



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



LOUISE MANGUEIRA DE LIMA

**Atividade anti-inflamatória do 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
(CISACN) em modelos murinos de inflamação aguda**

João Pessoa – PB

2023

LOUISE MANGUEIRA DE LIMA

**Atividade anti-inflamatória do 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
(CISACN) em modelos murinos de inflamação aguda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Coorientadora: Dra. Laércia Karla Diega Paiva Ferreira

João Pessoa - PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Louise Mangueira de.
Atividade anti-inflamatória do
2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
(CISACN) em modelos murinos de inflamação aguda /
Louise Mangueira de Lima. - João Pessoa, 2023.
128 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.
Coorientação: Laércia Karla Diega Paiva Ferreira.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacoterapia - Pulmão. 2. Inflamação - Lesão
pulmonar aguda. 3. Edema de pata. 4. CISACN. I.
Piuvezam, Marcia Regina. II. Ferreira, Laércia Karla
Diega Paiva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.451.1:611.24(043)

LOUISE MANGUEIRA DE LIMA

**Atividade anti-inflamatória do 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
(CISACN) em modelos murinos de inflamação aguda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **farmacologia**.

APROVADO em 25 / 08 / 2023

BANCA EXAMINADORA



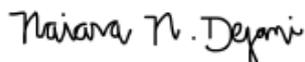
Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (Presidente)
(Universidade Federal da Paraíba - UFPB)



Profa. Dra. Laércia Karla Diega Paiva Ferreira (Coorientadora)
(Universidade Federal de Campina Grande - UFPB)



Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas (Membro Interno)
(Universidade Federal da Paraíba - UFPB)



Profa. Dra. Naiara Naiana Dejani (Membro Externo)
(Universidade Federal da Paraíba - UFPB)

Aos meus pais, Fátima e Antônio, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus: a Ele minha gratidão eterna pelo privilégio de tê-Lo sempre comigo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Fátima e Antônio, por todo o apoio, amor e encorajamento que me proporcionaram ao longo desta jornada; sou extremamente grata à dedicação e aos sacrifícios que fizeram em prol da minha educação. À Thaise, minha irmã, minha melhor confidente e exemplo de dedicação, que me inspira a ser a melhor versão de mim mesma todos os dias. Ao meu namorado Ítalo pela presença constante, sou grata por tê-lo como meu apoio e parceiro de vida e profissão. Agradeço de forma geral a todos familiares e amigos que sempre se fazem presentes na minha vida.

À minha estimada orientadora, Profa. Marcia Piuvezam, a sua orientação sábia, paciência e dedicação foram verdadeiramente fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal; obrigada por acreditar em mim e me ajudar a alcançar este marco importante em minha jornada acadêmica. À minha querida coorientadora Profa. Laércia Ferreira, agradeço por sua disposição em ouvir minhas ideias, esclarecer minhas dúvidas e oferecer orientações precisas, sua dedicação e expertise foram pilares fundamentais.

Em especial, agradeço pelo companheirismo de sempre e apoio incondicional de Cosmo Isaías e João Batista, meus irmãos científicos. A todos do Laboratório de Imunofarmacologia: Larissa Adilis, Allysson, Raquel, Bruno, Vinícius, Lorrane, Matheus e Vytor, pela disponibilidade e ajuda sempre necessárias.

À minha banca examinadora, professoras Sandra Mascarenhas e Naiara Dejani, por terem dedicado seu tempo e delicadeza para avaliar meu trabalho de forma criteriosa, enriquecendo-o. Ao professor Cláudio Gabriel por gentilmente ceder a substância teste para a realização deste trabalho.

À Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em nome de seus servidores e professores, que contribuíram arduamente para meu crescimento na ciência e pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e técnico; à Universidade Federal da Paraíba e ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos pelo apoio físico e institucional.

Agradeço!!!

"Sem as obras, os mais belos pensamentos nada representam"

(St. Terezinha do Menino Jesus)

LIMA, L.M. Atividade anti-inflamatória do 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (CISACN) em modelos murinos de inflamação aguda. Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Dissertação/CCS/UEPB (2023)

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo à injúria, entretanto, quando não controlada, pode causar danos aos tecidos. Um exemplo disso é a lesão pulmonar aguda (LPA) e sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), que são patologias caracterizadas por taquipneia aguda, edema pulmonar grave e diminuição da complacência pulmonar, resultando em insuficiência respiratória hipoxêmica. Até o momento, não há uma farmacoterapia padrão e direcionada para a LPA/SDRA. O 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (CISACN) é um aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da isatina que possui atividades antitumoral e antimalárica, toxicidade aguda e citotoxicidade baixas com boa disponibilidade oral teórica. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório do CISACN, administrado via oral (v.o.) em modelos murinos de edema de pata, peritonite e LPA. Para tal, camundongos *Swiss* fêmeas foram pré-tratados com o CISACN (3,125 mg/kg, 6,25 mg/kg ou 12,5 mg/kg) e desafiados via intraplantar (v.ipl) com os agentes flogísticos carragenina, prostaglandina (PGE_2), bradicinina (BK), serotonina (5-HT), histamina ou composto 48/80, e via intraperitoneal com carragenina (1%). O pré-tratamento com o CISACN na dose de 6,25 mg/kg reduziu ($p < 0,05$) o edema de pata induzido pelos agentes flogísticos e diminuiu ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos, a permeabilidade vascular e as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6, no lavado peritoneal coletado 4 horas após o desafio com a carragenina. No modelo experimental de LPA, camundongos BALB/c machos foram desafiados por instilação nasal (i.n.) com lipopolissacarídeo (LPS) e, uma hora após, foram tratados (v.o.) com CISACN (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg ou 25 mg/kg) e, 24 horas depois, coletados o fluido do lavado broncoalveolar (BALF), o soro e os pulmões. O tratamento com CISACN (12,5 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos e as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 no BALF, a formação do edema pulmonar e diminuiu os níveis séricos de TNF- α , bem como atenuou alterações histopatológicas, como edema, infiltrado celular e hemorragia. Os efeitos anti-inflamatórios do CISACN podem estar associados à inibição da via de sinalização TLR4/MAPK-p38, visto que, a partir de uma abordagem *in silico*, evidenciou-se que o CISACN apresentou forte energia de ligação e afinidade com esses alvos moleculares. Portanto, os resultados apresentados nesse estudo demonstram o potencial anti-inflamatório do CISACN, colocando-o como uma molécula promissora no desenvolvimento de um fármaco anti-inflamatório.

Palavras-chaves: CISACN; inflamação; edema de pata; peritonite; lesão pulmonar aguda.

**LIMA, L.M. Anti-inflammatory activity of 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (CISACN) in murine models of acute inflammation.
Postgraduate in Natural and Synthetic Bioactive Products.
Dissertation/CCS/UFPB (2023)**

ABSTRACT

Inflammation is a physiological response of the body to injury, however, when not controlled, it can cause tissue damage. An example of this is acute lung injury (ALI) and its most severe form, acute discomfort syndrome (ARDS), which are pathologies characterized by acute tachypnea, severe pulmonary edema and decreased lung compliance, originating in respiratory hypoxemia. So far, there is no standard and targeted pharmacotherapy for ALI/ARDS. 2-(3-Hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (CISACN) is a Morita-Baylis-Hillman adduct derived from isatin that has antitumor and antimalarial activities, low acute toxicity and cytotoxicity with good theoretical oral availability. Thus, the goal of this work was to evaluate the anti-inflammatory effect of CISACN, administered orally (v.o.) in murine models of paw edema, peritonitis, and ALI. For this purpose, female Swiss mice were pre-treated with CISACN (3.125 mg/kg, 6.25 mg/kg or 12.5 mg/kg) and challenged intraplantarly (v.ipl) with phlogistic agents: carrageenan, prostaglandin (PGE₂), bradykinin (BK), serotonin (5-HT), histamine or compound 48/80 and intraperitoneally with carrageenan (1%). Pre-treatment with CISACN at a dose of 6.25 mg/kg reduced ($p < 0.05$) paw edema induced by phlogistic agents and decreased ($p < 0.05$) neutrophil migration, vascular permeability, and pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in peritoneal lavage collected four hours after challenge with carrageenan. In the experimental model of ALI, male BALB/c mice were challenged by nasal instillation (i.n.) with lipopolysaccharide (LPS) and, one hour later, treated (v.o.) with CISACN (6.25 mg/kg, 12.5 mg/kg or 25 mg/kg) and, 24 hours later, collected bronchoalveolar lavage fluid (BALF), serum and lungs. Treatment with CISACN (12.5 mg/kg) reduced ($p < 0.05$) neutrophil migration and the cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6 in BALF, the formation of pulmonary edema and decreased levels serum levels of TNF- α , as well as attenuated histopathological alterations, such as edema, cellular infiltration, and hemorrhage. The anti-inflammatory effects of CISACN appear to be associated with the inhibition of the TLR4/MAPK-p38 signaling pathway, since, from an *in silico* approach, it was shown that CISACN showed strong binding energy and affinity with these molecular targets. Therefore, the results presented in this study demonstrate the anti-inflammatory potential of CISACN, placing it as a promising molecule in the development of a drug and subsequent clinical trials in pathological events involving inflammation.

Keywords: CISACN; inflammation; paw edema; peritonitis; acute lung injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da migração e adesão leucocitária na parede endotelial durante o processo inflamatório.....	28
Figura 2. Esquema representativo do processo patológico da lesão pulmonar aguda (LPA).....	37
Figura 3. Esquema representativo da técnica de <i>docking</i> molecular.....	44
Figura 4. Esquema representativo da Reação de Morita-Baylis-Hillman.....	47
Figura 5. Estrutura química da isatina.....	49
Figura 6. Estrutura química do CISACN.....	50
Figura 7. Reação para preparação do CISACN.....	53
Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental de edema de pata induzido por carragenina.....	55
Figura 9. Esquema representativo do protocolo experimental de edema de pata induzido por PGE ₂ , BK, 5-HT, Hist ou 48/80.....	56
Figura 10. Esquema representativo do protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	57
Figura 11. Esquema representativo do protocolo experimental de LPA induzida por LPS.....	59
Figura 12. Efeito do tratamento oral com CISACN nos aspectos histopatológicos pulmonar utilizando a coloração de HE.....	82
Figura 13. Estrutura da MAPK p38 complexada ao CISACN (A) e dexametasona (B).....	85
Figura 14. Estrutura da MAPK ERK 2 complexada ao CISACN (A) e dexametasona (B).....	86
Figura 15. Estrutura da porção p65 do NF-κB complexada ao CISACN (A) e dexametasona (B).....	87

Figura 16. Estrutura do receptor TLR-4 complexado ao CISACN (A) e dexametasona (B).....	88
Figura 17. Esquema representativo da atividade anti-inflamatória do CISACN em modelos murinos de inflamação aguda.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais do protocolo de edema de pata induzido por carragenina.....	54
Tabela 2. Grupos experimentais do protocolo de edema de pata induzido por PGE ₂ , BK, 5-HT, Hist ou 48/80.....	56
Tabela 3. Grupos experimentais do protocolo de peritonite induzida por carragenina.....	57
Tabela 4. Grupos experimentais do protocolo de LPA induzida por LPS.....	58
Tabela 5. Escore histológico.....	61
Tabela 6. Resultados da energia de ligação por <i>docking</i> molecular.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por carragenina.....	64
Gráfico 2. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por PGE ₂	65
Gráfico 3. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por BK.....	66
Gráfico 4. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por 5-HT.....	66
Gráfico 5. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por histamina.....	67
Gráfico 6. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por 48/80.....	68
Gráfico 7. Efeito do tratamento oral com o CISACN na migração de células totais e diferenciais no lavado peritoneal.....	69
Gráfico 8. Efeito do tratamento oral com o CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico no lavado peritoneal.....	71
Gráfico 9. Efeito do tratamento oral com o CISACN na produção de citocinas pró-inflamatórias no lavado peritoneal.....	72
Gráfico 10. Efeito do tratamento oral com o CISACN na migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar.....	75
Gráfico 11. Efeito do tratamento oral com o CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico na cavidade pulmonar.....	76
Gráfico 12. Efeito do tratamento oral com o CISACN na razão úmido/seco do peso dos pulmões.....	77
Gráfico 13. Efeito do tratamento oral com o CISACN na produção de citocinas pró-inflamatórias na cavidade pulmonar e soro.....	78

Gráfico 14. Efeito do tratamento oral com o CISACN nos aspectos histopatológicos pulmonar utilizando a coloração de HE.....83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
AECC	<i>American-European Consensus Conference</i>
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
ALA	Alanina
AMBH	Aduto de Morita-Baylis-Hillman
ANOVA	Análise de Variância
ARG	Arginina
ASP	Ácido aspárgico
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
B1R	Receptor de bradicinina 1
B2R	Receptor de bradicinina 2
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
BK	Bradicinina
CD14	Antígeno de diferenciação de monócitos CD14
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	Carragenina
CI₅₀	Concentração inibitória média
CISACN	2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX	Ciclooxigenase
CYS	Cisteína
CysLT	Leucotrieno cisteinil
DABCO	(1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano)
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DL₅₀	Dose letal média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECMO	Oxigenação por membrana extracorpórea
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ESICM	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i>
FiO₂	Fração inspirada de oxigênio
GLN	Glutamina
GLU	Ácido Glutâmico
GLY	Glicina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GR	Receptores de glicocorticoides
GRE	Grupo retirador de elétrons
h	Hora
HIS	Histidina
Hist	Histamina
HL-60	Linhagem celular de leucemia humana
HR	Receptores de histamina

H&E	Hematoxilina e Eosina
IκB	Proteína inibitória kappa B
IκK	Cinase do fator nuclear kappa B
ICAM-1, 2	Molécula de adesão intercelular 1, 2
IL	Interleucina
ILE	Isoleucina
IFN	Interferon
Indo	Indometacina
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzida
i.m.	Intramuscular
i.n.	Intranasal
i.p.	Via intraperitoneal
JNK	Cinase Jun N-terminal
K₂CO₃	Carbonato de potássio
Kg	Quilograma
LBP	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos
LEU	Leucina
LFA-1	Antígeno 1 associado à função leucocitária
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LRR	Repetições ricas em leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LOX	Lipoxigenase

LYS	Lisina
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MD-2	Proteína mielóide diferenciadora 2
MET	Metionina
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitros
MMHG	Milímetros de mercúrio
MPO	Mieloperoxidase
MVD	Molegro Virtual Docker
MYD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NCI-H292	Linhagem celular de câncer de pulmão humano
NEMO	Modulador enzimático NF-κB
NET	Armadilha extracelular de neutrófilos
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PaO₂	Pressão parcial de oxigênio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Salina tampão fosfato
PDE	Fosfodiesterase
PECAM-1	Molécula de adesão de células endoteliais 1
PEEP	Pressão expiratória final positiva
PGs	Prostaglandinas

PHE	Fenilalanina
PLA2	Fosfolipase A2
RMBH	Reação de Morita-Baylis-Hillman
SCCM	<i>Society Critical Care Medicine</i>
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SER	Serina
SN2	Substituição nucleofílica tipo 2
S-LEX	Sicelyl LewisX – ligante de selectina
THR	Treonina
TIR/TYR	Tirosina
TIRAP	Domínio do receptor Toll/interleucina-1
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA₂	Tromboxano A2
UPA	Unidade de produção animal
UTI	Unidade de terapia intensiva
u/s	Úmido/Seco
VAL	Valina
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
v. ip.	Via intraperitoneal
v. ipl.	Via intraplantar
v. o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1. Aspectos gerais da inflamação.....	26
2.2. Inflamação aguda.....	26
2.2.1. Eventos vasculares e celulares.....	27
2.2.2. Mediadores Inflamatórios	29
2.2.2.1 Aminas vasoativas	29
2.2.2.2 Cininas	30
2.2.2.3 Derivados do ácido araquidônico.....	30
2.2.2.4 Citocinas	31
2.2.3. Farmacoterapia para manejo da inflamação aguda.....	33
2.3. Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SRDA)	34
2.3.1. Definição e histórico	34
2.3.2. Etiologia e epidemiologia	35
2.3.3. Fisiopatologia	36
2.3.4. LPA/SDRA e COVID-19.....	41
2.3.5. Protocolo experimental de LPA induzido por LPS	42
2.3.6. Estratégias terapêuticas	44
2.4. Substâncias sintéticas.....	45
2.4.1. Reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH).....	46
2.4.2. Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH)	48
2.4.3. O AMBH 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitril – CISACN – derivado da isatina	48
3. OBJETIVOS	52

3.1. Geral.....	52
3.2. Específicos	52
4. METODOLOGIA.....	Erro! Indicador não definido.
4.1. Obtenção da substância.....	53
4.2. Animais	Erro! Indicador não definido.
4.3. Protocolo experimental de edema de pata induzido por carragenina...	54
4.4. Protocolo experimental de edema de pata induzido por PGE ₂ , bradicinina, serotonina, histamina e 48/80	55
4.5. Protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	57
4.6. Protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo.....	58
4.7. Contagem de células totais e diferenciais	59
4.8. Dosagem de proteínas totais	60
4.9. Quantificação de citocinas	60
4.10. Razão do peso do pulmão úmido/seco na LPA	60
4.11. Análise histopatológica do tecido pulmonar na LPA	61
4.12. Avaliação do <i>Docking</i> molecular	62
4.13. Análise estatística.....	63
5. RESULTADOS	64
5.1. Efeito anti-inflamatório do CISACN em modelos experimentais de edema de pata	64
5.1.1. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por carragenina.....	64
5.1.2. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por prostaglandina (PGE ₂)	65
5.1.3. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por bradicinina (BK)	65
5.1.4. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por serotonina (5-HT)	66

5.1.5.	Efeito do CISACN no edema de pata induzido por histamina	67
5.1.6.	Efeito do CISACN no edema de pata induzido por composto 48/80	68
5.2.	Efeito anti-inflamatório do CISACN em modelo experimental de peritonite induzida por carragenina	69
5.2.1.	Efeito do CISACN na migração de células totais e diferenciais na cavidade peritoneal	69
5.2.2.	Efeito do CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico na cavidade peritoneal	71
5.2.3.	Efeito do CISACN na produção de citocinas pró-inflamatórias na cavidade peritoneal	72
5.3.	Efeito anti-inflamatório do CISACN em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo.....	74
5.3.1.	Efeito do CISACN na migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar	74
5.3.2.	Efeito do CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico na cavidade pulmonar	76
5.3.3.	Efeito do CISACN no edema pulmonar avaliado pela razão úmido/seco (u/s) do pulmão	77
5.3.4.	Efeito do CISACN na produção de citocinas pró-inflamatórias na cavidade pulmonar e soro	78
5.3.5.	Efeito do CISACN nos aspectos histopatológicos pulmonares	81
5.3.6.	Análise de <i>Docking</i> molecular.....	83
5.3.6.1.	Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com a MAPK p38.....	84
5.3.6.2.	Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com a MAPK ERK 2	85
5.3.6.3.	Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com a porção p65 do NF-kB	87

5.3.6.4. Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com o receptor TLR-4	88
6. DISCUSSÃO	90
7. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS.....	104
ANEXOS.....	121

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação essencial do sistema imunológico que envolve um conjunto abrangente de respostas fisiológicas a um organismo estranho. No entanto, a inflamação exacerbada ou não resolvida pode ocasionar dano tecidual e contribuir para a patogênese de várias doenças inflamatórias. Como consequência, a resposta inflamatória é caracterizada por cinco sinais clínicos fundamentais, que incluem dor, calor, rubor, edema e perda da função (DUARTE et al., 2022). Os fármacos utilizados para alívio da inflamação são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs). Entretanto, estas classes farmacológicas produzem diversos efeitos adversos, o que impossibilita seu uso para grande parcela da população (GHASEMIAN; OWLIA; OWLIA, 2016).

O estado inflamatório pode causar alterações em diversos órgãos e sistemas desencadeando disfunções patológicas agudas complexas, como a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), um processo fisiopatológico desenvolvido a partir de lesão pulmonar aguda (LPA) (LU et al., 2022). A SDRA/LPA é caracterizada clinicamente por taquipneia aguda, edema pulmonar grave e diminuição da complacência pulmonar, gerando um grave problema de insuficiência respiratória hipoxêmica (ZIAKA; EXADAKTYLOS, 2022). Apesar dos recentes avanços na compreensão da fisiopatologia e dos mecanismos moleculares da doença, a incidência ainda prevalece alta e a taxa de mortalidade corresponde a 40%, aproximadamente. Além disso, a eficácia das abordagens terapêuticas ainda é bastante limitada e não existem tratamentos farmacológicos específicos (LONG; MALLAMPALLI; HOROWITZ, 2022).

Sendo assim, é de fundamental importância o avanço no desenvolvimento de candidatos a novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias agudas que apresentem eficácia e segurança, de modo a reduzir a incidência e a taxa de mortalidade dos indivíduos acometidos.

Reações com poucas etapas e com alta taxa de rendimento se apresentam como alternativas promissoras para a síntese de novas moléculas bioativas (PANDEY et al., 2018). A Reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) destaca-se na química orgânica por apresentar características importantes, como a economia total de

átomos, a realização em meio aquoso e produção de baixos impactos ambientais (XIE; HUANG, 2015). Por sua vez, os produtos gerados nessa reação são denominados de adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH), moléculas com ampla versatilidade sintética. Estudos com os AMBH demonstraram que estes apresentam diversas atividades biológicas, como antitumoral, antileishmanial, antioxidante, antimalárica, anti-inflamatória, vasorrelaxante, antichagásica e antimicrobiana (PAIVA FERREIRA et al., 2023).

O 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, o CISACN, é um AMBH cuja síntese orgânica usa como substrato a isatina, que possui uma gama de propriedades biológicas, incluindo atividade anti-inflamatória (NATH et al., 2020). O CISACN apresenta-se como uma molécula farmacologicamente promissora, visto que demonstrou atividades antitumoral (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016a) e antimalárica e possui um perfil toxicológico aceitável (PESSOA -PB, 2020).

Assim, o potencial terapêutico descrito acima do CISACN justifica a investigação de sua utilização para o possível tratamento de doenças inflamatórias agudas. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a atividade anti-inflamatória do CISACN em modelos experimentais de inflamação aguda, incluindo a LPA, e seus possíveis mecanismos de ação, via abordagens *in vivo* e *in silico*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é uma reação imune fisiológica de defesa do organismo contra diversos estímulos deletérios, incluindo patógenos, toxinas, células destruídas e/ou radiação (ADEGBAJU; OTUNOLA; AFOLAYAN, 2020). Quando a resposta inflamatória é controlada, o resultado é a limitação da sobrevivência e proliferação dos patógenos, seguida de uma fase de resolução e reparo; entretanto, essa resposta pode tornar-se exacerbada e prejudicial, quando não controlada (CORDARO et al., 2019). O processo inflamatório é um mecanismo inespecífico e imediato e é caracterizado por cinco sinais cardinais que incluem: calor, rubor, edema, dor e perda de função (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2022). Compreendendo uma cadeia de respostas organizadas e dinâmicas, o mecanismo inflamatório inclui eventos celulares e vasculares com respostas humorais específicas. Essas vias envolvem a alteração da localização física de células como monócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos, plasma e fluidos no local inflamado (ZINDEL; KUBES, 2020).

De modo geral, a inflamação compreende duas fases, com base no tempo do processo que responde ao dano lesivo. A fase aguda ocorre imediatamente após a lesão e pode durar alguns dias; dependendo do grau da lesão, esta fase aguda pode ser suficiente para resolver qualquer dano (VARELA et al., 2018). Se essa inflamação persistir, como resultado de uma exposição prolongada a estímulos inflamatórios ou de uma reação inadequada a moléculas próprias, haverá a fase crônica, caracterizada pela mudança das células imunológicas para um fenótipo mononuclear e posterior dano tecidual e fibrose. Observa-se a contribuição da inflamação crônica em diversas doenças, incluindo artrite, asma, aterosclerose, doenças autoimunes, diabetes e câncer, e condições de envelhecimento (PAHWA; GOYAL; JIALAL, 2022).

2.2. Inflamação aguda

A fase aguda do processo inflamatório é caracterizada pela formação de edema intersticial e infiltração de leucócitos, quando um conjunto de defesas celulares e teciduais agem em resposta aos diversos estímulos (OU et al., 2021). Este processo

é caracterizado pela presença de eventos vasculares, como a vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular, e a migração celular, principalmente de neutrófilos, para o local inflamado (SERHAN; LEVY, 2018).

2.2.1. Eventos vasculares e celulares

Durante a inflamação, os vasos sanguíneos tendem a sofrer modificações que culminam na passagem de proteínas plasmáticas e leucócitos para o local da lesão ou dano. Essas modificações são fortemente influenciadas por moléculas pró-inflamatórias, como prostaglandinas (PGs), histamina e óxido nítrico (NO) (PANIGRAHY et al., 2021). As respostas que ocorrem na microvasculatura normalmente aparecem em poucos minutos após a lesão tecidual. Diante de uma vasoconstrição transitória, as arteríolas dilatam-se, gerando um aumento no fluxo sanguíneo com consequente abertura dos leitos capilares, proporcionando, então, o aparecimento do eritema e do calor. Além disso, com o aumento da permeabilidade, o exsudato, líquido rico em proteínas, extravasa para dentro dos tecidos extravasculares, levando a formação do edema, e as hemácias ficam mais concentradas, aumentando a viscosidade do sangue, o que deixa o fluxo mais lento. Todo esse processo resulta no aumento da pressão osmótica do líquido intersticial, acarretando em um maior efluxo de água do sangue para os tecidos (ALESSANDRI et al., 2013).

A infiltração de leucócitos no sistema circulatório é essencial durante as respostas inflamatórias. Como resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, células, principalmente os neutrófilos, migram ao longo de um gradiente quimiotático para o local da lesão de maneira orquestrada e mediada por citocinas e proteínas de fase aguda (DAVID; KUBES, 2019). Essa migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o endotélio é feita através de uma cascata de eventos clássicos, que incluem marginação e rolamento, adesão firme e diapedese; normalmente, esses eventos são dependentes de moléculas de adesão, que estão expressas nas membranas de leucócitos e células endoteliais (MARGRAF; LOWELL; ZARBOCK, 2022).

Durante o processo de marginação, os leucócitos rolam na superfície endotelial de forma a aderir transitoriamente nas moléculas de adesão da família das selectinas,

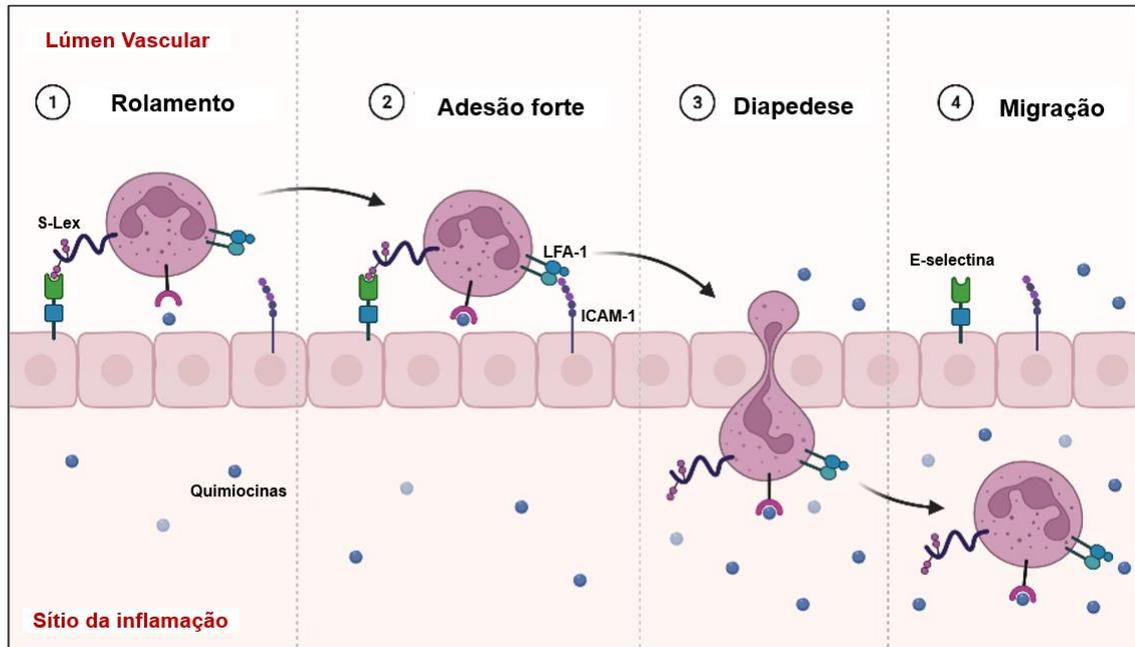
que são: a L-selectina, constitutivamente expressa em leucócitos e importante na migração de neutrófilos e linfócitos para o local inflamado; a P-selectina, pré-formada e armazenada nas plaquetas ou em células endoteliais, atuando na fase mais precoce do recrutamento celular; e a E-selectina, que se apresenta exclusivamente em células endoteliais, responsável pelo processo de adesão de células (JUBELI et al., 2012).

Após o rolamento, os leucócitos passam a se aderir firmemente ao endotélio, adesões essas mediadas pelas integrinas e pela superfamília das imunoglobulinas expressas nas superfícies celulares dos leucócitos. As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas transmembrana expressas, normalmente, nas membranas plasmáticas dos leucócitos em estado de baixa afinidade, constituídas por uma subunidade α e outra β , e que medeiam a adesão, migração e ativação celular (MRUGACZ et al., 2021). A superfamília de imunoglobulinas inclui a molécula de adesão intercelular-1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2), a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão de células endoteliais plaquetárias-1 (PECAM-1) (GUO et al., 2015; ZENG et al., 2018).

Depois da aderência, os leucócitos migram pela parede do vaso comprimindo-se entre as células ao nível de junções intercelulares em direção ao parênquima tissular; esse processo é denominado diapedese, e é mediado por fatores quimiotáticos, como interleucina-8 (IL-8) e componentes do sistema complemento (GAUDET et al., 2019).

Após ativação dos leucócitos, pode ocorrer o processo de fagocitose e liberação de mediadores solúveis que amplifiquem a resposta inflamatória. Existindo, portanto, o controle e reparo desse processo inflamatório, a inflamação é reduzida de forma gradativa e o organismo pode restabelecer a homeostase (SERHAN et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1. Esquema representativo da migração e adesão leucocitária na parede endotelial durante o processo inflamatório



Fonte: criado e adaptado em BioRender (2020). Em resposta a estímulos inflamatórios, as moléculas de adesão, como as selectinas e glicoproteínas, expressas em células endoteliais e leucócitos interagem ocasionando uma adesão transitória, de modo que os leucócitos rolam ao longo da parede endotelial vascular. Em seguida, os leucócitos passam a se aderir firmemente ao endotélio, através da ligação de integrinas e superfamília das imunoglobulinas expressas nas superfícies celulares dos leucócitos. Após a aderência, os leucócitos migram pela parede do vaso em um processo denominado diapedese, mediado por fatores quimiotáticos. ICAM-1: molécula de adesão da célula intercelular-1. LFA-1: antígeno 1 associado à função leucocitária. S-lex: Sialyl LewisX – ligante de selectinas.

2.2.2. Mediadores Inflamatórios

2.2.2.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas, histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT), são as primeiras substâncias a serem liberadas, principalmente através dos mastócitos e monócitos, durante a ativação da cascata inflamatória. Estudos revelam que essas aminas são liberadas ao mesmo tempo e em concentrações em que cada uma é capaz de exercer seu máximo efeito na permeabilidade vascular e no aumento do fluxo sanguíneo. Estas alterações levam ao aparecimento de sinais clássicos da inflamação, como rubor, calor e edema (RATAN et al., 2022).

A histamina é armazenada principalmente no interior de grânulos de mastócitos e liberada após diversos estímulos físicos e químicos. É sintetizada como resultado da atividade catalítica da enzima histidina descarboxilase e é considerada um importante mediador da resposta inflamatória aguda e das reações alérgicas (SANLIER; BEKTESOGLU, 2021). A histamina exerce suas funções através de quatro

receptores (HR): H1, H2, H3 e H4, que são receptores acoplados a proteína G (GPCRs), sendo responsável por alterações vasculares como vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular e exsudação plasmática, ocasionando o edema (BRANCO et al., 2018).

A 5-HT, de forma semelhante a histamina, é um mediador vasoativo pré-formado e age sobre receptores específicos, sendo encontrada em plaquetas e células enterocromafínicas e nos mastócitos de roedores, mas não de humanos. A serotonina regula a inflamação e a imunidade ao atuar promovendo um efeito vasodilatador e um aumento da permeabilidade vascular, levando ao edema, além de produzir rubor, causado devido a uma constrição venosa com conseqüente aumento no enchimento capilar (WU et al., 2019). Essa amina também age como um quimioatraente potente, recrutando células imunes inatas para locais de inflamação e também altera a produção e liberação de citocinas e ativação/proliferação celular (ROUMIER; BÉCHADE; MAROTEAUX, 2019).

2.2.2.2 Cininas

As cininas representam um grupo que desempenha um papel crucial na inflamação e, dentre elas, a bradicinina (BK) e a lisil-bradicinina (calidina) destacam-se como as principais envolvidas (PIRAHANCHI; SHARMA, 2022).

A BK é uma molécula que apresenta uma meia vida plasmática curta, variando entre 10 e 50 segundos e atua através dos receptores de bradicinina B1 e B2 (B1R e B2R). O B2R é constitutivamente expresso em tecidos saudáveis e está envolvido em respostas como vasodilatação, equilíbrio e retenção de fluidos, contração do músculo liso e algesia; já o B1R está ausente em tecidos normais e é induzido por trauma tecidual ou inflamação. Alterações no sistema cinina têm sido associadas a diversos processos patológicos, como inflamação, dor crônica, vasculopatia, neuropatia, obesidade, diabetes e câncer e, normalmente, a ativação excessiva do sistema cinina leva ao estado pró-inflamatório (LAU et al., 2020; QADRI; BADER, 2017).

2.2.2.3 Derivados do ácido araquidônico

O ácido araquidônico (AA), molécula normalmente armazenada no interior de fosfolípídeos de membrana de forma esterificada, é um ácido graxo essencial clivado pela fosfolipase A2 (PLA2) e que serve de substrato para duas vias enzimáticas, a da ciclooxigenase (COX) e a da lipoxigenase (LOX), que resultam na liberação de mediadores locais importantes na resposta inflamatória (WANG et al., 2021).

As COXs estão envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, e suas isoformas são classificadas como COX-1 (constitutiva), COX-2 (induzida) e COX-3, que é uma variante da COX-1. Inicialmente, metabolizam o AA em prostaglandina G₂ (PGG₂) instável e depois o convertem em PGH₂. A PGH₂, assim como as prostanóides sintases e isomerases seletivas de células e tecidos, não é estável e pode facilmente gerar muitas prostaglandinas bioativas, a exemplo das D₂, E₂, F_{2α} e I₂, e tromboxano A₂ (TXA₂), dependendo da expressão diferencial nos diferentes tecidos (WANG et al., 2019).

Em particular, destacam-se as prostaglandinas PGE₂ e a PGI₂, por se apresentarem como potentes agentes vasodilatadores, aumentando a permeabilidade induzida por mediadores como BK e histamina, e por causarem a hiperalgesia, ao potencializarem os efeitos da BK (ROUZER; MARNETT, 2020).

Os leucotrienos (LT), segunda principal família dos derivados do ácido araquidônico, são sintetizados pela via LOX e têm um papel importante no processo inflamatório. Eles podem ser divididos em dois grupos: o diidroxi-leucotrienos, formado principalmente pelo leucotrieno B₄ (LTB₄), e os leucotrienos peptídicos, formados pelos leucotrienos cisteinil (CysLTs) (GILBERT; NEWCOMER; WERZ, 2021). Atuam desempenhando função relevante na constrição da musculatura lisa, além de participarem de processos de inflamação aguda, aumentando a permeabilidade vascular e favorecendo, portanto, o edema da zona afetada. Nas vias aéreas, atuam como potentes broncoconstritores e o efeito é superior ao da histamina, sendo a contração intensamente prolongada. Dessa forma, atuam em diversas doenças como asma, reações de hipersensibilidade imediata, reações inflamatórias e infarto do miocárdio (ORAFIAIE et al., 2020).

2.2.2.4 Citocinas

As citocinas são proteínas produzidas por células imunes e atuam amplificando a resposta imune e recrutando células para sítios de inflamação. Exercem seus efeitos em várias células e desempenham uma variedade de papéis, como na inflamação e na diferenciação celular, estudos revelam que, devido as suas ações pleiotrópicas, ou seja, diferentes ações em diferentes tipos celulares, as citocinas podem aumentar ou suprimir a produção de outras citocinas (MATSUMOTO et al., 2018). Esses mediadores solúveis possuem uma meia-vida curta, por isso, em condições normais, eles são rapidamente eliminados, garantindo uma bioatividade limitada. Entretanto, em processos inflamatórios, as citocinas podem ser liberadas em quantidade satisfatória para promover um efeito sistêmico (BERRAONDO et al., 2018).

Em geral, as citocinas incluem as interleucinas (IL), interferons (IFN), quimiocinas e fatores de necrose tumoral (TNF). As citocinas clássicas podem ser classificadas em pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 (ROE, 2021). Durante o processo inflamatório, as citocinas são liberadas e agem na produção de proteínas de fase aguda. As ILs pró-inflamatórias atuam na área lesionada, de forma a sinalizar a inflamação; além disso, também estão associadas com a indução e manutenção da dor aguda (NAVAEI-ALIPOUR et al., 2021).

A IL-1 β é produzida por neutrófilos e macrófagos e está envolvida na migração leucocitária, promovendo a proliferação e diferenciação de células do sistema imune. Em adição, a IL-1 β regula positivamente a expressão gênica e secreção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2, que participam da produção de mediadores inflamatórios (TULOTTA; OTTEWELL, 2018).

A IL-6, por sua vez, destaca-se por ser a principal citocina envolvida na produção de proteínas de fase aguda e células da resposta imune, como neutrófilos, são estimuladas pela sinalização clássica dessa interleucina; além disso, os níveis de IL-6 permanecem aumentados em condições inflamatórias crônicas, o que ocasiona a maior sobrevivência de linfócitos e macrófagos que amplificam a inflamação (NARAZAKI; KISHIMOTO, 2018).

O TNF- α é uma citocina sintetizada e liberada no local da lesão a partir de diversas células e age na estimulação de outras citocinas pró-inflamatórias, induzindo também a expressão de moléculas de adesão celular (ZHAO et al., 2021).

2.2.3. Farmacoterapia para manejo da inflamação aguda

Uma significativa parcela da população é afetada por distúrbios relacionados à inflamação e, atualmente, o manejo para tratamento dessas doenças geralmente é realizado através da prática clínica tradicional com drogas esteroides ou não esteroides. Entretanto, apesar da fácil acessibilidade, o uso crônico desses medicamentos leva a sérios efeitos adversos (PATIL et al., 2019).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são um grupo de medicamentos amplamente utilizados no tratamento agudo da inflamação e agem inibindo as etapas iniciais da biossíntese de prostaglandinas por meio da inibição da COX. A estrutura química dos AINEs e a capacidade de inibir cada isoenzima (COX-1 ou COX-2) varia de um para outro fármaco (QANDIL, 2012). Porém, o uso prolongado de AINEs está relacionado com toxicidades cardiovasculares, gastrointestinais e renais, o que limita sua utilização em diversos pacientes (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

Por outro lado, têm-se os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), conhecidos como glicocorticoides. Ao serem administrados, ligam-se ao receptor de glicocorticoides (GR) que está presente no citoplasma de todas as células humanas. Esse complexo ativado pode então migrar para o núcleo, onde regula a expressão gênica por meio da ligação direta de elementos responsivos a glicocorticoides no ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ligando-se a outros fatores de transcrição. Isso resulta em um importante efeito imunossupressor, mas, conseqüentemente, acarreta efeitos adversos indesejáveis e, às vezes, graves, como hipertensão, hiperglicemia, osteoporose e parada do crescimento. Além disso, a toxicidade e a recorrência dos sintomas na descontinuação são grandes problemas relacionados à essas drogas (DORRINGTON et al., 2020).

Visto isso, há uma extrema necessidade de explorar novos agentes anti-inflamatórios com ação seletiva, ou seja, sem interferir no mecanismo regulatório da inflamação, e menor toxicidade, proporcionando, assim, um maior acervo de opções para tratamento da inflamação.

2.3. Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SRDA)

2.3.1. Definição e histórico

A lesão pulmonar aguda (LPA) e sua manifestação clínica mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SRDA), são doenças pulmonares inflamatórias agudas caracterizadas por infiltração densa de células, principalmente neutrófilos, edema bilateral difuso com consequente diminuição da complacência pulmonar, dano alveolar e deposição da membrana hialina no lúmen broncoalveolar, resultando em insuficiência respiratória hipóxica (SHAW; MCAULEY; O’KANE, 2019).

A descrição clínica que define LPA existe há mais de 50 anos. Em 1967, Ashbaugh e colaboradores descreveram, pela primeira vez, o aparecimento de uma síndrome clínica caracterizada por dispneia grave, taquipneia, cianose refratária à oxigenoterapia, perda da complacência pulmonar e infiltrado alveolar difuso observada na radiografia de tórax; o início da síndrome foi agudo, geralmente poucas horas após o distúrbio clínico subjacente. A essa síndrome, atribuiu-se o termo “síndrome do desconforto respiratório do adulto” (ASHBAUGH et al., 1967).

Já em 1994, na Conferência de Consenso Americana – Europeia (*American-European Consensus Conference - AECC*), definiu-se a adoção de conceitos para LPA e SDRA, relacionadas a gravidade dos sintomas, distinguindo-se a partir do índice de oxigenação – (PaO_2/FiO_2): $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ para LPA e ≤ 200 para SDRA, ou seja, pacientes com menor grau de hipoxemia são diagnosticados com LPA, enquanto aqueles com maior grau são diagnosticados com SDRA (BERNARD et al., 1994).

Enfim, a definição mais atualizada foi proposta somente em 2012, conhecida como definição de Berlin, de acordo com a *European Society of Intensive Care Medicine (ESICM/Berlin)*, *Society Critical Care Medicine (SCCM)* e a *American Thoracic Society (ATS)*. A definição de Berlin teve como objetivo identificar de forma mais precisa fatores como diagnóstico, gravidade e prognóstico relacionados a SDRA, permitindo que a abordagem terapêutica fosse aplicada de maneira mais oportuna e adequada (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; FERGUSON et al., 2012).

Nessa definição são considerados os seguintes critérios: natureza aguda da lesão (início dentro de uma semana de um insulto clínico conhecido, ou novo, ou sintomas respiratórios progressivamente piores); imagem radiológica (opacidades

bilaterais – não completamente explicadas por derrames, colapsos pulmonar, ou nódulos); origem do edema (insuficiência respiratória não completamente explicada por insuficiência cardíaca ou sobrecarga de fluídos); e nível de hipoxemia (limiar específico da relação PaO₂/FiO₂ medida com um requerimento mínimo da pressão expiratória final positiva (PEEP) ≥ 5 cmH₂O, distinguindo-se três categorias de gravidade: leve (200 mmHg < PaO₂/FiO₂ ≤ 300 mm Hg), moderada (100 mm Hg < PaO₂ / FiO₂ ≤ 200 mm Hg) e grave (PaO₂/FiO₂ ≤ 100 mm Hg) (RANIERI et al., 2012; ROTTA et al., 2015).

Portanto, o termo LPA vem sendo considerado como uma condição mais leve da SDRA e, por isso, é o modelo mais aceito para mimetizar a síndrome em animais, com o intuito de compreender e observar mudanças fisiopatológicas relacionadas à doença (CARLA et al., 2020).

2.3.2. Etiologia e epidemiologia

Atualmente, ainda existe uma grande dificuldade para caracterizar fatores como incidência e mortalidade na SDRA, devido a sua complexa natureza intrínseca. A origem dessa doença pode ser dividida em dois grandes grupos: causas pulmonares diretas, quando o dano atinge os pulmões através das vias aéreas ou por traumatismo torácico e incluem pneumonia, aspiração do suco gástrico, inalação de fumaça, quase afogamento, entre outros; e causas pulmonares indiretas, quando o causador do dano atinge os pulmões através da corrente sanguínea, incluindo trauma, queimadura, sepse e múltiplas transfusões sanguíneas (EWORUKE; MAJOR; GILBERT MCCLAIN, 2018). E, embora se avalie a possibilidade de uma predisposição genética para o desenvolvimento e gravidade da SDRA, uma ligação genética ainda não foi claramente identificada (GRIGORYEV et al., 2004).

Apesar do avanço nas mudanças no gerenciamento de fluidos e a dedicação ao controle precoce da origem ter reduzido a incidência, a SDRA ainda apresenta uma mortalidade que se aproxima de 33%, representando mais de 10% de todas as internações em unidades de terapia intensiva (UTI) e 4% de todas as internações hospitalares, resultando, portanto, na utilização significativa de recursos de saúde em todo o mundo (MATTHAY et al., 2019).

Crítérios como definição, heterogeneidade da população e variações etiológicas e geográficas ainda permitem muitas controvérsias quanto a prevalência e incidência da LPA/SDRA mundialmente. De fato, um estudo revelou que entre UTIs de 50 países diferentes, a prevalência de SDRA foi de 10,4% das internações, com distintos graus, que corresponderam a: SDRA leve (30,0%), SDRA moderada (46,6%), e SDRA grave (23,4%) (BELLANI et al., 2016). Além disso, países como Estados Unidos apresentam incidência bastante elevada da doença, sendo até mesmo 10 vezes maior essa incidência do que no continente europeu (VILLAR et al., 2011). No Brasil, a incidência da SDRA varia de 1,8 a 31 por 100.000 habitante (CASER et al., 2014).

Fatores como idade e raça parecem também interferir na incidência da LPA/SDRA. Em um estudo, Rubenfeld e colaboradores descobriram que a taxa de mortalidade de LPA/SDRA foi significativamente menor em pacientes com idade de 15 a 19 anos quando comparado com pacientes de 85 anos de idade ou mais, permitindo inferir que a idade é um fator importante no prognóstico da doença (RUBENFELD et al., 2005). Em relação à raça, estudos demonstraram que pacientes afro-americanos e hispânicos apresentaram taxa de mortalidade em 60 dias maior do que pacientes caucasianos (ERICKSON et al., 2009).

2.3.3. Fisiopatologia

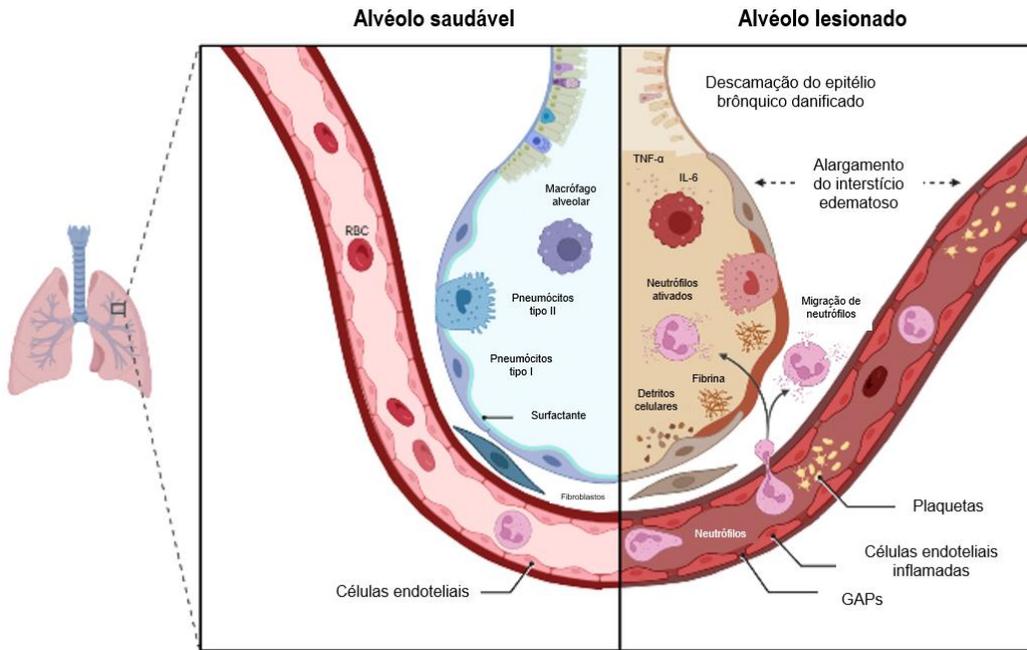
O entendimento correto sobre a fisiopatologia da LPA é um aspecto relevante para se obter novas propostas de tratamentos com alvo nesse processo e no aumento dos mecanismos de reparo pulmonar. Na LPA, ocorre uma ruptura das barreiras endoteliais e epiteliais pulmonares, que ocasiona perda da integridade da membrana alvéolo-capilar e migração transepitelial excessiva de neutrófilos com consequente liberação de mediadores citotóxicos pró-inflamatórios (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

A membrana alvéolo-capilar é composta pelo endotélio microvascular, interstício e epitélio alveolar. Em condições normais, o capilar alvéolo-pulmonar apresenta endotélio seletivamente permeável, onde as proteínas permanecem no espaço intravascular, enquanto os fluídos atravessam as membranas como resultado do balanço entre as forças hidrostáticas e gradientes oncóticos (MCNEIL et al., 2021).

Os pneumócitos do tipo I e do tipo II se unem e formam junções estreitas umas com as outras, permitindo que ocorra a regulação seletiva do fluxo de líquido através da barreira epitelial. Os pneumócitos do tipo I são células responsáveis pela formação da estrutura alveolar e pela troca gasosa, sendo menos resistentes ao dano lesivo; enquanto os pneumócitos do tipo II desempenham um papel central no processo de reparo epitelial e atuam na produção do surfactante, elemento responsável por diminuir a tensão superficial nos alvéolos (BROOKES et al., 2021).

Por sua vez, quando ocorre um dano lesivo aos pulmões, células residentes do sistema imune, principalmente os macrófagos, reconhecem os agentes invasores e agem liberando diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , quimiocinas e moléculas de adesão, que colaboram com a migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, no endotélio vascular (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016). Além disso, ocorre influxo do fluido rico em proteínas para o espaço intersticial e alvéolo, que irá formar um exsudato proteico, culminando na formação do edema intersticial (LI et al., 2020). Aliados, esses parâmetros resultam na destruição dos pneumócitos, com consequente formação de uma membrana hialina, rica em proteína e fibrina, e inativação do surfactante, ocasionando a redução da complacência pulmonar e levando ao quadro de hipóxia (PUNSAWAD; VIRIYAVEJAKUL; TECHARANG, 2019) (Figura 2).

Figura 2. Esquema representativo do processo patológico da lesão pulmonar aguda (LPA)



Fonte: criado e adaptado em BioRender (2020). O alvéolo normal (à esquerda), em comparação com o alvéolo lesado na fase inicial da LPA (à direita). Ao ocorrer a ativação de receptores presentes em células como macrófagos, mediada por patógenos, tem-se a liberação de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β e IL-6 e a migração de neutrófilos para o espaço alveolar, onde sofrem ativação. Os neutrófilos são responsáveis pela liberação de mediadores tóxicos, como espécies reativas de oxigênio e proteases, que danificam o endotélio capilar, ocasionando um aumento da permeabilidade capilar e consequente destruição das pneumócitos do tipo II e pneumócitos tipo I, promovendo a saída de líquido e proteínas que formarão um exsudato e, conseqüentemente, o edema, inativando a produção de surfactante e causando a deposição da membrana hialina.

A LPA/SDRA pode ser dividida em três fases que variam de acordo com o tempo e a evolução clínica da doença. São elas: fase exsudativa ou precoce, fase proliferativa ou fase fibroproliferativa e fase fibrótica ou de resolução (MATSUO et al., 2021).

A fase exsudativa ou precoce estende-se, geralmente, até a primeira semana após o início da lesão. Após o dano, células residentes, como macrófagos alveolares, liberam mediadores pró-inflamatórios e quimiocinas, contribuindo para o recrutamento excessivo de neutrófilos e células monocíticas e extravasamento de fluido rico em proteínas nos espaços alveolares. Assim, o resultante aumento da permeabilidade alvéolo-capilar, disfunção do surfactante e diminuição da depuração do líquido alveolar levam a formação do edema pulmonar, troca gasosa prejudicada e hipoxemia (PATEL et al., 2017).

Sobrepondo-se à fase exsudativa ou precoce, inicia-se a fase proliferativa ou fibroproliferativa, onde ocorre a reabsorção do edema alveolar e restauração da arquitetura e função alveolar. Nessa fase, os pneumócitos tipo I se proliferam e se

diferenciam em pneumócitos tipo II com o intuito de realizar o reparo ao substituir células lesadas e necróticas. Além disso, há processos como metaplasia escamosa, infiltração intersticial por miofibroblastos e deposição precoce de fibras colágenas. Essa fase se desenvolve após, aproximadamente, 10 a 14 dias (GOUDA; BHANDARY, 2019).

A fase fibrótica ou de resolução não ocorre em todos os pacientes com LPA/SDRA, mas tem sido associada a evidências mecânicas, bioquímicas, hipóxia progressiva, falência de múltiplos órgãos e aumento da mortalidade. É caracterizada pelo aparecimento de fibrose intersticial e intra-alveolar que pode resolver lentamente ou causar destruição pulmonar irreversível (BEN SALEM, 2017; HUANG et al., 2018).

Considera-se que os neutrófilos, células polimorfonucleares, desempenham um papel fundamental na fisiopatologia da LPA/SDRA, pois a ativação e a transmigração dessas células são eventos marcantes na progressão da doença (GROMMES; SOEHNLEIN, 2010). O papel fundamental dos neutrófilos na patogênese da LPA/SDRA foi demonstrado em estudos clínicos e em animais. Os neutrófilos são os primeiros envolvidos na inflamação e sua ativação excessiva e/ou prolongada colabora para a destruição da membrana basal e aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar (ZHOU; DAI; HUANG, 2011).

Apesar de sua ativação ser relevante para a defesa do hospedeiro, o excesso leva ao dano tecidual pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, como proteases, espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias e moléculas pró-coagulantes, contribuindo significativamente para a destruição da arquitetura dos alvéolos (PARK et al., 2019).

Além disso, estudos recentes mostram que os neutrófilos possuem outro mecanismo imunológico, liberando para o meio extracelular a cromatina associada a diferentes proteínas, formando um complexo de armadilhas extracelulares chamadas redes extracelulares neutrofílicas (NETs). As NETs são importantes em proceder com o dano, provocando o confinamento do patógeno no local da infecção. Entretanto, esta ação pode levar a danos teciduais e provocar lesões celulares, pela liberação de moléculas, como as proteases (LEE et al., 2017; SHI et al., 2020).

Diversas vias de sinalização regulam aspectos das funções imunes e servem como mediadores centrais das respostas inflamatórias, podendo ser alvos mais

específicos e direcionados para o tratamento de inúmeras patologias (PAPACONSTANTINO, 2019).

O sistema imune inato possui diversas classes de receptores importantes para o reconhecimento de agentes lesivos. Nesse sentido, destaca-se como sendo a classe de receptores mais importante nos mamíferos os denominados receptores similares à Toll (TLR, *Toll-like receptors*), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (BARTON, 2008). Esses receptores estão presentes em células como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos e podem ser divididos em: TLR 1, 2, 4, 5, 6, presentes na membrana plasmática, com domínios intracelular, com a presença de proteínas do tipo tirosina (TIR) como o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), e extracelular (repetições ricas em leucina – LRR); e TLR 3, 7, 8, 9 e 10, que estão localizados no meio intracelular, sem a presença de domínios extracelulares (LEVENTHAL; SCHRÖPPEL, 2012).

Dentre os PAMPs, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), a endotoxina primária de bactérias gram-negativas, é importante para ativar os TLR, principalmente o TLR4, complexado com o receptor denominado antígeno de diferenciação de monócitos CD14 (CD14); esse complexo é associado a uma proteína de ligação do tipo MD-2 (WANG et al., 2014). Quando ativado por LPS, esse complexo promove um sinal detectado por MyD88 que é transmitido por uma cascata de sinalização intracelular, podendo resultar na ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), por exemplo, e regular a ativação de fatores de transcrição como fator nuclear kappa B (NF- κ B), responsáveis pela indução da expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios (CHIANG; YU; GROGAN, 2011).

O NF- κ B é um complexo proteico que apresenta cinco fatores de transcrição que incluem: p50, p52, RelA (p65), RelB e c-Rel. Quando se tem um estímulo celular, ocorre a fosforilação do I κ B (I κ K) que consiste em subunidades de quinase catalítica (IKK α e IKK β) e a proteína reguladora não enzimática do tipo modulador enzimático NF- κ B (NEMO). Os heterodímeros NF- κ B são liberados do complexo NF- κ B/I κ B e translocados para o núcleo, culminado na expressão gênica de citocinas, como TNF- α , IL1 β e IL-6, e quimiocinas (SUN; CHANG; JIN, 2013). As MAPKs são subdivididas em subfamílias, que incluem a proteína quinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular (ERK 1 e 2), quinases N-terminais c-Jun 1–3 (JNK1, JNK2 e JNK3) e p38 MAPKs

(p38a, p38b, p38g e p38d). Elas são responsáveis por processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e respostas induzidas por estímulos como estresse (KHOLODENKO; BIRTWISTLE, 2009; YUE; LÓPEZ, 2020).

Portanto, a ativação dessas cascatas e vias de sinalização pode resultar em processos inflamatórios que induzem o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo a LPA/SDRA (CHEN et al., 2019).

2.3.4. LPA/SDRA e COVID-19

Em 2020, a LPA/SDRA ficou em maior evidência dada a sua manifestação na COVID-19, uma doença infecciosa causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) caracterizada principalmente por danos no sistema respiratório e cardiovascular e que ocasionou uma situação pandêmica (TEAM, 2020).

A COVID-19 aparece como doença assintomática ou apresenta sintomas leves na maioria dos pacientes. Na avaliação clínica, os sintomas mais comuns são febre, tosse, dispneia, mialgia e fadiga. Quando considerada grave, a COVID-19 causa dano alveolar maciço e insuficiência respiratória progressiva, em um curto período de tempo, que pode levar à SDRA (EMADI-BAYGI et al., 2021).

Quando o vírus entra em contato com o organismo, gera um dano celular que evolui para edema intersticial e enchimento de líquido alveolar, podendo ocorrer fases exsudativas proliferativas e fibróticas de dano alveolar difuso, deposição de membranas hialinas, hiperplasia atípica de pneumócitos, hemorragia alveolar e lesão de células endoteliais, características típicas da SDRA (SUESS; HAUSMANN, 2020). Além disso, o SARS-CoV-2 parece desencadear uma fase prolongada de hipercitocinemia que engloba uma ampla gama de mediadores pró-inflamatórios como IL-6, IL-1 β , TNF- α juntamente com a infiltração de células inflamatórias. Nesses casos, um aumento descontrolado de citocinas inflamatórias induz hiperpermeabilidade vascular, levando à falência dos sistemas cardíaco, hepático, renal e eventualmente à morte (GIRIJA; SHANKAR; LARSSON, 2020).

A pandemia de COVID-19 afetou milhões de pessoas e causou centenas de milhares de mortes em todo o mundo. No Brasil, em 2020, foram registradas 107.895 internações por SDRA, das quais 27.086 (25%) foram casos confirmados de COVID-19 e 7.514 (28%) foram a óbito (SOUSA et al., 2020).

Desde a descoberta do coronavírus e a sua rápida transmissão, vem crescendo o número de estudos para desenvolvimento de um tratamento eficaz e seguro para a COVID-19. Entretanto, até o momento, não existe uma terapia padrão para a infecção causada pelo SARS-CoV-2; o tratamento é baseado na utilização de anti-inflamatórios, antivirais, anticoagulantes e associações entre diversos medicamentos, por exemplo, e a prevenção ocorre por meio de vacina (MONTANI et al., 2022).

2.3.5. Protocolo experimental de LPA induzido por LPS

Os modelos animais apresentam muitos aspectos que mimetizam várias condições de doença em humanos. Além disso, são importantes para a descoberta de fármacos e/ou componentes, seus estudos toxicológicos, dose e efeitos colaterais para possível uso futuro em humanos (VAN DEN BUUSE et al., 2005).

Assim, esses modelos vêm facilitando os estudos mecanísticos e fornecendo informações sobre LPA/SDRA, incluindo as alterações fisiológicas e patológicas que ocorrem de acordo com a evolução da doença e contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (D’ALESSIO, 2018). Atualmente, estudos relatam a existência de vários protocolos experimentais na LPA/SDRA, dentre eles, a indução por ácido oleico, ventilação mecânica e indução por LPS (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008). O modelo experimental de LPA induzido por LPS é o mais estudado e amplamente utilizado, e considerado um importante indutor de sepse (ALI et al., 2020).

O uso do LPS bacteriano tem uma série de vantagens como método para modelar os efeitos da LPA em animais. A utilização desse complexo glicopeptídeo apresenta fácil administração, baixo custo e os resultados tendem a ser reprodutíveis em experimentos (CHOW et al., 2003). O LPS é um potente ativador das respostas imunes inatas através das vias dependentes de TLR4 e fornece informações sobre os efeitos das respostas inflamatórias do hospedeiro. A administração do LPS, em doses variando de 1 a 4mg/kg, provoca uma fase inicial (4-12h após o estímulo) caracterizada por aumento intenso de células polimorfonucleares, citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e aumento da permeabilidade vascular com formação de exsudato proteico, resultando em uma perda da função pulmonar (JIA et al., 2023).

As vias de administração do LPS mais empregadas no modelo de LPA/SDRA são as intratraqueal e intranasal em camundongos, acarretando nas principais características de dano pulmonar (KHADANGI et al., 2021). Além disso, as linhagens de camundongos utilizadas em protocolos experimentais também auxiliam quanto a resposta inflamatória desenvolvida. Por exemplo, camundongos BALB/c são muito sensíveis ao LPS, enquanto camundongos C57BL/6 são mais resistentes. Essa diferença reflete da duração da resposta inflamatória, liberação de mediadores, entre outros parâmetros (MATUTE-BELLO; FREVERT; MARTIN, 2008).

De forma complementar, métodos *in silico*, ou “experimentação através de simulação computacional”, vêm se evidenciando como metodologias frequentes na descoberta e otimização de novas moléculas que venham a tratar a LPA/SDRA, proporcionando vantagens como economia de tempo e recursos financeiros (LI et al., 2019b; SOUZA et al., 2021).

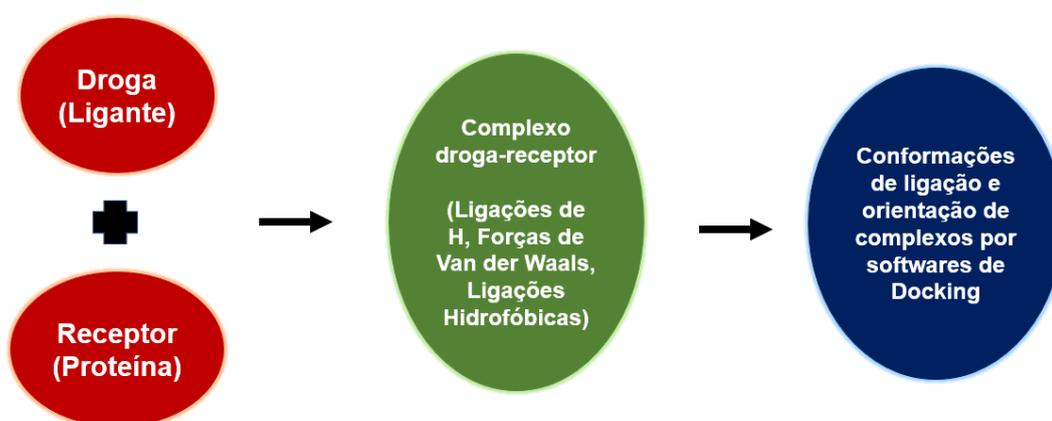
Esses métodos *in silico* incluem bancos de dados, relações quantitativas de estrutura-atividade, pesquisa de similaridade, modelos de homologia e outras modelagens moleculares, entre outros. Além disso, proporcionam esclarecimento na afinidade de uma molécula a um alvo, propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, bem como na caracterização físico-química, aumentando as chances de moléculas candidatas com propriedades inadequadas não prosseguirem para estudos toxicológicos, não clínicos e/ou clínicos (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007; KHAN et al., 2019).

A complementaridade geométrica e química de drogas (ligantes) e suas estruturas alvo biológicas (receptores) influencia as vias metabólicas ou transdução de sinal iniciando um efeito fisiológico ou farmacológico (ORTEGA; CARA; SALVADOR, 2012). Para tal, um dos métodos mais utilizados é o *docking* molecular, sendo considerado a melhor opção para prever as conformações de ligação energeticamente favoráveis de ligantes no sítio ativo de determinado alvo e elucidar interações moleculares. A partir dessa predição de orientação, forma-se um complexo que pode ser usado para estimar a afinidade de ligação ou a força de associação entre as duas moléculas (Figura 3) (FAN; FU; ZHANG, 2019).

O processo de *docking* proteína-ligante inicia-se com a aplicação de algoritmos que posicionam as moléculas no sítio ativo. Para colocar a molécula com precisão no sítio ativo, o tratamento da flexibilidade do ligante pode ser feito usando diferentes

métodos de busca. Entre eles, destaca-se o Molegro Virtual Docker (MVD), um software que calcula energias de interação entre ligantes e macromoléculas utilizando as estruturas tridimensionais, que podem ser obtidas através de modelos de homologia ou experimentos de raio-X/Ressonância Magnética Nuclear; esse programa possui algoritmos de busca e funções de pontuação nativas (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

Figura 3. Esquema representativo da técnica de *docking* molecular



Fonte: Adaptado de (GUPTA; SHARMA; KUMAR, 2018)

2.3.1. Estratégias terapêuticas

Com os crescentes estudos sobre a compreensão da fisiopatologia e epidemiologia da LPA/SDRA, identificou-se vários métodos de intervenção farmacológica e possível tratamento para a doença. Entretanto, ainda hoje, os índices de mortalidade e morbidade permanecem altos e a eficácia de uma abordagem terapêutica padrão é bastante limitada (MOKRA, 2020).

A melhora no gerenciamento da ventilação mecânica protetora do pulmão tem sido o efeito mais influente na mortalidade dos pacientes com LPA/SDRA, com o intuito de fornecer uma troca gasosa mais adequada (YNDROME; ETWORK, 2000; YOSHIDA et al., 2019). No entanto, a ventilação mecânica vem sendo avaliada como uma indutora da própria doença, ao causar agravamento da lesão e aumento do processo inflamatório (BATES; SMITH, 2018).

Outras práticas não farmacológicas também vêm sendo apontadas como estratégias atraentes para intervir na melhora da doença. Apresentando resultados favoráveis em diversos estudos, a posição prona, reservada a pacientes com SDRA grave, na fase aguda, atua como uma melhor combinação ventilação/perfusão que leva a uma distribuição mais homogênea da ventilação e melhoria na depuração de dióxido de carbono (GUÉRIN et al., 2013; UMBRELLO et al., 2016). A oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) pode ser usada como suporte respiratório, substituindo a troca gasosa alveolar endógena e permitindo a redução das configurações ventilatórias; porém, devido às indicações restritas, custo e necessidade de equipes especializadas, o seu uso é bastante limitado (ARAOS et al., 2019). E tem-se o gerenciamento conservador de fluidos, uma prática que melhora a função pulmonar e diminui a duração da ventilação mecânica e dos cuidados intensivos (KEDDISSI et al., 2019).

Quanto a abordagens farmacológicas, nos últimos tempos, várias classes de medicamentos foram utilizadas na tentativa de tratar a doença, entretanto, respostas favoráveis não foram alcançadas para todos os subgrupos de pacientes. O uso de bloqueadores neuromusculares (MEFFORD; DONALDSON; BISSELL, 2020), broncodilatadores β 2-agonistas (SCOTT et al., 2021), inibidores de fosfodiesterase (PDE) (MOKRA; MOKRY, 2021), antioxidantes (PATEL et al., 2020), aspirina (HU et al., 2019), entre outros, são adotados como estratégias, mas, os resultados de sua utilização ainda são questionáveis. Para tratar o processo inflamatório, destacam-se os corticosteroides, devido às suas ações anti-inflamatórias e antiedematosas (MOKRA et al., 2019; TOMAZINI et al., 2020). Porém, além de seus inúmeros efeitos adversos, estudos relatam que, se os corticosteroides forem iniciados 14 dias ou mais após o diagnóstico da doença, eles podem se tornar até prejudiciais, limitando, portanto, o tratamento (TONGYOO et al., 2016).

Dessa forma, os desafios terapêuticos na LPA/SDRA despertam o interesse da investigação de fármacos com efeitos seletivos às moléculas alvos envolvidas no processo fisiopatológico da doença, visando uma maior eficácia, diminuição de efeitos indesejáveis, e a implantação de uma terapia padrão que melhore a qualidade de vida dos pacientes e reduza o índice de mortalidade causado por essa enfermidade.

2.4. Substâncias sintéticas

Durante muito tempo, os produtos naturais e seus análogos estruturais forneceram grande contribuição à farmacoterapia, sendo considerados a principal fonte de descobertas de medicamentos. Entretanto, essa rota passa por alguns desafios, como a escassez da obtenção de fontes renováveis de compostos ativos com potenciais biológicos, barreiras técnicas para triagem, isolamento, caracterização e otimização, além de se ter poucos estudos a respeito da segurança sobre parâmetros toxicológicos e eficácia dos compostos naturais (ATANASOV et al., 2021; LARAIA; WALDMANN, 2017).

É nesse sentido que se destacam as preparações sintéticas como sendo novas alternativas atraentes e vantajosas para obtenção de novas drogas. Atualmente, o desenvolvimento de novos métodos sintéticos tem por objetivo acelerar o ritmo e melhorar a qualidade dos produtos na química medicinal, através de reações químicas e mudanças moleculares, como modificações estruturais, oxigenação, remoção de grupos substituintes, estereoquímica e hidrogenação; tudo isso, então, pode culminar na alteração da atividade biológica de uma molécula, podendo, assim, melhorá-la de forma considerável, quanto aos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos (CAMPOS et al., 2019; BÉRUBÉ, 2016).

Essa combinação entre a síntese orgânica e a química medicinal apresenta um significativo impacto na descoberta e desenvolvimento de medicamentos e interfere em processos necessários como estágio de fabricação, formulação, estabilidade e qualidade, além da busca de alternativas terapêuticas mais favoráveis que apresentem vantagens farmacoterapêuticas (BLAKEMORE et al., 2018).

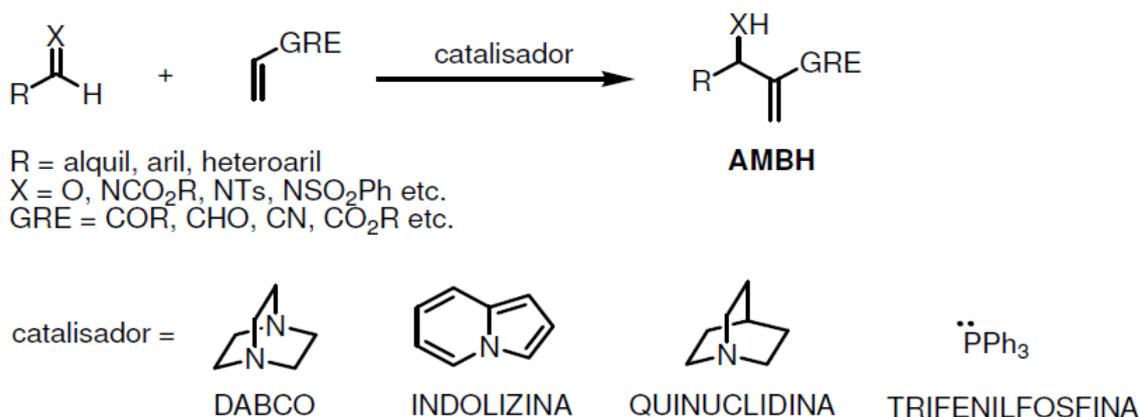
2.4.1. Reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH)

A reações carbono-carbono e suas interconversões em grupos funcionais apresentam-se como uma metodologia promissora e significativa na área da química orgânica sintética, e vêm desempenhando papel importante para descoberta de novas estruturas moleculares complexas, sendo consideradas mais versáteis quando comparadas a outras metodologias sintéticas (SIVAGURU et al., 2019).

Dentre essas reações, destaca-se a Reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) como sendo uma transformação química, versátil e econômica. Esse método

reacional é baseado entre a posição α de alceno ou alcino, como acroleína, vinilcetonas, ésteres acrílicos, acrilonitrila, fenil vinil sulfonas, vinil sulfonatos e vinil fosfonatos, ativado por um grupo retirador de elétrons (GRE) e um eletrófilo, a exemplo de uma variedade de aldeídos alifáticos, aromáticos, heteroaromáticos, aldeídos insaturados e funcionalizados, na presença de um organocatalisador, geralmente as aminas e as fosfinas (MORITAKEN-ICHI; SUZUKIZENNOSUKE; HIROSEHIROMITSU, 2006). Os produtos gerados nessa reação são denominados de adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH), moléculas polifuncionalizadas que têm sido amplamente utilizadas na síntese orgânica para uma variedade de aplicações (CALCATELLI et al., 2020). A figura 4 representa esquematicamente os componentes da RMHB.

Figura 4. Esquema representativo da Reação de Morita-Baylis-Hillman



Fonte: Adaptado de (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). GRE: grupo retirador de elétrons. AMBH: aduto de Morita-Baylis-Hillman

Além da promoção da síntese de várias estruturas de carbono relativamente simples, que podem ser utilizadas como intermediários sintéticos para a preparação de produtos naturais e outras substâncias mais complexas, a RMBH apresenta diversas outras vantagens, como: uma completa economia atômica, ou seja, todos os átomos dos reagentes são incorporados no produto; a possibilidade de utilização de condições brandas, onde a execução experimental pode ser realizada em meio aquoso ou na ausência de solvente; uma ampla tolerância de grupo funcional; e geração de produtos polifuncionalizados com relevante potencial sintético (CHEN et al., 2020b; PLATA; SINGLETON, 2015).

Já como desvantagens, a RMBH apresenta: a velocidade de reação, que pode variar de minutos a vários dias; a restrição de substratos; e a indução da quiralidade no carbono dos produtos. Contudo, devido a ampla gama de vantagens apresentadas por essa reação, os estudos a respeito de métodos que reduzam essas limitações são numerosos (CAMILO et al., 2022).

2.4.2. Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH)

Os produtos da RMBH, os AMBH, são moléculas que possuem várias funcionalidades reativas, ou seja, alceno, hidroxila e um grupo funcional que atrai elétrons nas proximidades, possibilitando a formação de uma matriz diversificada de novas reações orgânicas e transformações química (JUMA et al., 2022).

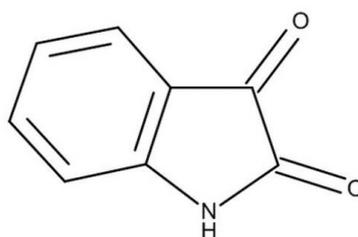
Os AMBH e seus derivados, apresentam-se como substratos de partida na preparação de produtos naturais ou moléculas funcionais relevantes (WANG et al., 2017) e suas atividades biológicas são relatadas desde 1999 (KUNDU et al., 1999). Desde então, há relatos na literatura que essas moléculas atuam como agentes antimaláricos, antileishmanial, antitumorais e antimicrobianos, por exemplo (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012).

Os AMBH apresentam alguns grupos funcionais, como hidroxila, olefina e éster, cetona, nitrila, sulfona ou fosfonato, e sua transformação pode levar a formação de acetatos, carbonatos e brometos, além de sofrerem rearranjos e reações de acoplamentos cruzados (NARENDAR REDDY; JAYATHIRTHA RAO, 2018). Produtos naturais, a exemplo dos compostos (+)-fostriecina, (+)-foslactomicina (SARKAR et al., 2009), umbelactona-1 (KAMAL; KRISHNAJI; VENKAT REDDY, 2007) e o ácido integerrinécico, um monoterpeneo natural encontrado em diversas espécies de plantas e constituinte de vários alcaloides pirrolizidínicos (DREWES; EMSLIE, 1982) são oriundos de reações que tiveram como reagente de partida um AMBH, simbolizando toda a sua importância para o desenvolvimento de novas moléculas promissoras.

2.4.3. O AMBH 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitril – CISACN – derivado da isatina

A isatina (1H-indole-2,3-diona) (Figura 5), também conhecida como indenediona e indol quinona, é um composto endógeno heterocíclico comumente utilizado para introdução de grupos farmacofóricos e consequente desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico. É composto por dois anéis cíclicos e planares, um com seis membros e o outro com cinco membros; o anel de seis membros possui caráter aromático, enquanto o anel de cinco membros possui caráter antiarômático. Além disso, possui um átomo de nitrogênio e dois grupos carbonila (MELIS et al., 2017).

Figura 5. Estrutura química da isatina



Fonte: (XU et al., 2017)

A presença de um núcleo indol na molécula da isatina proporciona uma grande versatilidade na molécula, com consequente possibilidade de criação de diversos derivados, a partir de métodos convencionais sintéticos. Os derivados da isatina são oriundos de certas reações químicas, como oxidação, expansão do anel e condensação aldólica; essas reações químicas formam a base para a síntese de outros derivados biologicamente importantes, como triptantrina, indirubina e 2-oxindoles (VARUN; SONAM; KAKKAR, 2019). Diversos estudos demonstraram que a isatina e seus derivados apresentam várias atividades biológicas como antibacteriana, anticonvulsivante e anticancerígena (BRITO et al., 2020a), antioxidante (ANDREANI et al., 2010), antimalárica (CHIYANZU et al., 2005) e anti-inflamatória (KUMAR et al., 2008).

Com foco na perspectiva molecular, o 3-hidroxi-2-oxindol quaternário ou espirocíclico vem recebendo atenção entre os químicos, pois é um núcleo molecular presente em diversos compostos com amplo espectro de atividades biológicas. Dentre seus precursores, as cetonas ativadas, núcleo de isatina, podem ser utilizadas como importantes pontos de partida para formação de AMBH (BRITO et al., 2020b).

Assim, destaca-se o composto denominado 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, o CISACN (Figura 6). Este aduto, derivado da isatina, possui um rendimento de aproximadamente 99% na reação química e é obtido em um curto tempo de reação (90 minutos), apresentando-se fisicamente como um sólido vermelho.

Figura 6. Estrutura química do CISACN



Fonte: (DA SILVA et al., 2016)

Além disso, já demonstrou atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral contra a linhagem HL-60 de leucemia humana, com concentração inibitória 50% (CI_{50}) de 7.8 μ M (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016b), e contra a linhagem NCI-H292 de câncer de pulmão, apresentando CI_{50} de 5.05 μ M (BRITO et al., 2020b), e também uma atividade antimalárica *in vitro*, onde foi capaz de reduzir a parasitemia do *Plasmodium falciparum* (W2) nos eritrócitos humanos, apresentando uma CI_{50} de 8,37 μ g/mL (MELO, 2020).

Quanto a estudos de toxicidade e fatores farmacocinéticos e físico-químicos, foi evidenciado, em estudos *in silico* (a partir de ferramentas computacionais), que o CISACN apresenta uma baixa citotoxicidade e uma boa viabilidade celular, ao causar baixa hemólise em eritrócitos humanos. Em adição, apresenta uma boa disponibilidade oral teórica, atendendo aos requisitos preconizados pela “Regra dos cinco” de Lipinski, com uma boa taxa de permeabilidade pelas membranas celulares, sendo assim, bem absorvido. Essa molécula também mostrou que, provavelmente, é inibidora da glicoproteína-P, a principal proteína de resistência em muitas células cancerígenas e, em adição, não apresenta potencial mutagênico. Em relação à toxicidade aguda oral teórica, ainda avaliada por testes *in silico*, o composto CISACN apresentou uma DL_{50} de 2.9260 mol/Kg, indicando assim uma baixa toxicidade. E a realização de testes *in vivo* com animais, permitiu que o CISACN fosse classificado

com uma DL₅₀ de 5000 mg/Kg, indicando, também, uma baixa toxicidade da molécula (PESSOA -PB, 2020).

Por conseguinte, o CISACN revela-se como uma molécula promissora para desenvolvimento de futuros fármacos, diante das evidências biológicas crescentes, sua fácil obtenção e baixa toxicidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar o efeito anti-inflamatório do CISACN, administrado por via oral, em modelos experimentais murinos de inflamação.

3.2. Específicos

- Investigar o efeito antiedematogênico e a dose farmacológica do CISACN utilizando o modelo experimental de edema de pata induzido por diversos agentes flogísticos, tais como: carragenina, PGE₂, bradicinina, serotonina, composto 48/80 e histamina;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do CISACN em modelo experimental de peritonite induzida por carragenina, observando no lavado peritoneal:
 - ✓ Migração de células inflamatórias;
 - ✓ Concentração de proteínas totais;
 - ✓ Produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1 β e IL-6.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do CISACN em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo, observando:
 - ✓ Migração de células inflamatórias para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF);
 - ✓ Edema e permeabilidade vascular pulmonar;
 - ✓ Produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no BALF e soro;
 - ✓ Parâmetros histopatológicos pulmonares (infiltrado celular, edema, hemorragia);
 - ✓ Interação molecular do CISACN, *in silico*, nos possíveis alvos moleculares (TLR4, NF- κ B e ERK 2 e p38 MAPKs).

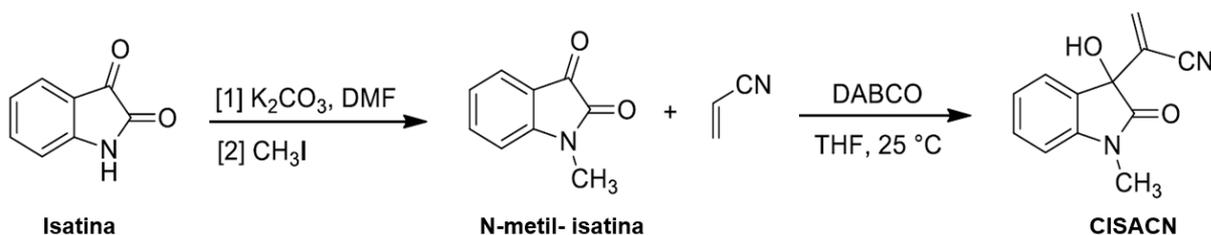
4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção da substância

O CISACN foi sintetizado e cedido gentilmente pelo professor Dr. Claudio Gabriel Lima Júnior, do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba.

Para a preparação do CISACN, duas etapas sintéticas foram realizadas (Figura 7). A primeira envolveu a metilação da isatina através de uma reação do tipo SN2 usando carbonato de potássio (K_2CO_3) como base e iodeto de metila como agente alquilante. Este produto obteve um rendimento de 98%. Posteriormente, o intermediário N-metil-isatina foi submetido a reação de Morita-Baylis-Hillman usando acrilonitrila como acceptor de Michael e DABCO como catalisador, formando o CISACN em rendimento de 95% após 90 minutos de reação (G. LIMA-JUNIOR et al., 2016b).

Figura 7. Reação para preparação do CISACN



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

4.2. Animais

Para os protocolos experimentais de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos e peritonite induzida por carragenina foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (*Mus musculus*) com idades entre seis e oito semanas, pesando entre 20 a 25g, fornecidos pela Unidade de Produção Animal (UPA) da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob a certidão nº 7316150420 (Anexo 1).

Para o protocolo de LPA induzida por LPS foram utilizados camundongos BALB/c machos com idades entre seis e oito semanas, pesando entre 20 e 25g

fornecidos pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal sob a certidão nº 7316150420 (Anexo 1).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h as 18h claro e das 18h às 6h escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental foi representado por seis animais.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)/Brasil, além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intramuscular (i.m.) de uma solução anestésica contendo 29 mg/mL de ketamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9 %).

4.3. Protocolo experimental de edema de pata induzido por carragenina

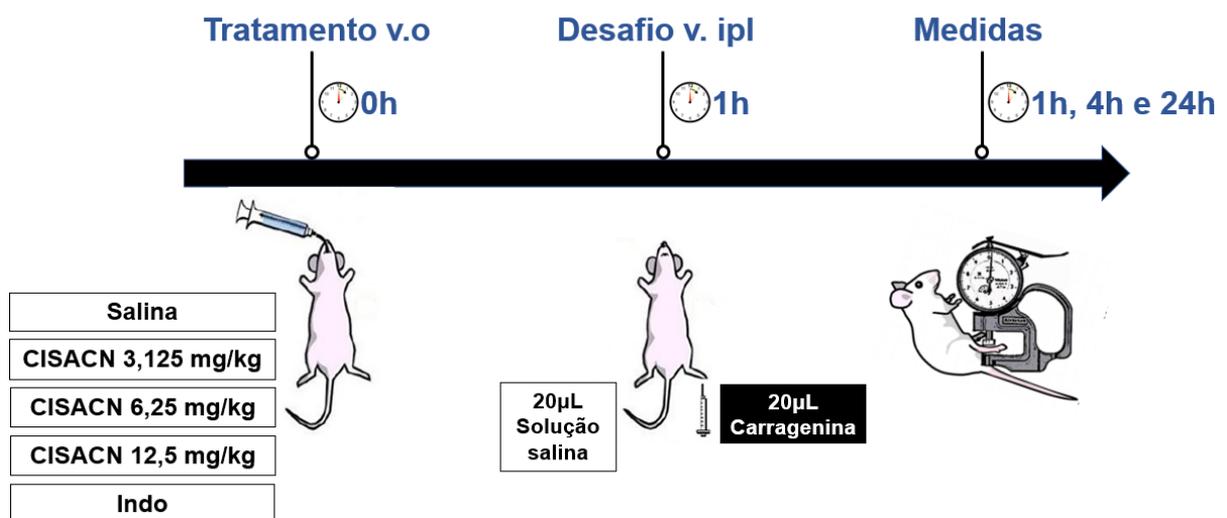
Os camundongos *Swiss* (n= 6/grupo), receberam a substância CISACN (3,125 mg/kg, 6,25 mg/ kg ou 12,5 mg/kg) ou a droga padrão indometacina (INDO 10 mg/kg), administradas por via oral (v.o.), 1h antes do desafio com a carragenina. Em seguida, por via intraplantar, na pata esquerda, receberam 20 µl de solução contendo carragenina (500 µg/pata). A pata direita recebeu o mesmo volume de salina, que foi utilizada como controle. Alterações no volume da pata foram medidas por um paquímetro digital nos intervalos de tempo de 1h, 4h e 24h após o desafio com a carragenina (Figura 8). A diferença entre o tamanho das patas direitas e esquerdas foi quantificada e tomada como índice do edema (SANTIAGO et al., 2015). Essa triagem permitiu a escolha da dose de 6,25 mg/kg para dar prosseguimento aos experimentos (de acordo com o resultado 5.1.1., página 64). A tabela 1 demonstra os tratamentos e desafios dos grupos experimentais.

Tabela 1. Grupos experimentais do protocolo de edema de pata induzido por carragenina

Grupo	Desafio	Tratamento
Basal	Salina	Salina
CG	Carragenina	Salina
CISACN 3,125 mg/kg	Carragenina	CISACN (3,125 mg/kg)
CISACN 6,25 mg/kg	Carragenina	CISACN (6,25 mg/kg)
CISACN 12,5 mg/kg	Carragenina	CISACN (12,5 mg/kg)
Indo	Carragenina	Indometacina (10 mg/kg)

Fonte: elaborada pela autora. CG: carragenina. Indo: indometacina.

Figura 8. Esquema representativo do protocolo experimental de edema de pata induzido por carragenina



Fonte: elaborada pela autora. V.o.: via oral. V. ipl.: via intraplantar. Indo: indometacina.

4.4. Protocolo experimental de edema de pata induzido por PGE₂, bradicinina, serotonina, histamina e 48/80

Os camundongos Swiss (n=6/grupo), receberam a substância CISACN (6,25 mg/ kg) ou as drogas padrão indometacina (INDO 10 mg/kg) ou prometazina (PROM 10 mg/kg), administradas por via oral (v.o.), 1h antes do desafio com os determinados agentes flogísticos. Em seguida, por via intraplantar, na pata esquerda, receberam 20 µl de solução contendo PGE₂ (5 µg/pata), bradicinina (6 nmol/pata), serotonina (1%, p/v), histamina (100 µg/pata) ou 48/80 (100 ng/pata). A pata direita recebeu o mesmo

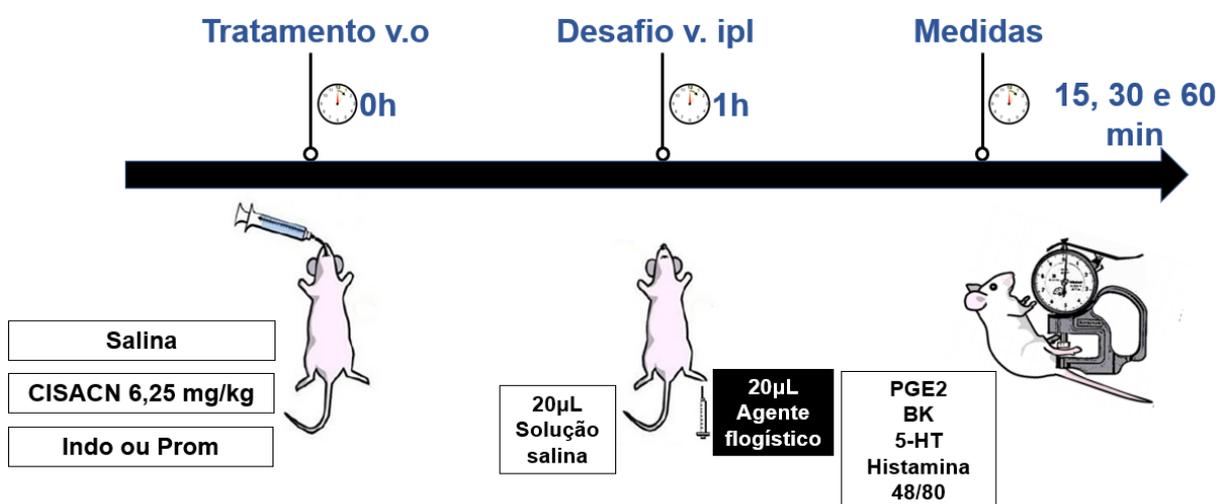
volume de salina, que foi utilizada como controle. Alterações no volume da pata foram medidas por um paquímetro digital nos intervalos de tempo de 15, 30 e 60 min para prostaglandina, 15 e 30 min para bradicinina e serotonina e 30 e 60 min para histamina e 48/80, após o desafio (Figura 9). A diferença entre o tamanho das patas direitas e esquerdas foi quantificada e tomada como índice do edema (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2017). A tabela 2 demonstra os tratamentos e desafios dos grupos experimentais.

Tabela 2. Grupos experimentais do protocolo de edema de pata induzido por PGE₂, BK, 5-HT, Hist ou 48/80

Grupo	Desafio	Tratamento
Basal	Salina	Salina
PGE ₂ ou BK ou 5-HT ou Hist ou 48/80	PGE ₂ ou BK ou 5-HT ou Histamina ou 48/80	Salina
CISACN 6,25 mg/kg	PGE ₂ ou BK ou 5-HT ou Histamina ou 48/80	CISACN (6,25 mg/kg)
Indo ou Prom	PGE ₂ ou BK ou 5-HT ou Histamina ou 48/80	Indometacina (10 mg/kg) ou Prometazina (10 mg/kg)

Fonte: elaborada pela autora. PGE₂: prostaglandina E2. BK: bradicinina. 5-HT: serotonina. Hist: histamina. Indo: indometacina. Prom: prometazina.

Figura 9. Esquema representativo do protocolo experimental de edema de pata induzido por PGE₂, BK, 5-HT, Hist ou 48/80



Fonte: elaborada pela autora. V.o.: via oral. V. ipl.: via intraplantar. Indo: indometacina. Prom: prometazina.

4.5. Protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina

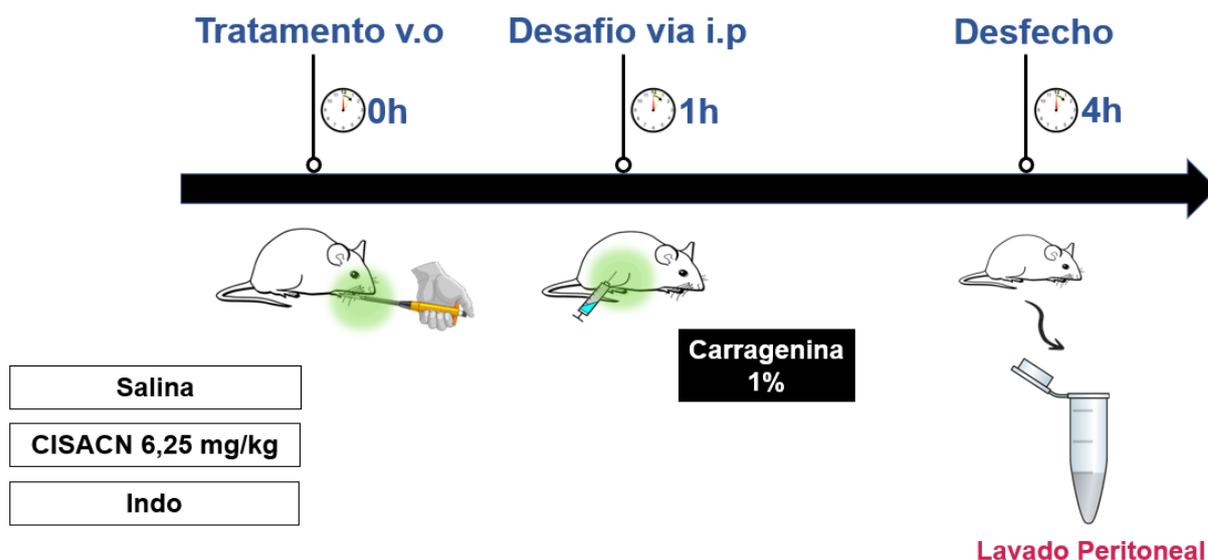
Os camundongos *Swiss* (n=6/grupo) foram pré-tratados por via oral com o CISACN (6,25 mg/kg) ou indometacina (INDO 10 mg/kg), e 1h após os pré-tratamentos foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) uma solução de carragenina a 1%. Após 4h do estímulo com o agente flogístico, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica (solução contendo 29 mg/mL de cetamina e 1,91 mg/mL de xilazina) e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS (DE FRANÇA et al., 2020). O peritônio foi cuidadosamente massageado por 30 segundos. A partir do infiltrado no lavado peritoneal, foram realizadas algumas análises (Figura 10). A tabela 3 demonstra os tratamentos e desafios dos grupos experimentais.

Tabela 3. Grupos experimentais do protocolo peritonite induzida por carragenina

Grupo	Desafio	Tratamento
Basal	Salina	Salina
CG	Carragenina	Salina
CISACN 6,25 mg/kg	Carragenina	CISACN (6,25 mg/kg)
Indo	Carragenina	Indometacina (10 mg/kg)

Fonte: elaborada pela autora. CG: carragenina. Indo: indometacina.

Figura 10. Esquema representativo do protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina



Fonte: elaborada pela autora. V.o.: via oral. V. ip.: via intraperitoneal. Indo: indometacina.

4.6. Protocolo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo

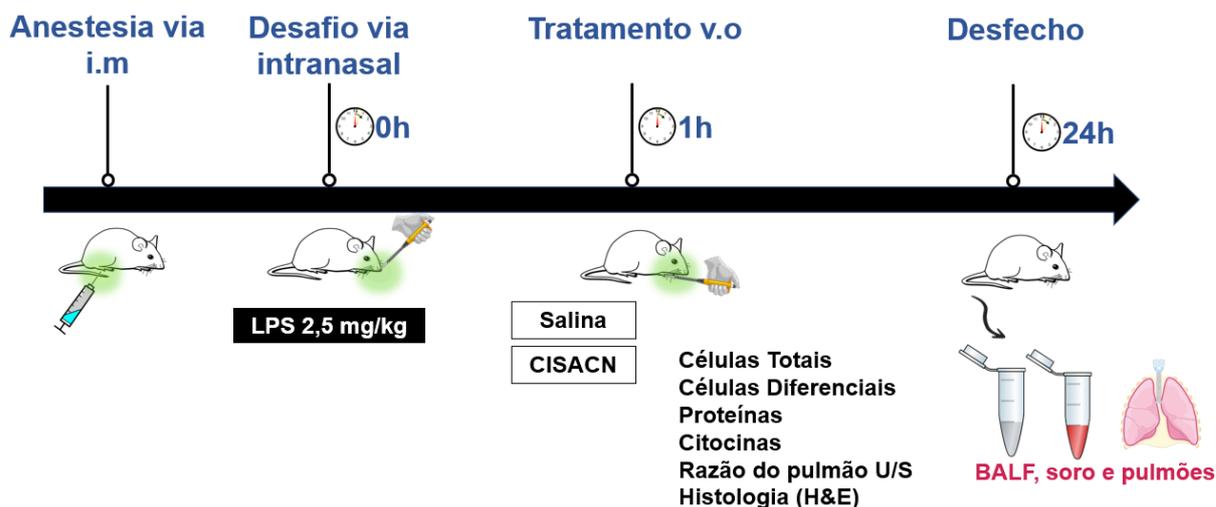
Os camundongos BALB/c (n=6/grupo), no dia zero (0), foram desafiados, por instilação nasal (i.n.), com uma solução de lipopolissacarídeo (LPS - 2,5 mg/kg, *E. coli* 0111: B4 (Sigma-Aldrich) em salina. Uma hora após o desafio, os animais foram tratados por via oral com o CISACN (6,25 mg/kg, 12,5 mg/kg ou 25 mg/kg). Após 24 horas do desafio, ocorreu o desfecho, onde os animais foram eutanasiados por overdose anestésica, e realizou-se a coleta do material biológico para análise dos parâmetros imunológicos (Figura 11) (RODRIGUES BERNARDO et al., 2021a). A tabela 4 demonstra os tratamentos e desafios dos grupos experimentais.

Tabela 4. Grupos experimentais do protocolo LPA induzida por LPS

Grupo	Desafio	Tratamento
Basal	Salina	Salina
LPS	Lipopolissacarídeo	Salina
CISACN 6,25 mg/kg	Lipopolissacarídeo	CISACN (6,25 mg/kg)
CISACN 12,5 mg/kg	Lipopolissacarídeo	CISACN (12,5 mg/kg)
CISACN 25 mg/kg	Lipopolissacarídeo	CISACN (25 mg/kg)

Fonte: elaborada pela autora. LPS: lipopolissacarídeo.

Figura 11. Esquema representativo do protocolo experimental de LPA induzida por LPS



Fonte: elaborada pela autora. I.m.: intramuscular. V.o.: via oral. LPS: lipopolissacarídeo. BALF: fluido do lavado broncoalveolar.

4.7. Contagem de células totais e diferenciais

Para a quantificação de células inflamatórias na cavidade pulmonar dos animais, no protocolo de LPA, foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) 24 horas após o desafio com o LPS. Para a coleta do BALF, utilizou-se 1,5 mL de PBS^{+/-} gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia, o fluido coletado foi transferido para tubos tipo *ependorf* e armazenado em isopor refrigerado.

A contagem do número total de células para os protocolos de peritonite e LPA foi realizada em câmara hemocitométrica após diluição (1:40), no lavado peritoneal, e (1:10), no BALF, em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) da suspensão celular contida no lavado e as células foram contadas no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS).

Após a realização da contagem das células totais, os tubos foram centrifugados a 300 g (centrífuga CR422, JONAM) a uma temperatura de 4 °C, por 6 minutos. Os sobrenadantes foram separados e congelados no freezer a temperatura de -20 °C para posterior dosagem de citocinas e mensuração das proteínas totais. Para contagem diferencial, o *pellet* foi ressuspensão em 500 µL de PBS^{+/-} gelado. Após

homogeneização foram coletados 200 µL de cada tubo contendo o lavado e foram centrifugados em centrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas contendo as células foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram definidos em duas populações celulares: mononucleares e polimorfonucleares (neutrófilos) (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015).

4.8. Dosagem de proteínas totais

A determinação da quantidade de proteínas no lavado peritoneal e BALF dos diferentes grupos experimentais foi realizada por método colorimétrico do corante vermelho de pirogalol (kit *sensiprot* da Labtest). O vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul, com o máximo de absorção de 600 nm. A absorbância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019).

4.9. Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram utilizados os sobrenadantes dos lavados, bem como o soro, no protocolo de LPA, dos camundongos e realizado o ensaio imunoenzimático ELISA, de acordo com as recomendações especificadas nos Kits do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CAUSA).

4.10. Razão do peso do pulmão úmido/seco na LPA

Após a eutanásia dos camundongos, os pulmões foram removidos e pesados para obtenção do peso “úmido”. Em seguida, os pulmões foram colocados a 60 °C por 48 horas e, após esse período, foram novamente pesados e obtido o peso “seco”. A

razão entre o peso úmido e o peso seco dos tecidos pulmonares avaliados foi tomada como índice do edema (RODRIGUES BERNARDO et al., 2021b).

4.11. Análise histopatológica do tecido pulmonar na LPA

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

A análise morfológica do tecido pulmonar foi realizada através de escore histológico. Para isso, foi atribuída uma pontuação de 0-4 referentes ao grau de alterações histológicas observadas. O campo microscópico foi pontuado como 0, 1, 2, 3 ou 4, o que corresponde a normal (sem alterações), leve (alterações em menos de 25% do campo microscópico), moderado (alterações entre 25% - 50% do campo microscópico), grave (alterações entre 50% - 75% do campo microscópico) ou extremamente grave (alterações em mais de 75% do campo microscópico), respectivamente (Tabela 5). Em cada lâmina, observou-se um total de 10 campos e a pontuação final foi obtida a partir do cálculo da média desses dos campos.

As alterações histológicas analisadas para a extensão da lesão causada foram: infiltrado celular, formação de edema e a presença de focos hemorrágicos, caracterizando hemorragia, o espessamento do septo alveolar, bem como o dano alveolar difuso (PAIVA FERREIRA et al., 2022).

Tabela 5. Escore histológico

Escore	Grau de alterações
0	Sem alterações
1	Leve: < 25% do campo
2	Moderado: entre 25% e 50% do campo
3	Grave: entre 50% e 75% do campo
4	Extremamente grave: > 75% do campo

Fonte: elaborada pela autora.

4.12. Avaliação do *Docking* molecular

Estudos de *docking* molecular foram realizados para estimar as interações de ligação do CISACN com possíveis alvos moleculares: TLR4, NF-kB e MAPKs ERK 2 e p38. O controle utilizado foi a Dexametasona, um fármaco glicocorticoide que é um inibidor potencial desses alvos em análise (GE et al., 2012; LASA et al., 2001; ZHANG et al., 2016).

As estruturas do CISACN e da Dexametasona, foram desenhadas no Marvin Sketch 21.13 e otimizadas no software *HyperChem* 8.0.6 (RMS 0.1 kcal/mol/Å). Foram usadas as configurações padrões, aplicando o método de campo de força da mecânica molecular MM+ e método quântico semi-empírico AM1 (Austin Model 1) (ABBASI; FERREIDONNEZHAD; MIRVEIS, 2021; RODRIGUES et al., 2021; SCOTTI et al., 2009).

As estruturas cristalinas das proteínas foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com resolução até 3 Å, sob os códigos 1A9U para MAPK p38, 4QPA para ERK 2, 1K3Z para NFkB – porção p65 e 2Z64 para TLR4. A ancoragem das moléculas com os alvos foram executados no software Molegro Virtual Docker (MVD). Os parâmetros utilizados para configurar o software foram, para os valores de scores de energia, MolDock Score e Rerank Score, seguido do consenso por meio da média aritmética dos dois com valor de corte para energia de ligação > -8 kcal/mol; o GRID foi determinado com resolução de 0,3 Å e um raio esférico de 15 Å; para a avaliação do ligante foi selecionado a ES interno, HBond interno, torções Sp2–Sp2; foi utilizado algoritmo MolDock Simplex Evolution

(MolDock SE) com um número de corridas de 10 e máximas iterações de 1500 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

Para a validação da técnica foi realizada o *redocking* e analisado valores para o desvio quadrático médio (RMSD - Root Mean Square Deviation) $< 2 \text{ \AA}$ para a determinação da distância média da sobreposição dos átomos do ligantes das proteínas (SCHLOSSER; RAREY, 2009). Outros parâmetros avaliados foram a energia de ancoragem e os tipos de interações com o sítio de ligação do alvo.

Por fim, as imagens em 2D e 3D das interações dos ligantes com os alvos foram visualizadas no programa Biovia Discovery Studio Visualizer 19.1.0.18287 (VIJAYAKUMAR et al., 2020).

4.13. Análise estatística

Os resultados desse estudo foram analisados pelo software GraphPad Prism versão 9.0 e valores com $p < 0,05$, foram considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados empregando-se o teste estatístico ANOVA one-way seguido do teste de Bonferroni ou Tukey.

5. RESULTADOS

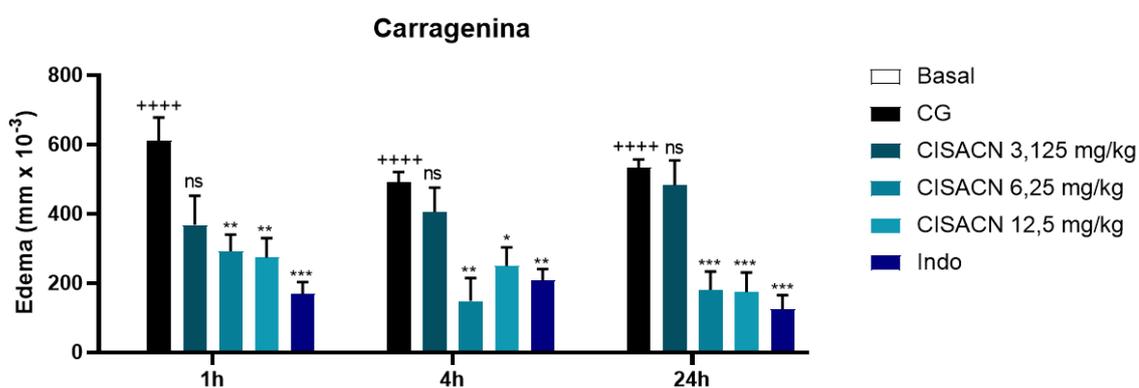
5.1. Efeito anti-inflamatório do CISACN em modelos experimentais de edema de pata

5.1.1. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por carragenina

No gráfico 1 pode-se observar que a administração intraplantar do agente flogístico carragenina (CG) induziu ($p < 0,05$) o edema na pata nos animais (grupo CG) em comparação com os animais que não receberam o agente flogístico (grupo basal). A indometacina (Indo, droga padrão) inibiu ($p < 0,05$) a formação do edema de pata em todos os intervalos de tempo avaliados, quando comparada com o grupo CG. O CISACN, nas doses de 6,25 mg/kg ou 12,5 mg/kg, foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) a formação do edema de pata em todos os intervalos de tempo avaliados, em relação ao grupo CG. Entretanto, a dose de 3,125 mg/kg do CISACN não reduziu o edema de pata nos animais, quando comparados aos do grupo CG.

De acordo com esses resultados, escolhemos a dose de 6,25 mg/kg, por ser a menor dose capaz de promover o efeito anti-edematogênico, para dar prosseguimento aos demais experimentos.

Gráfico 1. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por carragenina (CG)



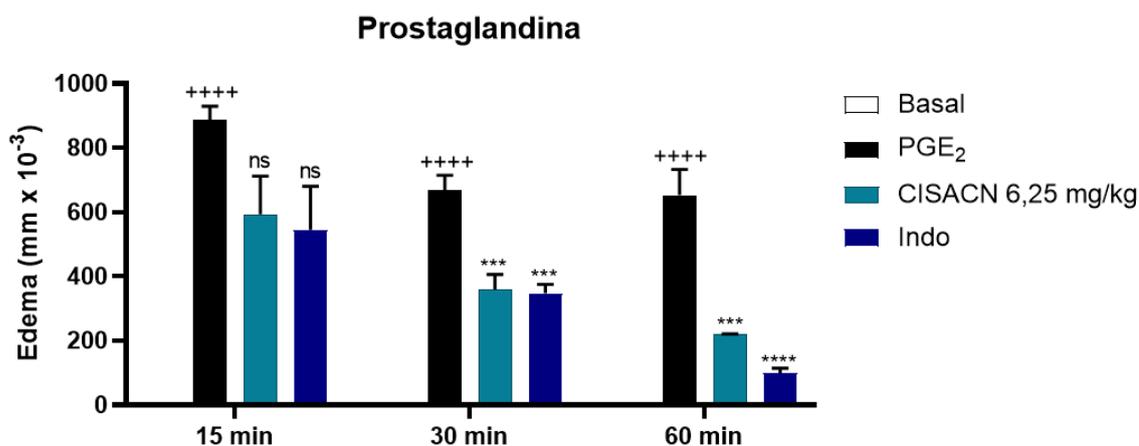
Camundongos Swiss fêmeas ($n=6$) receberam injeções intraplantar (500 $\mu\text{g/pata}$) de CG na pata traseira esquerda e salina, no mesmo volume, na pata traseira direita, 1h após o tratamento oral com CISACN (3,125 mg/kg ou 6,25 mg/kg ou 12,5 mg/kg) ou Indometacina (10 mg/kg). O edema foi medido nos tempos de 1h, 4h e 24h após o estímulo com a CG. As barras representam a média \pm E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção em função dos tratamentos. Os

dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. +++++ $p < 0,00001$ (comparado ao Basal); * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ (comparado ao CG).

5.1.2. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por prostaglandina (PGE₂)

O gráfico 2 apresenta os resultados de edema de pata induzido pela PGE₂ (grupo PGE₂) nos intervalos de tempo avaliados quando comparados com os do grupo basal ($p < 0,05$). Os tratamentos com CISACN (6,25 mg/kg) ou com a indometacina reduziram ($p < 0,05$) o edema na pata nos animais desafiados com o agente flogístico PGE₂ quando comparado com os do grupo PGE₂, nos tempos de 30 e 60 min.

Gráfico 2. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por prostaglandina E2 (PGE₂)



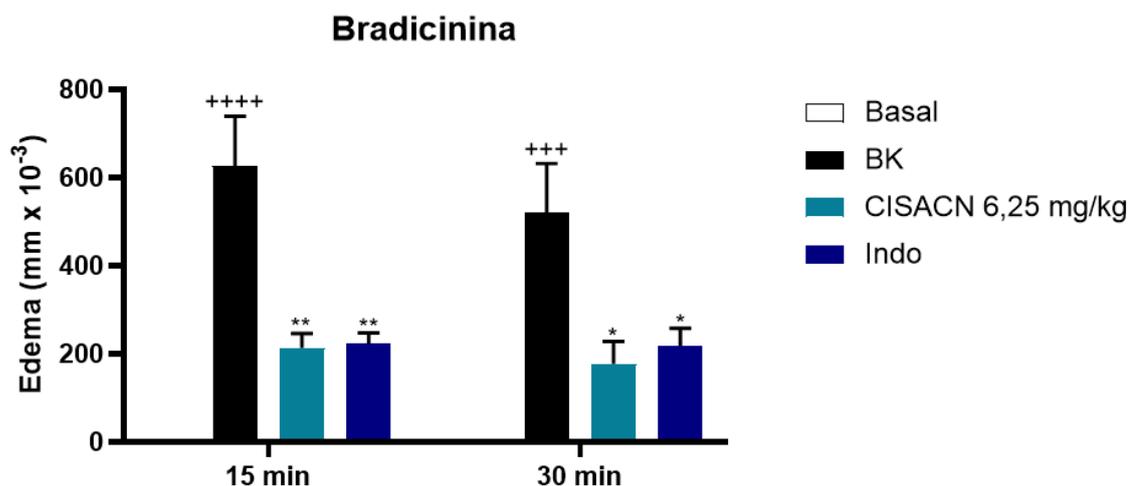
Camundongos Swiss fêmeas (n=6) receberam injeções intraplantar (5µg/pata) de PGE₂ na pata traseira esquerda e salina, com o mesmo volume, na pata traseira direita, 1h após o tratamento oral com CISACN (6,25 mg/kg) ou Indometacina (10 mg/kg). O edema foi medido nos tempos de 15, 30 e 60 min após o estímulo com a PGE₂. Os gráficos representam a média +/- E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. +++++ $p < 0,00001$ (comparado ao Basal); *** $p < 0,0001$ **** $p < 0,00001$ (comparado ao PGE₂); ns (não significativo).

5.1.3. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por bradicinina (BK)

A administração intraplantar do agente flogístico BK foi capaz de induzir ($p < 0,05$) o edema na pata nos animais quando comparados com os animais do grupo basal (Gráfico 3). O CISACN (6,25 mg/kg) e a indometacina foram capazes de reduzir

($p < 0,05$) o edema de pata nos animais desafiados com BK nos intervalos de tempo avaliados, 15 e 30 min, quando comparados com o grupo BK.

Gráfico 3. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por bradicinina (BK)

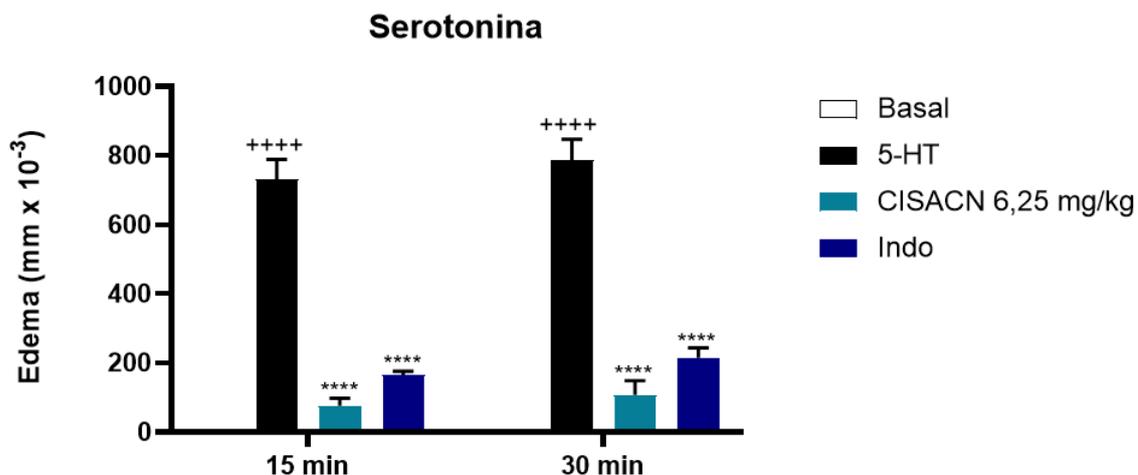


Camundongos *Swiss* fêmeas ($n=6$) receberam injeções intraplantar (6nmol/pata) de BK na pata traseira esquerda e salina, com o mesmo volume, na pata traseira direita, 1h após o tratamento oral com CISACN (6,25 mg/kg) ou Indometacina (10 mg/kg). O edema foi medido nos tempos de 15 e 30 min após o estímulo com a BK. Os gráficos representam a média \pm E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. + $p < 0,05$ quando comparado ao grupo basal; +++ $p < 0,0001$ ++++ $p < 0,00001$ (comparado ao Basal); * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ (comparado ao BK).

5.1.4. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por serotonina (5-HT)

A resposta edematogênica ($p < 0,05$), nos animais, induzida pela administração intraplantar de 5-HT foi demonstrada em todos os intervalos de tempo avaliados, 15 e 30 min, quando comparada com o grupo basal (Gráfico 4). Os tratamentos com CISACN (6,25 mg/kg) ou com a indometacina reduziram ($p < 0,05$) o edema na pata nos animais desafiados com o 5-HT em relação ao grupo 5-HT.

Gráfico 4. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por serotonina (5-HT)

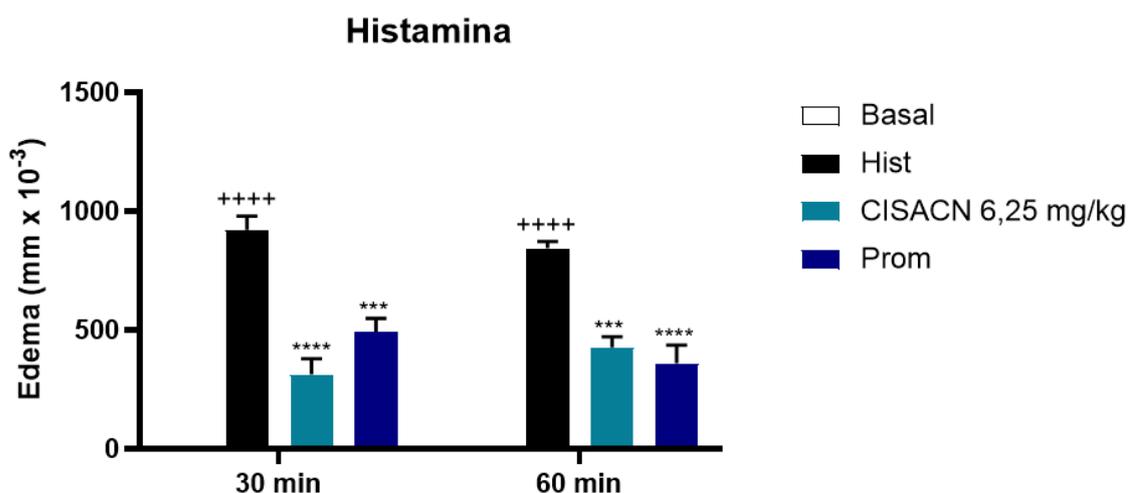


Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) receberam injeções intraplantar (1%, p/v) de 5-HT na pata traseira esquerda e salina, com o mesmo volume, na pata traseira direita, 1h após o tratamento oral com CISACN (6,25 mg/kg) ou Indometacina (10 mg/kg). O edema foi medido nos tempos de 15 e 30 min após o estímulo com a 5-HT. Os gráficos representam a média +/- E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. +++++ p < 0,00001 (comparado ao Basal); **** p < 0,00001 (comparado ao 5-HT).

5.1.5. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por histamina

A administração intraplantar de histamina (grupo Hist) induziu edema de pata nos intervalos de tempo avaliados, 30 e 60 min, quando comparada com o grupo basal (p<0,05) (Gráfico 5). Os tratamentos com CISACN (6,25 mg/kg) ou com a prometazina reduziram (p<0,05) o edema de pata nos animais desafiados com histamina quando comparados com os do grupo Hist nos tempos avaliados.

Gráfico 5. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por histamina (Hist)

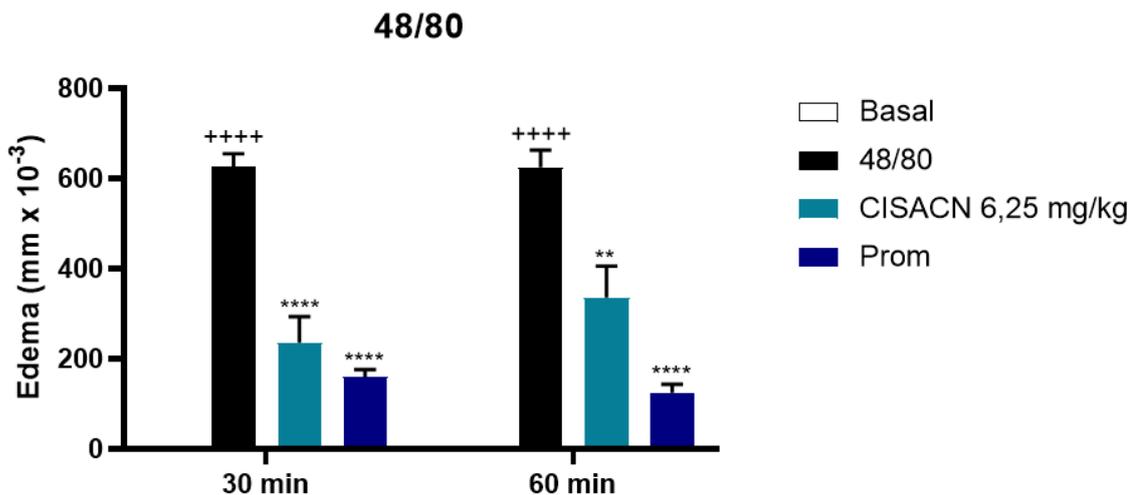


Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) receberam injeções intraplantar (100 µg/pata) de histamina na pata traseira esquerda e salina, com o mesmo volume, na pata traseira direita, 1h após o tratamento oral com CISACN (6,25 mg/kg) ou Prometazina (10 mg/kg). O edema foi medido nos tempos de 30 e 60 min após o estímulo com a histamina. Os gráficos representam a média +/- E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. **** p < 0,00001 (comparado ao Basal); *** p < 0,0001 **** p < 0,00001 (comparado ao Hist).

5.1.6. Efeito do CISACN no edema de pata induzido por composto 48/80

A administração intraplantar do agente flogístico 48/80 (grupo 48/80) foi capaz de induzir (p<0,05) o edema na pata nos animais em relação aos animais do grupo basal, em todos os tempos avaliados, 30 e 60 min (Gráfico 6). Os tratamentos com CISACN (6,25 mg/kg) ou com a prometazina reduziram (p<0,05) o edema de pata nos animais desafiados com o agente flogístico em relação ao grupo 48/80, nos tempos avaliados.

Gráfico 6. Efeito do tratamento oral com CISACN no edema de pata induzido por composto 48/80



Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) receberam injeções intraplantar (100ng/pata) de 48/80 na pata traseira esquerda e salina, com o mesmo volume, na pata traseira direita, 1h após o tratamento oral com CISACN (6,25 mg/kg) ou Prometazina (10 mg/kg). O edema foi medido nos tempos de 30 e 60 min após o estímulo com o 48/80. Os gráficos representam a média +/- E.P.M. da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. **** p < 0,00001 (comparado ao Basal); ** p < 0,001 **** p < 0,00001 (comparado ao 48/80).

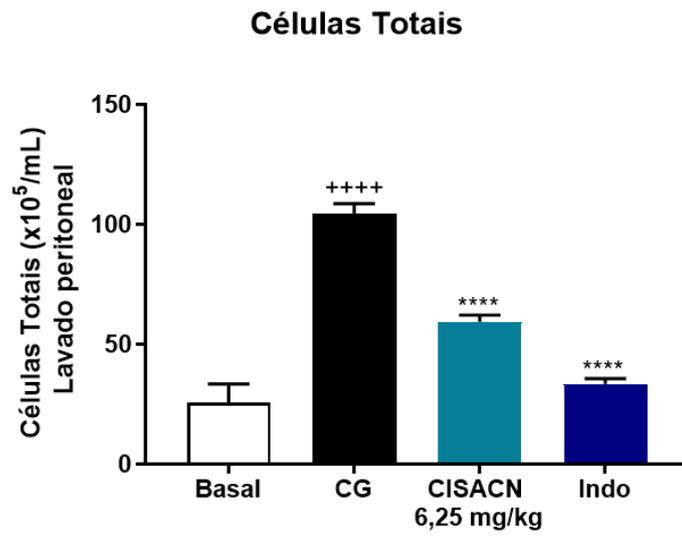
5.2. Efeito anti-inflamatório do CISACN em modelo experimental de peritonite induzida por carragenina

5.2.1. Efeito do CISACN na migração de células totais e diferenciais na cavidade peritoneal

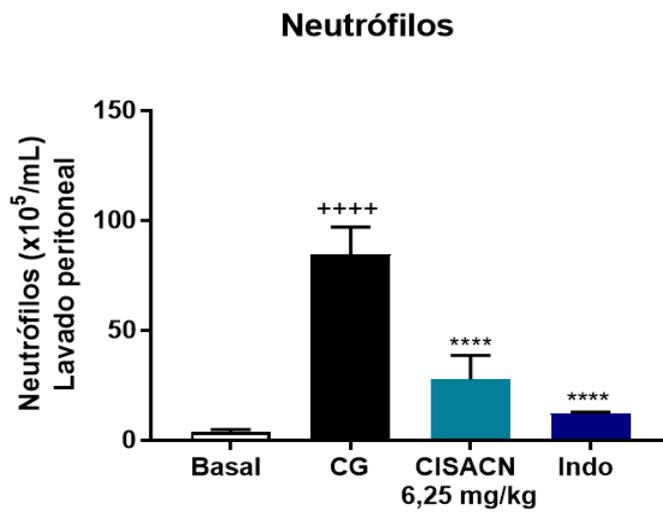
A celularidade na cavidade peritoneal dos animais dos diferentes grupos experimentais está apresentada no gráfico 7 (7A. células totais (10^5 /mL); 7B. neutrófilos (10^5 /mL) e 7C. mononucleares (10^5 /mL). Os animais do grupo CG (animais desafiados com a carragenina) apresentaram aumento (p < 0,05) na migração de células totais e de neutrófilos quando comparados aos do grupo basal. Entretanto, os animais desafiados com o agente flogístico e tratados com indometacina (grupo Indo, 10 mg/kg) ou CISACN (grupo CISACN, 6,25 mg/kg) apresentaram redução (p < 0,05) no número de células totais e neutrófilos, em relação ao grupo CG. O número de células mononucleares não apresentou alteração nos grupos tratados quando comparado com o grupo CG.

Gráfico 7. Efeito do tratamento oral com o CISACN na migração de células totais e diferenciais no lavado peritoneal

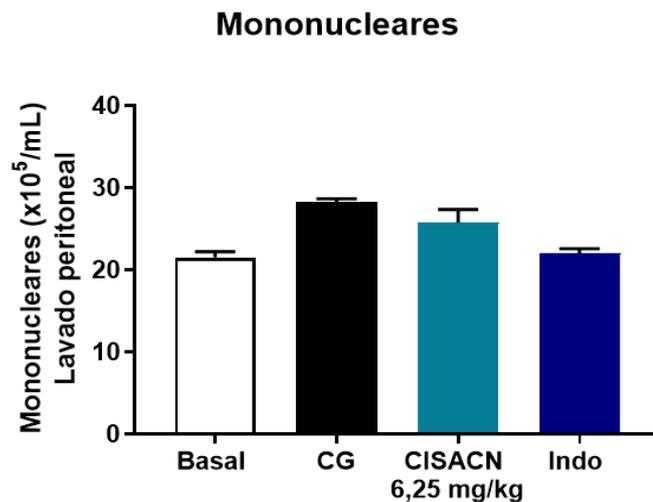
A.



B.



C.



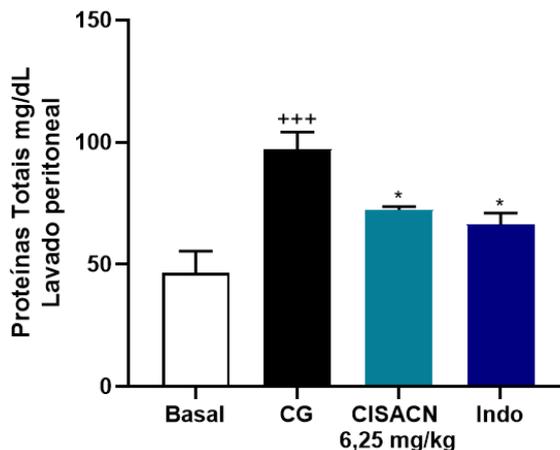
Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) receberam na cavidade peritoneal (300 µl) de CG (1%) 1h após o tratamento oral com CISACN 6,25 mg/kg ou Indometacina (10 mg/kg). Após 4h do estímulo com a CG, foi obtido o lavado peritoneal para determinar a celularidade total (A), e diferencial, onde foi realizado a diferenciação entre neutrófilos (B) e mononucleares (C). O gráfico representa a média +/- E.P.M. da contagem total e diferencial do lavado peritoneal, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. +++++ p < 0,00001 (comparado ao Basal); **** p < 0,00001 (comparado ao CG).

5.2.2. Efeito do CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico na cavidade peritoneal

A permeabilidade vascular foi avaliada por meio do extravasamento proteico presente na cavidade peritoneal dos animais. A concentração de proteínas totais (mg/dL) está demonstrada no gráfico 8. Os animais do grupo CG apresentaram aumento (p < 0,05) na concentração de proteínas totais em relação ao grupo basal. Os animais desafiados com carragenina e tratados com a indometacina (grupo Indo, 10 mg/kg) ou CISACN (grupo CISACN, 6,25 mg/kg) apresentaram redução (p < 0,05) do exsudato proteico, quando comparados com os do grupo CG.

Gráfico 8. Efeito do tratamento oral com o CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico

Proteínas Totais



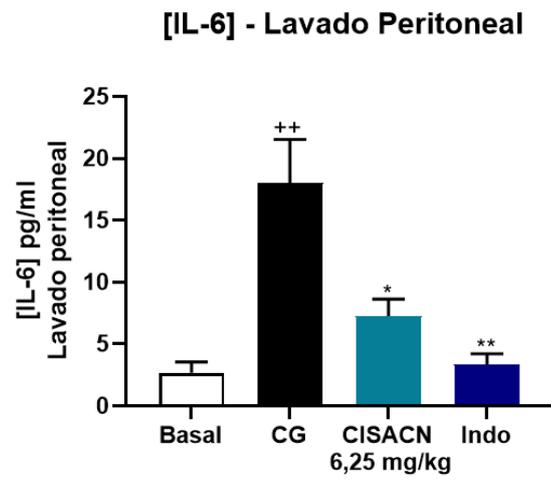
Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) receberam na cavidade peritoneal (300 μ l) de CG (1%) 1h após o tratamento oral com CISACN 6,25 mg/kg ou Indometacina (10 mg/kg). Após 4h do estímulo com a CG, foi obtido o lavado peritoneal para determinar a permeabilidade vascular e extravasamento proteico, através do teste de Vermelho de Pirogalol e, em seguida, lido em espectrofotômetro no comprimento de 600 nm. O gráfico representa a média +/- E.P.M. da concentração de proteínas totais do lavado peritoneal, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. +++ p < 0,0001 (comparado ao Basal); * p < 0,05 (comparado ao CG).

5.2.3. Efeito do CISACN na produção de citocinas pró-inflamatórias na cavidade peritoneal

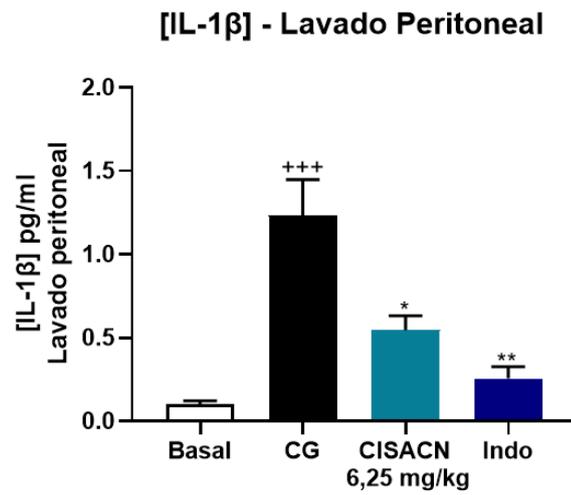
Os níveis das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α estão expressos no gráfico 9 (9A. IL-6; 9B. IL-1 β e 9C. TNF- α). O desafio com carragenina aumentou (p < 0,05) os níveis peritoneais de IL-6, IL-1 β e TNF- α em relação ao grupo basal; no entanto, os tratamentos com a indometacina (grupo Indo 10 mg/kg) ou CISACN (grupo CISACN, 6,25 mg/kg) reduziram (p < 0,05) os níveis dessas citocinas quando comparados ao grupo CG.

Gráfico 9. Efeito do tratamento oral com o CISACN produção de citocinas pró-inflamatórias no lavado peritoneal

A.

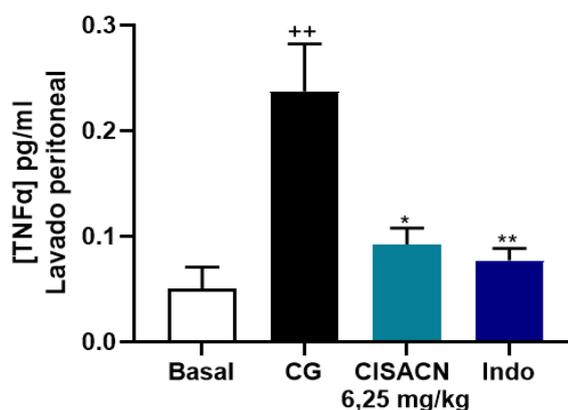


B.



C.

[TNF α] - Lavado Peritoneal



Camundongos *Swiss* fêmeas (n=6) receberam na cavidade peritoneal (300 μ l) de CG (1%) 1h após o tratamento oral com CISACN 6,25 mg/kg ou Indometacina (10 mg/kg). Após 4h do estímulo com a CG, foi realizado o lavado peritoneal para determinar produção de citocinas pró-inflamatórias. O gráfico representa a média +/- E.P.M. dos níveis de citocinas do lavado peritoneal, em função dos tratamentos. A. IL-6; B. IL-1 β ; C. TNF- α . Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ++ p < 0,001 +++ p < 0,0001 (comparado ao Basal); * p < 0,05 ** p < 0,001 (comparado ao CG).

5.3. Efeito anti-inflamatório do CISACN em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo

5.3.1. Efeito do CISACN na migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar

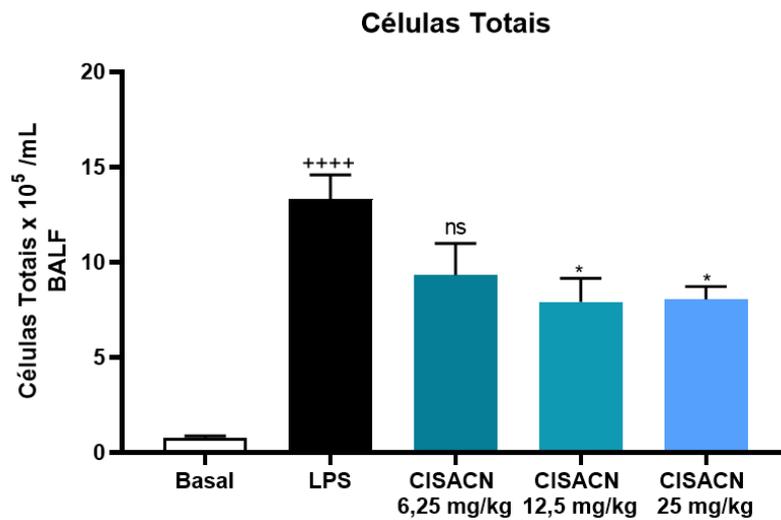
O perfil celular no BALF dos animais dos diferentes grupos experimentais está expresso no gráfico 10 (10A. células totais (10⁵/mL); 10B. neutrófilos (10⁵/mL) e 10C. mononucleares (10⁵/mL)). Os animais do grupo LPS apresentaram aumento (p < 0,05) no número de células inflamatórias totais para o espaço perialveolar, em relação ao grupo basal. O CISACN, nas doses de 12,5 mg/kg ou 25 mg/kg, foi capaz de reduzir (p<0,05) a migração dessas células inflamatórias, quando comparado ao grupo LPS. Os animais tratados com a dose de 6,25 mg/kg do CISACN não apresentaram redução no padrão de migração celular quando comparados aos do grupo LPS. Portanto, escolhemos a dose de 12,5 mg/kg para dar continuidade ao trabalho.

Em relação a contagem de células diferenciais, os animais do grupo LPS apresentaram aumento (p < 0,05) no número de neutrófilos e macrófagos para o espaço perialveolar, quando comparado ao grupo basal. Entretanto, o tratamento com

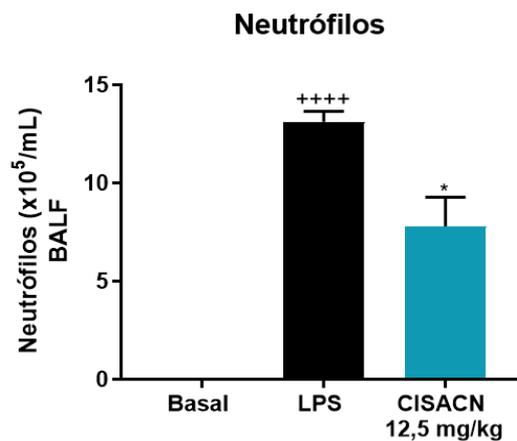
o CISACN (grupo CISACN, 12,5 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos em detrimento aos macrófagos quando comparado ao grupo LPS.

Gráfico 10. Efeito do tratamento oral com o CISACN na migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar

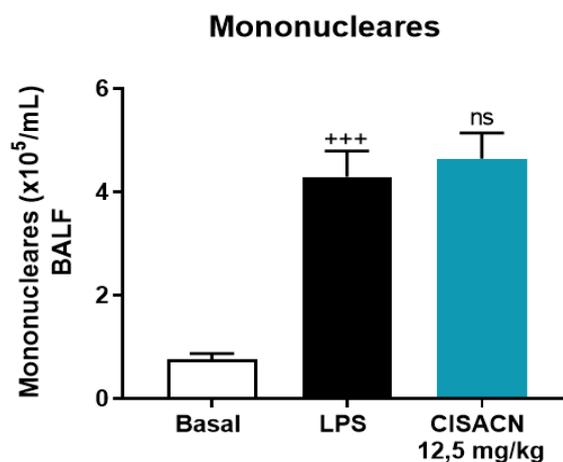
A.



B.



C.

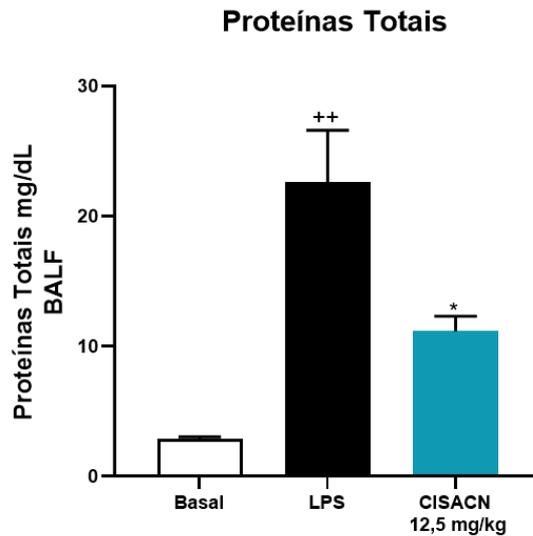


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e foram tratados por via oral com o CISACN uma hora após o desafio. Vinte e quatro (24) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e a uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação do BALF o pellet foi ressuspensão e citocentrifugado, corado pelo método de panótico, para contagem diferencial das populações celulares. (A) Células Totais, (B) Neutrófilos e (C) Mononucleares. O gráfico representa a média +/- E.P.M. da contagem total e diferencial do BALF, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. +++ p < 0,0001 ++++ p < 0,00001 (comparado ao Basal); * p < 0,05 (comparado ao LPS); ns (não significativo).

5.3.2. Efeito do CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico na cavidade pulmonar

O gráfico 11 apresenta o aumento (p < 0,05) na concentração de proteínas totais na cavidade broncoalveolar dos animais do grupo LPS em comparação aos do grupo basal após 24h do desafio com LPS. Os animais tratados com o CISACN (12,5 mg/kg) apresentaram redução (p < 0,05) do conteúdo proteico no fluido broncoalveolar quando comparados com os animais do grupo LPS.

Gráfico 11. Efeito do tratamento oral com o CISACN na permeabilidade vascular e extravasamento proteico na cavidade pulmonar

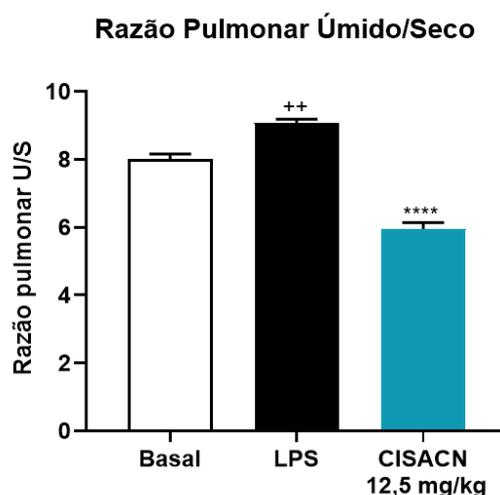


Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e foram tratados por via oral com o CISACN uma hora após o desafio. Vinte e quatro (24) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) e a uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação do BALF, o sobrenadante foi utilizado para dosagem de proteínas totais através do teste de Vermelho de Pirogalol e, em seguida, lido em espectrofotômetro no comprimento de 600 nm. O gráfico representa a média \pm E.P.M. da concentração de proteínas totais, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ++ $p < 0,001$ (comparado ao Basal); * $p < 0,05$ (comparado ao LPS).

5.3.3. Efeito do CISACN no edema pulmonar avaliado pela razão úmido/seco (u/s) do pulmão

O edema pulmonar foi determinado pela razão peso úmido/peso seco (u/s) dos pulmões. O gráfico 12 apresenta os resultados do edema pulmonar nos grupos basal, LPS e CISACN (12,5 mg/kg). Podemos observar que houve aumento ($p < 0,05$) da razão u/s dos pulmões nos animais do grupo LPS em relação aos do grupo basal. O tratamento com o CISACN (12,5 mg/kg) diminuiu ($p < 0,05$) a razão u/s quando comparado com o grupo LPS.

Gráfico 12. Efeito do tratamento oral com o CISACN na razão úmido/seco do peso dos pulmões



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e foram tratados por via oral com o CISACN uma hora após o desafio. Vinte e quatro (24) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA, foram coletados os pulmões, pesados e armazenados 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 +/- E.P.M. da razão pulmonar úmido/seco, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ++ p < 0,001 (comparado ao Basal); **** p < 0,00001 (comparado ao LPS).

5.3.4. Efeito do CISACN na produção de citocinas pró-inflamatórias na cavidade pulmonar e soro

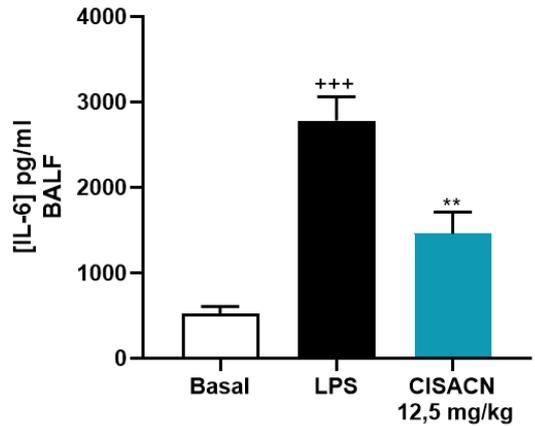
As concentrações das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α presentes no BALF e no soro dos animais dos diferentes grupos podem ser observadas no gráfico 13 (13A. IL-6; 13B. IL-1 β ; 13C. TNF- α - BALF; 13D. IL-6; 13E. IL-1 β ; 13F. TNF- α - soro). Animais desafiados com LPS (grupo LPS) apresentaram aumento (p < 0,05) nos níveis de IL-6, IL-1 β e TNF- α no BALF em relação ao grupo basal; o tratamento com CISACN (12,5 mg/kg) reduziu (p < 0,05) esses níveis, quando comparados aos do grupo LPS.

A nível sistêmico, os níveis de IL-6, IL-1 β não apresentaram alterações entre os grupos experimentais. Entretanto, os níveis de TNF- α estavam aumentados (p < 0,05) nos animais do grupo LPS quando comparados com os do grupo basal. Os níveis séricos de TNF- α foram reduzidos (p < 0,05) com o tratamento com o CISACN (12,5 mg/kg).

Gráfico 13. Efeito do tratamento oral com o CISACN produção de citocinas pró-inflamatórias na cavidade pulmonar e soro

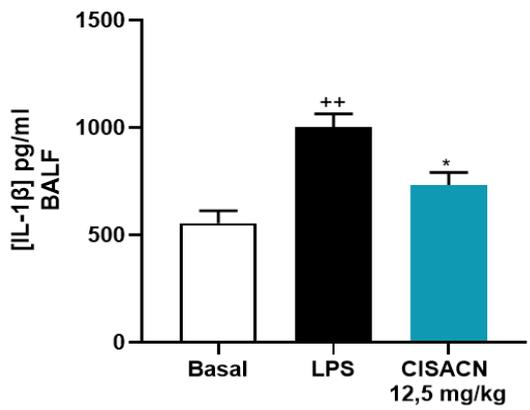
A.

[IL-6] - BALF



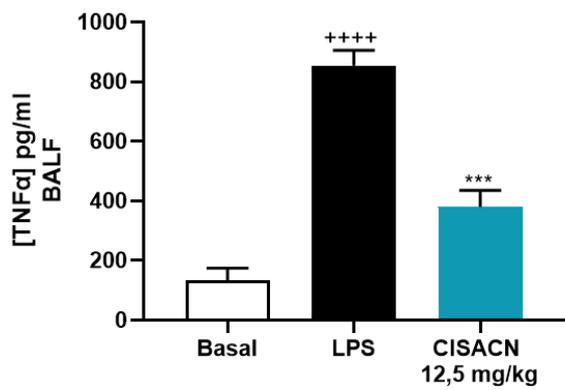
B.

[IL-1 β] - BALF

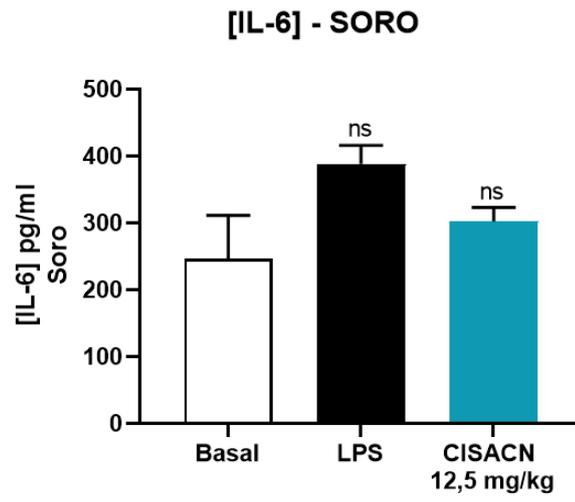


C.

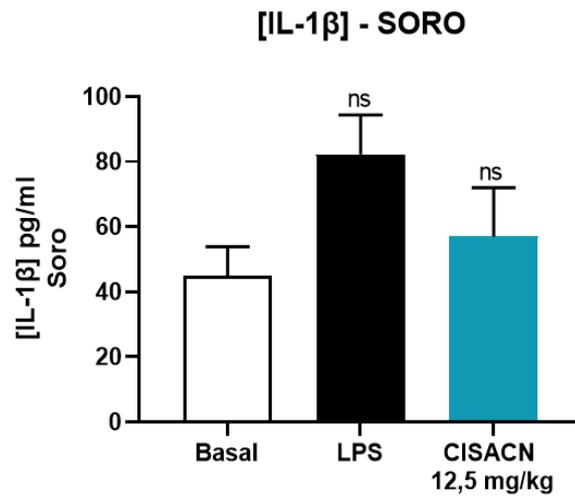
[TNF α] - BALF



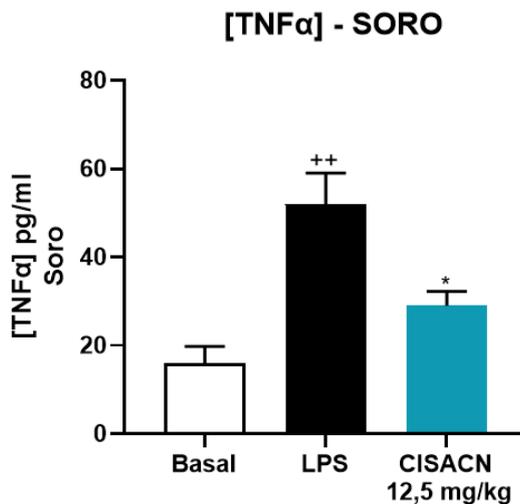
D.



E.



F.



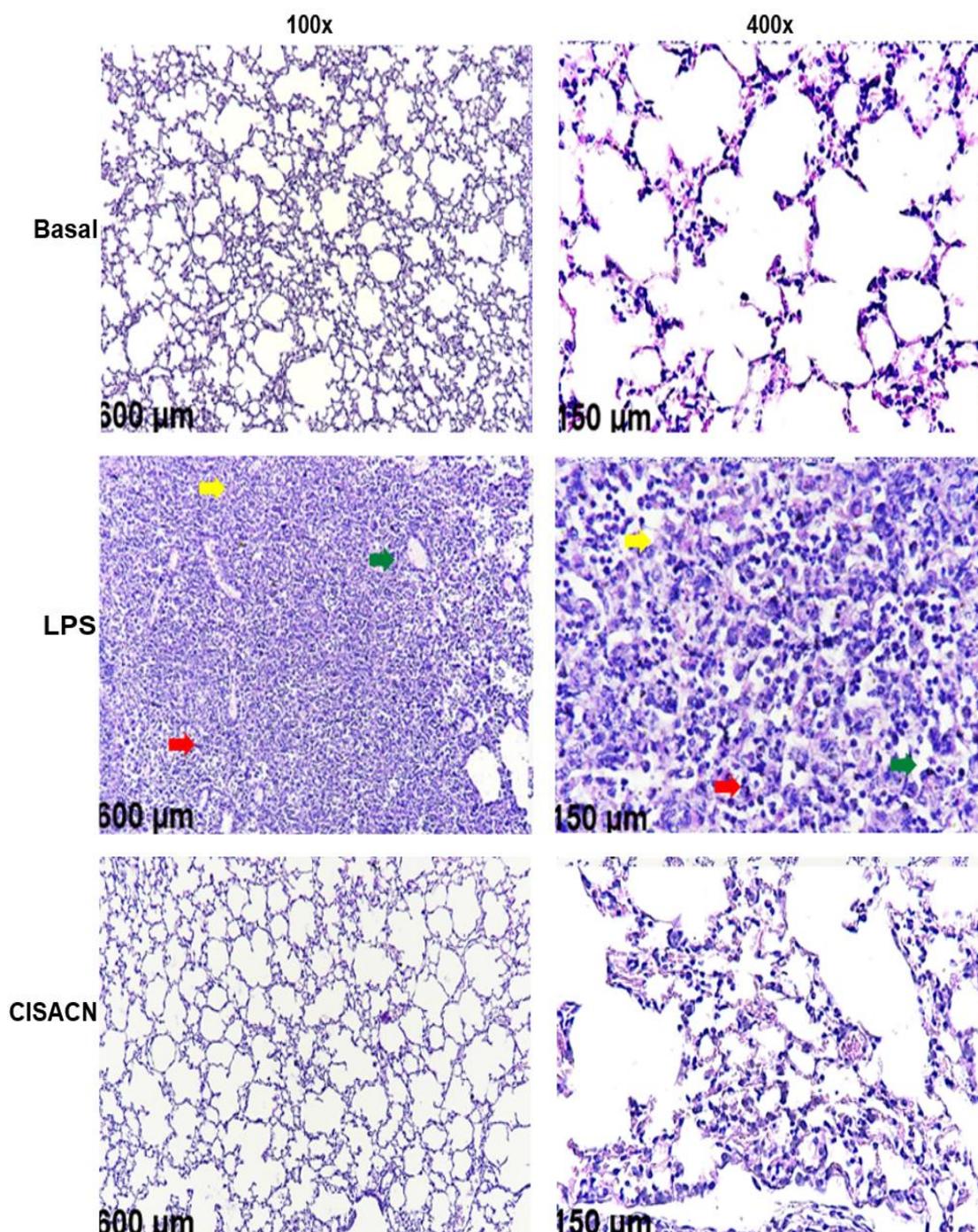
Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e foram tratados por via oral com o CISACN uma hora após o desafio. Vinte e quatro (24) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA, foi coletado o BALF, e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de citocinas seguindo o protocolo estabelecido no kit através do método imunoenzimático do tipo ELISA sanduiche. A. IL-6 no BALF; B. IL-1 β no BALF; C. TNF- α no BALF; D. IL-6 no soro; E. IL-1 β no soro; F. TNF- α no soro. O gráfico representa a média +/- E.P.M. dos níveis de citocinas no BALF ou soro, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ++ p < 0,001 +++ p < 0,0001 ++++ p < 0,00001 (comparado ao Basal); * p < 0,05 ** p < 0,001 *** p < 0,0001 (comparado ao LPS); ns (não significativo).

5.3.5. Efeito do CISACN nos aspectos histopatológicos pulmonares

Os aspectos histológicos do tecido pulmonar dos animais dos diferentes grupos experimentais estão demonstrados na Figura 12. A coloração de tecido pulmonar com H&E permitiu avaliar aspectos morfológicos como infiltração celular, edema e hemorragia. O grupo Basal apresentou tecido pulmonar com aspecto histológico normal, isto é, sem alterações na arquitetura alveolar. O grupo LPS, por sua vez, apresentou intensa infiltração celular em decorrência da inflamação intersticial desenvolvida (seta vermelha). Em adição, é possível observar o edema alveolar, decorrente do aumento da permeabilidade da membrana alveolar com presença de membranas hialinas e espessamento da parede alveolar (seta verde), além do dano alveolar difuso também marcado por aglomerados de hemácias (hemorragia) (seta amarela). O CISACN (12,5 mg/kg) diminuiu a inflamação alveolar, reduzindo os parâmetros de migração celular, edema e hemorragia com conseqüente diminuição do dano alveolar difuso.

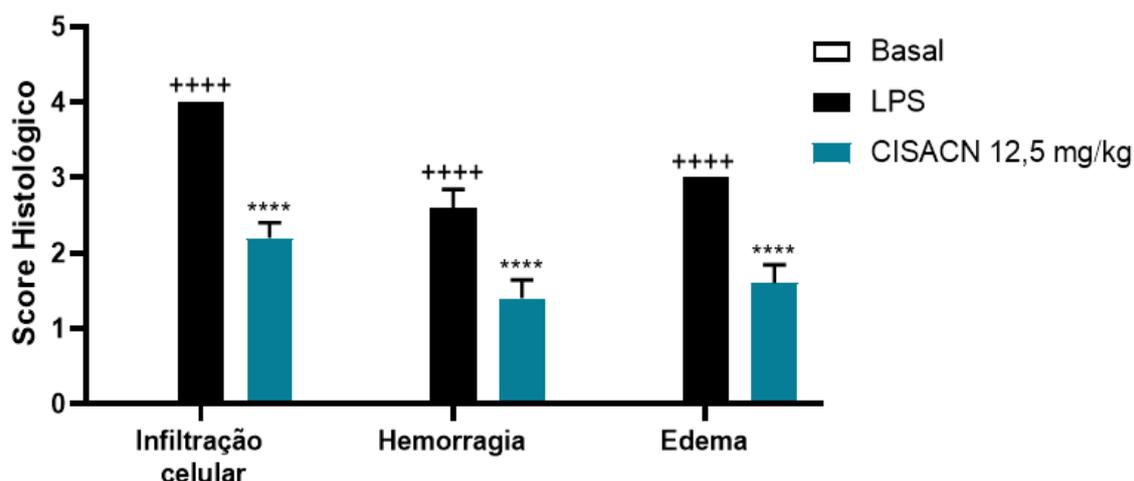
No escore histológico (Gráfico 14), confirmamos a redução da inflamação mediada pelo CISACN (12,5 mg/kg) quando comparada ao grupo LPS.

Figura 12. Efeito do tratamento oral com CISACN nos aspectos histopatológicos pulmonares utilizando a coloração de HE



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e foram tratados por via oral com o CISACN uma hora após o desafio. Vinte e quatro (24) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA, foi coletado o pulmão para as análises histológicas. Após submissão do órgão a protocolos de desidratação, hidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Na Figura 11, estão representadas as fotomicrografias nos aumentos de 100x (600 μm) e 400x (150 μm), onde pode-se observar os seguintes parâmetros inflamatórios: infiltração celular, edema e hemorragia. Setas vermelhas indicam presença de infiltrado celular, setas amarelas indicam presença de hemorragia e setas verdes indicam presença de edema. Resultados representativos de experimentos realizados em triplicada.

Gráfico 14. Efeito do tratamento oral com CISACN nos aspectos histopatológicos pulmonar utilizando a coloração de HE



Camundongos BALB/c machos (n=6) foram desafiados com LPS e foram tratados por via oral com o CISACN uma hora após o desafio. Vinte e quatro (24) horas após a instilação com o LPS e indução do modelo experimental de LPA, foi coletado o pulmão para as análises histológicas. Após submissão do órgão a protocolos de desidratação, hidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). Foi realizado o escore inflamatório, onde se foi pontuado os seguintes parâmetros: (0) - Ausência de alterações histológicas; (1) - Suave: menos de 25% do campo analisado; (2) - Moderado: 25-49% do campo analisado; (3) - Acentuado: 50-75% do campo analisado; (4) - Muito acentuado: mais de 75% do campo. O gráfico representa a média +/- E.P.M. do escore histológico, em função dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. +++++ p < 0,00001 (comparado ao Basal); **** p < 0,00001 (comparado ao LPS).

5.3.6. Análise de *Docking* molecular

A ancoragem molecular foi executada para analisar a afinidade e interação do CISACN com os alvos e possivelmente inferir seus mecanismos de ação. Para a validação do método foi realizado o *re-docking* pela obtenção dos valores de: 0,214 Å, na ancoragem de MAPK p38, 0,168 Å na ancoragem de MAPK ERK 2 e 0,732 Å na ancoragem de TLR-4; o NF-κB não apresentou molécula previamente ligada, impossibilitando a realização do *re-docking*.

Os resultados de energia de ligação do CISACN e da Dexametasona com os alvos moleculares em análise, após realizado o consenso dos *MolDock score* e *Rerank score*, estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da energia de ligação por *docking* molecular

Alvos	CISACN			Dexametasona		
	<i>MolDock</i> Score (kcal/mol)	<i>Rerank</i> Score (kcal/mol)	<i>Consenso</i> Score (kcal/mol)	<i>MolDock</i> Score (kcal/mol)	<i>Rerank</i> Score (kcal/mol)	<i>Consenso</i> Score (kcal/mol)
MAKP p38	-83,2535	-62,726	-72,990	-79,803	-26,266	-53,035
MAPK ERK 2	-72,402	-44,255	-58,329	-97,239	-66,288	-81,763
NF- κB	-78,512	-60,262	-69,387	-95,042	-75,251	-85,147
TRL4	-26,650	-18,374	-22,512	-39,498	20,5419	-9,47805

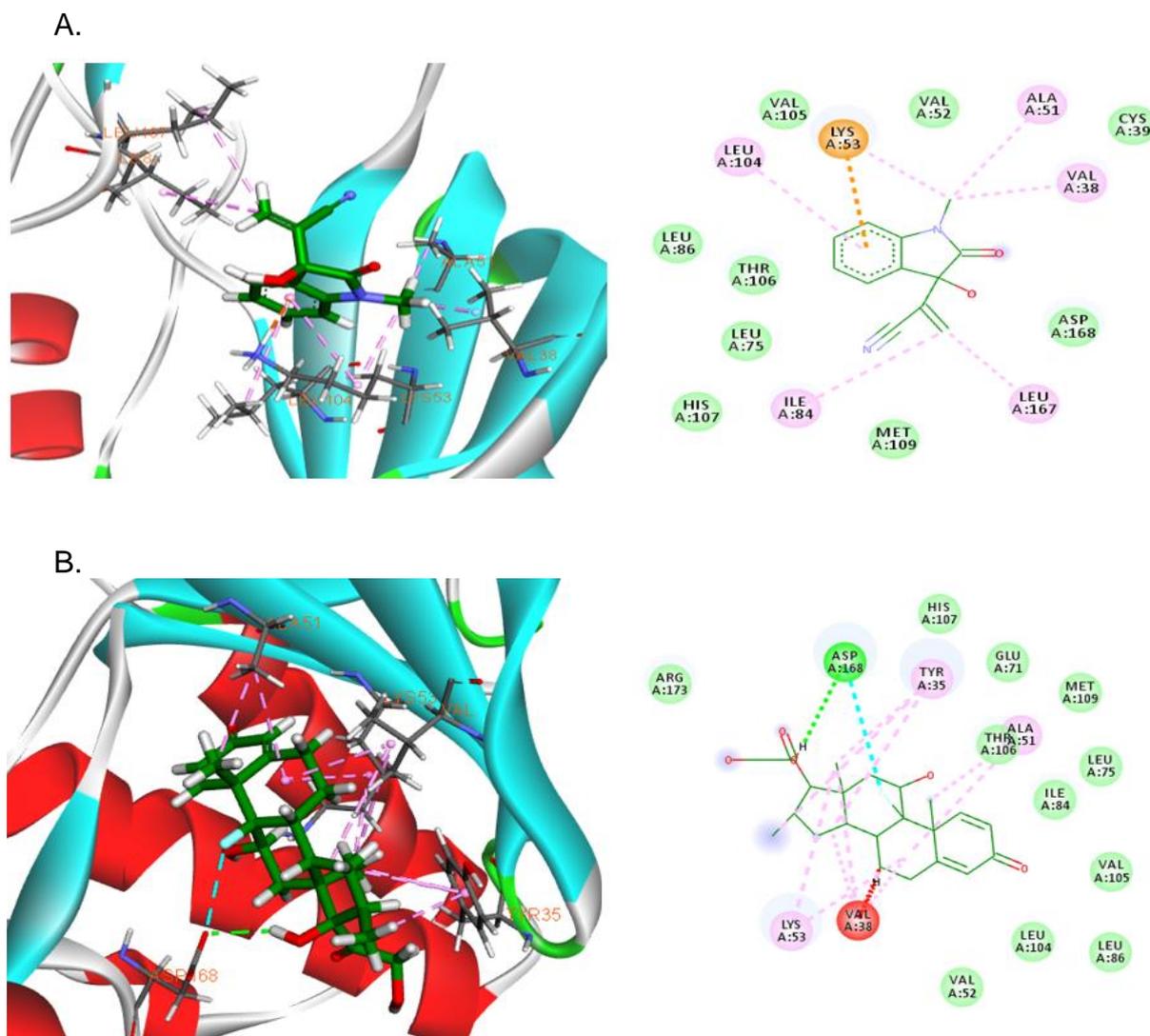
Fonte: elaborada pela autora.

5.3.6.1. Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com a MAPK p38

O CISACN exibiu boa energia de ligação com MAPK p38: -72,990 kcal/mol (Tabela 6), apresentando energia de ligação um pouco maior quando comparado com a energia do dexametasona, de -53,035 kcal/mol (Tabela 6), sendo possível afirmar que o CISACN possui afinidade com a proteína.

Quando analisadas as interações com os resíduos de aminoácidos da proteína, o CISACN (Figura 13A) formou diversas interações alquil com os resíduos LEU104, ILE84, LYS53, LEU167, ALA51, VAL38 e uma interação Pi-Cation com o resíduo LYS53 e interações de van der Waals com VAL105, VAL52, LEU86, LEU75, THR106, HIS107, MET109, ASP168, CYS39, enquanto a dexametasona (Figura 13B) apresentou com resíduo ASP168 uma ligação de hidrogênio e uma interação halogênica. Além de ter sido observado interações de van der Waals com os resíduos de aminoácidos ARG173, HIS107, GLU71, THR106, MET109, ILE84, LEU75, LEU86, LEU104, VAL105, VAL52, interações alquil com LYS53 e ALA51, e interações pi-alquil com o anel aromático do resíduo TYR35. Embora o resíduo de aminoácido VAL38 demonstre interações alquil com a dexametasona, essas interações são desfavoráveis devido aos choques estéricos intermoleculares, o que contribui para a diminuição da energia de ligação entre ligante-estrutura.

Figura 13. Estrutura da MAPK p38 complexada ao CISACN (A) e dexametasona (B)



Interações em 3D e 2D do CISACN (A) e dexametasona (B) com a MAPK p38

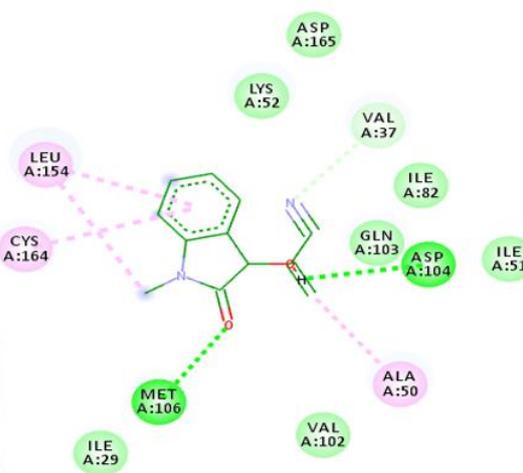
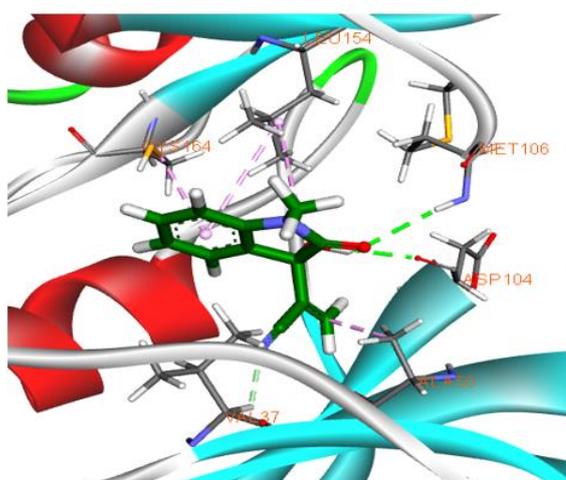
5.3.6.2. Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com a MAPK ERK 2

Quando observada a energia de ligação do CISACN com a MAPK ERK 2 (Tabela 6), ela apresentou energia e -58,329 kcal/mol, inferior a energia de ligação da dexametasona (-81,764 kcal/mol). A energia de interação foi inferior quando comparada com a dexametasona, entretanto destaca-se que apresentaram ligações semelhantes. O CISACN (Figura 14A) conseguiu se ligar por meio de ligações de

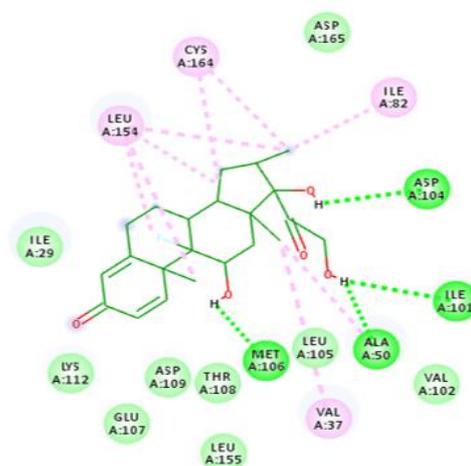
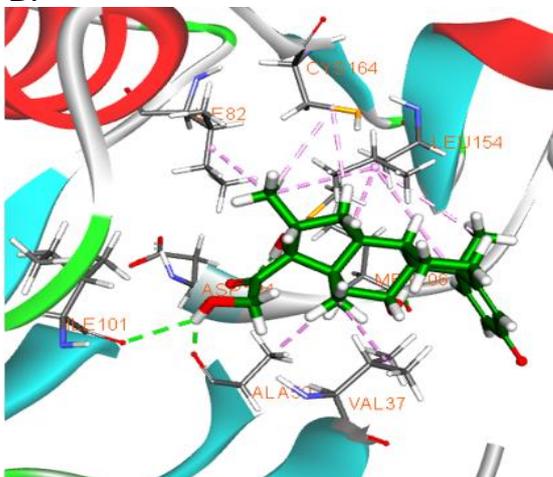
hidrogênios com os resíduos de aminoácido MET106 e ASP104, ligação carbono-hidrogênio com o resíduo VAL37, com interações alquil com os aminoácidos LEU154, CYS164 e ALA50, e interações de van der Waals com os resíduos ASP165, LYS52, VAL102, VAL37, ILE82, ILE51, ILE29 e GLN103. Por sua vez, a dexametasona (Figura 14B) interagiu por ligações de hidrogênio com os resíduos MET106, ASP104, ALA50 e ILE101; interações de alquil com LEU154, CYS164 VAL37, ALA50 e ILE82, e interações de van der Waals com ILE29, ASP109, LYS112, VAL102, GLU107, THR108 LEU155 e LEU105.

Figura 14. Estrutura da MAPK ERK 2 complexada ao CISACN (A) e dexametasona (B)

A.



B.

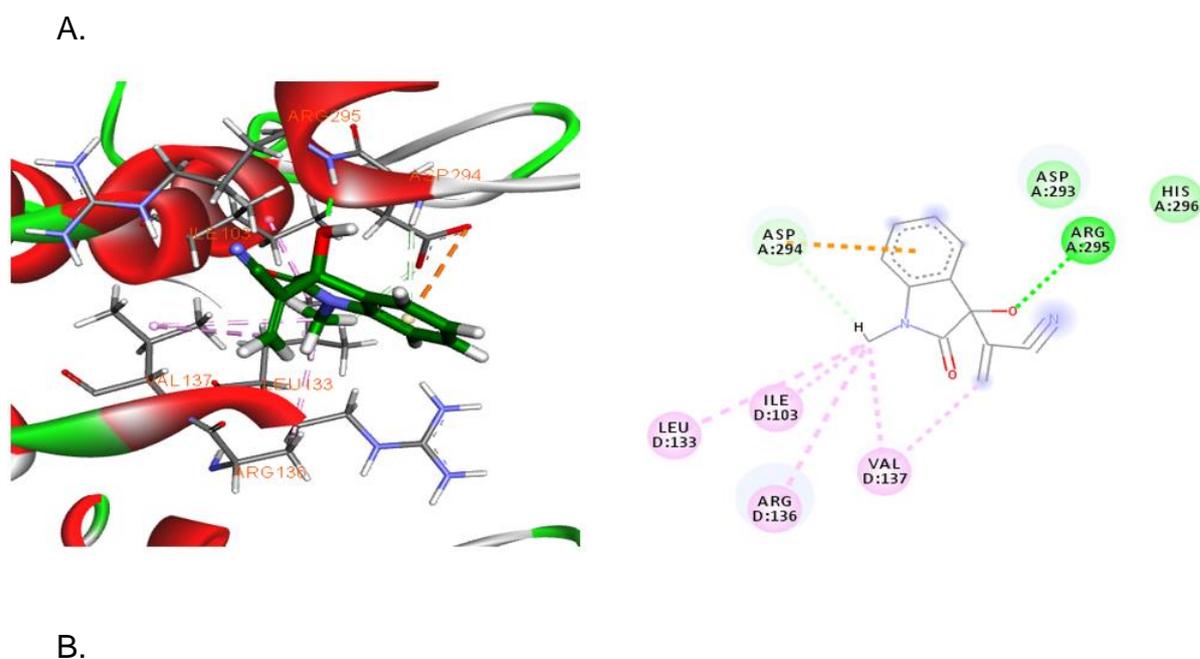


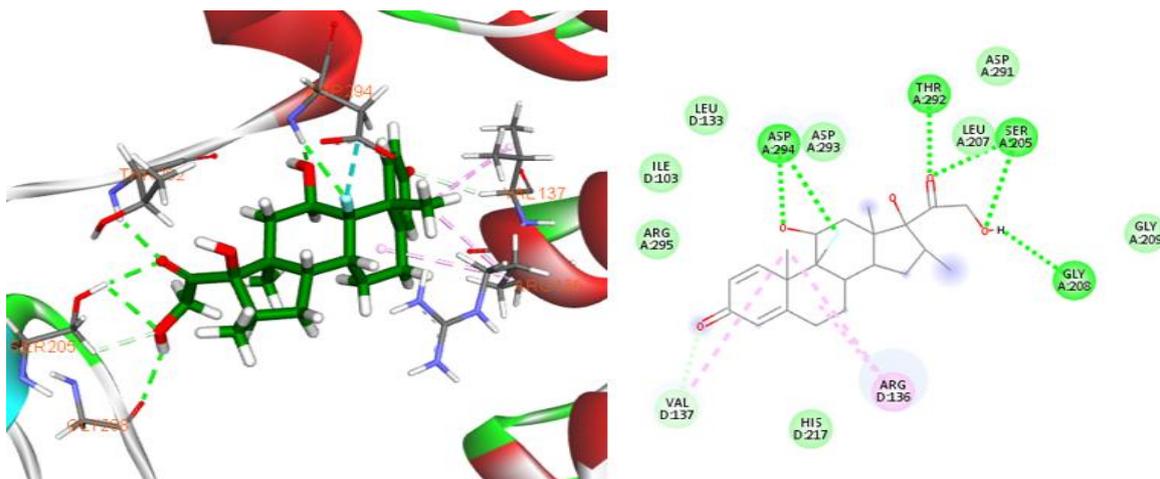
Interações em 3D e 2D do CISACN (A) e dexametasona (B) com a MAPK ERK 2

5.3.6.3. Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com a porção p65 do NF-κB

Na ancoragem do CISACN com o alvo NF-κB na porção 65, a energia de ligação desse ligante foi de -69,387 kcal/mol, enquanto a da dexametasona foi de -85,147 kcal/mol (Tabela 6). O CISACN (Figura 15A) apresentou interações com o alvo por meio de ligações de hidrogênio convencional com o resíduo ARG295 e ligações de carbono-hidrogênio e pi-cation com ASP294, outras interações encontradas foram de alquil com a LEU133, ILE103, VAL137 e ARG136, e van der Waals com ASP293 e HIS296. Enquanto a molécula teve apenas 1 ligação de hidrogênio, a dexametasona (Figura 15B) apresentou 6 ligações: 2 com o resíduo ASP294 e SER205, 1 com a THR292 e GLY208, também uma ligação carbono-hidrogênio com VAL137, além de interações alquil com os resíduos de aminoácidos VAL137 e ARG136 e van der Waals com LEU133, ILE103, ARG295, LEU207, ASP291, ASP293, GLY209 e HIS217.

Figura 15. Estrutura da porção p65 do NF-κB complexada ao CISACN (A) e dexametasona (B)





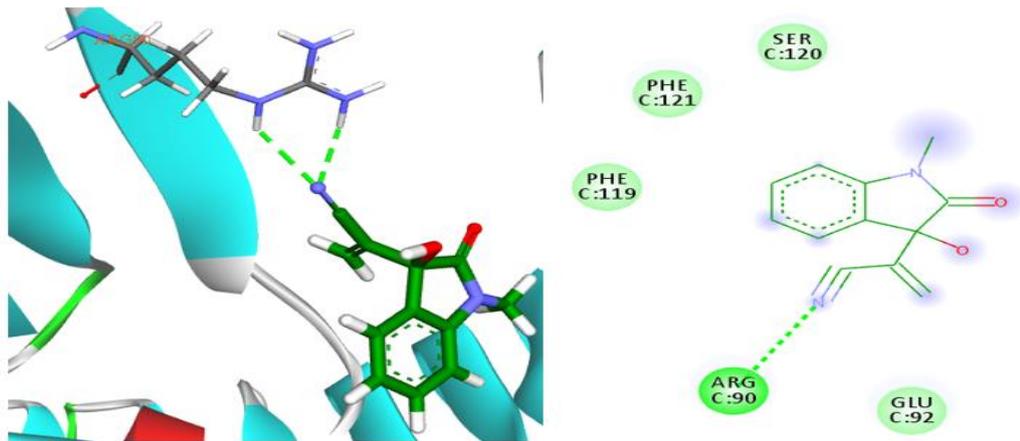
Interações em 3D e 2D do CISACN (A) e dexametasona (B) com a porção p65 do NF-kB

5.3.6.4. Interação molecular do CISACN (A) e dexametasona (B) com o receptor TLR-4

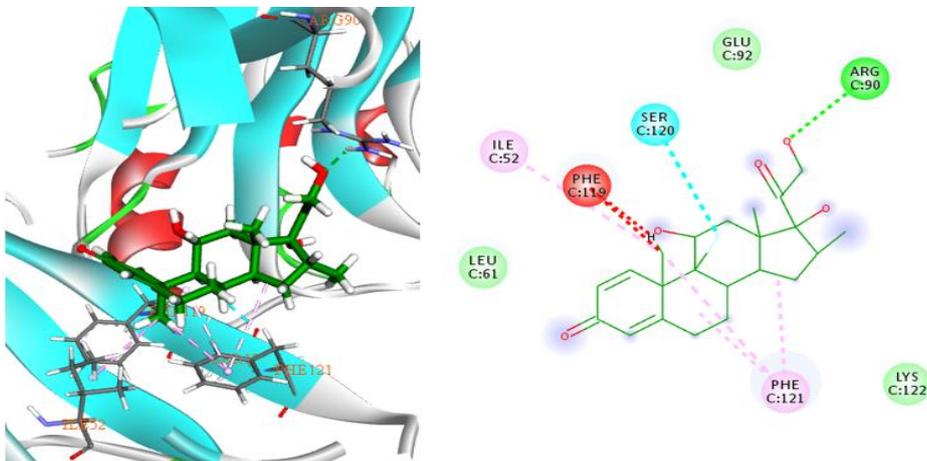
Por fim, em relação a ancoragem do CISACN com o alvo TLR4, o consenso score foi de -22,512 kcal/mol, devido a presença de um score positivo, a energia da dexametasona apesar de ter sido -9,478 kcal/mol, apresentou pouca significância pois no *Rerank score* ele apresentou valor positivo (20,542 kcal/mol) (Tabela 6). O CISACN (Figura 16A) conseguiu interagir com o alvo através da ligação de hidrogênio convencional com o resíduo ARG90 e com interações de van der Waals com os resíduos SER120, PHE121, PHE119 e GLU92. Enquanto a dexametasona (Figura 16B), interagiu com vários resíduos, sendo eles: a ARG90 por meio da ligação de hidrogênio; a PHE121 com interações pi-alquil; a ILE52 com interações alquil; a SER120 por interações halogênios e com as interações de van der Walls com os resíduos LYS122, LEU61 e GLU92. Além disso, a dexametasona apresentou 2 interações desfavoráveis com o resíduo PHE119.

Figura 16. Estrutura do receptor TLR-4 complexado ao CISACN (A) e dexametasona (B)

A.



B.



Interações em 3D e 2D do CISACN (A) e dexametasona (B) com o receptor TLR-4

6. DISCUSSÃO

O processo inflamatório é uma resposta biológica complexa do corpo a danos, lesões ou agentes irritantes, que visa restaurar a homeostase e promover a recuperação dos tecidos afetados; entretanto, uma inflamação descontrolada ou prolongada pode levar a danos teciduais adicionais e contribuir para diversas condições patológicas (JISHA et al., 2019), como a LPA, e sua forma mais grave, a SDRA, que são doenças que levam a danos no tecido pulmonar, com aumento da migração de polimorfonucleares e citocinas pró-inflamatórias e dano alveolar difuso (LIU et al., 2016). Atualmente, ainda não há uma terapia específica e direcionada para essa enfermidade (CHEN et al., 2020a).

Sendo assim, na busca por novas moléculas promissoras que venham tratar condições inflamatórias agudas, destaca-se o CISACN, um aduto de Morita-Baylis-Hilman derivado da isatina, que demonstrou atividades antitumoral e antimalárica (BRITO et al., 2020a; G. LIMA-JUNIOR et al., 2016c), apresentando baixas citotoxicidade e toxicidade aguda e boa viabilidade celular e disponibilidade oral teórica (PESSOA -PB, 2020).

Este trabalho, portanto, avaliou a atividade anti-inflamatória do CISACN em protocolos experimentais de inflamação aguda e seus possíveis mecanismos de ação envolvidos, via abordagens *in vivo* e *in silico*.

Nossos achados evidenciaram o efeito anti-inflamatório do CISACN ao inibir a formação de edema de pata induzido por carragenina, PGE₂, BK, 5-HT, histamina e 48/80; bem como ao diminuir aspectos inflamatórios na cavidade peritoneal de animais, como a migração de neutrófilos, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α) e edema; e ao atenuar o processo inflamatório na LPA, reduzindo, na cavidade pulmonar, a migração de neutrófilos, edema, citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α), e melhorando parâmetros histopatológicos, que estão associados, possivelmente, à inibição do receptor TLR-4 e da via de sinalização MAPK p-38.

Os modelos experimentais que mimetizam o processo inflamatório podem ser induzidos por diversos métodos, incluindo agentes imunogênicos, produtos de microrganismos, calor e irritantes químicos. Além de auxiliarem na compreensão do

mecanismo inflamatório, esses modelos colaboram para descoberta de novas drogas com potencial anti-inflamatório (MULEY; KRUSTEV; MCDUGALL, 2016).

Um dos sinais cardinais observados durante o processo inflamatório é o edema. Nessa perspectiva, modelos murinos experimentais edematogênicos vêm sendo utilizados para avaliar a formação desse sinal cardinal, de modo que a administração subcutânea de agentes flogísticos na região subplatar das patas traseiras de camundongos ocasiona a reação inflamatória aguda localizada, provocando um inchaço das patas devido ao rápido extravasamento de líquido e proteínas com consequente migração de leucócitos para o local inflamado (ZADEH-ARDABILI; RAD, 2019).

Nesse estudo, utilizamos o modelo de edema de pata induzido por carragenina que é historicamente usado, para mimetizar a formação do edema em camundongos e realizar a triagem de potenciais agentes anti-edematogênicos (BEN et al., 2022; THOMSON; FOWLER, 1981).

A carragenina é uma substância pertencente a uma família de polissacarídeos e é obtida de algas vermelhas comestíveis (MYERS; DEEVER; LEWANDOWSKI, 2019) que induz a inflamação de forma bifásica pela liberação sequencial de diversos mediadores inflamatórios. A fase inicial é geralmente caracterizada pela formação do edema dentro de uma hora após a administração da carragenina, ocasionando um trauma no local da lesão e sendo mediada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina; e a segunda fase, a partir de duas horas após a administração, é mediada pela produção exacerbada de prostaglandinas e pela migração de células como neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Em adição, nessa fase de atuação tardia da carragenina, também há liberação de enzimas, radicais livres e citocinas derivados de neutrófilos, como as mieloperoxidases (MPO), NO e TNF- α , IL-1 β e IL-6 (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Estudos realizados em células de tecidos, em cultura, revelaram que a administração da carragenina induz um aumento na liberação de IL-8 e interfere na atividade dos macrófagos. Os mecanismos de ativação da IL-8 são mediados por duas vias distintas, envolvendo o NF- κ B: a do TLR4 e mediada por espécies reativas de oxigênio. Entretanto, estudos indicam o envolvimento de possíveis outras vias de sinalizações (BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008; EL-SHITANY; EID, 2019).

O pré-tratamento com o CISACN nas doses de 6,25 mg/kg ou 12,5 mg/kg reduziu o edema de pata em camundongos desafiados com carragenina, nos intervalos de tempo avaliados. Portanto, a dose de 6,25 mg/kg foi escolhida para dar continuidade ao estudo pois, a menor dose capaz de promover o efeito desejado pode prevenir possíveis efeitos colaterais.

Resultados semelhantes foram relatados em um estudo em que derivados de isatina, denominados N-pirazoloil hidrazona de isatina e N-tiofenoacetil hidrazona de isatina, reduziram o edema de pata induzido por carragenina após 4h da sua administração (ZEESHAN et al., 2019). Assim, é possível sugerir que a classe de moléculas derivadas da isatina apresenta potencial anti-inflamatório ao atuar sobre as células do tecido inflamado, impedindo, conseqüentemente, a liberação de mediadores inflamatórios.

A atividade antiedematogênica do CISACN observada nos experimentos de edema de pata induzido por carragenina nas primeiras horas levou à convicção de que a molécula poderia estar envolvida na produção e/ou ação sobre receptores de mediadores inflamatórios iniciais. Portanto, avaliamos seu efeito em modelos de edema pata mediados pelos seguintes mediadores inflamatórios: prostaglandina, serotonina, bradicinina e histamina, de forma a respaldar nossa hipótese.

As prostaglandinas são eicosanoides derivados do ácido araquidônico (AA) exercendo papel fundamental como mediador pró-inflamatório (TSUGE et al., 2019). Em modelos experimentais a administração subcutânea da PGE₂ na pata do animal leva à mobilização do AA da membrana e seu subsequente metabolismo pela via metabólica da ciclooxigenase (COX-2), o que leva à produção da PGE₂. O tempo da primeira fase após o estímulo com PGE₂ é considerado lento seguida, então, por uma fase de dor intensa, edema e vermelhidão no tecido desafiado (YASMEN et al., 2023). O pré-tratamento com o CISACN reduziu a formação do edema nos tempos de 30 e 60 minutos após a administração da PGE₂, indicando que o CISACN possa estar atuando a nível de receptor da PGE₂ ou suprimindo pontos da sinalização intracelular induzidos pela PGE₂.

A bradicinina, principal produto do sistema enzimático calicreína-cinina, é gerada no plasma e em diversos outros tecidos periféricos em resposta a lesão mecânica ou infecção. Participa tanto do início quanto da progressão do processo inflamatório, onde sensibiliza terminais periféricos nociceptores (PIRAHANCHI;

SHARMA, 2019). Adicionalmente, a síntese de bradicinina potencializa a mobilização de AA e secreção de COX-2, que medeia a síntese de prostaglandinas, favorecendo, portanto, a formação do edema e dor, componentes essenciais da resposta inflamatória (MUSCELLA et al., 2020).

A injeção subcutânea da bradicinina em patas de animais provoca um aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia, e estudos relatam o aumento da concentração de bradicinina em exsudatos inflamatórios (ALQAHTANI et al., 2022; DERES et al., 2019). Nesse estudo, observamos a formação do edema pós administração da bradicinina e, o pré-tratamento com CISACN reduziu esse edema. Este dado indica que a molécula pode estar atuando em inibidores da calicreína, capaz, portanto de inibir reações inflamatórias agudas mediadas pela bradicinina (DAVIS; LU; MEJIA, 2010) bem como na diminuição da síntese de prostaglandinas visto que a bradicinina também auxilia na ativação da COX-2.

A serotonina é conhecida por ser um importante mediador inflamatório pois atua como potente vasodilatador e aumenta a permeabilidade vascular. Distribui-se principalmente no sistema nervoso central, no trato gastrointestinal e nas plaquetas, sendo cerca de 95% dessa substância sintetizada em células enterocromafins. A serotonina atua em diversas etapas na resposta inflamatória e pode, também, atuar na mobilidade de leucócitos, na fagocitose e na síntese de citocinas e quimiocinas (SHAJIB; KHAN, 2015). O CISACN reduziu o edema de pata induzido por serotonina, sendo um dado inédito visto que não existe na literatura nenhum AMBH ou derivado da isatina com essa propriedade.

O protocolo do edema de pata induzido por histamina tem sido extensamente utilizado para avaliar os potenciais anti-inflamatório e antialérgico de diversas moléculas (TAMADDONFARD; FARSHID; HOSSEINI, 2012). A histamina, produzida principalmente pelos mastócitos, se liga aos receptores histaminérgicos que estão amplamente distribuídos por todo o corpo. Nos processos inflamatórios, a histamina regula o edema, a vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular. Além disso, está envolvida na migração e nas funções dos leucócitos, proliferação de células T, diferenciação de células B, por exemplo (AKHTAR; SHABBIR, 2019).

Quando se busca avaliar a atividade de uma determinada molécula sobre a histamina, é necessário observar se ela atua no processo de degranulação dos

mastócitos, o que pode ser obtido pelo composto 48/80, ou pela administração direta da histamina no tecido (TACHIBANA et al., 2019).

O composto 48/80 é um potente agente indutor capaz de liberar seletivamente a histamina dos mastócitos. Quando o composto 48/80 é administrado no tecido conjuntivo ele provoca mudanças na superfície da célula, atravessando a membrana dos mastócitos e ativando uma proteína G do tipo Gi. Por sua vez, o dímero Gi/ $\beta\gamma$ ativa diretamente a fosfolipase C do tipo β_2 , que irá fosforilar os canais de cálcio, resultando no influxo desse íon e na consequente translocação e fusão à membrana plasmática das vesículas contendo histamina, causando, então, sua liberação. Tudo isso acontece de maneira não-lítica, ou seja, sem levar o mastócito à morte (PALOMÄKI; LAITINEN, 2006; SINNIAN et al., 2016).

O CISACN reduziu significativamente a formação de edema induzido pela histamina e pelo composto 48/80. Portanto, podemos sugerir que o CISACN reduz a degranulação de mastócitos e a liberação de histamina diretamente no tecido bem como reduz o efeito inflamatório da histamina. Um mecanismo possível seja via a redução do influxo do íon cálcio para o meio intracelular. Resultado semelhante foi relatado para compostos derivados da isatina, como os oriundos do 5-[2(3)-dialquil amino alcoxil]-indol-2,3-diona, que também apresentaram uma atividade anti-histamínica, destacando o potencial dessa classe de moléculas na inibição deste mediador inflamatório (SWATHI; SRINIVAS; SARANGAPANI, 2010).

Portanto, de acordo com a triagem preliminar com o CISACN podemos concluir que o CISACN apresenta uma promissora atividade antiedematogênica, atuando sobre mediadores inflamatórios (prostaglandina, bradicinina, serotonina e histamina) de fase inicial corroborando com os efeitos inflamatórios ocasionados pela carragenina. E os possíveis mecanismos de ação do CISACN podem envolver a ligação aos receptores de membrana celular e/ou nas vias de sinalização intracelular mediadas por esses agentes flogísticos.

De forma complementar e objetivando estudar o efeito do CISACN em outros parâmetros inflamatórios, realizamos o protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina. O peritônio funciona como um foco central para os leucócitos, que prontamente migram para o local como consequência de uma indução de inflamação; por isso, esse modelo experimental vem sendo amplamente utilizado para investigar o efeito de novos compostos sobre a migração de leucócitos no sítio inflamado (DE

SIQUEIRA PATRIOTA et al., 2022). Após o estímulo com carragenina, o peritônio se mantém repleto de mediadores inflamatórios, e isto permite a avaliação da quantificação e análise da permeabilidade vascular peritoneal, migração celular e alterações na produção de citocinas (SYAM et al., 2014).

Assim, observamos que o pré-tratamento com o CISACN dos animais desafiados intraperitonealmente com carragenina reduziu a migração de leucócitos, especificamente de neutrófilos, para o peritônio. Esse dado corrobora com o potencial efeito da isatina ao inibir a migração de neutrófilos em diferentes modelos experimentais, incluindo o de colite ulcerativa (NIRMAL et al., 2021) e o de hiperproliferação psoriasiforme (RABELO SOCCA et al., 2014).

Os neutrófilos se apresentam como o principal tipo de leucócito na resposta de defesa inata, sendo as primeiras células a serem recrutadas para o local afetado durante o processo inflamatório (DE SOUZA COSTA et al., 2018). A interação de neutrófilos recrutados com células residentes, mediadores inflamatórios locais ou matriz extracelular culmina na produção de vários outros mediadores, a exemplo de citocinas, quimiocinas, enzimas degradantes, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e proteases que amplificam a resposta inflamatória ao lesar o tecido circundante e causar efeitos deletérios (ALVES et al., 2009). Portanto, drogas que inibem o recrutamento e/ou ativação de neutrófilos, como o CISACN, podem ser úteis no tratamento de uma série de doenças inflamatórias.

O comprometimento da permeabilidade vascular é um processo chave na inflamação, pois permite o extravasamento de proteínas plasmáticas e leucócitos nos tecidos inflamados, levando à formação de edema que, conseqüentemente, pode ocasionar hipóxia tecidual e disfunção de múltiplos órgãos. Em geral, esse fator é induzido por mediadores vasoativos, como histamina, serotonina, eicosanoides, bradicinina ou citocinas (ZHOU et al., 2012).

Ao investigarmos a permeabilidade vascular no modelo de peritonite induzida por carragenina, constatamos que o CISACN diminuiu a concentração de proteínas totais no lavado peritoneal. Esse resultado é consistente com os resultados encontrados em modelos de edema de pata, confirmando, assim, o potencial efeito antiedematogênico do CISACN. Em adição, esse dado mostra-se relevante ao compararmos com o estudo realizado com outro AMBH derivado da isatina, denominado 2-(3-hidroxi-2-oxoindolin-3-il) (ISACN), que, em modelo experimental de

peritonite, reduziu a migração de neutrófilos e a produção de citocinas, mas não interferiu em parâmetros como a permeabilidade vascular (DE FRANÇA et al., 2020).

Por sua vez, a inibição na produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α em um modelo de peritonite indica um importante mecanismo pelo qual novas drogas inibem respostas inflamatórias agudas. Essas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na iniciação e progressão de respostas inflamatórias e são produzidas principalmente por macrófagos ativados e células residentes e ativam vias de sinalização em uma ampla variedade de células, com consequências na produção de mediadores que provocam o aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos e diversos outros eventos inflamatórios (CONTI et al., 2020).

Portanto, foi possível observar que o CISACN reduziu os níveis de IL-1 β , IL-6 TNF- α no peritônio. Esses dados corroboram com resultados descritos para um derivado de isatina, o isatinimino-acridinediona, que foi capaz de reduzir a liberação das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α em modelos experimentais de inflamação aguda (PERIYASAMI et al., 2019).

O fato de que a potente ação efectora de células como neutrófilos, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e a formação de edema tecidual estão intensamente relacionados com a severidade de doenças inflamatórias pulmonares (GIACALONE et al., 2020), decidimos avaliar o potencial efeito do CISACN frente a uma doença inflamatória aguda pulmonar, utilizando o modelo experimental LPA induzida por LPS.

A inflamação característica da LPA é mediada por uma extensa migração leucocitária a nível alveolar, em especial, os neutrófilos que desempenham papel central nessa doença (NOVA; SKOVIEROVA; CALKOVSKA, 2019). De fato, estudos demonstram que, em pacientes com SDRA, o aumento no número de neutrófilos correlaciona-se com a gravidade da doença (HOLLIDAY et al., 2021), enquanto a progressão da lesão pulmonar é reduzida pela depleção de neutrófilos (SONG et al., 2022).

Os neutrófilos são células que têm vida notavelmente curta, com uma meia-vida de 6 a 8 horas. No entanto, quando excessivamente ativados sua apoptose é retardada, podendo ocorrer dano ao tecido pulmonar, com a liberação de mediadores inflamatórios, a exemplo de citocinas, enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio, que em excesso causam lesão pulmonar difusa, o que agrava a resposta

inflamatória celular e a lesão tecidual pulmonar ao destruir a membrana basal e alterar a permeabilidade da membrana alvéolo-capilar (YANG et al., 2021).

Outro mecanismo envolvendo os neutrófilos é a NET, cuja formação excessiva está sendo cada vez mais reconhecida como um dos principais contribuintes para LPA (YAQINUDDIN; KASHIR, 2020). NETs são estruturas de DNA extracelular semelhantes a redes que são formadas em resposta à infecção: patógenos ficam nessa rede de DNA em expansão, que é ejetada do neutrófilo para cobrir uma extensa porção do meio extracelular; por sua vez, essas redes podem capturar e matar os patógenos incitantes. As NETs são revestidas com proteínas derivadas de grânulos, incluindo proteases e histonas que são altamente citotóxicas. Assim, embora a formação de NET seja benéfica, ao conter processos infecciosos, ela também pode infligir danos graves ao tecido hospedeiro (OBERMAYER et al., 2021). Logo, a depleção de neutrófilos pode ser importante alvo para diminuição de danos alveolares e conseqüente agravo no quadro da LPA.

No presente estudo, observamos que a administração intranasal do LPS aumentou o número de células inflamatórias na cavidade pulmonar dos animais, e o tratamento com o CISACN, nas doses de 12,5 mg/kg ou 25 mg/kg, reduziu essa migração celular. A dose de 12,5 mg/kg foi escolhida para dar seguimento aos experimentos por ser a menor dose testada capaz de provocar o efeito esperado. Em adição, analisamos, a partir de uma contagem diferencial das células, a migração de neutrófilos no BALF dos animais. No grupo de animais desafiados com LPS e, sem tratamento, observamos intensa migração de neutrófilos na cavidade pulmonar, e o tratamento com CISACN diminuiu o número dessas células, promovendo, portanto, proteção alveolar no desencadeamento da LPA.

Em consonância com os resultados anteriores observados no modelo de peritonite, podemos inferir que a ação anti-inflamatória do CISACN pode se estender a uma inflamação pulmonar. Além disso, esse resultado corrobora com um estudo envolvendo a isatina, que demonstrou ser capaz de reduzir a migração de leucócitos, como eosinófilos e neutrófilos, para cavidade pulmonar de animais, em modelo experimental de asma alérgica (KANDASAMY et al., 2010).

Em contraste, o tratamento com o CISACN não interferiu nas células mononucleares na cavidade pulmonar dos animais. Os macrófagos são células imunes inatas que desempenham diversos papéis em processos fisiológicos e

patológicos, tendo como função primária a de reconhecimento, fagocitose e eliminação dos patógenos invasores (ZHANG; WANG, 2014). Além disso, essas células exibem fenótipos com alta plasticidade e de grande diversidade, de acordo com o microambiente que estão inseridos, geralmente, apresentando uma dicotomia do tipo M1 e M2.

Os macrófagos do tipo M1 são caracterizados por apresentarem um perfil inflamatório, levando ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1beta, IL-6, TNF-alfa) e a produção de espécies reativas de oxigênio. Já os macrófagos do tipo M2 são induzidos pelas citocinas do perfil T_H2, como IL-4, IL-13 e IL-10, podendo desempenhar funções anti-inflamatórias e de reparação tecidual, produzindo altos níveis de citocinas TGF- β e IL-10 (OISHI; MANABE, 2018).

Ao observarmos a não interferência do tratamento com o CISACN sobre macrófagos no pulmão, podemos hipotetizar que o CISACN apresenta um efeito relacionado à plasticidade celular, com indução da polarização para macrófagos do tipo M2, que agem sobre o remodelamento e reparo tecidual.

Em estudos com protocolo de LPA induzida por LPS, observamos que potenciais ferramentas farmacológicas, como a Canaglifozina (um inibidor do co-transporte de sódio-glicose), têm efeitos diferentes nos macrófagos em dois estados de polarização, inibindo macrófagos M1 e aumentando macrófagos M2, indicando, assim, que há possibilidade de polarização de fenótipo de macrófagos M1 para M2 após o estímulo com LPS (LIN et al., 2020).

Além da intensa resposta inflamatória com infiltração de neutrófilos durante a LPA, os alvéolos apresentam um dano característico em células epiteliais e endoteliais que levam à quebra da barreira alvéolo-epitelial e, conseqüentemente, à formação de edema rico em altas concentrações de proteínas (LI et al., 2021). Os mecanismos potenciais desse dano epitelial-alveolar podem incluir morte celular, perda do contato célula-célula, alterações nos componentes da matriz extracelular e em seu contato com células epiteliais e alterações na comunicação entre células epiteliais e imunes (HERRERO; SANCHEZ; LORENTE, 2018). O edema alveolar resultante culmina no aumento significativo da permeabilidade da barreira epitelial alveolar e representa um dos principais fatores que contribuem para a hipoxemia. Além disso, a lesão epitelial leva ao comprometimento do transporte de fluido celular e redução da produção de surfactante (VILLAR; ZHANG; SLUTSKY, 2019).

Em modelo experimental de LPA, as concentrações de proteínas totais no BALF expressam uma medida da permeabilidade vascular pulmonar e a razão pulmonar u/s é um indicador da gravidade do edema pulmonar (SONG et al., 2021). Neste estudo, observamos que o tratamento com CISACN reduziu a concentração proteica na cavidade pulmonar e a razão u/s, conferindo uma atividade antiedematogênica do CISACN na LPA. Esses resultados estão alinhados com os descritos anteriormente, onde observamos que o CISACN apresenta potencial antiedematogênico ao inibir edema de pata induzido por vários agentes flogísticos e o edema em modelo de peritonite.

Durante o processo inflamatório da LPA, uma rede complexa de mediadores desempenha um papel importante na mediação, amplificação e manutenção da lesão pulmonar. Dentre eles, as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α desempenham função crucial, pois estão envolvidas em parâmetros essenciais como ativação e migração leucocitária e destruição tecidual (PINHEIRO et al., 2017).

A partir disso, avaliamos os níveis dessas citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) no BALF e no soro dos animais após o desafio com LPS. Observamos que o tratamento com o CISACN reduziu os níveis das citocinas avaliadas no BALF dos animais com LPA. Entretanto, a nível sistêmico, houve diferença apenas nos níveis de TNF- α , onde evidenciou-se que o desafio com LPS aumentou os níveis dessa citocina no soro dos animais, e o tratamento com CISACN foi capaz de reduzir esses níveis.

O TNF- α na LPA é uma das primeiras citocinas a ser liberada pelos macrófagos após estimulação com LPS e auxilia na secreção de outras citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e CXCL-8, que, por sua vez, recrutam leucócitos polimorfonucleares nos tecidos danificados e exacerbam ainda mais a lesão pulmonar (PATEL et al., 2013). Evidências relatam que existem relações diretas entre a proporção de TNF- α no BALF e a exacerbação da doença, com consequente aumento da complacência pulmonar e hipoxemia (LI et al., 2019a). Além disso, estudos indicaram ligação entre níveis plasmáticos elevados de TNF- α e gravidade e mortalidade em pacientes com LPA (PARSONS et al., 2005).

De forma semelhante, constatou-se que as concentrações de IL-1 β se correlacionam com a gravidade e exacerbação da LPA, podendo esta citocina estimular a produção de uma variedade de citocinas quimiotáticas, como CXCL-8, ativador de neutrófilos e de células epiteliais (ENA-78) e o peptídeo quimiotático de

monócitos (MCP-1) (AMOLI et al., 2005; VAN DE VEERDONK et al., 2011). Já a IL-6 também tem papel importante no processo fisiopatológico da LPA, induzindo diversas vias de sinalização intracelular e sendo responsável pela diferenciação celular (YANG et al., 2017). Atualmente foi demonstrado que a IL-6 se destaca como o melhor marcador sérico na progressão na COVID-19 (POTERE et al., 2021). Portanto, podemos inferir, a partir dos nossos resultados, tanto a IL-1 β como a IL-6 estão sendo produzidas no tecido pulmonar após o desafio com LPS, visto que não houve alterações em seus níveis séricos.

A ação de outro AMBH derivado da isatina na produção de citocinas pró-inflamatórias já foi relatada na literatura, França et al., 2020, demonstraram, em macrófagos em cultura, que o ISACN foi capaz de modular negativamente a produção de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 (DE FRANÇA et al., 2020). Em adição, outros AMBH também reduziram a produção de IL-6 e IL-1 β , em células tumorais (FAHEINA-MARTINS et al., 2017). Portanto, a redução desses mediadores durante o quadro da LPA, observada pelo tratamento com CISACN, indica um benefício e uma melhora no prognóstico da doença.

Em continuidade ao estudo, observamos o efeito do CISACN frente ao dano alveolar difuso, que é considerado o padrão histológico mais comum identificado em pacientes com LPA/SDRA. Normalmente a lesão das células epiteliais do alvéolo se caracteriza pelo surgimento de edema pulmonar, inflamação, hemorragia, deposição de membranas hialinas e congestão alveolar (HUGHES; BEASLEY, 2017).

Os padrões histopatológicos, observados nos animais do grupo LPS foram caracterizados por um tecido pulmonar com presença de hemorragia, intenso infiltrado celular, edema e estreitamento dos espaços alveolares, caracterizando a destruição e perda da integridade tecidual. No entanto, o tratamento com CISACN reverteu esses parâmetros, diminuindo, portanto, o dano alveolar difuso, corroborando com os achados acima citados como a diminuição da migração de células inflamatórias, da permeabilidade vascular e da gravidade do edema.

Em sequência hipotetizamos que o CISACN estaria atuando no processo de ativação de vias de transdução intracelular e para tal realizamos estudos *in silico*, usando a técnica de *docking* molecular, para analisar o potencial de ligação do CISACN a diferentes alvos moleculares tais como: TLR4, NF- κ B e as MAPKs p38 e ERK 2.

O TLR4 pertence à família de receptores TLR que induz respostas inflamatórias a diversos patógenos invasores, incluindo microrganismos que apresentam em sua superfície celular o LPS. Durante a ativação do TLR4 pelo LPS, participam o CD14, o MD-2 e a proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP). O LBP liga-se ao LPS e transfere o LPS para o CD14, resultando na sinalização através do complexo TLR4/MD-2. A partir daí, a transdução de vias de sinalização é iniciada, o que pode acarretar na ativação de MAPKs e de fatores nucleares, como o NF-κB. Essas enzimas e fator de transcrição intracelulares estão intimamente relacionados à regulação da resposta celular e associados a diversas atividades, a exemplo da produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas oxidantes. Essa cascata de sinalização intracelular ocorre por meio do recrutamento e ativação da MyD88 e da proteína adaptadora contendo o domínio do receptor Toll/interleucina-1 (TIRAP) (NIJLAND; HOFLAND; VAN STRIJP, 2014; OKAN et al., 2023).

Nas análises de *docking*, observamos que o CISACN apresenta boa energia de ligação com os alvos moleculares analisados, entretanto, os melhores resultados são atribuídos a interação da molécula com o TLR4 e a MAPK p38. O CISACN apresentou energias de ligação de -22,512 e -72,990 kcal/mol com TLR4 e a MAPK p38, respectivamente, maiores inclusive que as da droga padrão utilizada nos estudos, a dexametasona, que foram de -9,47805 e -53,035, respectivamente.

Em adição, o CISACN mostrou ter ancoragem análoga à da dexametasona, isto é, para o receptor TLR4, a molécula ligou-se de forma semelhante ao padrão através de ligações de hidrogênio e Van der Waals, por exemplo, com aminoácidos ARG 90, SER120 e GLU92. Resultados semelhantes foram encontrados entre o CISACN e a dexametasona para a proteína MAPK p38, onde CISACN e a dexametasona apresentaram interações alquil e ligações de Van der Waals com os aminoácidos LEU104, ILE84, LYS53, ALA51, VAL105, VAL52, LEU86, LEU75, THR106, HIS107 e MET109, indicando que, nesses dois alvos, a molécula se ligou ao sítio ativo, quando comparado a droga padrão, apresentando, portanto, possível atividade inibitória nessas vias de transdução de sinal. Entretanto, apesar da positiva predição *in silico*, mais estudos devem ser realizados a fim de respaldar essa hipótese.

Portanto, os dados analisados em estudos de *docking* demonstram mecanismos moleculares associados ao CISACN indicando efeito anti-inflamatório pois interagiu avidamente com o receptor TLR4 e a enzima MAPK p38. Esse achado

corroborar com os citados anteriormente onde o CISACN diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, migração de neutrófilos para cavidade pulmonar e formação de edema. Todos esses achados corroboram com um estudo realizado por França et. al. que avaliou o efeito anti-inflamatório de uma AMBH derivado da isatina, o ISACN, em protocolo de LPA induzida por LPS. O ISACN reduziu todos os parâmetros inflamatórios observados no estudo, como migração de neutrófilos, citocinas pró-inflamatórias, edema e alterações histopatológicas, e seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da via de sinalização TLR4/MAPK ERK-JNK-p38. Vale ressaltar que a diferença estrutural desses dois compostos é apenas a presença de uma metila (CH₃) no CISACN (DA SILVA et al., 2023).

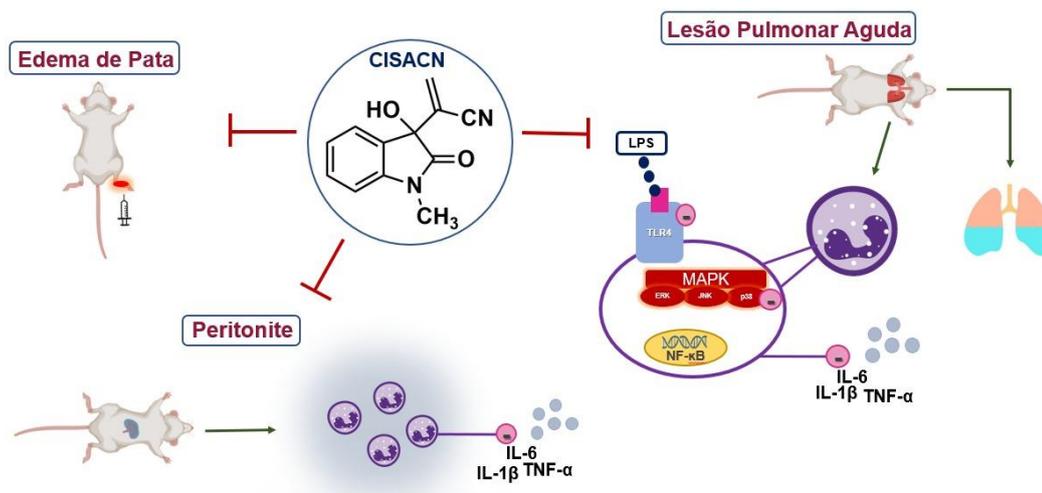
Em suma, os resultados apresentados neste trabalho são inéditos e demonstram o efeito anti-inflamatório do CISACN em modelos experimentais de inflamação aguda. O CISACN foi capaz de amenizar parâmetros inflamatórios tais como a formação do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos, inibiu a peritonite induzida por carragenina com diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias e na LPA melhorou os parâmetros histopatológicos como lesão epitélialveolar e edema. Este estudo respalda cientificamente o CISACN quanto ao seu potencial farmacológico e fornece subsídios para continuidade do estudo com perspectivas clínicas.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados no presente estudo, concluímos que o CISACN, um AMBH derivado da isatina, apresenta efeito anti-inflamatório em modelos experimentais de inflamação aguda, incluindo:

- edemas de pata induzidos por carragenina, PGE₂, BK, 5-HT, histamina e 48/80;
- peritonite induzida por carragenina, ao reduzir na cavidade peritoneal:
 - a migração de neutrófilos;
 - o edema;
 - as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.
- lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo, ao interferir:
 - na redução da migração de neutrófilos no BALF;
 - na diminuição do edema pulmonar;
 - na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 no BALF e TNF- α no soro;
 - nos parâmetros histopatológicos, reduzindo infiltração celular, edema e hemorragia no espaço alveolar;
 - nos mecanismos de ação intracelulares, a partir de estudos *in silico*, apresentando boa energia de ligação e afinidade de ligação com possíveis alvos moleculares, incluindo o receptor TLR-4 e a MAPK p38.

Figura 17. Esquema representativo da atividade anti-inflamatória do CISACN em modelos murinos de inflamação aguda



Fonte: elaborada pela autora.

REFERÊNCIAS

ABBASI, H.; FERREIDONNEZHAD, M.; MIRVEIS, Z. Vilazodone-Tacrine Hybrids as Potential Anti-Alzheimer Agents: QSAR, Molecular Docking, and Molecular Dynamic (MD) Simulation Studies. 2021.

ADEGBAJU, O. D.; OTUNOLA, G. A.; AFOLAYAN, A. J. Anti-inflammatory and cytotoxic evaluation of extracts from the flowering stage of celosia argentea. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 24 maio 2020.

AKHTAR, G.; SHABBIR, A. Ureginea indica attenuated rheumatoid arthritis and inflammatory paw edema in diverse animal models of acute and chronic inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, p. 111864, 28 jun. 2019.

ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, ago. 2013.

ALI, H. et al. Attenuation of LPS-induced acute lung injury by continentalic acid in rodents through inhibition of inflammatory mediators correlates with increased Nrf2 protein expression. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2020.

ALQAHTANI, Y. S. et al. Anti-Inflammatory Potentials of β -Ketoester Derivatives of N-Ary Succinimides: In Vitro, In Vivo, and Molecular Docking Studies. **Journal of Chemistry**, v. 2022, 2022.

ALVES, A. F. et al. Milonine, an Alkaloid of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Inhibits Histamine Release of Activated Mast Cells. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2118–2128, 1 dez. 2017.

ALVES, C. F. et al. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1097–1104, 12 ago. 2009.

AMOLI, M. M. et al. Two polymorphisms in the epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. **Disease Markers**, v. 21, n. 2, p. 75–77, 1 jan. 2005.

ANDREANI, A. et al. New isatin derivatives with antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1374–1378, 1 abr. 2010.

ARAOS, J. et al. Near-apneic ventilation decreases lung injury and fibroproliferation in an acute respiratory distress syndrome model with extracorporeal membrane oxygenation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 199, n. 5, p. 603–612, 1 mar. 2019.

ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 7511, p. 319–323, 1967.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery** 2021 20:3, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 jan. 2021.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413, 2 fev. 2008.

BATES, J. H. T.; SMITH, B. J. Ventilator-induced lung injury and lung mechanics. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 19, p. 378–378, out. 2018.

BELLANI, G. et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 788–800, 23 fev. 2016.

BEN, I. O. et al. Effect of *Trichilia monadelpha* (Thonn.) J. J. de Wilde (Meliaceae) extracts on C-reactive proteins levels and acute inflammation. **Scientific African**, v. 16, p. e011119, 1 jul. 2022.

BEN SALEM, C. Acute Respiratory Distress Syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 19, p. 1904, 9 nov. 2017.

BERNARD, G. R. et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 149, n. 3 Pt 1, p. 818–824, 1994.

BERRAONDO, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer** 2018 120:1, v. 120, n. 1, p. 6–15, 9 nov. 2018.

BÉRUBÉ, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 11, n. 3, p. 281–305, 3 mar. 2016.

BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. CARRAGEENAN-INDUCED NF κ B ACTIVATION DEPENDS ON DISTINCT PATHWAYS MEDIATED BY REACTIVE OXYGEN SPECIES AND HSP27 OR BY BCL10. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 0, p. 973, jul. 2008.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, p. 114147, 1 out. 2020.

BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. Molegro Virtual Docker for Docking. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2053, p. 149–167, 2019.

BLAKEMORE, D. C. et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug

- discovery. **Nature Chemistry** **2018** **10:4**, v. 10, n. 4, p. 383–394, 22 mar. 2018.
- BRANCO, A. C. C. C. et al. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- BRITO, V. B. M. et al. Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and ¹H NMR experimental studies of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives. **Molecular diversity**, v. 24, n. 1, p. 265–281, 1 fev. 2020a.
- BRITO, V. B. M. et al. Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and ¹H NMR experimental studies of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives. **Molecular Diversity**, v. 24, n. 1, p. 265–281, 1 fev. 2020b.
- BROOKES, O. et al. Co-culture of type I and type II pneumocytes as a model of alveolar epithelium. **PLOS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0248798, 1 set. 2021.
- BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 140, n. 4, p. 345–350, 1 abr. 2016.
- CALCATELLI, A. et al. Unconventional Transformations of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Synthesis**, v. 52, n. 20, p. 2922–2939, 16 out. 2020.
- CAMILO, N. S. et al. An Improved Protocol for the Morita-Baylis-Hillman Reaction Allows Unprecedented Broad Synthetic Scope. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2022, n. 9, p. e202101448, 7 mar. 2022.
- CAMPOS, K. R. et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science (New York, N.Y.)**, v. 363, n. 6424, 18 jan. 2019.
- CARLA, A. et al. Acute respiratory distress syndrome subphenotypes and therapy responsive traits among preclinical models: Protocol for a systematic review and meta-analysis. **Respiratory Research**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 7 abr. 2020.
- CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: prospective evaluation of 7,133 patients*. **Critical care medicine**, v. 42, n. 3, p. 574–582, mar. 2014.
- CHEN, Q. et al. Sini decoction ameliorates sepsis-induced acute lung injury via regulating ACE2-Ang (1-7)-Mas axis and inhibiting the MAPK signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 115, p. 108971, 1 jul. 2019.
- CHEN, T. et al. Recent developments of small molecules with anti-inflammatory activities for the treatment of acute lung injury. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 207, p. 112660, 1 dez. 2020a.
- CHEN, Z. C. et al. Transformations of Modified Morita-Baylis-Hillman Adducts from Isatins Catalyzed by Lewis Bases. **Chemical record (New York, N.Y.)**, v. 20, n. 6, p. 541–555, 1 jun. 2020b.
- CHIANG, E. Y.; YU, X.; GROGAN, J. L. Immune complex-mediated cell activation from systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients elaborate different requirements for IRAK1/4 kinase activity across human cell types. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 2, p. 1279–1288, 15 jan. 2011.
- CHIYANZU, I. et al. Design, synthesis and anti-plasmodial evaluation in vitro of new

4-aminoquinoline isatin derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 9, p. 3249–3261, 1 maio 2005.

CHOW, C. W. et al. Oxidative stress and acute lung injury. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 29, n. 4, p. 427–431, 1 out. 2003.

CONTI, P. et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 34, n. 2, p. 327–331, 1 mar. 2020.

CORDARO, M. et al. Safety and efficacy of a new micronized formulation of the ALIamide palmitoylglucosamine in preclinical models of inflammation and osteoarthritis pain. **Arthritis Research and Therapy**, v. 21, n. 1, p. 1–17, 28 nov. 2019.

D'ALESSIO, F. R. Mouse models of acute lung injury and ARDS. **Methods in Molecular Biology**, v. 1809, p. 341–350, 2018.

DA SILVA, J. S. DE F. et al. Morita-Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) modulates the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury. <https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2177553>, 2023.

DA SILVA, W. A. V. et al. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita–Baylis–Hillman adducts against *Leishmania donovani*: A twin drug approach. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 18, p. 4523–4526, 15 set. 2016.

DAVID, B. A.; KUBES, P. Exploring the complex role of chemokines and chemoattractants in vivo on leukocyte dynamics. **Immunological Reviews**, v. 289, n. 1, p. 9–30, 1 maio 2019.

DAVIS, A. E.; LU, F.; MEJIA, P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 104, n. 5, p. 886–893, nov. 2010.

DE FRANÇA, J. S. et al. Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process In vitro and In vivo. **Inflammation**, p. 1–9, 24 nov. 2020.

DE SIQUEIRA PATRIOTA, L. L. et al. Inhibition of Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice by the Microgramma vacciniifolia Frond Lectin (MvFL). **Polymers 2022, Vol. 14, Page 1609**, v. 14, n. 8, p. 1609, 15 abr. 2022.

DE SOUZA COSTA, M. et al. Photobiomodulation reduces neutrophil migration and oxidative stress in mice with carrageenan-induced peritonitis. **Lasers in medical science**, v. 33, n. 9, p. 1983–1990, 1 dez. 2018.

DERES, L. et al. The effects of bradykinin B1 receptor antagonism on the myocardial and vascular consequences of hypertension in SHR rats. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. MAY, p. 624, 21 maio 2019.

DO NASCIMENTO XAVIER, B. M. et al. MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF-κB signaling pathway-TLR4 dependent. **Inflammation Research**, v. 68, n. 12, p. 1061–1070, 1 dez. 2019.

- DORRINGTON, A. M. et al. The Historical Role and Contemporary Use of Corticosteroids in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 14, n. 9, p. 1316–1329, 16 set. 2020.
- DREWES, S. E.; EMSLIE, N. D. Necic acid synthons. Part 1. Total synthesis of integerrineic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 0, p. 2079–2083, 1 jan. 1982.
- DUARTE, L. R. F. et al. Resolution of Inflammation in Acute Graft-Versus-Host-Disease: Advances and Perspectives. **Biomolecules**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2022.
- EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 21–37, 1 set. 2007.
- EL-SHITANY, N. A.; EID, B. G. Icariin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF- κ B signaling pathways. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 120, p. 109567, 1 dez. 2019.
- EMADI-BAYGI, M. et al. Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) as a System-Level Infectious Disease With Distinct Sex Disparities. **Frontiers in immunology**, v. 12, 29 nov. 2021.
- ERICKSON, S. E. et al. Racial and ethnic disparities in mortality from acute lung injury. **Critical care medicine**, v. 37, n. 1, p. 1–6, 2009.
- EWORUKE, E.; MAJOR, J. M.; GILBERT MCCLAIN, L. I. National incidence rates for Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and ARDS cause-specific factors in the United States (2006-2014). **Journal of critical care**, v. 47, p. 192–197, 1 out. 2018.
- FAHEINA-MARTINS, G. V. et al. Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory Effects by Modulating Inflammatory Mediator Expression in RAW264.7 Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA**, v. 319, n. 7, p. 698–710, 20 fev. 2018.
- FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 1 jun. 2019.
- FERGUSON, N. D. et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. **Intensive care medicine**, v. 38, n. 10, p. 1573–1582, 2012.
- G. LIMA-JUNIOR, C. et al. Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))**, v. 12, n. 7, p. 602–612, 8 jun. 2016a.
- G. LIMA-JUNIOR, C. et al. Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))**, v. 12, n. 7, p. 602–612, 8 jun. 2016b.
- G. LIMA-JUNIOR, C. et al. Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and

Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 602–612, 8 jun. 2016c.

GAUDET, A. et al. Endocan regulates acute lung inflammation through control of leukocyte diapedesis. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 127, n. 3, p. 668–678, 2019.

GE, Y. et al. The molecular mechanisms of the effect of Dexamethasone and Cyclosporin A on TLR4 /NF- κ B signaling pathway activation in oral lichen planus. **Gene**, v. 508, n. 2, p. 157–164, 25 out. 2012.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, 2016.

GIACALONE, V. D. et al. Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. **International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 851**, v. 21, n. 3, p. 851, 28 jan. 2020.

GILBERT, N. C.; NEWCOMER, M. E.; WERZ, O. Untangling the web of 5-lipoxygenase-derived products from a molecular and structural perspective: The battle between pro- and anti-inflammatory lipid mediators. **Biochemical Pharmacology**, v. 193, p. 114759, 1 nov. 2021.

GIRIJA, A. S. S.; SHANKAR, E. M.; LARSSON, M. Could SARS-CoV-2-Induced Hyperinflammation Magnify the Severity of Coronavirus Disease (CoViD-19) Leading to Acute Respiratory Distress Syndrome? **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1206, 27 maio 2020.

GOUDA, M. M.; BHANDARY, Y. P. Acute Lung Injury: IL-17A-Mediated Inflammatory Pathway and Its Regulation by Curcumin. **Inflammation**, v. 42, n. 4, p. 1160–1169, 15 ago. 2019.

GRIGORYEV, D. N. et al. Science review: Searching for gene candidates in acute lung injury. **Critical Care**, v. 8, n. 6, p. 440–447, 30 dez. 2004.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. **Molecular Medicine 2011 17:3**, v. 17, n. 3, p. 293–307, 18 out. 2010.

GUÉRIN, C. et al. Prone Positioning in Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. **NEJM.org. N Engl J Med**, v. 23, n. 6, p. 2159–68, 2013.

GUO, Y. et al. Platelet-derived Wnt antagonist Dickkopf-1 is implicated in ICAM-1/VCAM-1-mediated neutrophilic acute lung inflammation. **Blood**, v. 126, n. 19, p. 2220–2229, 5 nov. 2015.

GUPTA, M.; SHARMA, R.; KUMAR, A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, p. 210–217, 1 out. 2018.

HANNOODEE, S.; NASURUDDIN, D. N. Acute Inflammatory Response. **Nature**, v. 206, n. 4979, p. 20, 14 nov. 2022.

HERRERO, R.; SANCHEZ, G.; LORENTE, J. A. New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury. **Annals of Translational Medicine**, v. 6, n. 2, p. 32–32, jan. 2018.

- HOLLIDAY, Z. M. et al. Neutrophils and secondary infections in COVID-19 induced acute respiratory distress syndrome. **New Microbes and New Infections**, v. 44, p. 100944, 1 nov. 2021.
- HU, X. et al. Aspirin-triggered resolvin D1 alleviates paraquat-induced acute lung injury in mice. **Life Sciences**, v. 218, p. 38–46, 1 fev. 2019.
- HUANG, X. et al. The role of macrophages in the pathogenesis of ali/ards. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.
- HUGHES, K. T.; BEASLEY, M. B. Pulmonary Manifestations of Acute Lung Injury: More Than Just Diffuse Alveolar Damage. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 7, p. 916–922, 1 jul. 2017.
- JIA, X. et al. Total glycosides of *Rhodiola rosea* L. attenuate LPS-induced acute lung injury by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 158, p. 114186, 1 fev. 2023.
- JISHA, N. et al. Anti-inflammatory efficacy of methanolic extract of *Muntingia calabura* L. leaves in Carrageenan induced paw edema model. **Pathophysiology**, v. 26, n. 3–4, p. 323–330, 1 set. 2019.
- JUBELI, E. et al. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 158, n. 2, p. 194–206, 10 mar. 2012.
- JUMA, W. P. et al. The Application of Biocatalysis in the Preparation and Resolution of Morita-Baylis-Hillman Adducts and Their Derivatives. **ChemBioChem**, v. 23, n. 7, p. e202100527, 5 abr. 2022.
- KAMAL, A.; KRISHNAJI, T.; VENKAT REDDY, P. A new chemoenzymatic Baylis–Hillman approach for the synthesis of enantiomerically enriched umbelactones. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 40, p. 7232–7235, 1 out. 2007.
- KANDASAMY, R. et al. Isatin down-regulates expression of atrial natriuretic peptide receptor A and inhibits airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 218–225, fev. 2010.
- KEDDISSI, J. I. et al. Fluid management in Acute Respiratory Distress Syndrome: A narrative review. **Canadian Journal of Respiratory Therapy: CJRT = Revue Canadienne de la Thérapie Respiratoire : RCTR**, v. 55, p. 1, 2019.
- KHADANGI, F. et al. Intranasal versus intratracheal exposure to lipopolysaccharides in a murine model of acute respiratory distress syndrome. **Scientific Reports** |, v. 11, p. 7777, 123AD.
- KHAN, T. et al. Computational Drug Designing and Prediction Of Important Parameters Using in silico Methods- A Review. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 15, n. 5, p. 384–397, 27 mar. 2019.
- KHOLODENKO, B. N.; BIRTWISTLE, M. R. Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**, v. 1, n. 1, p. 28–44, jul. 2009.
- KUMAR, H. et al. 1,3,4-Oxadiazole/thiadiazole and 1,2,4-triazole derivatives of biphenyl-4-yloxy acetic acid: synthesis and preliminary evaluation of biological

properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2688–2698, 8 fev. 2008.

KUNDU, M. K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene- propionic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 5, p. 731–736, 8 mar. 1999.

LARAIA, L.; WALDMANN, H. Natural product inspired compound collections: evolutionary principle, chemical synthesis, phenotypic screening, and target identification. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 23, p. 75–82, 1 mar. 2017.

LASA, M. et al. Dexamethasone Destabilizes Cyclooxygenase 2 mRNA by Inhibiting Mitogen-Activated Protein Kinase p38. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 3, p. 771–780, 1 fev. 2001.

LAU, J. et al. A Systematic Review of Molecular Imaging Agents Targeting Bradykinin B1 and B2 Receptors. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 8, p. 1–20, 1 ago. 2020.

LEE, K. H. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. **Autoimmunity reviews**, v. 16, n. 11, p. 1160–1173, 1 nov. 2017.

LEVENTHAL, J. S.; SCHRÖPPEL, B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. **Kidney International**, v. 81, n. 9, p. 826–832, 1 maio 2012.

LI, J. et al. Alveolar epithelial glycocalyx shedding aggravates the epithelial barrier and disrupts epithelial tight junctions in acute respiratory distress syndrome. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 111026, 1 jan. 2021.

LI, L. et al. Acute lung injury in patients with COVID-19 infection. **Clinical and Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 20–27, 1 mar. 2020.

LI, Q. et al. Carnosic acid protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, n. 5, p. 3707–3714, 1 nov. 2019a.

LI, Y. et al. Combining an in silico approach with an animal experiment to investigate the protective effect of troxerutin for treating acute lung injury. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 10 jun. 2019b.

LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 1 jul. 2012.

LIN, F. et al. Canagliflozin alleviates LPS-induced acute lung injury by modulating alveolar macrophage polarization. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106969, 1 nov. 2020.

LIU, T. et al. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 22 dez. 2016.

LONG, M. E.; MALLAMPALLI, R. K.; HOROWITZ, J. C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury. **Clinical Science**, v. 136, n. 10, p. 747–769, 27 maio 2022.

- LU, Q. et al. MicroRNAs: Important Regulatory Molecules in Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences** **2022**, Vol. **23**, Page **5545**, v. 23, n. 10, p. 5545, 16 maio 2022.
- M PAIVA FERREIRA, L. A. et al. Curine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Downregulating the TLR4/MD-2/NF- κ B(p65) Signaling Pathway. [s.d.].
- MARGRAF, A.; LOWELL, C. A.; ZARBOCK, A. Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. **Blood**, v. 139, n. 14, p. 2130–2144, 7 abr. 2022.
- MATSUMOTO, H. et al. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. **Scientific Reports** **2018** **8**:1, v. 8, n. 1, p. 1–11, 18 set. 2018.
- MATSUO, A. et al. Significance of nuclear LOXL2 inhibition in fibroblasts and myofibroblasts in the fibrotic process of acute respiratory distress syndrome. **European Journal of Pharmacology**, v. 892, p. 173754, 5 fev. 2021.
- MATTHAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature reviews. Disease primers**, v. 5, n. 1, 2019.
- MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 295, n. 3, set. 2008.
- MCNEIL, J. B. et al. Linear Association Between Hypoalbuminemia and Increased Risk of Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Adults. **Critical Care Explorations**, v. 3, n. 9, p. e0527, 14 set. 2021.
- MEFFORD, B.; DONALDSON, J. C.; BISSELL, B. D. To Block or Not: Updates in Neuromuscular Blockade in Acute Respiratory Distress Syndrome. <https://doi.org/10.1177/1060028020910132>, v. 54, n. 9, p. 899–906, 28 fev. 2020.
- MELIS, C. et al. Isatin: a privileged scaffold for the design of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 68–73, 25 out. 2017.
- MELO, C R. UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-CCS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS CINTHIA RODRIGUES MELO ATIVIDADE ANTIPLASMODIAL IN VITRO DE UM DERIVADO DA N-METIL-ISATINA (CH3ISACN), E SUA TOXICIDADE IN SILICO E IN VIVO. 2020.
- MOKRA, D. et al. Corticosteroids in Acute Lung Injury: The Dilemma Continues. **International Journal of Molecular Sciences** **2019**, Vol. **20**, Page **4765**, v. 20, n. 19, p. 4765, 25 set. 2019.
- MOKRA, D. Acute Lung Injury – From Pathophysiology to Treatment. **Physiological Research**, v. 69, n. Suppl 3, p. S353, 2020.
- MOKRA, D.; MOKRY, J. Phosphodiesterase Inhibitors in Acute Lung Injury: What Are the Perspectives? **International Journal of Molecular Sciences** **2021**, Vol. **22**, Page **1929**, v. 22, n. 4, p. 1929, 16 fev. 2021.
- MONTANI, D. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. **European Respiratory**

Review, v. 31, n. 163, 31 mar. 2022.

MORITAKEN-ICHI; SUZUKIZENNOSUKE; HIROSEHIROMITSU. A Tertiary Phosphine-catalyzed Reaction of Acrylic Compounds with Aldehydes. <https://doi.org/10.1246/bcsj.41.2815>, v. 41, n. 11, p. 2815–2815, 27 mar. 2006.

MOWERY, N. T.; TERZIAN, W. T. H.; NELSON, A. C. Acute lung injury. **Current problems in surgery**, v. 57, n. 5, 1 maio 2020.

MRUGACZ, M. et al. Integrins: An Important Link between Angiogenesis, Inflammation and Eye Diseases. **Cells**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2021.

MULEY, M. M.; KRUSTEV, E.; MCDOUGALL, J. J. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 88–101, 1 fev. 2016.

MUSCELLA, A. et al. Bradykinin stimulates prostaglandin E2 release in human skeletal muscular fibroblasts. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 507, p. 110771, 1 maio 2020.

MYERS, M. J.; DEEVER, C. M.; LEWANDOWSKI, A. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response. **Molecular immunology**, v. 109, p. 38–42, 1 maio 2019.

NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 11, 9 nov. 2018.

NARENDAR REDDY, T.; JAYATHIRTA RAO, V. Importance of Baylis-Hillman adducts in modern drug discovery. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 30, p. 2859–2875, 25 jul. 2018.

NATH, R. et al. Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. **Journal of Molecular Structure**, v. 1222, p. 128900, 15 dez. 2020.

NAVAEI-ALIPOUR, N. et al. The effects of honey on pro- and anti-inflammatory cytokines: A narrative review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 7, p. 3690–3701, 1 jul. 2021.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, [s.d.].

NIJLAND, R.; HOFLAND, T.; VAN STRIJP, J. A. G. Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies. **Marine Drugs** 2014, Vol. 12, Pages 4260-4273, v. 12, n. 7, p. 4260–4273, 23 jul. 2014.

NIRMAL, G. R. et al. Photothermal treatment by PLGA–gold nanorod–isatin nanocomplexes under near-infrared irradiation for alleviating psoriasiform hyperproliferation. **Journal of Controlled Release**, v. 333, p. 487–499, 10 maio 2021.

NOVA, Z.; SKOVIEROVA, H.; CALKOVSKA, A. Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 831, v. 20, n. 4, p. 831, 15 fev. 2019.

OBERMAYER, A. et al. Neutrophil Extracellular Traps in Fatal COVID-19-Associated Lung Injury. **Disease Markers**, v. 2021, 2021.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International Immunology**, v. 30, n. 11, p. 511–528, 29 out. 2018.

OKAN, A. et al. Evaluation of the protective role of resveratrol against sepsis caused by LPS via TLR4/NF- κ B/TNF- α signaling pathways: Experimental study. **Cell Biochemistry and Function**, 2023.

ORAFIAE, A. et al. An overview of lipoxygenase inhibitors with approach of in vivo studies. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 148, 1 jun. 2020.

ORTEGA, S. S.; CARA, L. C. L.; SALVADOR, M. K. In silico pharmacology for a multidisciplinary drug discovery process. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 27, n. 4, p. 199–207, dez. 2012.

OU, Z. et al. B1- And b2-integrins: Central players in regulating vascular permeability and leukocyte recruitment during acute inflammation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 320, n. 2, p. H734–H739, 1 fev. 2021.

PACHECO DE OLIVEIRA, M. T. et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 400–412, 4 jul. 2015.

PAHWA, R.; GOYAL, A.; JIALAL, I. Chronic Inflammation. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**, p. 300–314, 8 ago. 2022.

PAIVA FERREIRA, L. A. M. et al. Curine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Downregulating the TLR4/MD-2/NF- κ B(p65) Signaling Pathway. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 32, n. 1, p. 111–121, 1 fev. 2022.

PAIVA FERREIRA, L. A. M. et al. Biological Activities of Morita-Baylis-Hillman Adducts (MBHA). **Mini reviews in medicinal chemistry**, 2 fev. 2023.

PALOMÄKI, V. A. B.; LAITINEN, J. T. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D–lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT_{1A} receptors in rat brain sections. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 6, p. 596, 3 mar. 2006.

PANDEY, A. K. et al. Reactivity of Morita-Baylis-Hillman Adducts in C-H Functionalization of (Hetero)aryl Nitrones: Access to Bridged Cycles and Carbazoles. **Organic letters**, v. 20, n. 15, p. 4632–4636, 3 ago. 2018.

PANIGRAHY, D. et al. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 227, p. 107879, 1 nov. 2021.

PAPACONSTANTINO, J. The Role of Signaling Pathways of Inflammation and Oxidative Stress in Development of Senescence and Aging Phenotypes in Cardiovascular Disease. **Cells 2019, Vol. 8, Page 1383**, v. 8, n. 11, p. 1383, 4 nov. 2019.

PARK, I. et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. **The European respiratory journal**, v. 53, n. 3, 1 mar. 2019.

- PARSONS, P. E. et al. Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 288, n. 3, mar. 2005.
- PATEL, U. et al. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug discovery today**, v. 22, n. 1, p. 186–193, 1 jan. 2017.
- PATEL, V. et al. Dietary Antioxidants Significantly Attenuate Hyperoxia-Induced Acute Inflammatory Lung Injury by Enhancing Macrophage Function via Reducing the Accumulation of Airway HMGB1. **International Journal of Molecular Sciences** **2020, Vol. 21, Page 977**, v. 21, n. 3, p. 977, 1 fev. 2020.
- PATEL, B. V. et al. TNF-Induced Death Signaling Triggers Alveolar Epithelial Dysfunction in Acute Lung Injury. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 8, p. 4274–4282, 15 abr. 2013.
- PATIL, K. R. et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, 1 set. 2019.
- PERIYASAMI, G. et al. A competent synthesis and efficient anti-inflammatory responses of isatinimino acridinedione moiety via suppression of in vivo NF- κ B, COX-2 and iNOS signaling. **Bioorganic chemistry**, v. 90, 1 set. 2019.
- PINHEIRO, N. M. et al. Acute lung injury is reduced by the α 7nAChR agonist PNU-282987 through changes in the macrophage profile. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1, p. 320–332, 1 jan. 2017.
- PIRAHANCI, Y.; SHARMA, S. Physiology, Bradykinin. **StatPearls**, 7 fev. 2019.
- PIRAHANCI, Y.; SHARMA, S. Physiology, Bradykinin. **StatPearls**, 25 jul. 2022.
- PLATA, R. E.; SINGLETON, D. A. A case study of the mechanism of alcohol-mediated morita baylis-hillman reactions. the importance of experimental observations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 11, p. 3811–3826, 25 mar. 2015.
- POTERE, N. et al. The role of IL-6 and IL-6 blockade in COVID-19. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1919086>, v. 17, n. 6, p. 601–618, 2021.
- PUNSAWAD, C.; VIRIYAVEJAKUL, P.; TECHARANG, T. Surfactant Protein D Is Altered in Experimental Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2019, 2019.
- QADRI, F.; BADER, M. Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1409724>, v. 22, n. 1, p. 31–44, 2 jan. 2017.
- QANDIL, A. M. Prodrugs of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), more than meets the eye: a critical review. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 17244–17274, 2012.
- RABELO SOCCA, E. A. et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: A molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 209, n. 1, p. 48–55, 25

fev. 2014.

RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. **JAMA**, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 13 jun. 2012.

RATAN, Z. A. et al. Overview of inflammation. **Recent Advancements in Microbial Diversity: Macrophages and their Role in Inflammation**, p. 29–51, 1 jan. 2022.

RODRIGUES BERNARDO, L. et al. Milonine Protects Against Acute Lung Injury By Modulating The Akt And NF- κ B Signaling Pathway. 2021a.

RODRIGUES BERNARDO, L. et al. Milonine Protects Against Acute Lung Injury By Modulating The Akt And NF- κ B Signaling Pathway. 2021b.

RODRIGUES, C. H. P. et al. In silico Evaluation of Cucurbit [6] uril as a Potential Detector for Cocaine and Its Adulterants Lidocaine, Caffeine, and Procaine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 800–810, 2021.

ROE, K. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 2, p. e12970, 1 fev. 2021.

ROTTA, A. T. et al. Progress and perspectives in pediatric acute respiratory distress syndrome. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 27, n. 3, p. 266–273, 1 jul. 2015.

ROUMIER, A.; BÉCHADE, C.; MAROTEAUX, L. Serotonin and the Immune System. **Serotonin: The Mediator that Spans Evolution**, p. 181–196, 1 jan. 2019.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Structural and Chemical Biology of the Interaction of Cyclooxygenase with Substrates and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 15, p. 7592–7641, 12 ago. 2020.

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

SANLIER, N.; BEKTESOGLU, M. Migraine and Biogenic Amines. **Ann Med Health Sci Res**, v. 11, p. 1362–1371, 2021.

SANTIAGO, R. F. et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p. 2203–2215, 1 dez. 2015.

SARKAR, S. M. et al. Enantio- and stereoselective route to the phoslactomycin family of antibiotics: formal synthesis of (+)-fostriecin and (+)-phoslactomycin B. **Chemical Communications**, n. 39, p. 5907–5909, 29 set. 2009.

SCHLOSSER, J.; RAREY, M. Beyond the Virtual Screening Paradigm: Structure-Based Searching for New Lead Compounds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 4, p. 800–809, abr. 2009.

SCOTT, A. M. et al. The association between cumulative dose of inhaled bronchodilators and mortality in patients with severe ARDS. 2021.

SCOTTI, L. et al. Molecular physicochemical parameters predicting antioxidant activity of Brazilian natural products. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 908–913, 2009.

SERHAN, C. N. et al. Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, 2015.

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2 jul. 2018.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 3, p. 561–574, 1 mar. 2015.

SHAW, T. D.; MCAULEY, D. F.; O'KANE, C. M. Emerging drugs for treating the acute respiratory distress syndrome. <https://doi.org/10.1080/14728214.2019.1591369>, v. 24, n. 1, p. 29–41, 2 jan. 2019.

SHI, Y. et al. Aerobic Exercise Attenuates Acute Lung Injury Through NET Inhibition. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 409, 19 mar. 2020.

SILVA, L. R. et al. Milonine, a Morphinandienone Alkaloid, Has Anti-Inflammatory and Analgesic Effects by Inhibiting TNF- α and IL-1 β Production. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2074–2085, 11 dez. 2017.

SINNIAH, A. et al. The role of the Annexin-A1/FPR2 system in the regulation of mast cell degranulation provoked by compound 48/80 and in the inhibitory action of nedocromil. **International Immunopharmacology**, v. 32, p. 87–95, 1 mar. 2016.

SIVAGURU, P. et al. Cleavage of carbon–carbon bonds by radical reactions. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 9, p. 2615–2656, 7 maio 2019.

SONG, D. et al. Salidroside attenuates acute lung injury via inhibition of inflammatory cytokine production. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 111949, 1 out. 2021.

SONG, D. et al. PTP1B inhibitors protect against acute lung injury and regulate CXCR4 signaling in neutrophils. **JCI Insight**, v. 7, n. 14, 22 jul. 2022.

SOUSA, G. O. et al. Epidemiological evolution of COVID-19 in Brazil and worldwide. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e630974653–e630974653, 29 maio 2020.

SOUZA, T. N. et al. Local administration of p-coumaric acid decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: In vitro and in silico studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 897, p. 173929, 15 abr. 2021.

SUESS, C.; HAUSMANN, R. Gross and histopathological pulmonary findings in a COVID-19 associated death during self-isolation. **International Journal of Legal Medicine**, v. 134, n. 4, p. 1285–1290, 1 jul. 2020.

SUN, S. C.; CHANG, J. H.; JIN, J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. **Trends in immunology**, v. 34, n. 6, p. 282–289, jun. 2013.

SWATHI, K.; SRINIVAS, A.; SARANGAPANI, M. Design, synthesis and biological evaluation of 5-[2(3)-dialkylamino alkoxy] indole 2,3-diones as new antihistamine agents. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 2, n. 2, p. 220–225, 2010.

SYAM, S. et al. β Mangostin suppress LPS-induced inflammatory response in RAW

264.7 macrophages in vitro and carrageenan-induced peritonitis in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 435–445, 28 abr. 2014.

TACHIBANA, T. et al. Physiological responses to central and peripheral injections of compound 48/80 and histamine in chicks. **Physiology & behavior**, v. 211, 1 nov. 2019.

TAMADDONFARD, E.; FARSHID, A.; HOSSEINI, L. Crocin alleviates the local paw edema induced by histamine in rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, 2012.

TEAM, T. N. C. P. E. R. E. The Epidemiological Characteristics of an Outbreak of 2019 Novel Coronavirus Diseases (COVID-19) — China, 2020. **China CDC Weekly**, v. 2, n. 8, p. 113, 2 fev. 2020.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315–3321, 2006.

THOMSON, A. W.; FOWLER, E. F. Carrageenan: a review of its effects on the immune system. **Agents and actions**, v. 11, n. 3, p. 265–273, 1981.

TOMAZINI, B. M. et al. Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 324, n. 13, p. 1307–1316, 2020.

TONGYOO, S. et al. Hydrocortisone treatment in early sepsis-associated acute respiratory distress syndrome: results of a randomized controlled trial. **Critical care (London, England)**, v. 20, n. 1, 15 out. 2016.

TSUGE, K. et al. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E₂-exacerbated inflammation and immune diseases. **International Immunology**, v. 31, n. 9, p. 597–606, 23 ago. 2019.

TULOTTA, C.; OTTEWELL, P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. **Endocrine-related cancer**, v. 25, n. 7, p. R421–R434, 1 jul. 2018.

UMBRELLO, M. et al. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 1, 1 jan. 2016.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. **Trends in immunology**, v. 32, n. 3, p. 110–116, mar. 2011.

VAN DEN BUUSE, M. et al. Importance of animal models in schizophrenia research. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 39, p. 550–557, 2005.

VARELA, M. L. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115–1127, 1 ago. 2018.

VARUN; SONAM; KAKKAR, R. Isatin and its derivatives: a survey of recent syntheses, reactions, and applications. **MedChemComm**, v. 10, n. 3, p. 351, 3 mar. 2019.

VIJAYAKUMAR, B. G. et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel

coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020.

VILLAR, J. et al. The ALIEN study: Incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1932–1941, 14 out. 2011.

VILLAR, J.; ZHANG, H.; SLUTSKY, A. S. Lung Repair and Regeneration in ARDS: Role of PECAM1 and Wnt Signaling. **Chest**, v. 155, n. 3, p. 587–594, 1 mar. 2019.

WANG, B. et al. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

WANG, J. et al. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- κ B pathway. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2085–2090, 1 dez. 2014.

WANG, T. et al. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, 1 ago. 2019.

WANG, X. et al. Palladium-Catalyzed Asymmetric Allylic Allylation of Racemic Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 4, p. 1116–1119, 19 jan. 2017.

WU, H. et al. Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity. **Pharmacological Research**, v. 140, p. 100–114, 1 fev. 2019.

XIE, P.; HUANG, Y. Morita–Baylis–Hillman adduct derivatives (MBHADs): versatile reactivity in Lewis base-promoted annulation. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 32, p. 8578–8595, 5 ago. 2015.

XU, Z. et al. Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 2, p. 159–167, 1 fev. 2017.

YANG, M. L. et al. IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 6 mar. 2017.

YANG, S. C. et al. Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome. **Biomedical Journal**, v. 44, n. 4, p. 439–446, 1 ago. 2021.

YAQINUDDIN, A.; KASHIR, J. Novel therapeutic targets for SARS-CoV-2-induced acute lung injury: Targeting a potential IL-1 β /neutrophil extracellular traps feedback loop. **Medical Hypotheses**, v. 143, p. 109906, 1 out. 2020.

YASMEN, N. et al. Transient inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 after status epilepticus blunts brain inflammation and is neuroprotective. **Molecular Brain**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 25 jan. 2023.

YNDROME, S.; ETWORK, N. The New England Journal of Medicine VENTILATION WITH LOWER TIDAL VOLUMES AS COMPARED WITH TRADITIONAL TIDAL VOLUMES FOR ACUTE LUNG INJURY AND THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME A BSTRACT Background Traditional approaches to mechanical. v. 342, p. 1301, 2000.

YOSHIDA, T. et al. Impact of spontaneous breathing during mechanical ventilation in

acute respiratory distress syndrome. **Current opinion in critical care**, v. 25, n. 2, p. 192–198, 1 abr. 2019.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 2346, v. 21, n. 7, p. 2346, 28 mar. 2020.

ZADEH-ARDABILI, P. M.; RAD, S. K. Anti-pain and anti-inflammation like effects of Neptune krill oil and fish oil against carrageenan induced inflammation in mice models: Current statues and pilot study. **Biotechnology Reports**, v. 22, p. e00341, 1 jun. 2019.

ZEESHAN, S. et al. N-Pyrazoloyl and N-thiopheneacetyl hydrazone of isatin exhibited potent anti-inflammatory and anti-nociceptive properties through suppression of NF- κ B, MAPK and oxidative stress signaling in animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 68, n. 7, p. 613–632, 1 jul. 2019.

ZENG, W. J. et al. Topical delivery of l-theanine ameliorates TPA-induced acute skin inflammation via downregulating endothelial PECAM-1 and neutrophil infiltration and activation. **Chemico-biological interactions**, v. 284, p. 69–79, 25 mar. 2018.

ZHANG, J. et al. HMGB1-TLR4 signaling participates in renal ischemia reperfusion injury and could be attenuated by dexamethasone-mediated inhibition of the ERK/NF- κ B pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 10, p. 4054, 2016.

ZHANG, L.; WANG, C. C. Inflammatory response of macrophages in infection. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v. 13, n. 2, p. 138–152, 15 abr. 2014.

ZHAO, Y. FAN et al. TNF- α - mediated peripheral and central inflammation are associated with increased incidence of PND in acute postoperative pain. **BMC anesthesiology**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

ZHOU, G. et al. Ascorbate protects against vascular leakage in cecal ligation and puncture-induced septic peritonitis. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 302, n. 4, fev. 2012.

ZHOU, X.; DAI, Q.; HUANG, X. Neutrophils in acute lung injury. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, n. 6, p. 2278–2283, 1 jun. 2011.

ZIACA, M.; EXADAKTYLOS, A. ARDS associated acute brain injury: from the lung to the brain. **European Journal of Medical Research** 2022 27:1, v. 27, n. 1, p. 1–11, 13 ago. 2022.

ZINDEL, J.; KUBES, P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annual review of pathology**, v. 15, p. 493–518, 24 jan. 2020.

ANEXOS

1. Certificado CEUA

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

João Pessoa, 14 de julho de 2023



Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



Profa. Dra. Glúcia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco III Prédio da Reitoria - Gabinete da Vice-reitoria - CEP 58051-085 - João Pessoa/PB - tel: 55 (83) 3216-7155
Horário de atendimento: 2ª a 6ª das 14 às 17h - e-mail: ceua@ufpb.br
CEUA N 7316150420



2. Produção Científica durante o Mestrado

- Artigos Científicos Publicados

“Curine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Downregulating the TLR4/MD-2/NF- κ B(p65) Signaling Pathway”. Larissa A. M. Paiva Ferreira, Láercia K. D. Paiva Ferreira, Talissa M. Monteiro, Francisco A. A. F. Gadelha, **Louise M. de Lima**, Mayara dos Santos Maia, Marcus Tullius Scotti, Jaime Ribeiro-Filho, Celidarque da S. Dias, Marcia Regina Piuvezam. Revista Brasileira de Farmacognosia (V.32, p.111–121, 2022). doi: 10.1007/s43450-022-00230-4.

Revista Brasileira de Farmacognosia (2022) 32:111–121
<https://doi.org/10.1007/s43450-022-00230-4>

ORIGINAL ARTICLE



Curine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Downregulating the TLR4/MD-2/NF- κ B(p65) Signaling Pathway

Larissa A. M. Paiva Ferreira¹ · Laércia K. D. Paiva Ferreira¹ · Talissa M. Monteiro¹ · Francisco A. A. F. Gadelha¹ · Louise M. de Lima¹ · Mayara dos Santos Maia² · Marcus Tullius Scotti² · Jaime Ribeiro-Filho³ · Celidarque da S. Dias⁴ · Marcia Regina Piuvezam¹

Received: 7 September 2021 / Accepted: 3 January 2022 / Published online: 28 January 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2022

“Milonine attenuates the lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by modulating the Akt/NF- κ B signaling pathways”. Larissa R. Bernardo, Laércia Karla D. P. Ferreira, Larissa A. M. P. Ferreira, Cosmo Isaías D. Vieira, João Batista de Oliveira, **Louise M. de Lima**, Adriano Francisco Alves, Rubens S. Araújo, Mayara S. Maia, Marcus T. Scotti, José Maria Barbosa Filho, Marcia Regina Piuvezam. Annals of the Brazilian Academy of Sciences (V. 94, p. 94, 2022). doi: 10.1590/0001-3765202220211327.



An Acad Bras Cienc (2022) 94(Suppl. 4): e20211327 DOI 10.1590/0001-3765202220211327
Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

HEALTH SCIENCES

Milonine attenuates the lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by modulating the Akt/NF- κ B signaling pathways

LARISSA R. BERNARDO, LAÉRCIA KARLA D.P. FERREIRA, LARISSA A.M.P. FERREIRA, COSMO ISAÍAS D. VIEIRA, JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA, LOUISE M. DE LIMA, ADRIANO FRANCISCO ALVES, RUBENS S. ARAÚJO, MAYARA S. MAIA, MARCUS T. SCOTTI, JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO & MARCIA REGINA PIUVEZAM

“Biological Activities of Morita-Baylis-Hillman Adducts (MBHA)”. Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, **Louise Manguiera de Lima**, Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Larissa Rodrigues Bernardo, Aleff Castro, Cláudio Gabriel Lima Júnior, Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, Marcia Regina Piuvezam. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry (V. 23, n. 17, p. 1691-1710, 2023). doi: 10.2174/1389557523666230202103719.

Biological Activities of Morita-Baylis-Hillman Adducts (MBHA)

Author(s): Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira ^{ID}, Louise Manguiera de Lima ^{ID}, Laercia Karla Diega Paiva Ferreira ^{ID}, Larissa Rodrigues Bernardo ^{ID}, Aleff Castro, Claudio Gabriel Lima Junior, Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos ^{ID} and Marcia Regina Piuvezam* ^{ID}

“Fisiopatologia e modelos murinos de Rinossinusite Crônica com Pólipos Nasais (RSCcPN), uma revisão”. Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Louise Manguiera de Lima, João Batista de Oliveira, Cosmo Isaías Duvirgens Vieira, Larissa Rodrigues Bernardo, Marcia Regina Piuvezam. Brazilian Journal of Development (V. 8, n. 9, p. 63781-63794, 2022). doi: 10.34117/bjdv8n9-224.



Brazilian Journal of Development | 63781
ISSN: 2525-8761

Fisiopatologia e modelos murinos de Rinossinusite Crônica com Pólipos Nasais (RSCcPN), uma revisão

Pathophysiology and murine models of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (CRScPN), a review

DOI:10.34117/bjdv8n9-224

- **Capítulos de Livros com ISBN Publicados**

“AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA DEXAMETASONA EM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS (CARAS) NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA”. Louise Manguiera de LIMA, João Batista de OLIVEIRA, Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA, Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA, Marcia Regina PIUVEZAM. Farmácia: os desafios do novo cenário (p. 23-44) ISBN: 978-65-89069-21-8.

AValiação DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA
DEXAMETASONA EM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA
ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS (CARAS) NO
LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA

CAPÍTULO 13

AValiação DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA DEXAMETASONA EM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS (CARAS) NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Louise Manguiera de LIMA ¹

João Batista de OLIVEIRA ¹

Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA ¹

Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA ^{2,3}

Marcia Regina PIUVEZAM ⁴

¹ Pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos (PGPNBS), UFPB; ² Pós-Doutoranda do PGPNBS, UFPB; ³ Professora Substituta da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural em Patos, UFCG; ⁴ Orientadora/ Professora no PGPNBS, UFPB.
louisemanguiera123@gmail.com
mrpiuvezam@tif.ufpb.br

“LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO – AVALIAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO EXPERIMENTAL”. João Batista de OLIVEIRA, Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA, **Louise Manguiera de LIMA**, Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA, Marcia Regina PIUVEZAM. Farmácia: os desafios do novo cenário (p. 67-86) ISBN: 978-65-89069-21-8.

LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO –
AVALIAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DAS CITOCINAS PRÓ-
INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 15

LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO – AVALIAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO EXPERIMENTAL

João Batista de OLIVEIRA ¹

Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA ¹

Louise Manguiera de LIMA ¹

Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA ²

Márcia Regina PIUVEZAM ³

¹ Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos (PPgPNBS / UFPB); ² Pós doutoranda do PPgPNBS / UFPB; Professora substituta da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural em Patos, UFCG; ³ Orientadora/Professora Titular do PPgPNBS / UFPB.
jbo@academico.ufpb.br

“RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO”. Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA, Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA, **Louise Manguiera de LIMA**, Larissa Rodrigues BERNARDO, Marcia Regina PIUVEZAM. Farmácia: os desafios do novo cenário (p. 87-106) ISBN: 978-65-89069-21-8.

RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA
REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN*
VIVO E *IN VITRO*

CAPÍTULO 16

RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA ^{1,2}

Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA ³

Louise Mangueira de LIMA ³

Larissa Rodrigues BERNARDO ⁴

Marcia Regina PIUVEZAM ⁵

¹ Pós-graduanda do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos (PgPNSB), UFPB; ² Professora substituta da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural em Patos, UFCG; ³ Pós-graduandas do PgPNSB, UFPB; ⁴ Pós-graduanda do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos (DITM), UFPB; ⁵ Orientadora/Professora no PgPNSB e DITM, UFPB.

laerciapaiva@gmail.com

“EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA”. Larissa Rodrigues BERNARDO, Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA, **Louise Mangueira de LIMA**, Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA, Marcia Regina PIUVEZAM. Ciências Naturais e Exatas: os desafios do novo cenário (p. 119-137). ISBN: 978-65-89069-28-7.

EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA

CAPÍTULO 6

EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA

Larissa Rodrigues BERNARDO ¹

Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA ²

Louise Mangueira de LIMA ²

Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA ²

Marcia Regina PIUVEZAM ³

¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM/UFPB); ² Pós-graduandos no Programa em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPNSB/UFPB); ³ Orientadora/Professora no DITM e PPNSB.

rs.larissa@hotmail.com
mrpiuvezam@lft.ufpb.br

- **Anais Científicos Publicados**

“MILONINE PROTECTS AGAINST ACUTE LUNG INJURY BY MODULATING THE AKT AND NF-KB SIGNALING PATHWAY”. Larissa Rodrigues Bernardo, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Cosmo Isaías Duvirgens Vieira, João Batista de Oliveira, **Louise Mangueira de Lima**, Adriano Francisco Alves, Rubens da Silva Araújo, Mayara dos Santos Maia, Marcus Tullius Scotti, José Maria Barbosa Filho, Marcia Regina Piuvezam. 45th Annual Meeting of The Brazilian Society for Immunology, 2022.



IMMUNO 2021

45TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY
SEPTEMBER 26-28, 2021 | ONLINE

We hereby certify that the abstract entitled "**MILONINE PROTECTS AGAINST ACUTE LUNG INJURY BY MODULATING THE AKT AND NF-KB SIGNALING PATHWAY**" by authors "LARISSA RODRIGUES BERNARDO; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; ADRIANO FRANCISCO ALVES; RUBENS DA SILVA ARAÚJO; MAYARA DOS SANTOS MAIA; MARCUS TULLIUS SCOTTI; JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO; MARCIA REGINA PIUEZAM. UFPB, JOÃO PESSOA - PB - BRASIL. " was presented during the XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, *On-line*, from September 26th to 28th, 2021.

"GAMMA-TERPINENE, AN ESSENTIAL OIL, INHIBITS P38/NF-KB SIGNALING PATHWAY BY SUPPRESSING TLR4 IN A MURINE MODEL OF ACUTE LUNG INJURY". Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Talissa Mozzini Monteiro, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Larissa Rodrigues Bernardo, **Louise Manguiera de Lima**, João Batista de Oliveira, Cosmo Isaías Duvirgens Vieira, Marcia Regina Piuvezam. 45th Annual Meeting of The Brazilian Society for Immunology, 2022.



IMMUNO 2021

45TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY
SEPTEMBER 26-28, 2021 | ONLINE

We hereby certify that the abstract entitled "**GAMMA-TERPINENE, AN ESSENTIAL OIL, INHIBITS P38 / NF-KB SIGNALING PATHWAY BY SUPPRESSING TLR4 IN A MURINE MODEL OF ACUTE LUNG INJURY**" by authors "LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; TALISSA MOZZINI MONTEIRO; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; LARISSA RODRIGUES BERNARDO; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA; MARCIA REGINA PIUEZAM. UFPB, JOÃO PESSOA - PB - BRASIL. " was presented during the XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, *On-line*, from September 26th to 28th, 2021.

"MHTP, A SYNTHETIC ALKALOID, MODULATES THE EXPERIMENTAL COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS) BY DOWNREGULATION P38/ERK1/2 MAPK AND NF-KB PATHWAYS IN LYMPHOCYTES". Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Grasiela Costa Bezerra Barros, Talissa Mozzini Monteiro, Luiz A. de Araújo Silva, Luis Cezar Rodrigues, Marcia Regina Piuvezam. 45th Annual Meeting of The Brazilian Society for Immunology, 2022.



IMMUNO 2021

45TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY
SEPTEMBER 26-28, 2021 | ONLINE

We hereby certify that the abstract entitled "**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.**" by authors "LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; GRASIELA COSTA BEZERRA BARROS; TALISSA MOZZINI MONTEIRO; LUIZ A. DE ARAÚJO SILVA; LARISSA RODRIGUES BERNARDO; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; ADRIANO FRANCISCO ALVES; LUIS CEZAR RODRIGUES; MARCIA REGINA PIUVEZAM.

UFPB, JOÃO PESSOA - PB - BRASIL. " was presented during the XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, On-line, from September 26th to 28th, 2021.

- **Apresentações Orais em Congresso Internacional**

"AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA DEXAMETASONA EM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS (CARAS) NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA". Louise Mangueira de LIMA, João Batista de OLIVEIRA, Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA, Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA, Marcia Regina PIUVEZAM. CINASAMA – CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 2021. TRABALHO PREMIADO COMO HONRA AO MÉRITO.

Certificamos que o trabalho intitulado AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA DEXAMETASONA EM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS (CARAS) NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA sob autoria de LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA, LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA, LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM foi apresentado de forma ORAL, na área LIVRO FARMÁCIA – Imunofarmacologia durante o CINASAMA - CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE II Edição on-line, realizado no período de 11/12/2021 à 12/12/2021, e será publicado como capítulo de livro.

"LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO – AVALIAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO EXPERIMENTAL". João Batista de OLIVEIRA, Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA, Louise Mangueira de LIMA, Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA, Marcia Regina PIUVEZAM. CINASAMA – CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 2021.

Certificamos que o trabalho intitulado LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO – AVALIAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MODELO MURINO EXPERIMENTAL sob autoria de JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA, COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM foi apresentado de forma ORAL, na área LIVRO FARMÁCIA – Imunofarmacologia durante o CINASAMA - CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE II Edição on-line, realizado no período de 11/12/2021 à 12/12/2021, e será publicado como capítulo de livro.

“RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO”. Laércio Karla Diega Paiva FERREIRA, Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA, **Louise Mangueira de LIMA**, Larissa Rodrigues BERNARDO, Marcia Regina PIUVEZAM. CINASAMA – CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 2021.

Certificamos que o trabalho intitulado RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO sob autoria de LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, LARISSA RODRIGUES BERNARDO, MARCIA REGINA PIUVEZAM foi apresentado de forma ORAL, na área LIVRO FARMÁCIA – Imunofarmacologia durante o CINASAMA - CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE II Edição on-line, realizado no período de 11/12/2021 à 12/12/2021, e será publicado como capítulo de livro.

“EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA”. Larissa Rodrigues BERNARDO, Larissa Adilis Maria Paiva FERREIRA, **Louise Mangueira de LIMA**, Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA, Marcia Regina PIUVEZAM. CINASAMA – CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE, 2021. TRABALHO PREMIADO COMO HONRA AO MÉRITO.

Certificamos que o trabalho intitulado EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA sob autoria de LARISSA RODRIGUES BERNARDO, LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM foi apresentado de forma ORAL, na área CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - Imunologia durante o CINASAMA - CONGRESSO INTERNACIONAL DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE II Edição on-line, realizado no período de 11/12/2021 à 12/12/2021, e será publicado como capítulo de livro.

- **Patente de Inovação Submetida**

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, Rubens da Silva Araújo, Mayara dos Santos Maia, Marcus Tullius Scotti, José Maria Barbosa Filho Marcia Regina Piuvezam. 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.



22/12/2021 870210119472
12:28
29409161943967597

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

Número do Processo: BR 10 2021 026081 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade: ALCALOIDE PARA O TRATAMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA LESÃO PULMONAR AGUDA

Resumo: A presente invenção refere-se ao uso do alcaloide Milonina para o tratamento da lesão pulmonar aguda (LPA), uma patologia de origem inflamatória que leva a insuficiência respiratória, e reivindica o seu efeito farmacológico nesta doença. A milonina apresentou efeito antiinflamatório através de análises celulares e moleculares em modelo experimental de LPA induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos e, para a predição de alvo molecular, foi realizado estudo in silico. Os resultados mostraram que o tratamento oral com o alcaloide morfínico foram capazes de modular negativamente: o edema pulmonar, a lesão do tecido pulmonar, a infiltração de células inflamatórias no pulmão e a produção de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α no lavado broncoalveolar, e apenas a IL-6 a nível sistêmico. Esse mecanismo protetor de modulação parece estar associado à: inibição das proteínas intracelulares Akt e do fator de nuclear- κ B, que são fatores reguladores de genes para citocinas inflamatórias. Em adição, estudos in silico mostraram que o alcaloide formou interações hidrofóbicas com os aminoácidos Ile124 e Phe126 na cavidade do receptor MD-2 associado ao receptor Toll Like - 4.