficácia dos candidatos a medicamentos são:

- **Absorção:** que pode ser entendida pela passagem do fármaco na bicamada lipídica, por meio de uma via de administração até chegar à circulação sanguínea. Muitos fatores influenciam esse processo, incluindo as propriedades físico-químicas, a formulação e a via de administração de um medicamento. A permeabilidade de um fármaco através das membranas biológicas é um fator chave que influencia a absorção e distribuição (BRUNTON; BJORN; RANDA., 2017).

- **Distribuição:** descreve o movimento do fármaco de forma reversível de um local para outro dentro do organismo;
- **Metabolismo:** corresponde a biotransformação do fármaco, ocorrendo principalmente no fígado pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP);
- **Excreção:** refere-se a retirada do fármaco do organismo. Essa eliminação ocorre geralmente pelos rins;
- **Toxicidade:** em caso de resíduos do fármaco decorrentes do metabolismo serem tóxicos, podem produzir efeitos indesejáveis ao indivíduo.

Várias ferramentas computacionais foram desenvolvidas para realizar predições das propriedades físico-químicas associadas à ADMET. Essas ferramentas usam métodos avaliando a similaridade estrutural com estruturas químicas de compostos que falharam em testes pré-clínicos ou possuem algum efeito toxicológico/adverso (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Dentre as ferramentas disponíveis, apresenta-se o swissADME (<http://www.swissadme.ch>) que se baseia em resultados de estudos disponíveis em bancos de dados. Essa ferramenta online permite o estudo preditivo das características farmacocinéticas, especialmente ADME, biodisponibilidade, farmacodinâmica e química medicinal da molécula a ser analisada.

A plataforma gera códigos SMILES para a molécula desenhada que são processadas as diferentes análises. Uma dessas análises é a predição da biodisponibilidade, que é realizada a partir de informações físico-químicas geradas pela ferramenta, como lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação para detectar a semelhança do medicamento. Os padrões de absorção gastrointestinal passiva e permeação da barreira hematoencefálica (BHE), bem como substrato ou não substrato da glicoproteína de permeabilidade (P-gp) e CYPs, são avaliados seguindo o modelo descrito por Daina e colaboradores (2017).

Outra ferramenta complementar na predição do ADMET é denominada de *OSIRIS Property Explorer* (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) que auxilia na procura de potenciais riscos de toxicidade, levando em consideração a

carcigenocidade, mutagenicidade, teratogenicidade, irritação, sensibilização e neurotoxicidade (KHAN et al., 2019).

Objetivos

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Determinar mecanismo de ação da milonina no modelo murino de LPA induzida por LPS e seu perfil ADMET.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o tratamento da milonina em animais com lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo, observando os seguintes parâmetros:
 - Migração de células inflamatórias para o lavado broncoalveolar (BAL);
 - A produção de citocinas pró-inflamatórias no BAL e no sangue;
 - A concentração de proteínas totais no BAL;
 - O edema pulmonar a partir do peso dos pulmões;
 - As alterações histopatológicas e morfométricas nos tecidos pulmonares;
 - Os mecanismos envolvidos em células do BAL via a marcação das proteínas de sinalização intracelular, como NFκB e Akt
- Estudar, *in silico*, a milonina observando os seguintes parâmetros:
 - A interação molecular da milonina no possível alvo molecular (TLR4/MD2);
 - A predição de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (ADMET);

Metodologia

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Camundongos BALB/c machos (6~8 semanas de idade, pesando entre 20 e 30g) foram adquiridos da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa e Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba sob protocolo 7316150420 (**ANEXO I**). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 23 ± 2 °C, ventilação regular, bem como água potável e alimentos suficientes durante todo o período de experimentação.

4.2. Obtenção e preparo da milonina

A substância foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (UFPB/CCS/João Pessoa, PB, Brasil). A solução do composto foi preparada da seguinte forma: 1 mg da milonina em 50 µL de HCl 1N e adicionado 800 µL de solução salina (NaCl 0,9%). O pH foi ajustado para 7 com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e acrescentada solução salina para 1000 µL. Em seguida a solução foi distribuída em tubos tipo eppendorf (200 µL da solução) e armazenados no congelador. No dia do experimento, as diluições da solução foram realizadas com salina para obter a dose desejada.

4.3. Estudos *in vivo*

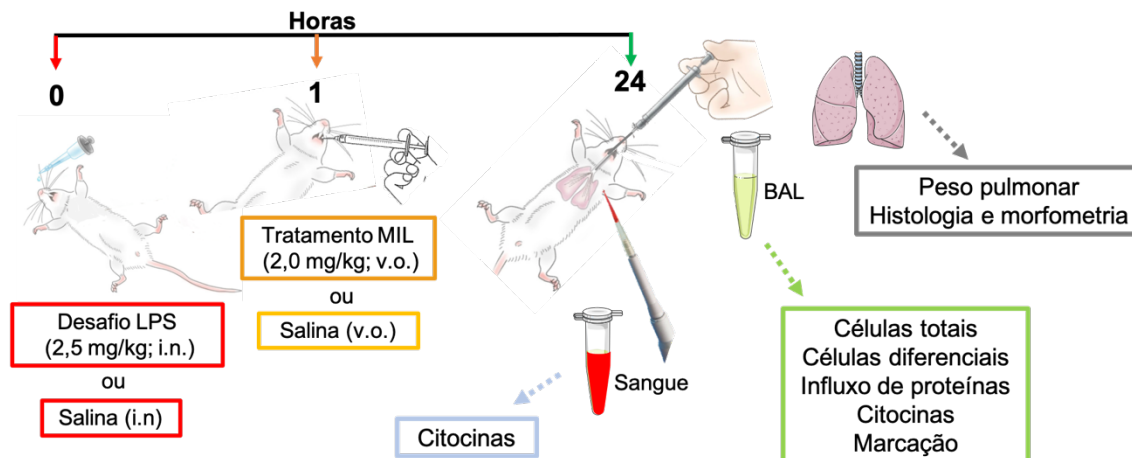
4.3.1. Tratamento dos animais

Os camundongos (n=6/grupo) foram tratados com por via oral (v.o) com 2 mg/kg de milonina, 1 hora após o desafio com o agente flogístico lipopolissacarídeo (LPS - *E. coli* 0111: B4-Sigma-Aldrich®). O grupo basal correspondeu aos animais tratados e desafiados com veículo (salina). O grupo controle (animais doentes) foi tratado com veículo e desafiado com LPS. A dose utilizada da milonina para o tratamento dos animais foi de 2,0 mg/kg, determinada a partir de estudo anterior (ALVES et al., 2017).

4.3.2. Protocolo experimental da lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS

Para induzir a lesão pulmonar aguda, os animais receberam anestesia intramuscular (i.m.) com 50 μ L de xilazina (1,91 mg/kg, Agener União, Brasil) e ketamina (29 mg/kg, Vetnil, Brasil). Em seguida receberam, por instilação nasal (i.n.), LPS (2,5 mg/kg) diluído em 40 μ L de solução salina estéril (veículo). O grupo basal recebeu apenas 40 μ L do veículo por via intranasal. Os camundongos foram eutanasiados 24h após o desafio com LPS por overdose de anestésico (300 μ L). Os materiais biológicos obtidos foram: o fluido do lavado broncoalveolar (BAL) utilizado para a contagem de células inflamatórias, para desvendar o(s) mecanismo(s) de ação do alcaloide nas células; dosagem de proteínas e citocinas no fluido do BAL; o sangue do plexo braquial, para análise de citocinas; e o tecido pulmonar para avaliação histológica (**Figura 7**).

Figura 7. Esquema utilizado no protocolo da lesão pulmonar aguda (LPA)

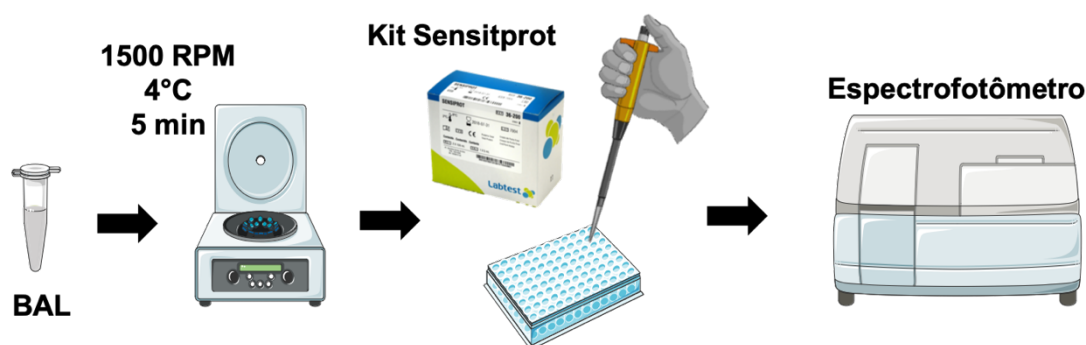


Nota: O experimento consiste do estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) ou veículo (salina) através da instilação nasal (i.n.) e o tratamento com milonina (MIL) ou veículo (salina) por via oral (v.o.). Após 24 horas do desafio, ocorre a eutanásia e segue para a coleta do material biológico como sangue, lavado broncoalveolar (BAL) e o pulmão.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

4.3.3. Contagem de células totais e diferencial do BAL

A contagem total das células foi feita a partir de uma alíquota do BAL com o auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga CR422, JONAM), seguida da obtenção do pellet e realização da

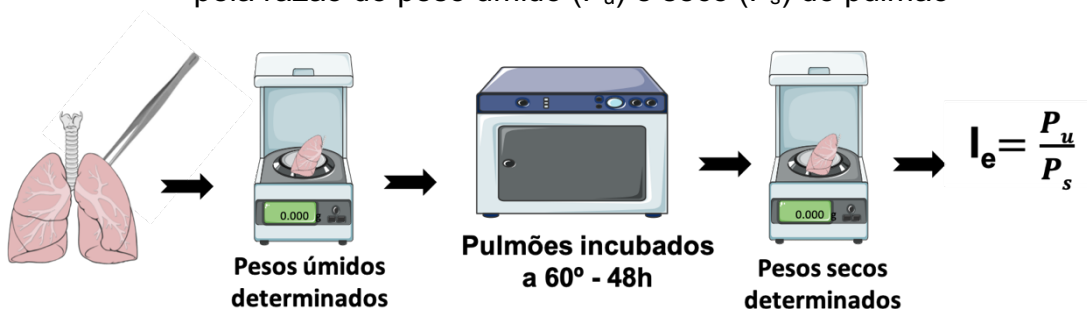


Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

4.3.5. Razão do peso do pulmão úmido/seco

Para a obtenção do índice do edema pulmonar (I_e), foi feita a análise da razão entre o peso úmido (P_u) e o peso seco (P_s) dos pulmões. Assim, os pulmões foram retirados e pesados em balança analítica de precisão (Marte mod: SHIMADZU AY220) para obtenção do peso úmido. Posteriormente, os pulmões foram armazenados em estufa de secagem (Socc. Fabbe LTDA, São Paulo - SP) por 48h a uma temperatura de 60 °C, sendo em seguida novamente pesados para obtenção do peso seco (**Figura 10**).

Figura 10. Representação do protocolo para obtenção do índice do edema (I_e) pela razão do peso úmido (P_u) e seco (P_s) do pulmão



Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

4.3.6. Coleta de sangue no plexo braquial

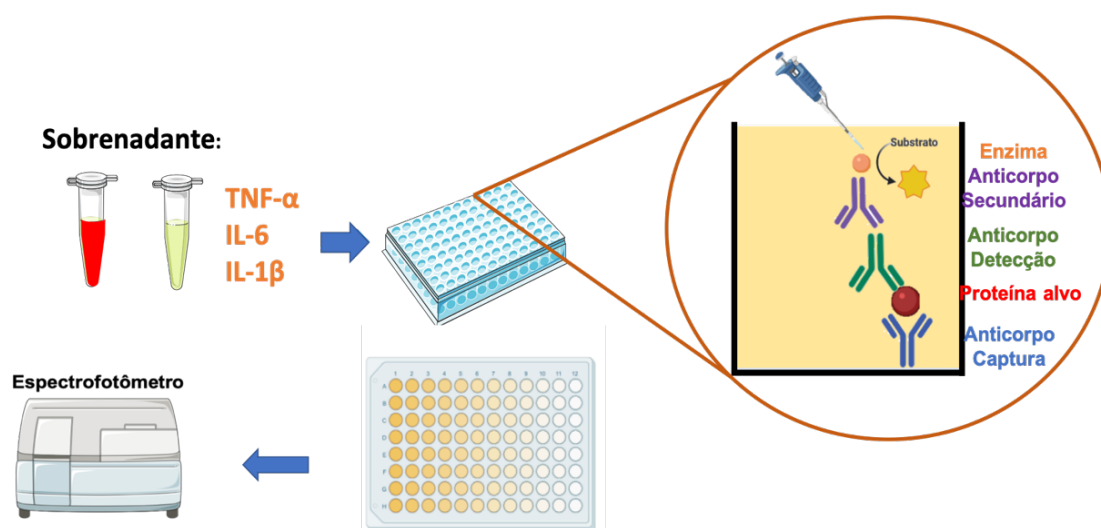
O sangue foi coletado pelo plexo braquial dos animais experimentais para a obtenção do soro. Após a anestesia dos animais, foi realizado um corte no plexo braquial, e o sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur, com a qual foi aspirado cerca de 500 a 1000 µL de sangue. O sangue foi armazenado

em tubos do tipo eppendorf e estocados em geladeira por cerca de 4 horas para facilitar formação dos coágulos e coleta dos soros, que foi feita após a centrifugação do sangue (amostra de 300g), a uma temperatura de 4°C, por 10 min. Os soros foram alicotados, etiquetados e congelados a -20 °C para as dosagens das citocinas.

4.3.7. Dosagens de citocinas do lavado broncoalveolar e soro

O sobrenadante obtido do BAL e o soros dos animais dos diferentes grupos foram dosados pelo método do ensaio imunoenzimático ELISA (**Figura 11**) para as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 (eBioscience, Inc. Science Center Drive, San Diego - USA).

Figura 11. Representação do ensaio imunoenzimático de ELISA do tipo sanduíche



Nota: Com o sobrenadante obtido foi realizado o ensaio imunoenzimático do Elisa do tipo sanduíche para quantificação de citocinas TNF- α e IL-1 β e IL-6. Esse método permite avaliar a expressão de citocinas em uma amostra através de uma série de etapas de incorporação e que farão o reconhecimento da presença da proteína-alvo. Em seguida promove uma mudança de cor ou fluorescência que é detectada e lida em espectrofotômetro.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

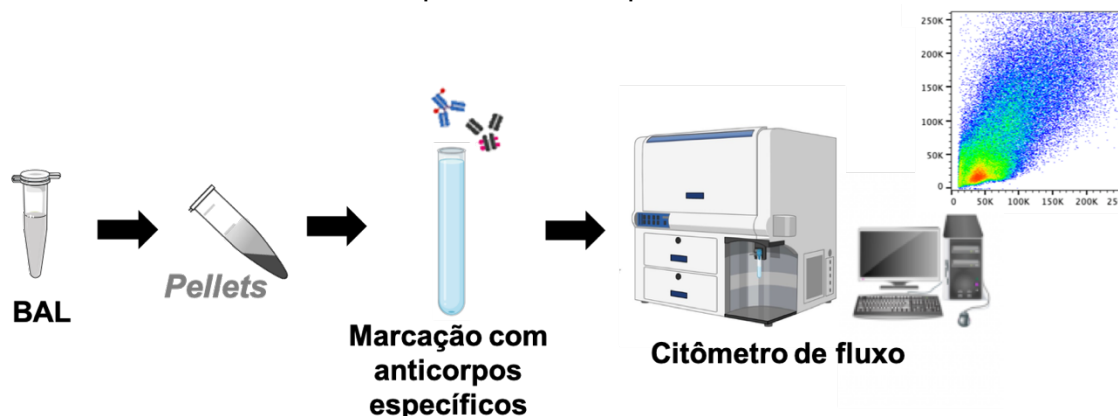
4.3.8. Análises histológica e morfométrica dos pulmões

Para a avaliação das características histológicas dos pulmões, esses foram retirados e fixados em formol a 10%. Em seguida, o tecido foi desidratado, diafanizado e parafinizado. Os pulmões em parafina foram submetidos a cortes em micrótomo (Leica RM 2125 - RT) e assentados em lâminas para a coloração com hematoxilina e eosina e análise de parâmetros inflamatórios. As imagens foram obtidas por microscopia óptica com aumento total de 200x e 400X (56.000 $\mu\text{m}^2/\text{campo}$) por uma microcâmara Multicam 5 (5MP), e analisadas com o software Motic Images Plus 2.0. Para as análises morfométricas, foram utilizadas vinte imagens aleatórias de lâminas de tecido pulmonar. Sob um microscópio óptico comum (BX40, Olympus) com resolução de 440x, vinte imagens foram retransmitidas para um sistema de análise de imagem (analisador de imagem Kontron Elektronik; Carl Zeiss, Alemanha - software KS300).

4.3.9. Citometria de Fluxo

A metodologia da citometria de fluxo foi utilizada para realizar a expressão da proteína intracelular Akt e da porção p65 do fator de transcrição NF κ B. As células obtidas do BAL foram ajustadas para a concentração de 5×10^5 células/mL. Em seguida foram incubadas com anticorpos específicos para as proteínas de interesse, o anti-Akt PE conjugado ou anti-p65NF κ B PE conjugado. No citômetro de fluxo (Becton–Dickinson FACS Canto II) foi analisada a diferenciação de populações celulares e em seguida a expressão dos anticorpos específicos com marcação fluorescente (**Figura 12**). O protocolo específico para cada marcação foi realizado em conformidade com as especificações do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Figura 12. Representação do protocolo de citometria de fluxo para obtenção da expressão Akt e p-65NFkB



Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

4.4. Estudos *in silico*

4.4.1. Avaliação do *Docking* molecular

Para a realização da modelagem molecular (*Docking*), foi necessária a busca das proteínas alvo relacionadas à doença de lesão pulmonar aguda (LPA) tais como os receptores o TLR4 e o MD-2 (sítio ativo de ligação do LPS). O complexo TLR4/MD-2 selecionado para o acoplamento molecular foi obtido do banco de dados de proteínas - PDB (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), sob o código PDB ID 3FXI. Para o acoplamento, a milonina foi inserida no formato SDF e todas as moléculas de água e cofatores removidos.

O programa Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) foi usado para calcular a energia de ligação. Para o procedimento de acoplamento (receptor - ligante), foi utilizado um GRID de raio de 15 Å e resolução de 0.30 cobrindo o local do local de ligação, definido através de um ligante conhecido. O modelo foi projetado para realizar o ajuste com as características esperadas entre o ligante (milonina) e a proteína-alvo (TLR4/MD-2), usando o algoritmo de busca heurística que combina a evolução diferencial e o ligante cristalográfico como modelo. O algoritmo de previsão de cavidade (Moldock) e a função de pontuação Moldock score foram selecionados para obter os resultados.

4.4.2. Predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (ADMET)

Os parâmetros ADMET foram calculados usando a ferramenta da web de acesso aberto SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), que oferece um conjunto de modelos preditivos rápidos para a avaliação das propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacológicas de compostos. Enquanto a previsão de toxicidade foi realizada no OSIRIS Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>). Para a absorção, foram considerados fatores que incluíram a permeabilidade da membrana, absorção intestinal e substrato da glicoproteína P ou inibidor. Assim, a molécula em estudo não excedeu mais do que duas violações da regra de Lipinski e consenso logP não superior a 4,15. A distribuição foi avaliada por fatores que incluem a barreira hematoencefálica (logBB) e a permeabilidade no Sistema Nervoso Central (SNC). O metabolismo foi previsto com base nos modelos CYP de substrato ou inibição (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). A toxicidade do alcaloide foi prevista com base nos seguintes parâmetros: mutagenicidade, tumorigenicidade, efeito sobre o sistema reprodutivo e irritabilidade.

4.5. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$. Para analisar os dados do citômetro de fluxo foi utilizado o programa FlowJo, versão 10. Os resultados foram expressos por média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) e analisados estatisticamente utilizando ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey.

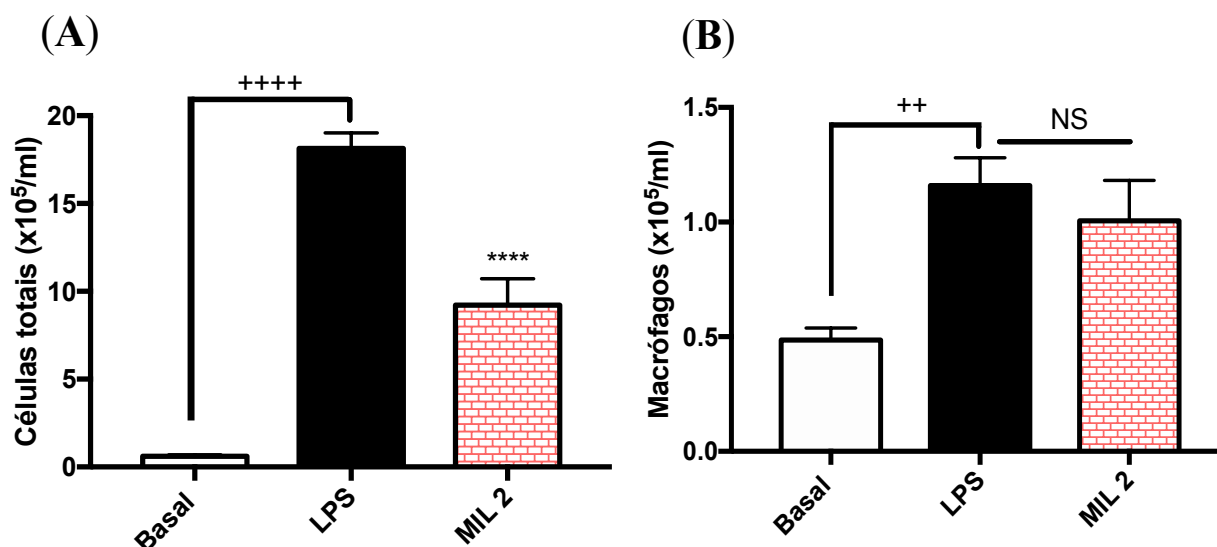
Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento com a milonina na migração de células total e diferencial após 24h do estímulo com o LPS no modelo de lesão pulmonar aguda

Os animais do grupo LPS (animais doentes) apresentaram aumento ($p < 0,0001$) no número de leucócitos totais no fluido do lavado broncoalveolar (BAL) quando comparados aos animais do grupo basal (animais saudáveis), indicando que o desafio com LPS foi eficaz em promover a migração de células para o pulmão. O tratamento com milonina na dose de 2 mg/kg dos animais doentes reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a migração de leucócitos para o pulmão (Gráfico 1A). O aumento de leucócitos no BAL dos camundongos doentes ocorreu devido ao aumento no número de neutrófilos ($p < 0,0001$), de linfócitos ($p < 0,0001$) e de macrófagos ($p < 0,001$). O tratamento com a milonina promoveu redução significativa ($p < 0,0001$) dos neutrófilos e linfócitos (Gráfico 1C e 1D), independente de macrófagos (Gráfico 1B).

Gráfico 1. Efeito do tratamento com milonina na migração de leucócitos total e diferencial para o espaço broncoalveolar no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)



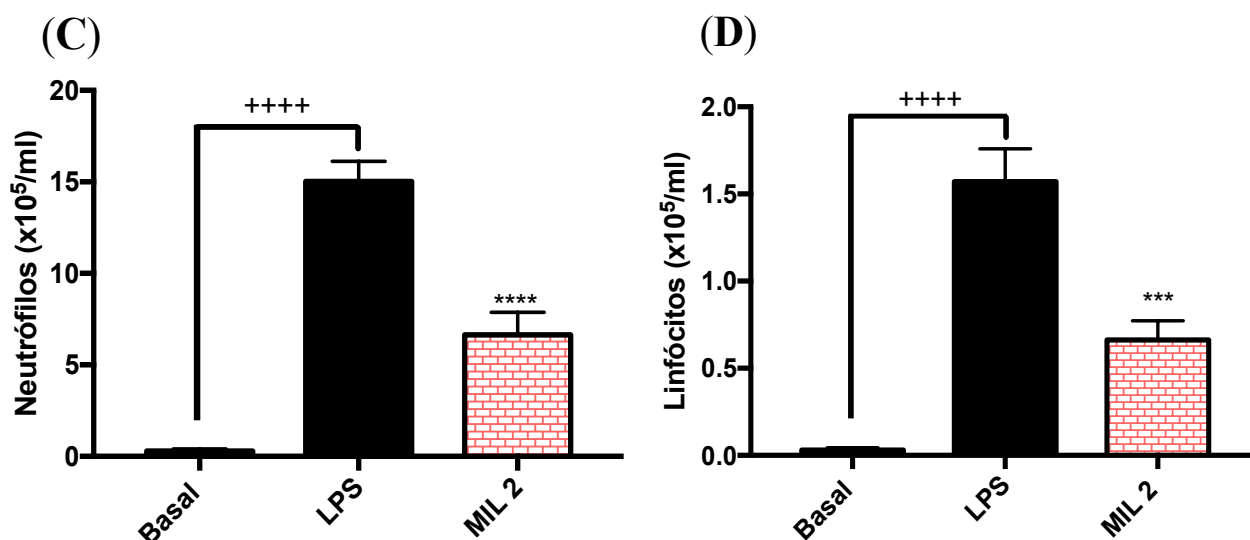


Gráfico 1. Camundongos BALB/c (n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e, 1h depois do desafio, foram tratados com a milonina (2,0 mg/kg) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). O fluido do lavado broncoalveolar foi recuperado 24h após o desafio. (A) migração de leucócitos totais para a região broncoalveolar; (B) migração de macrófagos; (C) migração de neutrófilos; (D) migração de linfócitos. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey ++ $p < 0,01$, ++++ $p < 0,0001$ comparação entre grupo LPS e basal; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.2. Efeito do tratamento com a milonina na permeabilidade pulmonar após 24h do estímulo com o LPS

O gráfico 2 apresenta os resultados do aumento ($p < 0,0001$) na concentração de proteínas totais na cavidade broncoalveolar dos animais do grupo LPS (doentes) em comparação aos do grupo basal (saudáveis) após 24h do estímulo. Os animais tratados com a milonina apresentaram redução ($p < 0,01$) do conteúdo proteico no fluido broncoalveolar.

Gráfico 2. Efeito do tratamento com milonina na permeabilidade pulmonar no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

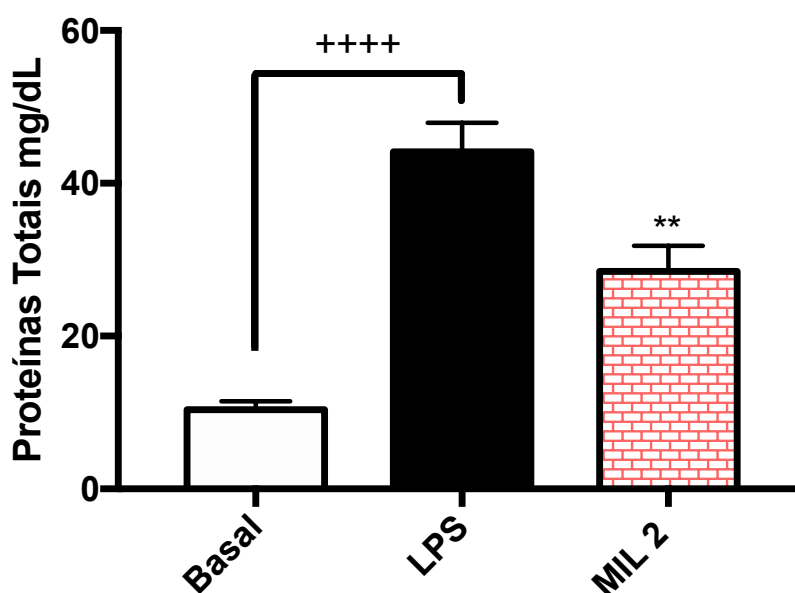


Gráfico 2. Camundongos BALB/c ($n=6$) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois do desafio foram tratados com a milonina (2,0 mg/kg;v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). A partir do fluido do lavado broncoalveolar recuperado foi avaliado o efeito do tratamento com a milonina na quantidade de proteínas totais extravasadas. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey ++++ $p < 0,0001$ comparação entre grupo LPS e basal; ** $p < 0,01$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.3. Efeito do tratamento com a milonina no edema pulmonar avaliado pela razão úmido/seco (u/s) do pulmão após 24h do estímulo com o LPS

O edema pulmonar foi determinado pela razão do peso dos pulmões após 24h do estímulo com o LPS. O gráfico 3 apresenta os resultados dos grupos de animais saudáveis (basal), doentes (LPS) e tratados com milonina (MIL 2). Assim, observamos aumento ($p < 0,01$) da razão u/s dos pulmões nos animais doentes (LPS) em relação aos saudáveis (basal). O tratamento com a milonina diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a razão u/s quando comparado com o grupo LPS.

Gráfico 3. Efeito do tratamento com milonina no edema pulmonar avaliado pela razão úmido/seco (U/S) do pulmão após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS)

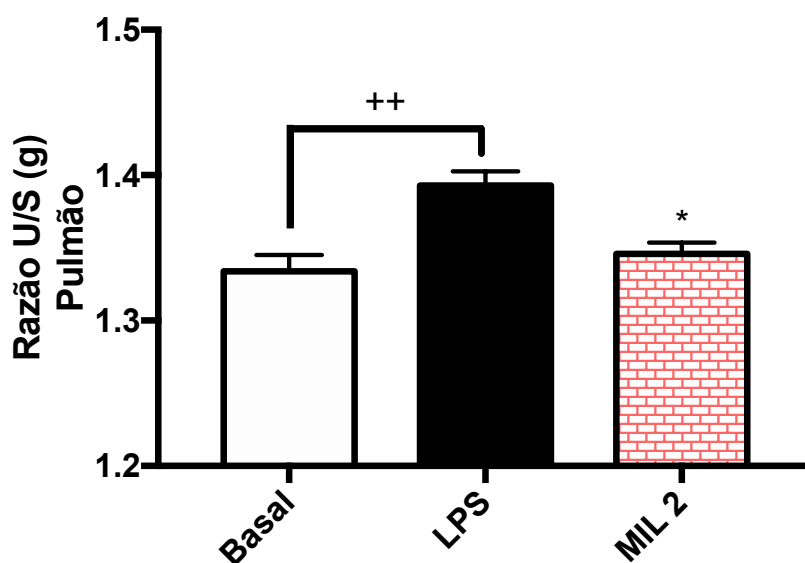


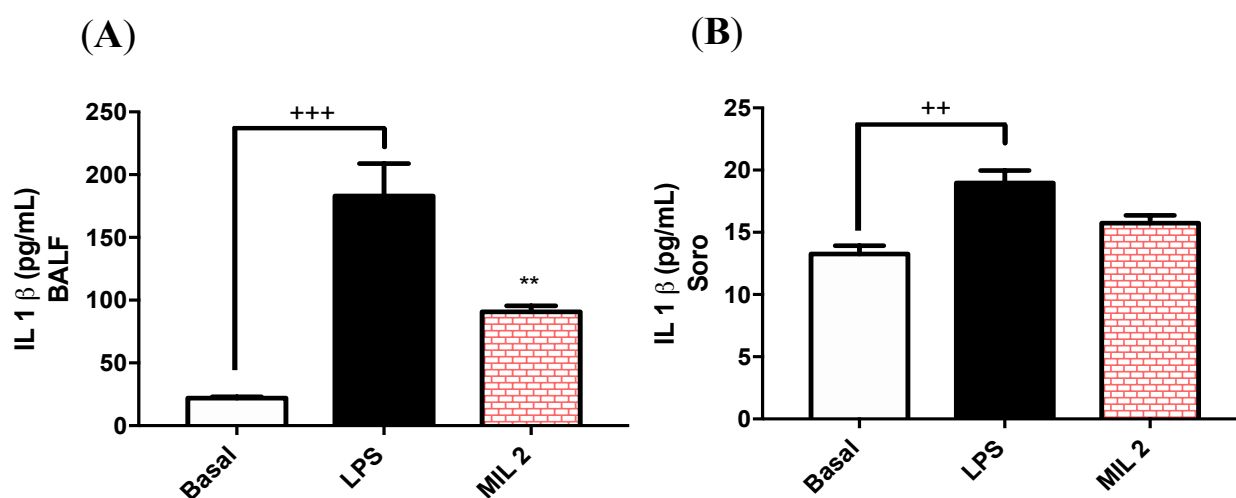
Gráfico 3. Camundongos BALB/c ($n=6$) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois do desafio foram tratados com a milonina (2,0 mg/kg;v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). No tempo de 24h após o desafio, os animais foram eutanasiados e coletado o pulmão, pesado e armazenado em estufa por 48h e, em seguida, os pulmões foram novamente pesados, obtendo-se a razão do peso pulmonar úmido/seco (u/s). O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey ++ $p < 0,01$ comparação entre grupo LPS e basal; * $p < 0,05$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.4. Efeito do tratamento com a milonina nos níveis de citocinas no lavado broncoalveolar e no soro após 24h do estímulo com o LPS

Como demonstrado no gráfico 4, observamos aumento significativo das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no BAL dos animais LPS quando comparados com os do grupo basal (gráfico 4A, C e E, respectivamente). O tratamento com a milonina reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis das três citocinas avaliadas. A nível sistêmico observamos que os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estavam significativamente elevados nos animais do grupo LPS quando comparados com os do grupo basal. No entanto, apenas os níveis de IL-6 foram reduzidos ($p < 0,05$) no soro com o tratamento com a milonina (gráfico 4D).

Gráfico 4. Efeito do tratamento com milonina nos níveis de citocinas no lavado broncoalveolar e no soro na lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por lipopolissacarídeo (LPS)



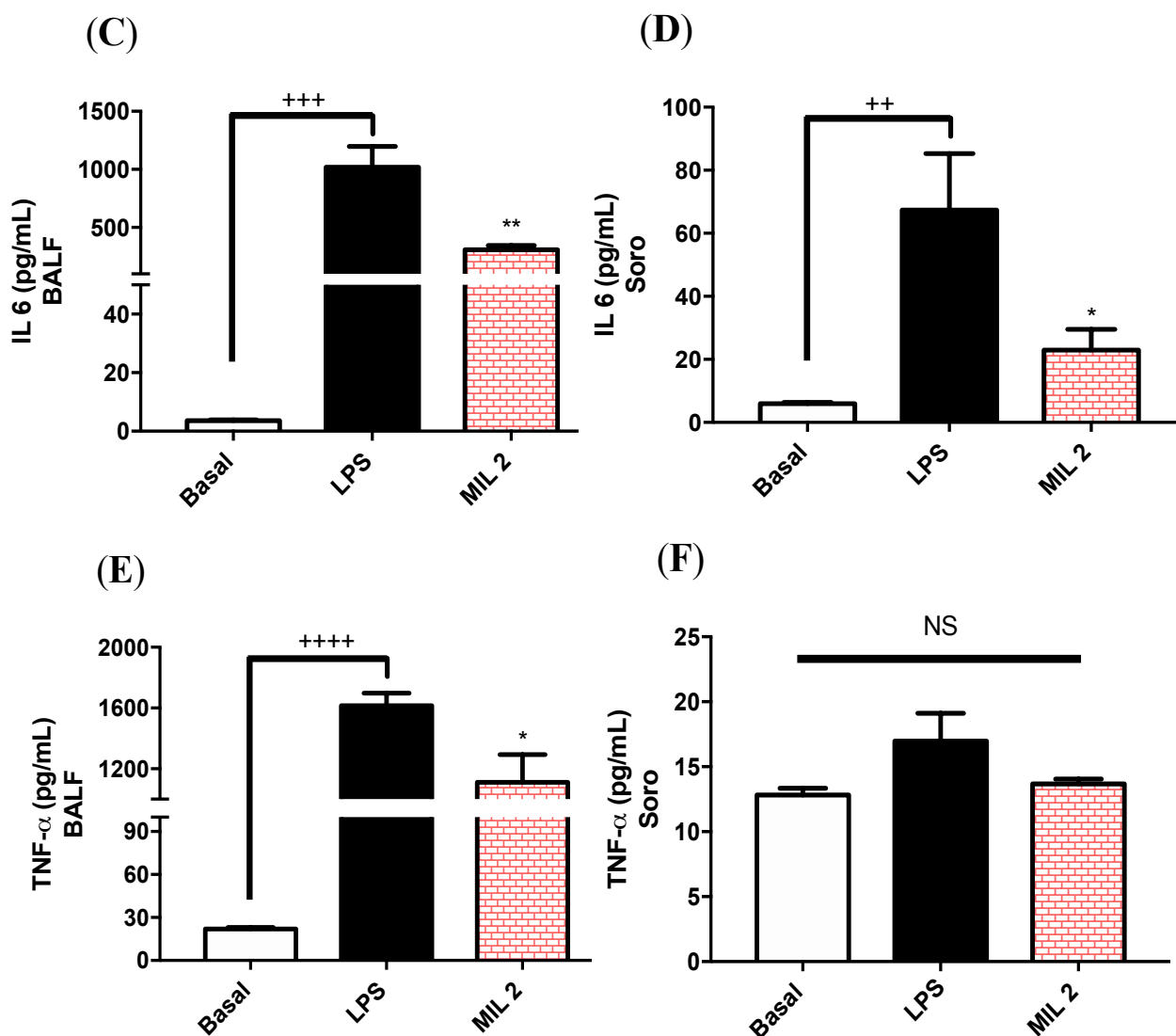


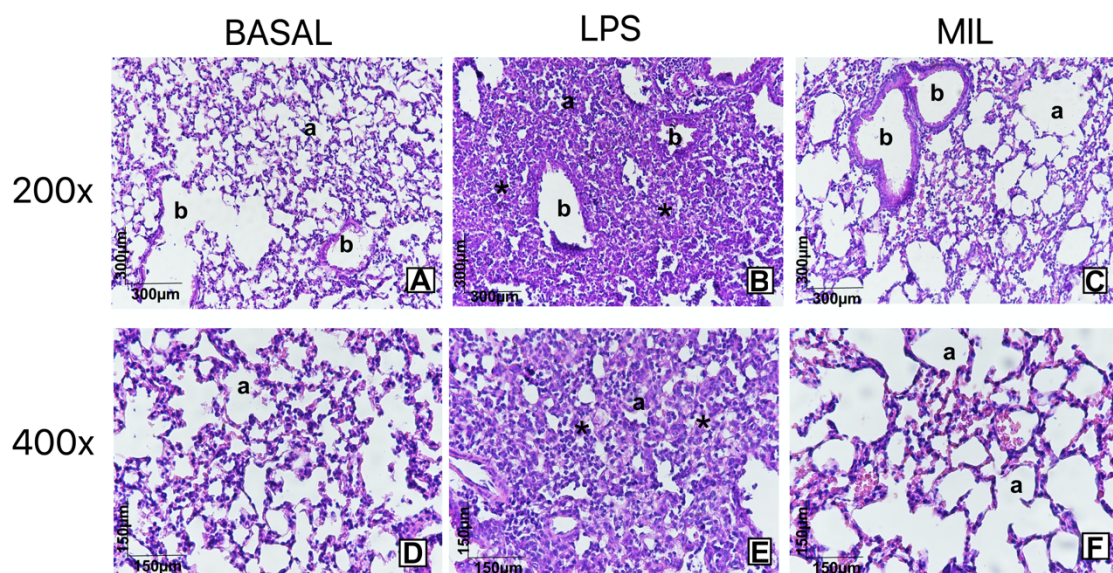
Gráfico 4. Camundongos BALB/c (n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois do desafio, foram tratados com a milonina (2,0 mg/kg; v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). No tempo de 24h após o desafio, os animais foram eutanasiados e coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e o sangue para avaliação dos níveis de citocinas: (A, B) IL-1 β ; (C, D) IL-6; (E, F) TNF- α ; no BALF e no soro, respectivamente. Os gráficos representam a média $\pm$ E.P.M. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$, ++++ $p < 0,0001$ comparação entre grupo LPS e basal; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.5. Efeito do tratamento com a milonina no tecido pulmonar após 24h do estímulo com o LPS

Nas imagens representativas de cortes de pulmões (**Figuras 13 A-E**) corados com hematoxilina e eosina observamos que os pulmões dos animais do grupo basal exibem bronquíolos (b) e alvéolos pulmonares (a) com ausência de células inflamatórias no parênquima pulmonar e preservação da arquitetura bronquicoalveolar (**Figura 13 A e D**). No entanto, os animais doentes (LPS), exibiram pulmões com alvéolos repletos de células inflamatórias (*) as quais preenchem totalmente os espaços alveolares (**Figura 13 B e E**). Os animais tratados com a milonina tiveram arquitetura bronquicoalveolar preservadas, além da redução do número de células inflamatórias nos espaços alveolares (C e F). Os dados morfométricos confirmam a redução do processo inflamatório induzida pela milonina (**Gráfico 5**).

FIGURA 13. Histologia de pulmões de camundongos com lesão pulmonar aguda (LPA) induzido por lipopolissacarídeo (LPS)



Nota: As imagens de A-F são fotomicrografias dos cortes histológicos do pulmão corados com H&E, x200 (300 µm), aproximados x400 (150 µm). Os asteriscos (*) indicam infiltrado celular, (b) a presença de bronquíolos e (a) alvéolos pulmonares. O grupo Basal (A e D) recebeu apenas salina. O grupo LPS (B e E) foi desafiado com LPS e tratado com salina (2,5 mg/kg; i.n). O grupo milonina (C e F) foi tratado com o alcaloide (2 mg/kg; v.o) e desafiado com LPS (2,5 mg/kg; i.n).

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

Gráfico 5. Dados morfométricos dos pulmões de camundongos com lesão pulmonar aguda (LPA) induzido por lipopolissacarídeo (LPS)

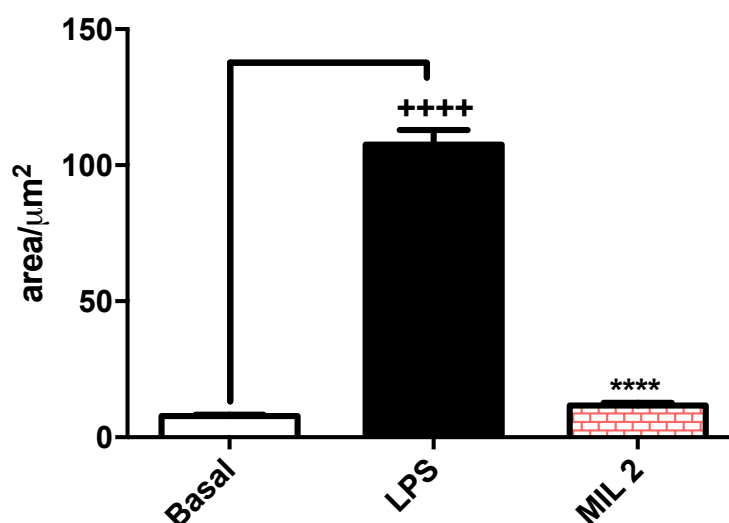


Gráfico 5. A partir de lâminas de tecido pulmonar submetidas ao protocolo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzido por lipopolissacarídeo (LPS), foram obtidas imagens aleatórias sob um microscópio óptico com resolução de 440×. Vinte imagens foram retransmitidas para um sistema de análise de imagem que quantifica a quantidade de processo inflamatório. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey +++++ $p < 0,0001$ comparação entre grupo LPS e salina; **** $p < 0,0001$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.6. Efeito do tratamento com a milonina na frequência de expressão da proteína intracelular Akt a partir do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o LPS

Para avaliar o mecanismo pelo qual a milonina reduz a lesão pulmonar, as células do BAL foram analisadas quanto à expressão da proteína intracelular Akt. No gráfico 6 encontram-se as análises dos grupos experimentais em *dot plots* (pontos), sendo que no gráfico 6A apresenta o *gate* da população de células selecionadas por tamanho/granulosidade. O gráfico 6B mostra a fluorescência das células marcadas para Akt, e os gráficos 6C, B, C e E exibem os *dot plots* da marcação de células pela expressão de Akt no grupo basal, LPS e tratado com milonina, respectivamente. A partir desses resultados obtemos a frequência (**gráfico 7A**) e intensidade de fluorescência (IF) (**gráfico 7B**) da ativação da proteína Akt observada, no qual os animais do grupo LPS apresentaram aumento de IF ($p < 0,001$; $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo Basal. No entanto, nos animais desafiados com LPS e tratados com milonina observou-se uma redução de IF ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$) do Akt quando comparados aos animais do grupo LPS.

Gráfico 6. Efeito do tratamento com a milonina na expressão da proteína Akt em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA)

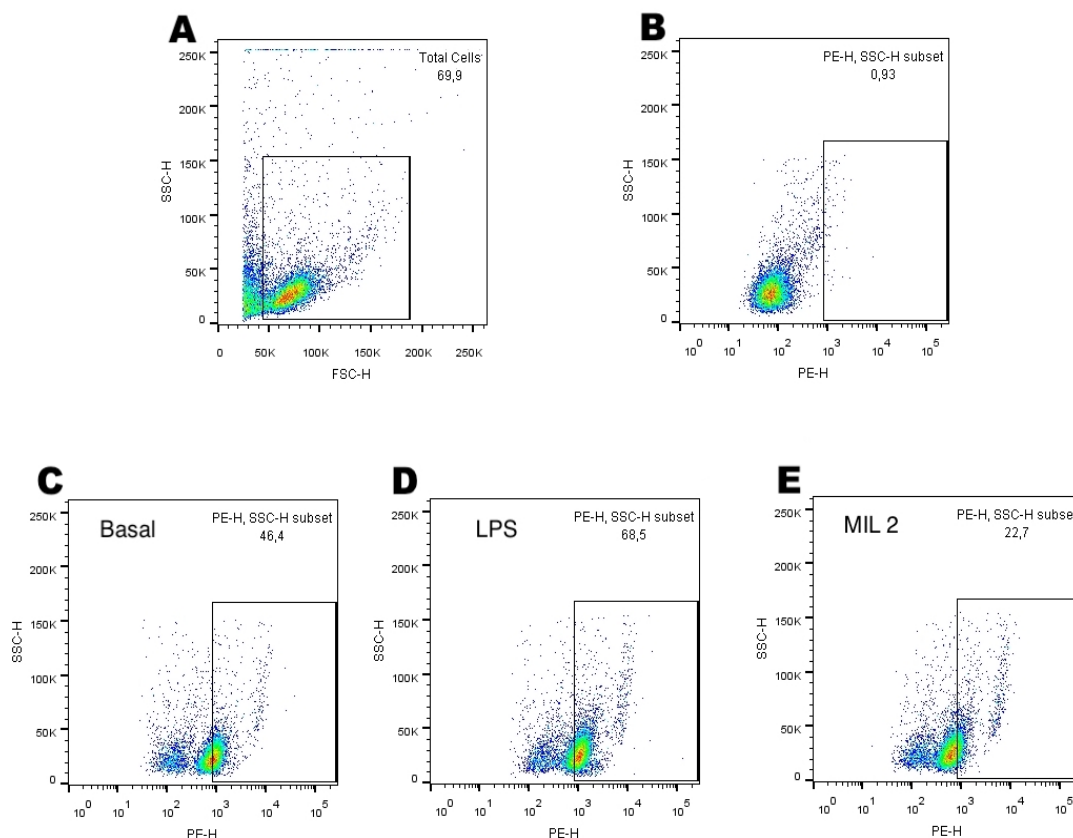


Gráfico 6. Camundongos BALB/c (n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois tratados com a milonina (2,0 mg/kg; v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). As células inflamatórias do BAL foram coletadas 24 h após o desafio e, pela técnica da citometria de fluxo obtido (A) o gráfico de pontos com o *gate* da população de células selecionadas por tamanho e granulosidade, (B) o gráfico de pontos da fluorescência de células marcadas para Akt e (C) gráfico de pontos da marcação pela expressão de Akt para os grupos basal, (D) LPS e (E) tratado com milonina.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

Gráfico 7. Efeito do tratamento com a milonina na frequência e intensidade de ativação da proteína intracelular Akt em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA)

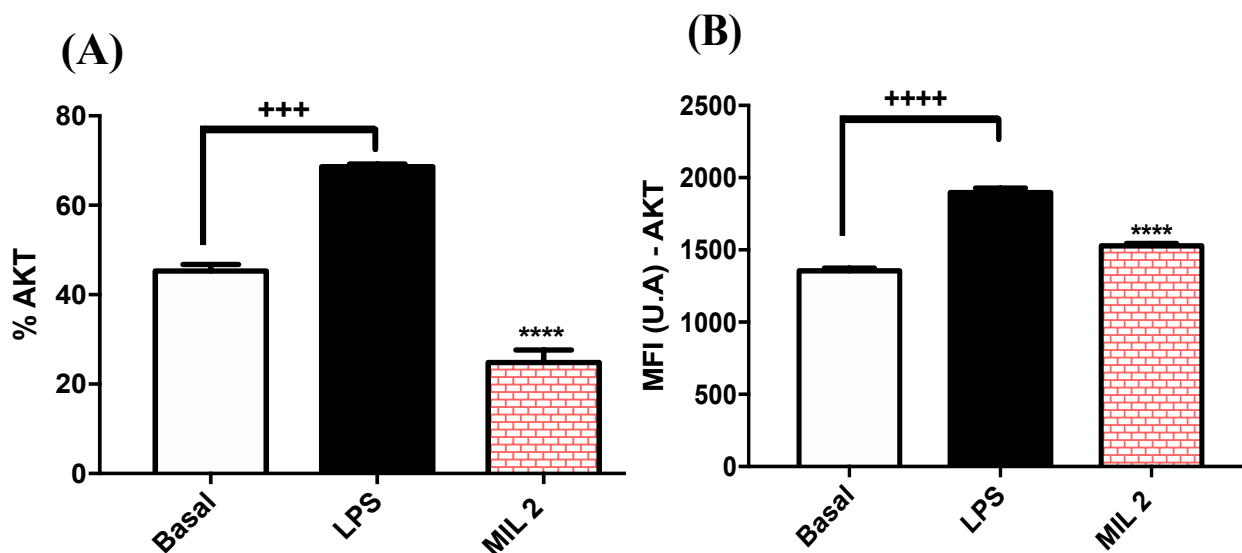


Gráfico 7. Camundongos BALB/c (n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois tratados com a milonina (2,0 mg/kg; v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). As células inflamatórias do BAL foram coletadas 24 h após o desafio e, pela técnica da citometria de fluxo. O gráfico (A) representa a média do percentual de expressão da frequência de ativação do Akt. O gráfico (B) representa a intensidade de fluorescência (MFI) do marcador anti-Akt. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. e submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey +++ $p < 0,001$ em comparação entre grupo LPS e basal; **** $p < 0,0001$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.7. Efeito do tratamento com a milonina na via de sinalização do NFκB (p65) a partir do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o LPS

As células do BAL foram analisadas quanto a expressão da proteína p65 do fator nuclear κB (p65 NFκB) pela técnica de citometria de fluxo e os resultados estão representados nos gráficos 8 e 9. No gráfico 8 encontram-se as análises por *dot plots* em citometria de fluxo, e o gráfico 8A mostra o *gate* da população de células selecionada por tamanho/granulosidade. O gráfico 8B mostra o *gate* da fluorescência das células marcadas com p65 NFκB e os gráficos 8 C, D e E exibem os *dot plots* da marcação de células pela expressão de p65 NFκB no grupo basal, LPS e tratado com milonina, respectivamente.

A partir desses resultados obtemos a frequência (**gráfico 9A**) e intensidade de fluorescência (**gráfico 9B**) de ativação do p65 NFκB. Assim, a frequência e intensidade de fluorescência de ativação do fator de transcrição p65NFκB no BAL em que os animais do grupo LPS apresentaram aumento ($p < 0,0001$; $p < 0,01$) quando comparados ao grupo Basal, respectivamente. Os animais desafiados com LPS e tratados com milonina foram capazes de reduzir ($p < 0,0001$; $p < 0,05$) a frequência e intensidade de fluorescência de ativação do p65NFκB no BAL quando comparados aos animais do grupo LPS, apresentando resultado similar aos animais saudáveis (grupo Basal). Esses resultados indicam que o efeito anti-inflamatório da milonina se dá, em parte, através a regulação negativa das vias de sinalização Akt/NFκB.

Gráfico 8. Efeito do tratamento com a milonina na expressão da porção p65 do fator de transcrição NFκB em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA)

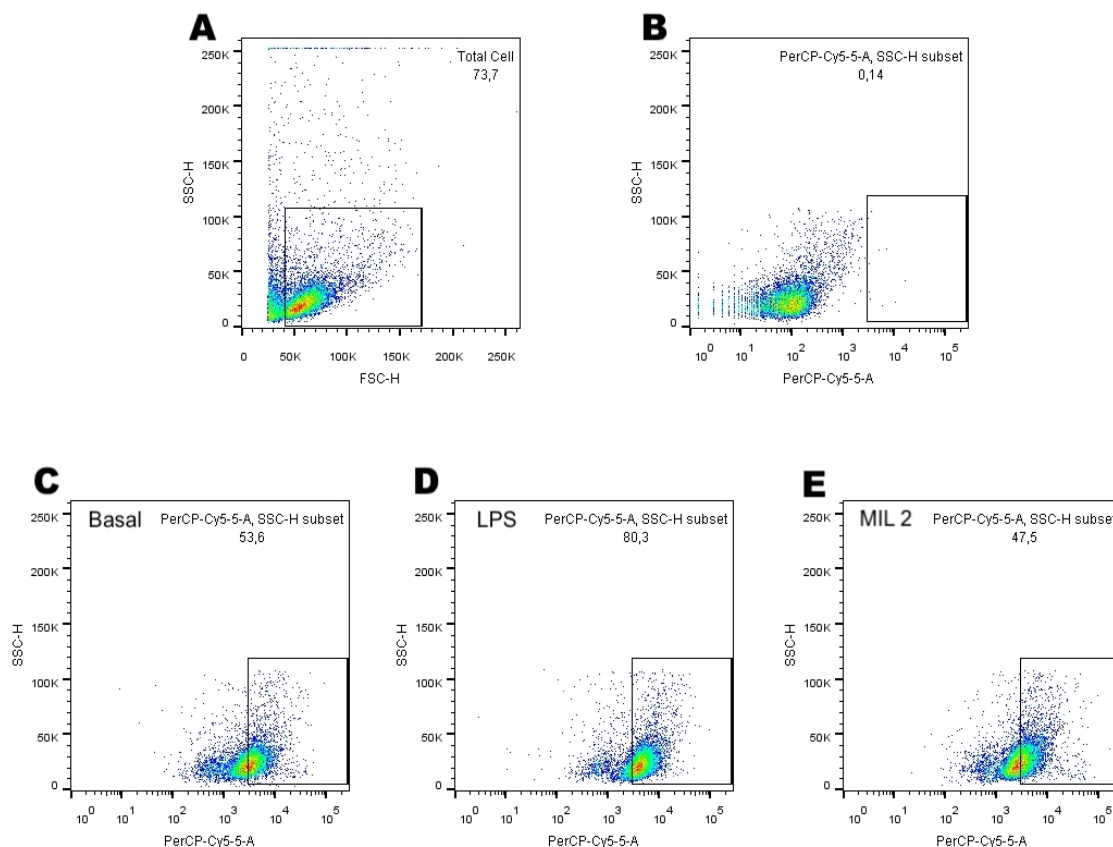


Gráfico 8. Camundongos BALB/c (n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois tratados com a milonina (2,0 mg/kg;v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com salina. As células inflamatórias do BAL foram coletadas 24 h após o desafio e, pela técnica da citometria de fluxo obtido (A) o gráfico de pontos com o *gate* da população de células selecionadas por tamanho e granulosidade, (B) o gráfico de pontos da fluorescência de células marcadas pelo NFκB (p65), e (C) gráfico de pontos da marcação de NFκB (p65), para os grupos Basal, (D) LPS e (E) tratado com milonina.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

Gráfico 9. Efeito do tratamento com a milonina na frequência de ativação da porção p65 do fator de transcrição NFκB(p65) em células do lavado broncoalveolar após 24h do estímulo com o lipopolissacarídeo (LPS) no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA)

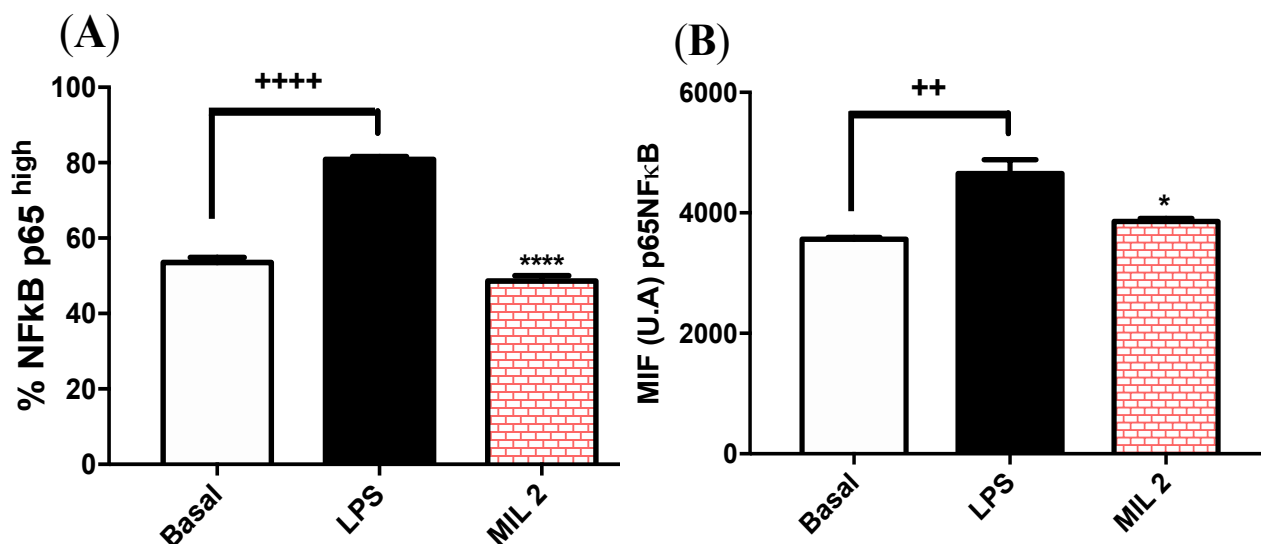


Gráfico 9. Camundongos BALB/c (n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) e 1h depois tratados com a milonina (2,0 mg/kg; v.o) ou veículo (grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com veículo (salina). As células inflamatórias do BAL foram coletadas 24 h após o desafio e, pela técnica da citometria de fluxo. O gráfico (A) representa a média do percentual de expressão da frequência de ativação da p65 do NFκB. O gráfico (B) representa a intensidade de fluorescência (MFI) do marcador anti-p65 do NFκB. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. e submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey +++++ $p < 0,0001$, ++ $p < 0,01$ em comparação entre grupo LPS e basal; **** $p < 0,0001$, * $p < 0,05$ para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.8 Análise de estudos *in silico* da milonina e o complexo TLR4/MD-2

Neste estudo, o encaixe entre a milonina e o complexo molécula – o receptor TLR4/MD-2 foi usado para investigar um possível mecanismo de ação do alcaloide e explorar suas interações químicas. A cavidade hidrofóbica denominada MD-2 do receptor desempenha papel fundamental no reconhecimento do LPS. Devido a essa informação, a milonina foi acoplada a essa proteína com o objetivo de avaliar um possível mecanismo de antagonismo de resposta molecular. A capacidade da milonina em se ligar ao MD-2 foi demonstrada com a energia de ligação de -43.96 kcal/mol. Em adição, o alcaloide formou diversas interações hidrofóbicas com a cavidade do MD-2, evento que pode ser verificado na figura 14 onde é possível observar as interações hidrofóbicas da milonina com os aminoácidos Ile124 e Phe126 do receptor MD-2 (**Figura 14B**).

Figura 14. Estrutura do receptor Toll like-4 e proteína diferenciação mieloide 2 (TLR4/MD-2) complexado a milonina

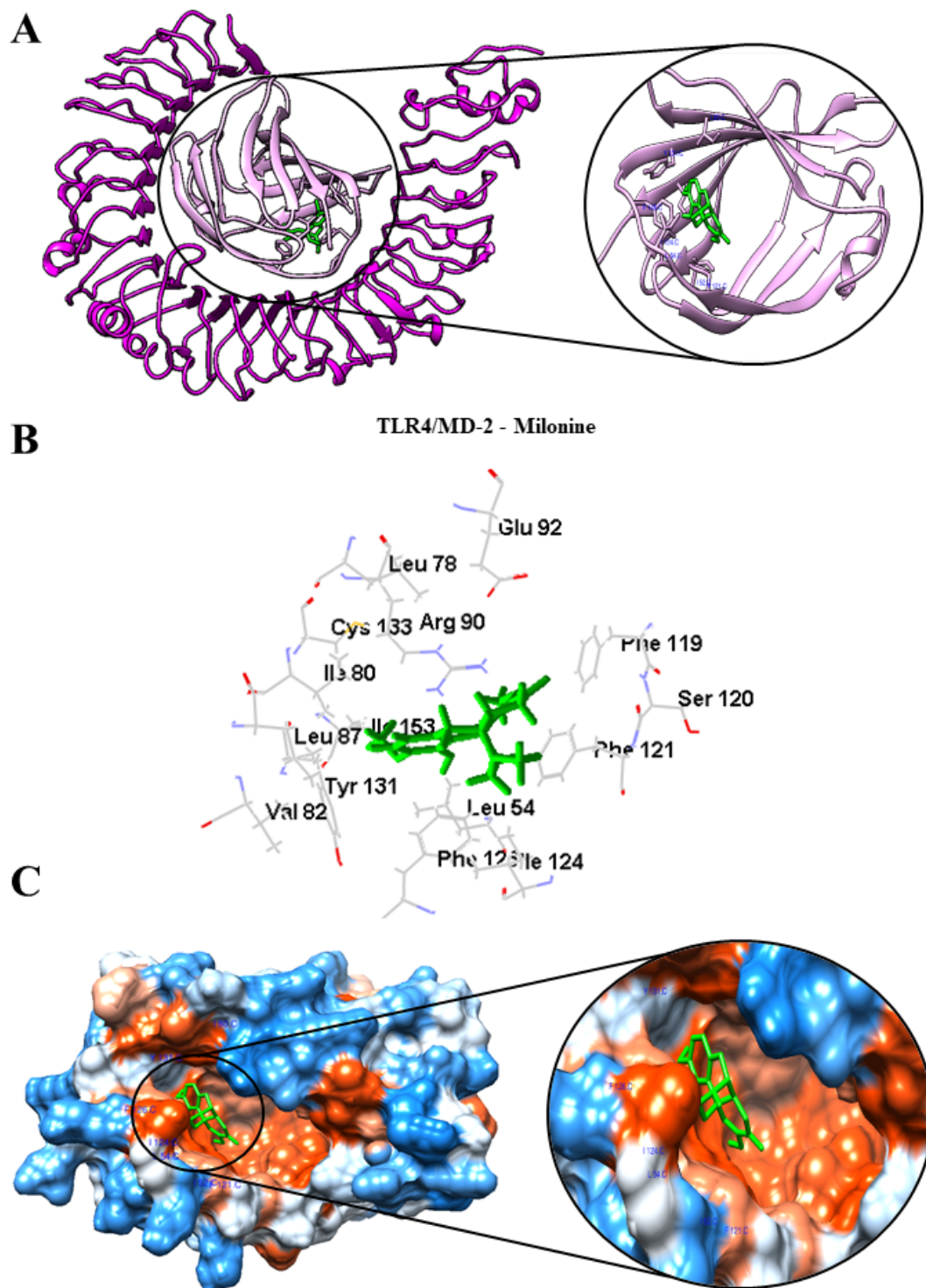


Figura 14. (A) A região compreendida pelo TLR4 está colorida em lilás escuro, a MD-2 está colorida em lilás claro e a milonina em verde. (B) Interações 3D do complexo MD-2 e a milonina. (C) Representação da superfície do MD-2. Resíduos carregados positivamente e negativamente estão coloridos em azul e laranja, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

5.9 Predição de propriedade farmacocinética e farmacodinâmica (ADMET)

A milonina foi submetida a diversas ferramentas preditivas computacionais para avaliar suas propriedades físico-químicas e seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico (ADMET). Através das propriedades físico-químicas, procuramos verificar a absorção e biodisponibilidade do composto. Como parâmetro consideramos a regra de Lipinski que é útil para a avaliação da biodisponibilidade de compostos administrados por via oral, isto é: compostos com peso molecular $\leq 500\text{g/mol}$; número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 ; doador de hidrogênio ≤ 5 ; e coeficiente de lipofilicidade ≤ 5 (LIPINSKI et al., 1997). Como resultado, observamos que a milonina não apresentou nenhuma violação das regras.

Outro parâmetro de regra para biodisponibilidade oral relevante é a regra de Veber, que atesta que o composto deve apresentar número de ligações rotacionais ≤ 10 e a área de superfície polar (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ (VEBER et al., 2002). Nesse sentido, os resultados acima descritos demonstram que o alcaloide apresenta propriedades moleculares excelentes quando relacionamos aos aspectos de absorção e permeabilidade em membranas biológicas após a administração.

Os fatores, como lipofilicidade e solubilidade, são importantes para determinar a distribuição de um medicamento *in vivo*. O parâmetro mais comum para lipofilicidade é o coeficiente de partição entre n-octanol e água (cLogP). No estudo verificamos que a milonina apresenta ótima lipofilicidade pois apresenta um cLogP 2,09. Para a solubilidade em meio aquoso (LogS), são representados de acordo com a seguinte escala: Insolúvel < -10 < pouco solúvel < -6 < Moderadamente < -4 < Solúvel < -2 Muito solúvel < 0 < Altamente solúvel. O composto foi considerado solúvel, com valor de LogS -3,71 (**Tabela I**).

Outro parâmetro associado a predição da biodisponibilidade é o TPSA, que está relacionado ao transporte molecular passivo através das membranas e, a partir dos dados gerados, é possível gerar valores de absorção gastrointestinal (%ABS). Nesse sentido valores de $\text{TPSA} < 140 (\text{\AA})^2$ são classificados por indicar boa absorção gastrointestinal e barreira

hematoencefálica. Em nossos dados, a milonina apresentou valores de TPSA de 59,00 (A°)² e uma taxa de absorção (%ABS) de 88,64% (**Tabela I**).

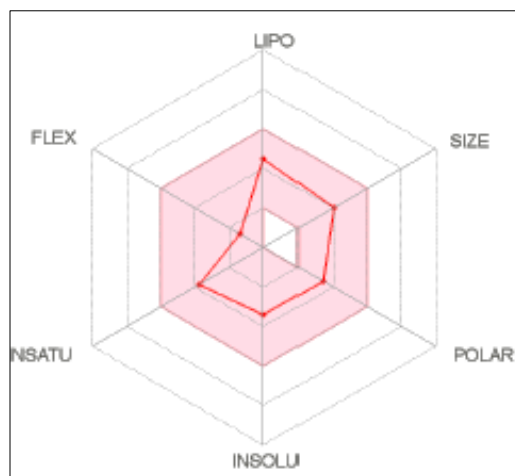
Tabela I – Análise *in silico* das características físico-químicas da milonina

ALH	DLH	MM(g/mol)	cLogP	Violação	N.LigR	TPSA	%ABS	LogS
5	1	329,39	2,09	0	2	59,00	88,64	-3,71

Nota: ALH: Aceptores de ligações de hidrogênio; DLH: doadores de ligações de hidrogênio; MM: massa molar; cLogP: coeficiente de partição; N.ligR: Número de Ligantes rotativos; TPSA: do inglês, área de superfície polar topográfica; %ABS: porcentagem de absorção; LogS: solubilidade.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

A partir dos dados acima descritos, o *software* gerou uma figura compilando seis propriedades físico-químicas (lipofilicidade, tamanho, polaridade, solubilidade, flexibilidade e saturação) que são levadas em consideração para a classificação de um fármaco semelhante a droga, conhecido como radar de biodisponibilidade. Este radar apresenta seis eixos com as seis propriedades importantes para a biodisponibilidade da molécula após a administração por via oral. Além disso, o radar de biodisponibilidade ilustra uma região rosa que expressa o limite considerado ótimo para cada propriedade, ao passo que o traçado em vermelho expressa os resultados obtidos para milonina. Observamos na Figura 15 que o alcaloide se posiciona inteiramente na faixa rosa indicando que a molécula teste se encontra dentro dos parâmetros físico-químicos, indicando ter uma boa disponibilidade oral.

Figura 15. Radar de biodisponibilidade da milonina

Nota: A área rosa representa a faixa ideal para cada propriedade e a vermelha corresponde aos resultados associados a milonina. LIPO: Lipofilicidade; SIZE: Massa molecular em g/mol; POLAR: Polaridade; INSOLU: Insolubilidade; INSATU: Insaturação; FLEX: Flexibilidade.

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

O metabolismo é extremamente importante e contribui na determinação da eficácia do fármaco, atuando na sua biodisponibilidade, meia-vida e geração de metabólitos nocivos ou sem potencial terapêutico. Os resultados mostraram que a milonina não inibiu ou não foi substrato para as quatro das cinco enzimas CYP analisadas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4). Isso indica que dificilmente o composto poderá formar subprodutos que podem diminuir sua eficácia (**Tabela II**).

Tabela II – Predição do comportamento da milonina para absorção, interação BHE, P-gp e isoformas de CYP450

AGi	BHE	P-gp	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
Alta	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não

Nota: AGi: absorção gastrointestinal, BHE: Barreira hemato-encefálica (se a molécula atravessa a barreira), P-gp: glicoproteína P (se a molécula interage com substrato), CYP: Isoformas da enzima citocromo P-450 oxidase (se a molécula inibe a enzima).

Fonte: Elaborada pela autora BERNARDO, 2022.

A toxicidade também foi avaliada e a milonina não apresentou qualquer tipo de previsibilidade no desenvolvimento de mutagenicidade, tumorigênese, efeito negativo no sistema reprodutor e irritabilidade. Portanto, essa molécula apresenta excelente perfil ADMET, principalmente por não apresentar risco de toxicidade.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O processo fisiopatológico da LPA se inicia com o insulto inicial, onde a ativação de macrófagos induz a inflamação pulmonar, levando a uma ruptura da membrana alvéolo-capilar, o que promove o aumento da permeabilidade de exsudato de proteínas e macromoléculas resultando no edema pulmonar considerado um marco fisiopatológico da LPA (WARE; MATTHAY, 2000).

No presente estudo, os animais desafiados com o LPS apresentaram edema pulmonar, e o tratamento com a milonina foi capaz de atenuar o extravasamento de líquido dos vasos para o tecido (exsudato proteico), portanto, atenuando a formação do edema pulmonar (SILVA et al., 2017). A ação anti-edematogênica da milonina foi previamente demonstrada em modelos experimentais de edema de pata induzido por agentes flogísticos como o LPS, a histamina, a prostaglandina E2 e a bradicinina. No modelo de permeabilidade microvascular da cavidade peritoneal induzida por ácido acético, a milonina atenuou o extravasamento de líquido com a preservação das paredes dos vasos sanguíneos e da formação do edema peritoneal (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Outra característica associada ao agravamento do processo inflamatório na LPA é a infiltração leucocitária, principalmente de neutrófilos, células efetoras nessa patologia. Essas células são as primeiras a serem recrutadas via os fatores quimiotáticos liberados de tecidos pulmonares danificados tais como histamina e TNF- α que atuam sobre o endotélio induzindo-o à expressão de moléculas de adesão como as L-selectinas (CHIANG et al., 2020; YANG et al., 2021).

O intenso influxo de neutrófilos no foco inflamatório leva à degranulação celular, com liberação de produtos tóxicos como proteinases, citocinas, espécies reativas de oxigênio e polipeptídeos catiônicos (ZEMANS; COLGAN; DOWNEY, 2009). Essas moléculas provocam aumento do estresse oxidativo local e contribuem para a destruição da arquitetura dos alvéolos, promovendo danos nas células adjacentes, como os pneumócitos tipo I ou II (YANG et al., 2021).

Em adição, essas moléculas acionam sinais quimiotáticos que induzem um *feedback* positivo, amplificando o processo inflamatório.

Outro mecanismo associado aos neutrófilos é a armadilha extracelular de neutrófilos (NETs), responsável pela eliminação de patógenos. Esse mecanismo além de eliminar o patógeno, danifica o tecido ao redor, uma vez que a resposta de defesa é inespecífica. Assim, o acúmulo de neutrófilos nos pulmões conduz a um quadro desfavorável ao paciente (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). Dessa forma, estratégias na redução de neutrófilos no tecido pulmonar, seja no recrutamento ou no comprometimento das funções imunológicas dos mesmos, são previstas para atenuar a lesão pulmonar.

Nesse estudo, foi observada intensa migração de células polimorfonucleares (neutrófilos) no fluido do lavado broncoalveolar (BAL) dos animais após 24h de estímulo com LPS. Observou-se que o tratamento com o alcaloide foi capaz de reduzir o número dessas células, sendo esse evento confirmado na análise histológica do tecido pulmonar. De forma semelhante ao nosso resultado, o alcaloide morfina sinomenina, composto natural utilizado na medicina Chinesa para o tratamento de artrite reumatoide, apresentou em modelo de LPA a redução na infiltração de neutrófilos nos tecidos pulmonares (CD177) (LI et al., 2013). Portanto, frente a esses resultados sugerimos preliminarmente que o alcaloide apresenta efeito anti-inflamatório na lesão pulmonar aguda via a inibição da migração de neutrófilos para o tecido pulmonar.

Adicionalmente, não observamos no BAL dos animais doentes e tratados com a milonina alteração no número de macrófagos. Os macrófagos são células que compõem o tecido pulmonar e são considerados as sentinelas no reconhecimento de patógenos. Apresentam-se em populações distintas como macrófagos do tipo M1 que possuem um perfil inflamatório, caracterizado pela expressão e secreção de fatores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e os macrófagos M2 que apresentam um perfil regulador e são caracterizados pela expressão e secreção de fatores anti-inflamatórios, como IL-10 e fator de crescimento transformador- β (TGF- β). O fenótipo dos macrófagos pode ocorrer de acordo com o microambiente em que

se encontram (HEROLD; MAYER; LOHMEYER, 2011; LASKIN; MALAVIYA; LASKIN, 2019).

O fato de a milonina não interferir no número dessa população celular no pulmão indica que seu efeito possa estar relacionado a sua ação na plasticidade celular, isto é, induzindo uma polarização de macrófagos para o perfil M2, com função reguladora da inflamação e do reparo do tecido. Em apoio a essa hipótese, o derivado da sinomenina, nomeado de C16, apresentou diminuição na expressão dos fatores de correlação ao fenótipo M1, com aumento na expressão aos fatores associados ao fenótipo M2 no modelo experimental de LPA. Esses resultados indicam que o C16 reprograma o fenótipo de macrófagos M1 para M2 após o estímulo de LPS (NI et al., 2021).

Os resultados desse estudo mostraram que a milonina também reduziu o número de linfócitos. Entretanto, essa população celular não exerce papel preponderante na fase mais aguda da lesão pulmonar aguda, mas apresenta papel preponderante em estágios crônicos, a exemplo do surgimento da população de linfócitos com perfil Th17 associado ao recrutamento de neutrófilos, o que agrava o quadro crônico da doença. Tem sido observado que pacientes com LPA induzida por infecção, e que apresentam um quadro grave, possuem ativação e proliferação de células com perfil Th17 (RISSO et al., 2015). Portanto, acreditamos que uma investigação do efeito da milonina em um modelo experimental de inflamação mais tardio de análise e que desenvolve o perfil imune Th17 poderá esclarecer a hipótese de que o alcaloide apresenta efeito sobre essa população celular.

Durante a LPA, vários mediadores contribuem para o aumento da permeabilidade e sustentam o recrutamento de leucócitos. Esses mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 são os principais componentes na exacerbação das respostas inflamatórias durante a LPA induzida por LPS. O TNF- α e a IL-1 β promovem o acúmulo de neutrófilos e a liberação de outra citocina como a IL-6, iniciando e dando continuidade à resposta inflamatória. A IL-6, TNF- α e IL-1 β apresentam sinergismo na resposta inflamatória (MURAKAMI; KAMIMURA; HIRANO, 2019). Em adição, a IL-6 é um importante indicador de gravidade das doenças inflamatórias, portanto,

monitorar o nível dessa citocina é crucial para a compreensão do processo fisiopatológico na LPA (CIESLA et al., 2005; BHATIA; MOOCHALA, 2004; GOODMAN et al., 2003).

Os estudos de quantificação das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , IL6, no BAL e no soro dos animais doentes tratados com a milonina nos mostraram níveis de produção reduzidos no BAL. Entretanto, a nível sistêmico, apenas a IL-6 foi reduzida. Segundo Hui e colaboradores (2017) e Swaroopa e colaboradores (2016) demonstraram que o aumento nos níveis séricos de IL-6 está diretamente relacionado ao aumento da taxa de mortalidade na LPA (HUI et al., 2017; SWAROOPA et al., 2016), portanto sua modulação a nível sistêmico parece ser um marcador de resolução.

Cabe ainda ressaltar que os níveis de TNF- α detectados no BAL dos animais dos diferentes grupos (saúdáveis, doentes ou tratados com milonina) indicam que essa citocina é produzida no pulmão no desafio com LPS, pois não houve diferença dessa citocina a nível sistêmico entre os grupos. Portanto, podemos inferir que o TNF- α esteja mediando a lesão tecidual e ativando o endotélio pulmonar no sentido de permitir a migração de neutrófilos para o tecido, e a milonina esteja, portanto, regulando sua produção e consequentemente diminuindo a lesão pulmonar (MILLAR et al., 2016).

O efeito da milonina na produção de citocinas foi previamente relatado em modelos de peritonite induzida por ácido acético corroborando, portanto com os resultados obtidos nesse estudo. Silva e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento com a milonina foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β no peritônio inflamado dos animais. Corroborando com os resultados acima descritos, estudos com a sinomenina, alcaloide morfinâmico, mostraram, em modelo experimental de artrite (LIU et al., 2018; XU et al., 2021) e em modelo de LPA expressiva redução dessas citocinas (LI et al., 2013; LIU et al., 2018). Portanto, com base nos resultados aqui apresentados hipotetizamos que um dos mecanismos de ação da milonina na regulação da inflamação aguda na LPA induzida por LPS esteja ligado à diminuição da ativação de vias de transdução intracelular envolvidas na produção de citocinas.

Para respaldar essa hipótese avaliamos o efeito da milonina no receptor Toll-like 4 (TLR4). Esse receptor desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro a microrganismos patogênicos, pois é o sítio de ligação do LPS. Uma vez o receptor seja ativo por seu ligante ativa via de sinalização NFκB (CHEN; HUA, 2020). Importante ressaltar que a via NFκB é o principal alvo de vias de sinalização como Akt e p38 MAPK, que controlam a fosforilação do inibidor do NFκB (IκB) e a translocação nuclear, para realização da produção de citocinas (NIE et al., 2019; STRASSHEIM et al., 2004; YUM et al., 2001).

Examinamos o efeito do alcaloide na ativação das vias de sinalização de Akt/NFκB. Assim, sob o estímulo do LPS, os animais tratados apenas com salina apresentaram regulação positiva para ambas as vias analisadas, Akt e NFκB nas células do BAL. Os animais desafiados com o LPS e tratados com a milonina apresentaram inibição da via de sinalização Akt/NFκB nas células do BAL. Em conformidade com esses resultados, têm sido descritos estudos com outros compostos morfinaêmicos, como dextrometorfano, naltrexona, sinomenina, oxicodona, que também demonstraram inibir a via de sinalização NFκB em modelos experimentais de inflamação (CHEN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2020). Esses resultados indicam que o efeito anti-inflamatório da milonina é, em parte, devido à inibição da via de sinalização intracelular Akt/NFκB no modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Alguns trabalhos relataram que os alcaloides morfinaêmicos diminuem a expressão do NFκB pela redução da ativação do TLR4 (LI et al., 2020; XU et al., 2020; ZENG; TONG, 2020). A ativação do receptor TLR4 pelo LPS requer elementos de iniciação como a interação com a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2) complexada ao receptor. O LPS é transferido para uma bolsa hidrofóbica na cavidade do MD-2, que leva a uma homodimerização do receptor TLR4, sendo esse evento essencial para ativação da sinalização intracelular (PARK et al., 2012). Portanto, com os resultados acima descritos, levantamos a hipótese de que a milonina tenha o MD-2 como alvo potencial. Assim, para verificar tal hipótese usamos a análise de *docking* molecular e verificamos que milonina apresenta ligação com o MD-2 via interações hidrofóbicas com os

aminoácidos Ile124 e Phe126. Estudos futuros serão necessários para avaliar a significância desses sítios de ligação no contexto da homodimerização do TLR4.

Diante da atividade imunoreguladora da milonina no contexto da LPA e a perspectiva de vir a ser um fitofármaco investigamos suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Nesse contexto, a obtenção das informações ocorreu por meio de análise computacional, utilizando *softwares* que fazem uso de algoritmos, e que possuem uso comprovado (KIRCHMAIR et al., 2015). As características físico-químicas de um fármaco, tais como peso da molécula, lipofilicidade, aceptores e doadores de hidrogênio, e suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), podem ser avaliadas via técnicas computacionais que vem sendo bastante utilizadas no estudo dos candidatos a novos fármacos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019).

As propriedades farmacocinéticas de absorção e biodisponibilidade oral da milonina foram avaliadas e consideramos a regra de *Lipinski*, que tem como definição um conjunto de parâmetros capazes de identificar compostos com problemas de absorção e permeabilidade. Nessa análise observamos que a milonina não apresentou violação da regra de *Lipinski* (LIPINSKI et al., 1997). Em adição, um outro parâmetro da regra Veber (número de ligações rotacionáveis e área de superfície polar), adicional para biodisponibilidade oral, também mostrou que a milonina não violou tal regra. Cabe aqui registrar que essa regra está associada à flexibilidade da molécula para a passagem através das membranas, permite a predição da absorção intestinal humana e passagem na barreira hematoencefálica (VEBER et al., 2002). Nesse sentido, os resultados do alcaloide indicam que possui propriedades moleculares excelentes quando relacionamos aspectos de absorção e permeabilidade em membranas biológicas.

Em adição, o metabolismo e excreção de fármacos estão associados ao processo de biotransformação, onde geralmente enzimas específicas atuam alterando a estrutura química do fármaco. O principal objetivo está em facilitar o processo de excreção tornando a molécula mais polar para ser eliminada (BRUNTON; BJORN; RANDA, 2017). Entre as enzimas que se destacam para o

metabolismo de muitos compostos, estão incluídas as isoformas de citocromo P-450, também conhecidas como CYP, que estão associadas ao metabolismo de vários medicamentos e xenobióticos. Dentre elas, as mais importantes CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e CYP3A5, responsáveis pela metabolização de mais de 90% das drogas (LYNCH; PRICE, 2007; ZANGER; SCHWAB, 2013). Nesse contexto, nosso estudo indica que a milonina inibe apenas uma das enzimas testadas (CYP2D6), sugerindo um perfil fracamente tóxico e com menor interação medicamentosa.

Outra propriedade fundamental de ser avaliada em uma molécula é a sua toxicidade, que deve ser evidenciada precocemente para evitar erros no desenvolvimento de ensaios não-clínicos tardios ou até em ensaios clínicos. Para tal, é possível utilizar através de técnicas computacionais um algoritmo de previsão de risco de toxicidade, ou seja, permitir avaliar a probabilidade de potenciais efeitos tóxicos que possam ser causados por uma molécula candidata a um medicamento (THARWAT; MOEMEN; HASSANIEN, 2016). Neste contexto, verificamos que a milonina não apresentou indicativo de efeitos tóxicos tais como mutagênico e tumorigênico no aparelho reprodutivo ou irritantes.

Dessa forma, diante do exposto acima, os resultados preditivos demonstram que a milonina apresenta boa propriedade farmacocinética e farmacodinâmica, tais como: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Essas são características que refletem a sua segurança e viabilidade para testes futuros.

Por fim, em resumo em nosso estudo, os resultados obtidos indicam que (1) em modelo experimental murino da LPA, a milonina atenuou o edema pulmonar, a lesão do tecido pulmonar e a infiltração de células inflamatórias; (2) inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS; (3) inibiu as vias de sinalização de Akt e NFκB, associadas à interação direta do alcaloide ao complexo TLR4/MD2; (4) apresentou um perfil ADMET aceitável como futuro fitofármaco.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, concluímos que o tratamento com milonina de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS:

- Apresentou atividade anti-inflamatória por inibir a migração de células inflamatórias dependente principalmente de neutrófilos no tecido pulmonar;
- Diminuiu a quantidade de proteínas totais extravasadas para o tecido inflamado, bem como o edema pulmonar;
- Regulou negativamente os níveis de IL-1- β , TNF- α , IL-6 no BAL, sendo a IL-6 diminuída também ao nível sistêmico;
- Manteve preservada a arquitetura bronquicoalveolar com redução do número de células inflamatórias nos espaços alveolares;
- Reduziu a ativação intracelular de Akt e a fosforilação de p65NF-kB em células do BAL.

Em estudos *in silico*, a milonina:

- Apresentou energia de ligação com interações hidrofóbicas e afinidade de ligação a aminoácidos na cavidade da proteína acessória MD-2 do receptor TLR4;
- Apresentou perfil ADMET preditivo com: alta absorção gastrointestinal e biodisponibilidade; baixa probabilidade de formar subprodutos com as CYP que poderiam diminuir sua eficácia; e baixa toxicidade para mutagenicidade, tumorigênese, sistema reprodutor e irritabilidade.

Portanto, a milonina, alcaloide morfinâmico de *Cissampelos sympodialis*, apresentou segurança, bom perfil teórico farmacocinético e farmacodinâmico, bem como propriedades anti-inflamatória sendo, portanto, uma molécula potencial para o desenvolvimento de um fitofármaco para o tratamento da inflamação pulmonar aguda.

Referências

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Adriano F.; VIEIRA, Giciane C.; GADELHA, Francisco A. A. F.; CAVALCANTE-SILVA, Luiz H. A.; MARTINS, Marco A.; BARBOSA-FILHO, José M.; PIUVEZAM, Marcia R. Milonine, an Alkaloid of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Inhibits Histamine Release of Activated Mast Cells. **Inflammation**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 2118–2128, 2017. DOI: 10.1007/s10753-017-0652-z. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-017-0652-z>.

AMATO, Marcelo B. P. et al. Effect of a Protective-Ventilation Strategy on Mortality in the Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 338, n. 6, p. 347–354, 1998. DOI: 10.1056/NEJM199802053380602. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199802053380602>.

AMATO, Marcelo B. P.; CARVALHO, Carlos R. R.; VIEIRA, Sílvia; ISOLA, Alexandre; ROTMAN, Vivian; MOOCK, Marcelo; JOSÉ, Anderson; FRANCA, Suelene Aires. Ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda / síndrome do desconforto respiratório agudo. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 374–383, 2007. DOI: 10.1590/S0103-507X2007000300020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2007000300020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

ASHBAUGH, David G.; BIGELOW, Donald B.; PETTY, Thomas L.; LEVINE, Bernard E. Acute respiratory distress in adults. **The Lancet**, [S. l.], v. 290, n. 7511, p. 319–323, 1967. DOI: 10.1016/S0140-6736(67)90168-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673667901687>.

BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. **The American review of respiratory disease**, [S. l.], v. 116, n. 4, p. 589–615, 1977. DOI: 10.1164/arrd.1977.116.4.589. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/921049>.

BAGCHI, Aranya; HERRUP, Elizabeth A.; WARREN, H. Shaw; TRIGILIO, James; SHIN, Hae-Sook; VALENTINE, Catherine; HELLMAN, Judith. MyD88-Dependent and MyD88-Independent Pathways in Synergy, Priming, and Tolerance between TLR Agonists. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 178, n. 2, p. 1164–1171, 2007. DOI: 10.4049/jimmunol.178.2.1164. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.178.2.1164>.

BARBOSA FILHO, José; AGRA, Maria de Fátima; THOMAS, George. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciênc. cult. (São Paulo)**, [S. l.], p. 386–94, 1997.

BARREIRO, Eliezer J.; RODRIGUES, Carlos R.; ALBUQUERQUE, Magaly G.; SANT'ANNA, Carlos M. R.; ALENCASTRO, Ricardo B. **Modelagem molecular: Uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em Química Medicinal**. [s.l.: s.n.].

BATES, Jason H. T.; SMITH, Bradford J. Ventilator-induced lung injury and lung

mechanics. **Annals of Translational Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 19, p. 378–378, 2018. DOI: 10.21037/atm.2018.06.29. Disponível em: <http://atm.amegroups.com/article/view/20276/21285>.

BEITLER, Jeremy R.; MALHOTRA, Atul; THOMPSON, B. Taylor. Ventilator-induced Lung Injury. **Clinics in Chest Medicine**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 633–646, 2016. DOI: 10.1016/j.ccm.2016.07.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027252311630079X>.

BELLANI, Giacomo et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. **JAMA**, [S. l.], v. 315, n. 8, p. 788, 2016. DOI: 10.1001/jama.2016.0291. Disponível em: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2016.0291>.

BELLINGAN, Geoff J. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. **Thorax**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 540–546, 2002. DOI: 10.1136/thorax.57.6.540. Disponível em: <https://thorax.bmj.com/lookup/doi/10.1136/thorax.57.6.540>.

BERNARD, Gordon R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 149, n. 3, p. 818–824, 1994. DOI: 10.1164/ajrccm.149.3.7509706. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm.149.3.7509706>.

BHATIA, Madhav; MOOCHHALA, Shabbir. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. **The Journal of Pathology**, [S. l.], v. 202, n. 2, p. 145–156, 2004. DOI: 10.1002/path.1491. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1491>.

BIGATELLO, Luca M.; PESENTI, Antonio. Ventilator-induced Lung Injury. **Anesthesiology**, [S. l.], v. 111, n. 4, p. 699–700, 2009. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181b76545. Disponível em: <https://pubs.asahq.org/anesthesiology/article/111/4/699/9581/Ventilatorinduced-Lung-InjuryLess-Ventilation-Less>.

BRUNTON, Laurence; BJORN, Knollman; RANDA., Hilal-Dandan. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 13. ed. New Yor: McGraw-Hill, 2017.

BUTT, Yasmeen; KURDOWSKA, Anna; ALLEN, Timothy Craig. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 140, n. 4, p. 345–350, 2016. DOI: 10.5858/arpa.2015-0519-RA. Disponível em: <http://meridian.allenpress.com/aplm/article/140/4/345/65203/Acute-Lung-Injury-A-Clinical-and-Molecular-Review>.

CASER, Eliana B.; ZANDONADE, Eliana; PEREIRA, Ewerton; GAMA, Ana Maria Casati; BARBAS, Carmen S. V. Impact of Distinct Definitions of Acute Lung Injury on Its Incidence and Outcomes in Brazilian ICUs. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 574–582, 2014. DOI:

10.1097/01.ccm.0000435676.68435.56. Disponível em:
<http://journals.lww.com/00003246-201403000-00010>.

CAVALCANTE, Horacina M. M. **Atividade espasmolítica em musculatura lisa e citotoxicidade de milonina – um novo alcaloide das folhas de *C. sympodialis* EICHL**. 2003. Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2003.

CAVALCANTE, Horacina M. M.; RIBEIRO, Thaís P.; SILVA, Darízy F.; NUNES, Xirley P.; BARBOSA-FILHO, José M.; DINIZ, Margareth F. F. M.; CORREIA, Nadja A.; BRAGA, Valdir A.; MEDEIROS, Isac A. Cardiovascular Effects Elicited by Milonine, a New 8,14-Dihydromorphinandienone Alkaloid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 122–130, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2010.00631.x. Disponível em:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-7843.2010.00631.x>.

CHEN, Der-Yuan; SONG, Pei-Shan; HONG, Jau-Shyong; CHU, Ching-Liang; PAN, I. Horng; CHEN, Yi-Ming; LIN, Ching-Hsiung; LIN, Sheng-Hao; LIN, Chi-Chen. Dextromethorphan Inhibits Activations and Functions in Dendritic Cells. **Clinical and Developmental Immunology**, [S. l.], v. 2013, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1155/2013/125643. Disponível em:
<https://www.hindawi.com/journals/jir/2013/125643/>.

CHEN, Hong; BAI, Chunxue; WANG, Xiangdong. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 773–783, 2010. DOI: 10.1586/ers.10.71. Disponível em:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/ers.10.71>.

CHEN, Zhi; HUA, Shan. Transcription factor-mediated signaling pathways' contribution to the pathology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **American journal of translational research**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 5608–5618, 2020. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33042442>.

CHENG, Li; ZHAO, Yan; QI, Di; LI, Wen; WANG, Daoxin. Wnt/ β -catenin pathway promotes acute lung injury induced by LPS through driving the Th17 response in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 495, n. 2, p. 1890–1895, 2018. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.058. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X1732452X>.

CHEUNG, Oi-Yee; GRAZIANO, Paolo; SMITH, Maxwell L. Acute Lung Injury. *In: Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach*. [s.l.] : Elsevier, 2018. p. 125-146.e3. DOI: 10.1016/B978-0-323-44284-8.00006-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323442848000065>.

CHIANG, Chih-Chao; KORINEK, Michal; CHENG, Wei-Jen; HWANG, Tsong-Long. Targeting Neutrophils to Treat Acute Respiratory Distress Syndrome in Coronavirus Disease. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.572009. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2020.572009/full>.

CHIMENTI, Laura et al. Comparison of direct and indirect models of early

induced acute lung injury. **Intensive Care Medicine Experimental**, [S. l.], v. 8, n. S1, p. 62, 2020. DOI: 10.1186/s40635-020-00350-y. Disponível em: <https://icm-experimental.springeropen.com/articles/10.1186/s40635-020-00350-y>.

CHOI, Bong-Hyuk; AHN, In-Sook; KIM, Yu-Hee; PARK, Ji-Won; LEE, So-Young; HYUN, Chang-Kee; DO, Myoung-Sool. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte. **Experimental & Molecular Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 599–605, 2006. DOI: 10.1038/emm.2006.71. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/emm200671>.

CROKER, Ben A.; KIU, Hiu; NICHOLSON, Sandra E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 414–422, 2008. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.07.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952108000499>.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 42717, 2017. DOI: 10.1038/srep42717. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep42717>.

DE FREITAS, Maria R.; DE ALENCAR, Jacicarlos L.; DA-CUNHA, Emidio V. L.; BARBOSA-FILHO, Jose M.; GRAY, Alexander I. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 1553–1555, 1995. a. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00332-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942295003322>.

DE FREITAS, Maria Regina; DE ALENCAR, Jacicarlos Lima; DA-CUNHA, Emidio V. L.; BARBOSA-FILHO, Jose M.; GRAY, Alexander I. Milonine, an 8,14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 1553–1555, 1995. b. DOI: 10.1016/0031-9422(95)00332-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942295003322>.

DE HARO, Candelaria; MARTIN-LOECHES, Ignacio; TORRENTS, Eva; ARTIGAS, Antonio. Acute respiratory distress syndrome: prevention and early recognition. **Annals of Intensive Care**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 11, 2013. DOI: 10.1186/2110-5820-3-11. Disponível em: <http://annalsofintensivecare.springeropen.com/articles/10.1186/2110-5820-3-11>.

DE NARDO, Dominic. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, [S. l.], v. 74, n. 2, p. 181–189, 2015. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.02.025. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466615001039>.

DEBNATH, Bikash; SINGH, Waikhom Somraj; DAS, Manik; GOSWAMI, Sanchari; SINGH, Mahesh Kumar; MAITI, Debasish; MANNA, Kuntal. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials Today Chemistry**, [S. l.], v. 9, p. 56–72, 2018. DOI:

10.1016/j.mtchem.2018.05.001. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468519418300685>.

FERREIRA, Leonardo L. G.; ANDRICOPULO, Adriano D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 24, n. 5, p. 1157–1165, 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.03.015. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644618303301>.

FIALKOW, Léa; FARENZENA, Maurício; WAWRZENIAK, Iuri; BRAUNER, Janete; VIEIRA, Sílvia; VIGO, Alvaro; BOZZETTI, Mary. Mechanical ventilation in patients in the intensive care unit of a general university hospital in southern Brazil: an epidemiological study. **Clinics**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 145–151, 2016. DOI: 10.6061/clinics/2016(03)05. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785851/?report=classic>.

FOSSATI, Elena; NARCROSS, Lauren; EKINS, Andrew; FALGUEYRET, Jean-Pierre; MARTIN, Vincent J. J. Synthesis of Morphinan Alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e0124459, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0124459. Disponível em:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124459>.

GARCIA, Cristiane S. N. B.; PELOSI, Paolo. Diferenças entre as Formas Pulmonares e Extrapulmonares da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. **Pulmão RJ**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 19–23, 2011.

GENG, Xiao et al. Matrine inhibits itching by lowering the activity of calcium channel. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 11328, 2018. DOI:

10.1038/s41598-018-28661-x. Disponível em:
<http://www.nature.com/articles/s41598-018-28661-x>.

GOODMAN, Richard B.; PUGIN, Jérôme; LEE, Janet S.; MATTHAY, Michael A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 523–535, 2003. DOI: 10.1016/S1359-6101(03)00059-5. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610103000595>.

GROMMES, Jochen; SOEHNLEIN, Oliver. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. **Molecular Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 3–4, p. 293–307, 2011. DOI: 10.2119/molmed.2010.00138. Disponível em:

<https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.2119/molmed.2010.00138>.

GU, Lili; LI, Ning; GONG, Jianfeng; LI, Qiurong; ZHU, Weiming; LI, Jieshou. Berberine Ameliorates Intestinal Epithelial Tight-Junction Damage and Down-regulates Myosin Light Chain Kinase Pathways in a Mouse Model of Endotoxemia. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 203, n. 11, p. 1602–1612, 2011. DOI: 10.1093/infdis/jir147. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jir147>.

GUO, Jinsheng; FRIEDMAN, Scott L. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 21, 2010. DOI: 10.1186/1755-1536-3-21. Disponível em:

<https://fibrogenesis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-1536-3-21>.

HEROLD, Susanne; MAYER, Konstantin; LOHMEYER, Juergen. Acute Lung

Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 2, 2011. DOI: 10.3389/fimmu.2011.00065. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2011.00065/abstract>.

HERRIDGE, Margaret S. et al. Functional Disability 5 Years after Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 364, n. 14, p. 1293–1304, 2011. DOI: 10.1056/NEJMoa1011802. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1011802>.

HERRIDGE, Margaret S.; MOSS, Marc; HOUGH, Catherine L.; HOPKINS, Ramona O.; RICE, Todd W.; BIENVENU, O. Joseph; AZOULAY, Elie. Recovery and outcomes after the acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients and their family caregivers. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 725–738, 2016. DOI: 10.1007/s00134-016-4321-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-016-4321-8>.

HORBY P, LIM WS, EMBERSON JR, MAFHAM M, Et al. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 384, n. 8, p. 693–704, 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa2021436. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2021436>.

HUANG, Xiaofang; XIU, Huiqing; ZHANG, Shufang; ZHANG, Gensheng. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2018, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1155/2018/1264913. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2018/1264913/>.

HUGHES, JP; REES, S.; KALINDJIAN, SB; PHILPOTT, KL. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.

HUI, Liangliang; ZHANG, Xiangcheng; AN, Xusheng; LI, Jinfang; ZANG, Kui; SHANG, Futai; ZHANG, Chongming; ZHANG, Guoxin. Higher serum procalcitonin and IL-6 levels predict worse diagnosis for acute respiratory distress syndrome patients with multiple organ dysfunction. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 7401–7407, 2017. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6965210/>. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31966582>.

KAR, Supratik; LESZCZYNSKI, Jerzy. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 1473–1487, 2020. DOI: 10.1080/17460441.2020.1798926. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17460441.2020.1798926>.

KHAN, Tahmeena; LAWRENCE, Alfred J.; AZAD, Iqbal; RAZA, Saman; JOSHI, Seema; KHAN, Abdul Rahman. Computational Drug Designing and Prediction Of Important Parameters Using in silico Methods- A Review. **Current Computer-Aided Drug Design**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 384–397, 2019. DOI: 10.2174/1573399815666190326120006. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/170974/article>.

KIELIAN, Tammy L.; BLECHA, Frank. CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: A review. **Immunopharmacology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 187–205, 1995. DOI: 10.1016/0162-3109(95)00003-C. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016231099500003C>.

KIRCHMAIR, Johannes; GÖLLER, Andreas H.; LANG, Dieter; KUNZE, Jens; TESTA, Bernard; WILSON, Ian D.; GLEN, Robert C.; SCHNEIDER, Gisbert. Predicting drug metabolism: experiment and/or computation? **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 387–404, 2015. DOI: 10.1038/nrd4581. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd4581>.

KITCHEN, Douglas B.; DECORNEZ, Hélène; FURR, John R.; BAJORATH, Jürgen. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004. DOI: 10.1038/nrd1549. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd1549>.

LASKIN, Debra L.; MALAVIYA, Rama; LASKIN, Jeffrey D. Role of Macrophages in Acute Lung Injury and Chronic Fibrosis Induced by Pulmonary Toxicants. **Toxicological Sciences**, [S. l.], v. 168, n. 2, p. 287–301, 2019. DOI: 10.1093/toxsci/kfy309. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article/168/2/287/5258484>.

LI, Jun; ZHAO, Li; HE, Xie; ZENG, Yi-Jun; DAI, Shuang-Shuang. Sinomenine Protects against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice via Adenosine A2A Receptor Signaling. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. e59257, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0059257. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059257>.

LI, Sicong; LIU, Xin; CHEN, Xiaoran; BI, Lei. Research Progress on Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Alkaloids from Chinese Medical Herbs. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2020, p. 1–10, 2020. a. DOI: 10.1155/2020/1303524. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2020/1303524/>.

LI, Xinyi; LI, Rui; FANG, Qing; JAMAL, Muhammad; WANG, Chengyao; WANG, Yanlin; ZHANG, Zongze; WU, Xiaojing; SONG, Xuemin. Oxycodone attenuates vascular leak and lung inflammation in a clinically relevant two-hit rat model of acute lung injury. **Cytokine**, [S. l.], p. 155346, 2020. b. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155346. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466620303628>.

LI, Zheng; GENG, Ya-Na; JIANG, Jian-Dong; KONG, Wei-Jia. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S. l.], v. 2014, p. 1–12, 2014. DOI: 10.1155/2014/289264. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/289264/>.

LIAO, Chenzhong; PEACH, Megan L.; YAO, Risheng; NICKLAUS, Marc C. Molecular docking and structure-based virtual screening. In: **In Silico Drug Discovery and Design**. Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Science Ltd, 2013. p. 6–20. DOI: 10.4155/ebo.13.181. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.4155/ebo.13.181>.

LILL, Markus A.; DANIELSON, Matthew L. Computer-aided drug design platform using PyMOL. **Journal of computer-aided molecular design**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 13–9, 2011. DOI: 10.1007/s10822-010-9395-8.

LIMA, Lídia M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000600015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000600015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

LIMA, Thaline F. A.; ROCHA, Juliana D. B.; GUIMARÃES-COSTA, Anderson B.; BARBOSA-FILHO, José M.; DECOTÉ-RICARDO, Débora; SARAIVA, Elvira M.; ARRUDA, Luciana B.; PIUVEZAM, Marcia R.; PEÇANHA, Ligia M. T. Warifteine, an Alkaloid Purified from *Cissampelos sympodialis*, Inhibits Neutrophil Migration In Vitro and In Vivo. **Journal of Immunology Research**, [S. l.], v. 2014, p. 1–12, 2014. DOI: 10.1155/2014/752923. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2014/752923/>.

LIPINSKI, Christopher A.; LOMBARDO, Franco; DOMINY, Beryl W.; FEENEY, Paul J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 1–3, p. 3–25, 1997. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X96004231>.

LIU, Suzi; CHEN, Qiuhua; LIU, Junjun; YANG, Xiaoting; ZHANG, Yan; HUANG, Fengjie. Sinomenine protects against E.coli-induced acute lung injury in mice through Nrf2-NF- κ B pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 107, p. 696–702, 2018. a. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.048. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218334188>.

LIU, Weiwei; ZHANG, Yajie; ZHU, Weina; MA, Chunhua; RUAN, Jie; LONG, Hongyan; WANG, Yue. Sinomenine Inhibits the Progression of Rheumatoid Arthritis by Regulating the Secretion of Inflammatory Cytokines and Monocyte/Macrophage Subsets. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, 2018. b. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02228. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02228/full>.

LOU, Tianjiong; ZHANG, Zhongai; XI, Zhilei; LIU, Kang; LI, Lin; LIU, Baolin; HUANG, Fang. Berberine Inhibits Inflammatory Response and Ameliorates Insulin Resistance in Hepatocytes. **Inflammation**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 659–667, 2011. DOI: 10.1007/s10753-010-9276-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-010-9276-2>.

LYNCH, Tom; PRICE, Amy. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. **American family physician**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 391–6, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708140>.

MA, Ailing; YANG, Yongya; WANG, Qiuyang; WANG, Yin; WEN, Jing; ZHANG, Yanli. Anti-inflammatory effects of oxymatrine on rheumatoid arthritis in rats via regulating the imbalance between Treg and Th17 cells. **Molecular Medicine Reports**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 3615–3622, 2017. DOI: 10.3892/mmr.2017.6484.

Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.6484>.

MA, Bin; HOTTIGER, Michael O. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00378. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00378/abstract>.

MANSKE, Richard; RODRIGO, Russell. **The alkaloids**. New York: Academic Press, 1965.

MATTHAY, Michael A.; WARE, Lorraine B.; ZIMMERMAN, Guy A. The acute respiratory distress syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 122, n. 8, p. 2731–2740, 2012. DOI: 10.1172/JCI60331. Disponível em: <http://www.jci.org/articles/view/60331>.

MATTHAY, Michael A.; ZEMANS, Rachel L. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 147–163, 2011. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130158. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011110-130158>.

MATUTE-BELLO, Gustavo; FREVERT, Charles W.; MARTIN, Thomas R. Animal models of acute lung injury. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 295, n. 3, p. L379–L399, 2008. DOI: 10.1152/ajplung.00010.2008. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00010.2008>.

MAZGAEEN, Lalita; GURUNG, Prajwal. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 379, 2020. DOI: 10.3390/ijms21020379. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/2/379>.

MCGETTRICK, Anne F.; O'NEILL, Luke AJ. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 20–27, 2010. DOI: 10.1016/j.coi.2009.12.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791509002258>.

MEDURI, G. Umberto; BRIDGES, Lisa; SHIH, Mei-Chiung; MARIK, Paul E.; SIEMIENIUK, Reed A. C.; KOCAL, Mehmet. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 829–840, 2016. DOI: 10.1007/s00134-015-4095-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00134-015-4095-4>.

MEDURI, Gianfranco U.; BELL, William; SINCLAIR, Scott; ANNANE, Djillali. Pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. Glucocorticoid receptor-mediated regulation of inflammation and response to prolonged glucocorticoid treatment. **La Presse Médicale**, [S. l.], v. 40, n. 12, p. e543–e560, 2011. DOI: 10.1016/j.lpm.2011.04.023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S075549821100491X>.

MELO, Patricia S.; CAVALCANTE, Horacina M.; BARBOSA-FILHO, José M.; DINIZ, Margareth F. F. M.; MEDEIROS, Isac A.; HAUN, Marcela. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 142, n. 1–2, p. 143–151, 2003. DOI: 10.1016/S0378-4274(03)00064-X.

Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842740300064X>.

MILLAR, Fraser R.; SUMMERS, Charlotte; GRIFFITHS, Mark J.; TOSHNER, Mark R.; PROUDFOOT, Alastair G. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: Insights and therapeutic opportunities. **Thorax**, [S. l.], v. 71, n. 5, p. 462–473, 2016. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-207461.

MOKRA, Daniela; MIKOLKA, Pavol; KOSUTOVA, Petra; MOKRY, Juraj. Corticosteroids in Acute Lung Injury: The Dilemma Continues. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 19, p. 4765, 2019. DOI: 10.3390/ijms20194765. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/19/4765>.

MOWERY, Nathan T.; TERZIAN, W. T. Hillman; NELSON, Adam C. Acute lung injury. **Current Problems in Surgery**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 100777, 2020. DOI: 10.1016/j.cpsurg.2020.100777. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011384020300472>.

MURAKAMI, Masaaki; KAMIMURA, Daisuke; HIRANO, Toshio. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. **Immunity**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 812–831, 2019. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.027. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476131930144X>.

NETWORK, Acute Respiratory Distress Syndrome; BROWER, Roy; MATTHAY, Michael; MORRIS, Alan; SCHOENFELD, David; THOMPSON, Taylor; WHEELER, Arthur. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 342, n. 18, p. 1301–1308, 2000. DOI: 10.1056/NEJM200005043421801. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200005043421801>.

NI, Ping; LIU, Yue-Qin; MAN, Jin-Yu; LI, Wang; XUE, Shan-Shan; LU, Tao-Hong; SU, Zhao-Liang; ZHOU, Cheng-Lin. C16, a novel sinomenine derivatives, promoted macrophage reprogramming toward M2-like phenotype and protected mice from endotoxemia. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, [S. l.], v. 35, p. 205873842110267, 2021. DOI:

10.1177/20587384211026786. Disponível em:

<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/20587384211026786>.

NIE, Yunjuan et al. Dehydrocostus Lactone Suppresses LPS-induced Acute Lung Injury and Macrophage Activation through NF- κ B Signaling Pathway Mediated by p38 MAPK and Akt. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 1510, 2019. DOI: 10.3390/molecules24081510. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/8/1510>.

NUSSE, Roel. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Research**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 28–32, 2005. DOI: 10.1038/sj.cr.7290260. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/7290260>.

OLIVEIRA, Maria T. P.; RAMALHO, Theresa R. O.; FERREIRA, Laércia K. D. P.; LIMA, Ana L. A.; CORDEIRO, Manuela B.; COSTA, Hermann F.; RODRIGUES, Luís C.; PIUVEZAM, Marcia R. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid.

Immunopharmacology and Immunotoxicology, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 400–412, 2015. DOI: 10.3109/08923973.2015.1070173. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08923973.2015.1070173>.

PARK, Sun H.; KIM, Nam D.; JUNG, Jae-Kyung; LEE, Chong-Kil; HAN, Sang-Bae; KIM, Youngsoo. Myeloid differentiation 2 as a therapeutic target of inflammatory disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 133, n. 3, p. 291–298, 2012. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.11.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725811002038>.

PIERRI, Ciro L.; PARISI, Giovanni; PORCELLI, Vito. Computational approaches for protein function prediction: A combined strategy from multiple sequence alignment to molecular docking-based virtual screening. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1804, n. 9, p. 1695–1712, 2010. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570963910001068>.

PU, Jiang; FANG, Fan-Fu; LI, Xiu-Qing; SHU, Zhi-Heng; JIANG, Yi-Ping; HAN, Ting; PENG, Wei; ZHENG, Cheng-Jian. Matrine Exerts a Strong Anti-Arthritic Effect on Type II Collagen-Induced Arthritis in Rats by Inhibiting Inflammatory Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 17, n. 9, p. 1410, 2016. DOI: 10.3390/ijms17091410. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1410>.

PYRKOV, T. V.; OZEROV, I. V.; BALITSKAYA, E. D.; EFREMOV, R. G. Molecular docking: The role of noncovalent interactions in the formation of protein-nucleotide and protein-peptide complexes. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 446–455, 2010. DOI: 10.1134/S1068162010040023. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1134/S1068162010040023>.

QIN, Tian; DU, Ronghui; HUANG, Fengjie; YIN, Shasha; YANG, Jun; QIN, Siyuan; CAO, Wangsen. Sinomenine activation of Nrf2 signaling prevents hyperactive inflammation and kidney injury in a mouse model of obstructive nephropathy. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 92, p. 90–99, 2016. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584916000125>.

RAJASEKARAN, Subbiah; PATTARAYAN, Dhamotharan; RAJAGURU, P.; SUDHAKAR GANDHI, P. S.; THIMMULAPPA, Rajesh K. MicroRNA Regulation of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 231, n. 10, p. 2097–2106, 2016. DOI: 10.1002/jcp.25316. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25316>.

RANIERI, Marco; RUBENFELD, Gordon; THOMPSON, Taylor; FERGUSON, Niall; CALDWELL, Ellen; FAN, Eddy; CAMPOROTA, Luigi; SLUTSKY, Arthur. Acute Respiratory Distress Syndrome. **JAMA**, [S. l.], v. 307, n. 23, 2012. DOI:

10.1001/jama.2012.5669. Disponível em:
<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2012.5669>.

REZOAGLI, Emanuele; FUMAGALLI, Roberto; BELLANI, Giacomo. Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome. **Annals of Translational Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 14, p. 282–282, 2017. DOI: 10.21037/atm.2017.06.62. Disponível em:
<http://atm.amegroups.com/article/view/15694/15774>.

RIBEIRO-FILHO, Jaime; LEITE, Fagner C.; CALHEIROS, Andrea S.; CARNEIRO, Alan B.; AZEREDO, Juliana A.; ASSIS, Edson F.; DIAS, Celidarque S.; PIUVEZAM, Márcia R.; BOZZA, Patrícia. Curine Inhibits Macrophage Activation and Neutrophil Recruitment in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 705, 2019. DOI: 10.3390/toxins11120705. Disponível em:
<https://www.mdpi.com/2072-6651/11/12/705>.

RISSO, K.; KUMAR, G.; TICCHIONI, M.; SANFIORENZO, C.; DELLAMONICA, J.; GUILLOUET-DE SALVADOR, F.; BERNARDIN, G.; MARQUETTE, C. H.; ROGER, P. M. Early infectious acute respiratory distress syndrome is characterized by activation and proliferation of alveolar T-cells. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1111–1118, 2015. DOI: 10.1007/s10096-015-2333-x. Disponível em:
<http://link.springer.com/10.1007/s10096-015-2333-x>.

RIVIELLO, Elisabeth D. et al. Hospital Incidence and Outcomes of the Acute Respiratory Distress Syndrome Using the Kigali Modification of the Berlin Definition. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 193, n. 1, p. 52–59, 2016. DOI: 10.1164/rccm.201503-0584OC. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201503-0584OC>.

Robbins Basic Pathology - 10th Edition. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
<https://www.elsevier.com/books/robbins-basic-pathology/kumar/978-0-323-35317-5>. Acesso em: 29 nov. 2020.

ROTTA, Alexandre T.; PIVA, Jefferson P.; ANDREOLIO, Cinara; CARVALHO, Werther B.; GARCIA, Pedro C. R. Progress and perspectives in pediatric acute respiratory distress syndrome. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S. l.], v. 27, n. 3, 2015. DOI: 10.5935/0103-507X.20150035. Disponível em:
<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0103-507X.20150035>.

ROY, Anjali; SRIVASTAVA, Mansi; SAQIB, Uzma; LIU, Dongfang; FAISAL, Syed M.; SUGATHAN, Subi; BISHNOI, Suman; BAIG, Mirza S. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 40, p. 79–89, 2016. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.026. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156757691630354X>.

SAMPATH, VishnuPriya. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. **Agriculture and Natural Resources**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 115–120, 2018. DOI: 10.1016/j.anres.2018.08.002. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452316X17300406>.

SANTIAGO, Renata F. et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 2203–2215, 2015. DOI: 10.1007/s10753-015-0203-4. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-015-0203-4>.

SCHMELLER, T.; WINK, M. Utilization of Alkaloids in Modern Medicine. In: **Alkaloids**. Boston, MA: Springer US, 1998. p. 435–459. DOI: 10.1007/978-1-4757-2905-4_18. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-2905-4_18.

SILVA, Larissa R.; ALVES, Adriano F.; CAVALCANTE-SILVA, Luiz H. A.; BRAGA, Renan M.; DE ALMEIDA, Reinaldo N.; BARBOSA-FILHO, José M.; PIUVEZAM, Márcia R. Milonine, a Morphinandienone Alkaloid, Has Anti-Inflammatory and Analgesic Effects by Inhibiting TNF- α and IL-1 β Production. **Inflammation**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 2074–2085, 2017. DOI: 10.1007/s10753-017-0647-9. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-017-0647-9>.

SIPAHI, Emine Y.; ATALAY, Figen. Experimental Models of Acute Lung Injury. **Eurasian Journal of Pulmonology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 69–77, 2014. DOI: 10.5152/ejp.2014.49091. Disponível em: https://www.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdire=eurasianjpulmonol&plng=eng&un=SOLUNUM-49091.

SOUTO, Augusto L.; TAVARES, Josean F.; DA SILVA, Marcelo S.; DINIZ, Margareth F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, Petrônio F.; BARBOSA-FILHO, José M. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. **Molecules**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 8515–8534, 2011. DOI: 10.3390/molecules16108515. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/10/8515>.

STEINBERG, Kenneth P.; HUDSON, Leonard D.; GOODMAN, Richard B.; HOUGH, Catherine Lee; LANKEN, Paul N.; HYZY, Robert; THOMPSON, B. Taylor; ANCUKIEWICZ, Marek; NATIONAL HEART, LUNG, And Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Clinical Trials Network. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, [S. l.], v. 354, n. 16, p. 1671–84, 2006. DOI: 10.1056/NEJMoa051693. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16625008>.

STRASSHEIM, Derek; ASEHNOUNE, Karim; PARK, Jong-Sung; KIM, Jae-Yeol; HE, Qianbin; RICHTER, Donald; KUHN, Katherine; MITRA, Sanchayita; ABRAHAM, Edward. Phosphoinositide 3-Kinase and Akt Occupy Central Roles in Inflammatory Responses of Toll-Like Receptor 2-Stimulated Neutrophils. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 172, n. 9, p. 5727–5733, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.172.9.5727. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.172.9.5727>.

SWAROOPA, Deme; BHASKAR, Kakarla; MAHATHI, T.; KATKAM, Shivakrishna; RAJU, Y.; CHANDRA, Naval; KUTALA, Vijay. Association of serum interleukin-6, interleukin-8, and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score with clinical outcome in patients with acute respiratory

distress syndrome. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 20, n. 9, p. 518–525, 2016. DOI: 10.4103/0972-5229.190369. Disponível em: <https://www.ijccm.org/doi/10.4103/0972-5229.190369>.

SWEENEY, Rob Mac; MCAULEY, Daniel F. Acute respiratory distress syndrome. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 388, n. 10058, p. 2416–2430, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00578-X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27133972>.

SZARKA, Roderick J.; WANG, Nandi; GORDON, Lyle; NATION, P. ...; SMITH, Richard H. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997. DOI: 10.1016/S0022-1759(96)00236-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175996002360>.

THARWAT, Alaa; MOEMEN, Yasmine S.; HASSANIEN, Aboul Ella. A Predictive Model for Toxicity Effects Assessment of Biotransformed Hepatic Drugs Using Iterative Sampling Method. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 38660, 2016. DOI: 10.1038/srep38660. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep38660>.

THOMPSON, B. Taylor; CHAMBERS, Rachel C.; LIU, Kathleen D. Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 377, n. 6, p. 562–572, 2017. DOI: 10.1056/NEJMra1608077. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1608077>.

THOMSEN, René; CHRISTENSEN, Mikael H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006. DOI: 10.1021/jm051197e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm051197e>.

VAN DE WATERBEEMD, Han; GIFFORD, Eric. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 192–204, 2003. DOI: 10.1038/nrd1032. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrd1032>.

VEBER, Daniel F.; JOHNSON, Stephen R.; CHENG, Hung-Yuan; SMITH, Brian R.; WARD, Keith W.; KOPPLE, Kenneth D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002. DOI: 10.1021/jm020017n. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm020017n>.

VILLAR, Jesús; BLANCO, Jesús; KACMAREK, Robert M. Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome. **Current Opinion in Critical Care**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 1–6, 2016. DOI: 10.1097/MCC.0000000000000266. Disponível em: <http://journals.lww.com/00075198-201602000-00002>.

VOGEL, Stefanie N.; FENTON, Matthew. Toll-like receptor 4 signalling: new perspectives on a complex signal-transduction problem. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 664–668, 2003. DOI: 10.1042/bst0310664. Disponível em:

<https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/31/3/664/63515/Tolllike-receptor-4-signalling-new-perspectives-on>.

WARE, Lorraine. Pathophysiology of Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 337–349, 2006. DOI: 10.1055/s-2006-948288. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-948288>.

WARE, Lorraine B.; MATTHAY, Michael A. The acute respiratory distress syndrome. **The New England journal of medicine**, [S. l.], v. 342, n. 18, p. 1334–49, 2000. DOI: 10.1056/NEJM200005043421806. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793167>.

WEBB, David R. Animal models of human disease: Inflammation. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 87, n. 1, p. 121–130, 2014. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.06.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295213003857>.

WILLIAMS, George W.; BERG, Nathaniel K.; RESKALLAH, Alexander; YUAN, Xiaoyi; ELTZSCHIG, Holger K. Acute Respiratory Distress Syndrome. **Anesthesiology**, [S. l.], v. 134, n. 2, p. 270–282, 2021. DOI: 10.1097/ALN.0000000000003571. Disponível em: <https://pubs.asahq.org/anesthesiology/article/134/2/270/110746/Acute-Respiratory-Distress-SyndromeContemporary>.

WOUTERS, Olivier J.; MCKEE, Martin; LUYTEN, Jeroen. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA**, [S. l.], v. 323, n. 9, p. 844, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.1166. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762311>.

WU, Chaomin et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, [S. l.], v. 180, n. 7, p. 934, 2020. DOI: 10.1001/jamainternmed.2020.0994. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/2763184>.

WU, Min; WANG, Jie; LIU, Long-tao. Advance of studies on anti-atherosclerosis mechanism of berberine. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 188–192, 2010. DOI: 10.1007/s11655-010-0188-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11655-010-0188-7>.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **JAMA**, [S. l.], v. 323, n. 13, p. 1239, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.2648. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2762130>.

XAVIER, Bianka M. N.; FERREIRA, Larissa A. M. P.; FERREIRA, Laércia K. D. P.; GADELHA, Francisco A. A. F.; MONTEIRO, Talissa M.; DE ARAÚJO SILVA, Luiz A.; RODRIGUES, Luís C.; PIUVEZAM, Marcia R. MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF-κB signaling pathway-TLR4

dependent. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 68, n. 12, p. 1061–1070, 2019. DOI: 10.1007/s00011-019-01291-3. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-019-01291-3>.

XU, Neili; WANG, Yuejiao; ZHAO, Shuai; JIAO, Ting; XUE, Hongxia; SHAN, Fengping; ZHANG, Ning. Naltrexone (NTX) relieves inflammation in the collagen-induced- arthritis (CIA) rat models through regulating TLR4/NFκB signaling pathway. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 79, p. 106056, 2020. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106056. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576919313931>.

XU, Wencheng et al. Effects of sinomenine on the proliferation, cytokine production, and regulatory T-cell frequency in peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. **Drug Development Research**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 251–258, 2021. DOI: 10.1002/ddr.21748. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.21748>.

XU, Xiaoyun et al. Anti-pruritic and anti-inflammatory effects of oxymatrine in a mouse model of allergic contact dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 134–141, 2018. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.04.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181118301658>.

YANG, Jianzhong; AZAT, Mayra; PENG, Peng; CHANG, Yiping; GAO, Ranran; LI, Wenli; LI, Jiming; CHAI, Yage; LI, Dandan. Serum levels of TNF-α, IL-1β, IL-9, and IL-15 in acute respiratory distress syndrome. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 781–788, 2017.

YANG, Shun-Chin; TSAI, Yung-Fong; PAN, Yen-Lin; HWANG, Tsong-Long. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. **Biomedical Journal**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1016/j.bj.2020.09.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2319417020301499>.

YANG, Shun-Chin; TSAI, Yung-Fong; PAN, Yen-Lin; HWANG, Tsong-Long. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. **Biomedical Journal**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 439–446, 2021. DOI: 10.1016/j.bj.2020.09.001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2319417020301499>.

YU, Hui; LIN, Liangbin; ZHANG, Zhiqiang; ZHANG, Huiyuan; HU, Hongbo. Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 209, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-00312-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00312-6>.

YUM, Ho-Kee; ARCAROLI, John; KUPFNER, John; SHENKAR, Robert; PENNINGER, Josef M.; SASAKI, Takehiko; YANG, Kuang-Yao; PARK, Jong Sung; ABRAHAM, Edward. Involvement of Phosphoinositide 3-Kinases in Neutrophil Activation and the Development of Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 167, n. 11, p. 6601–6608, 2001. DOI: 10.4049/jimmunol.167.11.6601. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.167.11.6601>.

ZANG, Hui; ZHANG, Zhiqiang; LIU, Qingfeng; XIAO, Huimin; SUN, Tian; GUO, Enling; ZHANG, Lankun; GONG, Bensong. Oxymatrine improves L-arginine-induced acute pancreatitis related intestinal injury via regulating AKT/NFkB and claudins signaling. **Medicinal Chemistry Research**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 116–124, 2019. DOI: 10.1007/s00044-018-2269-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-018-2269-7>.

ZANGER, Ulrich M.; SCHWAB, Matthias. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813000065>.

ZEMANS, Rachel L.; COLGAN, Sean P.; DOWNEY, Gregory P. Transepithelial Migration of Neutrophils. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 519–535, 2009. DOI: 10.1165/rcmb.2008-0348TR. Disponível em: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2008-0348TR>.

ZENG, Meng-you; TONG, Qiao-yun. Anti-inflammation Effects of Sinomenine on Macrophages through Suppressing Activated TLR4/NF-κB Signaling Pathway. **Current Medical Science**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 130–137, 2020. DOI: 10.1007/s11596-020-2156-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11596-020-2156-6>.

ZHENG, Ping. Anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium-induced colitis of rats. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 11, n. 31, p. 4912, 2005. DOI: 10.3748/wjg.v11.i31.4912. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v11/i31/4912.htm>.

Anexos

9. ANEXO

9.1 Anexo I



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos e mecanismos de ação de produtos naturais e sintéticos bioativos em modelos experimentais de edema inflamatório, lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS).", protocolada sob o CEUA nº 7316150420 (ID 001064), sob a responsabilidade de **Marcia Regina Piuvezam e equipe; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; Larissa Rodrigues Bernardo; Grasiela Costa Bezerra; Raquel Fragoso Pereira; Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha ; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - 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 15/05/2020.

We certify that the proposal "Study of effects and mechanisms of action of natural and synthetic bioactive products in experimental models of inflammatory edema, acute lung injury (ALI) and combined allergic asthma and rhinitis syndrome (CARAS).", utilizing 676 Isogenics mice (325 males and 351 females), 312 Heterogenics mice (312 females), protocol number CEUA 7316150420 (ID 001064), under the responsibility of **Marcia Regina Piuvezam and team; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; Larissa Rodrigues Bernardo; Grasiela Costa Bezerra; Raquel Fragoso Pereira; Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha ; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - 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 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2020** a **12/2025**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 6 a 8 semanas N: 351
Linhagem:	Mus musculus - Balb/C			Peso: 20 a 25 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 6 a 8 semanas N: 325
Linhagem:	Mus musculus - Balb/C			Peso: 20 a 25 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 6 a 8 semanas N: 312
Linhagem:	Mus musculus - Swiss			Peso: 20 a 30 g

Local do experimento: Serão realizados no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa, 15 de maio de 2020

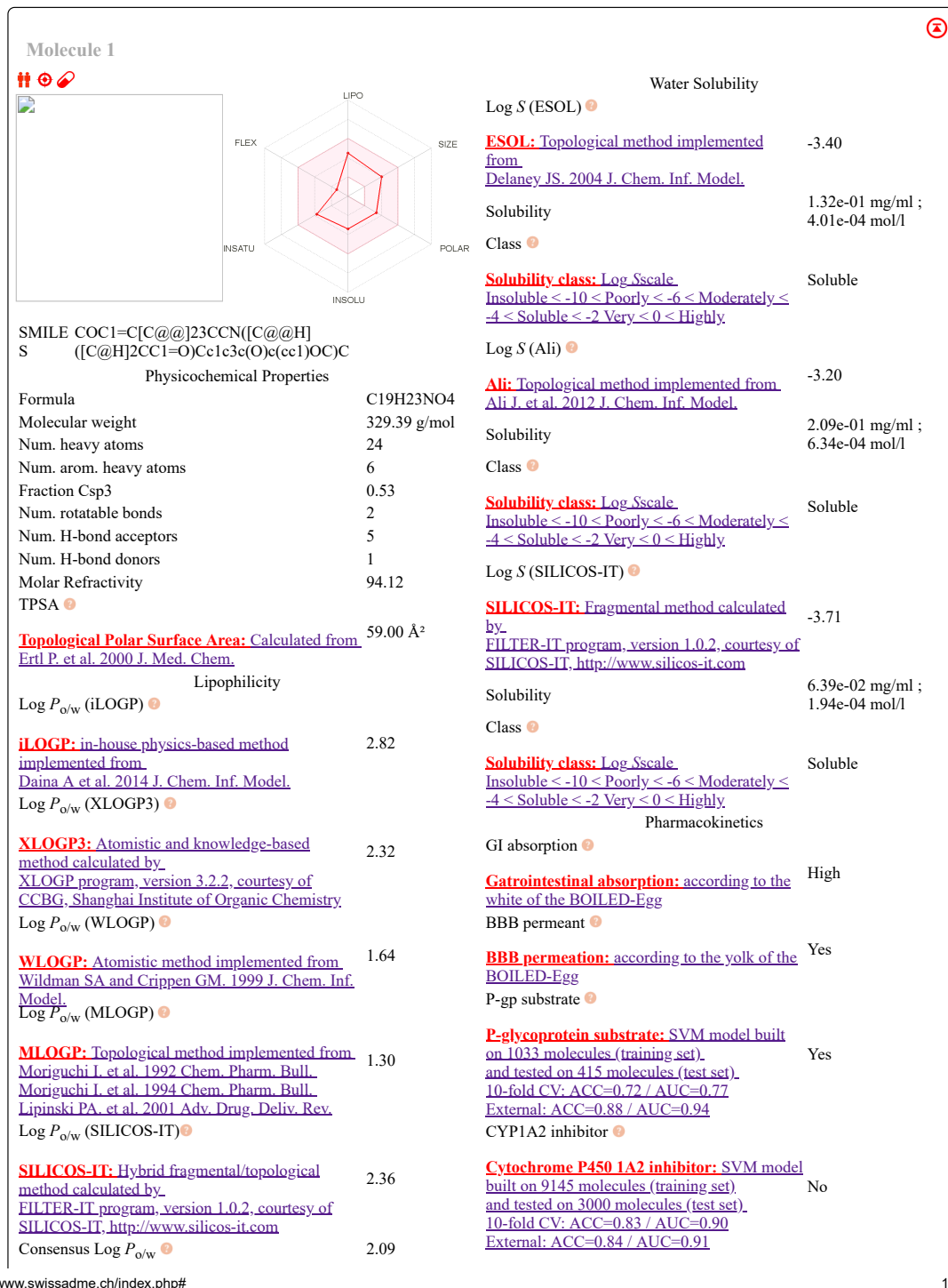
Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

9.2. ANEXO II - Dados gerados no SwissADME para o perfil ADMET da milionina

27/08/2020

SwissADME



27/08/2020

Consensus Log $P_{o/w}$: Average of all five predictions

SwissADME

CYP2C19 inhibitor ●

No

Cytochrome P450 2C19 inhibitor: SVM model built on 9272 molecules (training set) and tested on 3000 molecules (test set).
10-fold CV: ACC=0.80 / AUC=0.86
External: ACC=0.80 / AUC=0.87

CYP2C9 inhibitor ●

Cytochrome P450 2C9 inhibitor: SVM model built on 5940 molecules (training set) and tested on 2075 molecules (test set).
10-fold CV: ACC=0.78 / AUC=0.85
External: ACC=0.71 / AUC=0.81

No

CYP2D6 inhibitor ●

Cytochrome P450 2D6 inhibitor: SVM model built on 3664 molecules (training set) and tested on 1068 molecules (test set).
10-fold CV: ACC=0.79 / AUC=0.85
External: ACC=0.81 / AUC=0.87

Yes

CYP3A4 inhibitor ●

Cytochrome P450 3A4 inhibitor: SVM model built on 7518 molecules (training set) and tested on 2579 molecules (test set).
10-fold CV: ACC=0.77 / AUC=0.85
External: ACC=0.78 / AUC=0.86

No

Log K_p (skin permeation) ●

Skin permeation: QSPR model implemented from Potts RO and Guy RH. 1992 Pharm. Res.

-6.66 cm/s

Druglikeness

Lipinski ●

Lipinski (Pfizer) filter: implemented from Lipinski CA. et al. 2001 Adv. Drug Deliv. Rev.
MW < 500
MLOGP < 4.15
N or O < 10
NH or OH < 5

Yes; 0 violation

Ghose ●

Ghose filter: implemented from Ghose AK. et al. 1999 J. Comb. Chem.
160 < MW < 480
-0.4 < WLOGP < 5.6
40 < MR < 130
20 < atoms < 70

Yes

Veber ●

Veber (GSK) filter: implemented from Veber DF. et al. 2002 J. Med. Chem.
Rotatable bonds < 10
TPSA < 140

Yes

Egan ●

Egan (Pharmacia) filter: implemented from Egan WJ. et al. 2000 J. Med. Chem.
WLOGP < 5.88
TPSA < 131.6

Yes

Muegge ●

Muegge (Bayer) filter: implemented from Muegge J. et al. 2001 J. Med. Chem.

Yes

27/08/2020

SwissADME

[200 ≤ MW ≤ 600](#)[-2 ≤ XLOGP ≤ 5](#)[TPSA ≤ 150](#)[Num. rings ≤ 7](#)[Num. carbon ≥ 4](#)[Num. heteroatoms ≥ 1](#)[Num. rotatable bonds ≤ 15](#)[H-bond acc. ≤ 10](#)[H-bond don. ≤ 5](#)

Bioavailability Score ●

Abbott Bioavailability Score: Probability of F
[≥ 10% in rat](#) 0.55
[implemented from](#)
[Martin YC. 2005 J. Med. Chem.](#)

Medicinal Chemistry

PAINS ●

Pan Assay Interference
Structures: [implemented from](#) 0 alert
[Baell JB. & Holloway GA. 2010 J. Med.](#)
[Chem.](#)

Brenk ●

Structural Alert: [implemented from](#) 0 alert
[Brenk R. et al. 2008 ChemMedChem](#)

Leadlikeness ●

Leadlikeness: [implemented from](#)
[Teague SJ. 1999 Angew. Chem. Int. Ed.](#) Yes
[250 ≤ MW ≤ 350](#)
[XLOGP ≤ 3.5](#)
[Num. rotatable bonds ≤ 7](#)

Synthetic accessibility ●

Synthetic accessibility score: [from 1 \(very](#)
[easy\) to 10 \(very difficult\)](#) 4.55
[based on 1024 fragmental contributions \(FP2\)](#)
[modulated by size and complexity penalties,](#)
[trained on 12'782'590 molecules and tested on](#)
[40 external molecules \(\$r^2 = 0.94\$ \)](#)

9.3 Produção científica (2018-2022)

1. ARTIGOS EM PERIÓDICOS INTERNACIONAIS

1. Laércia K.D. Paiva Ferreira, Larissa A.M. Paiva Ferreira, Talissa M. Monteiro, Grasiela Costa Bezerra, Larissa Rodrigues Bernardo, Marcia Regina Piuvezam. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). International Immunopharmacology. DOI: doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105718, v. 74, 105718, September 2019. F.I. 3,361.

2. Larissa Rodrigues Bernardo, Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Cosmo Isaías Duvirgens Vieira, Adriano Francisco Alves, Pedro Thiago Ramalho Figueiredo and Marcia Regina Piuvezam. "4-Carvomenthenol, a monoterpene of essential oils, and its underlying effects on anti-inflammatory activity and immediate hypersensitivity reaction", Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 2021.

2. CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

2.1 BEZERRA, G. C.; FERREIRA, L. K. D. P.; FERREIRA, L. A. M. P.; BERNARDO, L. R.; MONTEIRO, T. M.; Fatores de transcrição e vias de sinalização intracelulares envolvidas na asma alérgica. Submetido a Farmácia: tecnologia a serviço da saúde, 1. 1ed.: v. 1, (24):p. 459-482. ISBN: 978-85-53005-25-3, 2020.

2.2 BERNARDO, L.R.; PIUVEZAM, M. R. Produtos naturais como fonte para o tratamento de doença de origem inflamatória: a LPA/SDRA. In: Laísa Vilar Cordeiro, et al. (Org.). Aqui se faz ciência!; pesquisas desenvolvidas em universidades federais e suas aplicabilidades para sociedade. 1ed. Goiânia: Editora Espaço Acadêmico, 2020, v. 1, p. 211-212.

2.3 VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; LIMA, L. M.; BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M. R. Investigação do efeito inflamatório via a formação do edema de pata, o choque anafilático e a permeabilidade vascular em modelos experimentais murinos. In: Giselle Medeiros da Costa One; Maria Luiza Souto Porto. (Org.). Farmácia: tecnologia a serviço da saúde. 1ed. João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2020, v. 1, p. 541-558.

3. PATENTES

3.1 PIUVEZAM, MARCIA R.; BERNARDO, L. R.; FERREIRA, L. K. D. P.; FERREIRA, L. A. M. P.; VIEIRA, C. I. D.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; FIGUEIREDO, P. T. R. Monoterpeno para tratamento de inflamação alérgica. Registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 12/08/2020. Número do registro: BR1020200164627. Universidade Federal da Paraíba, 2020.

3.2 BERNARDO, L. R.; FERREIRA, L. K. D. P.; FERREIRA, L. A. M. P.; VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; LIMA, L. M.; ALVES, A. F.; MAIA, M.S.; SCOTTI, M.T.; BARBOSA-FILHO, J.M.; PIUVEZAM, MARCIA R. Uso de um alcaloide para o tratamento do processo inflamatório na lesão pulmonar aguda. Registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 22/12/2021. Número do registro: BR102021026081-5. Universidade Federal da Paraíba, 2021.

4. COMUNICAÇÕES ORAIS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

4.1 BEZERRA, G. C.; FERREIRA, L. K. D. P.; FERREIRA, L. A. M. P.; BERNARDO, L. R.; MONTEIRO, T. M.; Fatores de transcrição e vias de sinalização intracelulares envolvidas na asma alérgica. IN: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2019.

4.2 VIEIRA, C. I. D., OLIVEIRA, J. B., LIMA, L. M., BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M.R. Investigação do efeito inflamatório via a formação do edema de pata, o choque anafilático e a permeabilidade vascular em modelos experimentais murinos. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2019.

4.3 VIEIRA, C. I. D., OLIVEIRA, J. B., LIMA, L. M., BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M.R. Indução dos sinais cardinais da inflamação - edema de pata e peritonite - em modelo murino. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2020.

4.4 VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; LIMA, L. M.; SANTOS, R. C. S.; BERNARDO, L. R. MECANISMOS DE AÇÃO EM PROTOCOLOS DE INDUÇÃO EDEMATOGÊNICA EM MODELO MURINO EXPERIMENTAL E SUA IMPORTÂNCIA NA PESQUISA NÃO CLÍNICA. In: IV Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências, 2019, Campina Grande - PB. Anais IV CONAPESC, 2019. v. 1.

4.5 BERNARDO, L. R.; FERREIRA, L. A. M. P., VIEIRA, C. I. D., OLIVEIRA, J. B., LIMA, L. M., PIUVEZAM, M.R. EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2021.

4.6 VIEIRA, C. I. D., OLIVEIRA, J. B., FERREIRA, L. K D. P., BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M.R. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2021.

4.7 FERREIRA, L. K D. P., FERREIRA, L. A. M. P., LIMA, L. M., BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M.R. RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2021.

5. COMUNICAÇÕES EM PÔSTER EM EVENTOS CIENTÍFICOS

5.1. LARISSA BERNARDO, LAERCIA FERREIRA, LARISSA FERREIRA, COSMO VIEIRA, LOUISE DE LIMA, JOÃO DE OLIVEIRA, GRASIELA

BEZERRA, ADRIANO ALVES, MARCIA PIUVEZAM. 4-CARVOMENTHENOL, A MONOTERPENE OF ESSENTIAL OILS, ATTENUATES THE ANAPHYLACTIC SHOCK REACTION BY DECREASING THE MAST CELL DEGRANULATION PROCESS IN MICE. In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, 2019.

5.2. LUIS RODRIGUES, MARCIA PIUVEZAM, LAERCIA FERREIRA, LARISSA FERREIRA, TALISSA MONTEIRO, GRASIELA BEZERRA, LARISSA BERNARDO, LUIZ SILVA, RAMON PEREIRA, LOUISE DE LIMA, JOÃO DE OLIVEIRA, ADRIANO ALVES. MHTP, SYNTHETIC TETRAHYDROISOQUINOLINE ALKALOID, INHIBITS EOSINOPHIL FUNCTION VIA MAP KINASES (P38 AND ERK1/2) PATHWAY IN EXPERIMENTAL COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS). In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, 2019.

5.3. GRASIELA BEZERRA, LARISSA FERREIRA, LAERCIA FERREIRA, TALISSA MONTEIRO, LARISSA BERNARDO, LOUISE DE LIMA, JOÃO DE OLIVEIRA, COSMO VIEIRA, ADRIANO ALVES, RAMON PEREIRA, MARCIA PIUVEZAM. 4-CARVOMENTHENOL, A MONOTERPENE OF ESSENTIAL OILS, REDUCES AIRWAY INFLAMMATION BY INCREASING IL-10 LEVEL, IN EXPERIMENTAL MODEL OF COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS). In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, 2019.

5.4 LARISSA FERREIRA; LAÉRCIA FERREIRA; TALISSA MONTEIRO; LOUISE DE LIMA; LARISSA BERNARDO; JOÃO OLIVEIRA; COSMO VIEIRA; MAYARA MAIA; MARCUS SCOTTI; CELIDARQUE DIAS; MARCIA PIUVEZAM. CURINE, A BISBENZYLISOQUINOLINE ALKALOID, AMELIORATES THE LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED ACUTE LUNG INJURY BY DOWNREGULATING THE TLR4/MD-2/NF-KB(P65) SIGNALING PATHWAY. In: XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, ONLINE, 2021.

5.5 LAÉRCIA FERREIRA; TALISSA MONTEIRO; LARISSA FERREIRA; LARISSA BERNARDO; LOUISE LIMA; JOÃO OLIVEIRA; COSMO VIEIRA; MARCIA PIUVEZAM. GAMMA-TERPINENE, AN ESSENTIAL OIL, INHIBITS P38/NFKB SIGNALING PATHWAY BY SUPPRESSING TLR4 IN A MURINE MODEL OF ACUTE LUNG INJURY. In: XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, ONLINE, 2021.

5.6 LAÉRCIA FERREIRA; LARISSA FERREIRA; GRASIELA BEZERRA BARROS; TALISSA MONTEIRO; LUIZ SILVA; LARISSA BERNARDO; JOÃO OLIVEIRA; LOUISE LIMA; ADRIANO ALVES; LUIS RODRIGUES; MARCIA PIUVEZAM. MHTP, A SYNTHETIC ALKALOID, MODULATES THE EXPERIMENTAL COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS) BY DOWNREGULATING P38/ERK1/2 MAPK AND NF-KB PATHWAYS IN LYMPHOCYTES. In: XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, ONLINE, 2021.

5.7 LARISSA BERNARDO; LAÉRCIA FERREIRA; LARISSA FERREIRA; COSMO VIEIRA; JOÃO OLIVEIRA; LOUISE LIMA; ADRIANO ALVES; RUBENS ARAÚJO; MAYARA MAIA; MARCUS SCOTTI; JOSÉ BARBOSA FILHO; MARCIA PIUVEZAM. MILONINE PROTECTS AGAINST ACUTE LUNG INJURY BY MODULATING THE AKT AND NF-KB SIGNALING PATHWAY. In: XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, ONLINE, 2021.

6. ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

6.1 Larissa Rodrigues Bernardo, Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Cosmo Isaías Duvirgens Vieira, João Batista de Oliveira, Louise Manguiera de Lima, Adriano Francisco Alves, Mayara dos Santos Maia, Marcus Tullius Scotti, José Maria Barbosa Filho, Marcia Regina Piuvezam. "Milonine protects against acute lung injury by modulating the Akt and NF- κ B signaling pathway". Submetido em: Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 2021.