



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos



Cosmo Isaias Duvirgens Vieira

Investigação do efeito anti-inflamatório do alcaloide sintético tetrahidroisoquinolínico, o 2, 6-dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolín-1-il) fenol (Di-MTF), em modelos animais de inflamação aguda e estudo *in silico*

João Pessoa – PB
Agosto – 2023



Cosmo Isaías Duvirgens Vieira



PgPNSB

Investigação do efeito anti-inflamatório do alcaloide sintético tetrahidroisoquinolínico, o 2, 6-dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolin-1-il) fenol (Di-MTF), em modelos animais de inflamação aguda e estudo *in silico*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de 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: Profa. Dra. Laércia Karla Diega Paiva Ferreira

**João Pessoa – PB
Agosto – 2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

V658i Vieira, Cosmo Isaias Duvirgens.

Investigação do efeito anti-inflamatório do alcaloide sintético tetrahidroisoquinolínico, o 2, 6-dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolín-1-il) fenol (Di-MTF), em modelos animais de inflamação aguda e estudo in silico / Cosmo Isaias Duvirgens Vieira. - João Pessoa, 2023.
99 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.

Coorientação: Laercia Karla Diega Paiva Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CSS.

1. Anti-inflamatório. 2. Alcaloide. 3. Tetrahidroisoquinolínico. 4. Lesão pulmonar aguda. 5. Estudos in silico. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Ferreira, Laercia Karla Diega Paiva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.276(043)



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências a Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos



Cosmo Isaias Duvirgens Vieira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de 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 22 agosto de 2023

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Marcia Regina Piuvezam – UFPB
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Laércio Karla Diega Paiva Ferreira-UFCG
(Coorientadora)

Prof.^a Dr.^a Tatiana Keesen de Souza Lima Clemente – UFPB

(Examinadora interno)



Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos – UFPB
(Examinador externo)

Dedicatórias

Dedico aos meus pais e toda a minha família.
A vocês eu dedico.

“A tarefa de viver é dura, mas fascinante.”

- Ariano Suassuna

RESUMO

A inflamação é um processo fisiológico desencadeado por células e moléculas de ação local capaz de dissipar o processo infeccioso/agressor e restabelecer a homeostase. Entretanto, se tornar persistente e duradouro, evolui para um estado crônico a exemplo da lesão pulmonar aguda (LPA), acometendo os alvéolos, com infiltrado celular, lesão da barreira alvéolo-capilar e produção de citocinas. A taxa de mortalidade dessa doença é de 40%-60% com ineficaz controle farmacológico. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito anti-inflamatório do alcaloide tetrahidroisoquinolínico, Di-MTF em modelos experimentais de inflamação aguda e estudos *in silico*. Para tal, camundongos fêmeas Swiss pré-tratados com Di-MTF (0,6; 1,25; 2,5mg/kg, via oral) e desafiados, no coxim plantar, com carragenina (CG), prostaglandina (PGE₂), bradicinina (BK), 5 hidroxitriptamina (5HT), composto 48/80 ou histamina para avaliar a atividade anti-edematogênica e, com CG administrado intraperitoneal, avaliar a permeabilidade, migração de células totais e diferenciais e citocinas. Para avaliar a lesão pulmonar aguda, camundongos BALB/c foram desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) e tratados com Di-MTF(1,25mg/kg). Vinte e quatro horas após o desafio, os animais foram eutanasiados, e o lavado broncoalveolar (BALF), sangue e pulmões foram coletados para as análises celulares e moleculares. Para a predição de alvos moleculares e perfil farmacocinético e farmacodinâmico, foram realizados estudos *in silico* utilizando o software ADMET (absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade), HyperChem e Molegro Virtual Docker (MVD). O pré-tratamento com Di-MTF reduziu ($p<0,05$) o edema de pata, a migração de neutrófilos para o peritônio, o extravasamento peritoneal de proteínas e redução de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α). Na LPA experimental o Di-MTF reduziu ($p<0,05$) a migração de leucócitos para o pulmão, principalmente de neutrófilos, fluidos proteicos, edema pulmonar, e as citocinas, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a IL-6 e TNF- α foram reduzidas a nível sistêmico. As lesões histológicas do tecido pulmonar foram atenuadas com o tratamento, tais como infiltrado celulares, edema e hemorragia. Estudos *in silico* de *docking* molecular mostraram que o Di-MTF apresentou melhor interação com p38 MAPK e Toll-like 4 (TLR4), energia de ligação de -66,680 kcal/mol e -37,577 kcal/mol, respectivamente. Seus parâmetros ADMET foram aceitáveis, mostrando segurança e biodisponibilidade. Portanto, concluímos que o Di-MTF exerceu efeito anti-inflamatório por modular parâmetros inflamatórios atrelados a interrupção das vias de sinalização de Toll like 4 (TLR4), p38MAPK. A molécula mostrou-se segura com boa biodisponibilidade sendo uma possível ferramenta farmacológica para o tratamento de inflamações agudas.

Palavras-chaves: Alcaloide tetrahidroisoquinolínico; lesão pulmonar aguda; anti-inflamatório; estudos *in silico*.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological process triggered by cells and molecules of local action capable of dissipating the infectious/aggressor process and restoring homeostasis. However, if it becomes persistent and long-lasting, it evolves into a chronic state such as acute lung injury (ALI), affecting the alveoli, with cell infiltration, damage to the alveolar-capillary barrier and production of cytokines. The mortality rate of this disease is 40%-60% with ineffective pharmacological control. Therefore, the aim of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of the tetrahydroisoquinoline alkaloid, Di-MTF in experimental models of acute inflammation and in silico studies. For this purpose, Swiss female mice were pre-treated with Di-MTF (0.6; 1.25; 2.5mg/kg, orally) and challenged, on the foot pad, with carrageenan (CG), prostaglandin (PGE₂), bradykinin (BK), 5 hydroxytryptamine (5HT), compound 48/80 or histamine to assess anti-edematogenic activity and, with intraperitoneally administered GC, assess permeability, total and differential cell migration, and cytokines. To assess acute lung injury, BALB/c mice were challenged with lipopolysaccharide (LPS) and treated with Di-MTF(1.25mg/kg). Twenty-four hours after the challenge, the animals were euthanized, and bronchoalveolar lavage (BALF), blood and lungs were collected for cellular and molecular analyses. For the prediction of molecular targets and pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, in silico studies were performed using ADMET software (absorption, distribution, metabolism and toxicity), HyperChem and Molegro Virtual Docker (MVD). Pre-treatment with Di-MTF reduced ($p<0.05$) paw edema, migration of neutrophils to the peritoneum, peritoneal extravasation of proteins and reduction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α). In experimental ALI, Di-MTF reduced ($p<0.05$) the migration of leukocytes to the lung, mainly neutrophils, protein fluids, pulmonary edema, and cytokines, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , the IL-6 and TNF- α were reduced at the systemic level. Histological lesions of lung tissue were attenuated with treatment, such as cell infiltrates, edema, and hemorrhage. In silico molecular docking studies showed that Di-MTF showed better interaction with p38 MAPK and Toll-like 4 (TLR4), binding energies of -66.680 kcal/mol and -37.577 kcal/mol, respectively. Its ADMET parameters were acceptable, showing safety and bioavailability. Therefore, we conclude that Di-MTF exerted an anti-inflammatory effect by modulating inflammatory parameters linked to the interruption of Toll-like 4 (TLR4) signaling pathways, p38MAPK. The molecule proved to be safe with good bioavailability, being a possible pharmacological tool for the treatment of acute inflammation.

Keywords: Tetrahydroisoquinoline alkaloid; acute lung injury; anti-inflammatory; in silico studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PÁGINA
Figura 1 –Esquema representativo dos eventos iniciais processo inflamatório.....	25
Figura 2 –Migração de leucócitos (neutrófilos) através dos vasos sanguíneos.....	26
Figura 3 –Formação do núcelo tetrahidroisoquinolínico.....	30
Figura 4 – 2,6dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolin-1-il) fenol (Di-MTF)	31
Figura 5 – Obtenção do Di-MTF pela reação de Pictet–Spengler.....	34
Figura 6 – Parâmetros histopatológicos da região pulmonar.....	57
Figura 7 – Interações entre MAPK p38 e o Di-MTF-A/Dexa-B em 2D e 3D.....	60
Figura 8 - Interações entre Toll-4 e o Di-MTF-A/Dexa-B no formato 2D e 3D.....	61
Figura 9 - Interações entre ERK2 e o Di-MTF-A/Dexa-B em 2D e 3D.....	62
Figura 10 - Interações entre NFkB e o Di-MTF-A/Dexa-B em 2D e 3D.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

PÁGINA

Gráfico 1 – Triagem da dose farmacológica do Di-MTF no modelo de edema de pata induzido por CG	41
Gráfico 2 – Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por PGE ₂	42
Gráfico 3 – Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por Bk.....	43
Gráfico 4 – Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por 5-HT	45
Gráfico 5 – Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por composto 48/80.....	46
Gráfico 6 – Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por histamina.....	47
Gráfico 7 – Efeito do Di-MTF na migração de células inflamatórias para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com CG.....	48
Gráfico 8 – Efeito do Di-MTF na formação de fluido proteico para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com CG.....	49
Gráfico 9 – Efeito do Di-MTF sobre os níveis de citocinas pro-inflamatórias para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com CG.....	50
Gráfico 10 – Efeito do Di-MTF sobre a migração de células total e diferencial para o BALF em modelo experimental lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	51
Gráfico 11 – Efeito do Di-MTF sobre extravasamento de fluido proteico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	53
Gráfico 12 – Efeito do Di-MTF no edema pulmonar via razão úmido/seco (u/s) do pulmão em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	54
Gráfico 13 – Efeito do Di-MTF sobre níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e no soro em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	55

Gráfico 14 – Score histológico do efeito anti-inflamatório do Di-MTF sobre parâmetros histopatológicos da região pulmonar em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	58
---	----

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 —Resultados da energia de ligação por docking molecular.....	59
Tabela 2 — Propriedades farmacocinéticas do Di-MTF.....	64

LISTA DE SIGLAS ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Trifosfato de Adenosina
B1 e B2	Subtipos de receptores da bradicinina
BK	Bradicinina
C	Carbono
Ca²⁺	Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA	Comité de Ética no Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Enzima ciclo-oxigenase
DAG	Diacylglicerol
DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
DC	Célula dendrítica (Dendritic Cell)
e.p.m	Erro Padrão da Média
E.M.P.	Erro Padrão da Média
EPO	Peroxidase Eosinofílica
g	gramas
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
H	Horas
H1	Receptor de Histamina 1
H2	Receptor de Histamina 2
H3	Receptor de Histamina 3
H4	Receptor de Histamina 4
IFNγ	Interferon gama
HE	Hematoxilina-eosina
Hist	Histamina
i.m.	Intramuscular
Ig	Imunoglobulina
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina

IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IP3	Inositol trifosfato
IpeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
Kg	Quilograma
LIMFA	Laboratório de Imunofarmacologia
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC4	Cisteinil leucotrienos
LTD4	Leucotrieno D4
LTs	Leucotrienos
mg	Miligrama
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II
min	minutos
mL	Mililitro
PLC	Fosfolipase C
TCR	Receptor de Célula T
MN	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidase
N	número
NF-kB	Fator de transcrição nuclear-kB
NO	Oxido nítrico
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PGI2	Prostaciclina
PMN	Polimorfonucleares

RPM	Rotações por Minuto
TLR4	Receptor Toll-like 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TSLP	Linfopoetina do estroma tímico
UFPB	Universidade Federal da Paraíba μ L Microlitro
v.i	via intraperitoneal
v.ipl	via intraplantar
v.o	via oral
α	Alfa
β	Beta
γ	gama
δ	Delta
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
LPA	Lesão pulmonar aguda
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
COVID-19	Doença coronavírus 2019
SARS-COV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
IECA II	Enzima conversora da angiotensina II)
Di-MTF	2, 6-dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolin-1-il) fenol
ELISA	Ensaio Imunoenzimático

Observações: As abreviaturas que não constam nesta lista de abreviações estão descritas no texto.

SUMÁRIO

PÁGINA

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICO.....	20
2.1 Reação inflamatória.....	20
2.2 Componentes da inflamação.....	21
2.2.1 Aminas vasoativas: Histamina/Serotonina.....	22
2.2.2 Cinina plasmática: Bradicinina.....	23
2.2.3 Mediador lipídico: Prostaglandina E ₂	24
2.3 Mecanismo celular e molecular da resposta da resposta inflamatória	24
2.4 Lesão Pulmonar Aguda e seus aspectos imunológicos	28
2.5 Alcaloides tetrahydroisoquinolinicos: Di-MTF.....	29
3.OBJETIVOS.....	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos.....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Animais.....	33
4.2 Preparo da solução do Alcaloide Sintético Di-MTF.....	34
4.3 Modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina.....	35
4.4 Modelo experimental de edema de pata induzido por prostaglandina E ₂ (PGE ₂), bradicinina (Bk), serotonina (5-HT), histamina e composto 48/80.....	35
4.5 Modelo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	36
4.6 Modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo(LPS).....	36
4.7 Contagem de células totais e diferenciais no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e no lavado peritoneal.....	36
4.8 Dosagem de proteínas totais do BALF e do lavado peritoneal	37
4.9 Quantificação de citocinas.....	37

4.10 Razão do peso do pulmão úmido/seco.....	37
4.11 Análise histológica do tecido pulmonar	37
4.12 Estudos <i>in sílico</i>	38
4.12.1 Avaliação do Docking molecular.....	38
4.12.2 Predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade (ADMET).....	39
4.13 Análises estatísticas.....	40
5. RESULTADOS	40
5.1 Triagem da dose farmacológica do Di-MTF no modelo de edema de pata induzido por Carragenina.....	40
5.2 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por PGE ₂	42
5.3 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por Bk.....	43
5.4 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por serotonina (5-HT)	44
5.5 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por composto 48/80.....	45
5.6 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por histamina.....	46
5.7 Efeito do Di-MTF na migração de leucócitos para o peritônio no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	47
5.8 Efeito do Di-MTF na formação de fluido proteico para o peritônio no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	48
5.9 Efeito do Di-MTF sobre níveis de citocinas pró-inflamatórias em modelo experimental de peritonite induzida por carragenina.....	49
5.10 Efeito do Di-MTF sobre migração de células total e diferencial em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	51

5.11 Efeito do Di-MTF na permeabilidade pulmonar via extravasamento de fluido proteico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	52
5.12 Efeito do Di-MTF no edema pulmonar via razão úmido/seco (u/s) do pulmão em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS	53
5.13 Efeito do Di-MTF sobre níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e no soro em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS	54
5.14 Efeito do Di-MTF sobre parâmetros histopatológicos da região pulmonar em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	56
5.15 Análise de estudos in silico do Di-MTF sobre interação com proteínas alvos MAPK p38, Toll-like 4 (TLR4), ERK2 e NFkB.....	58
5.16 Predição de propriedade farmacocinética e farmacodinâmica (ADMET).....	64
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS.....	93
ANEXO I: Certificação do CEUA.....	93
ANEXO II: Produção científica (2021-2023)	94

1. INTRODUÇÃO

A reação inflamatória é um processo fisiológico, em organismos vertebrados, induzida por um agente agressor e responsável por eliminar, esse agente agressor, e reparar os possíveis danos teciduais no sentido de restaurar a homeostase (BARTON, 2008; DANTAS et al., 2020).

Os mecanismos desencadeados por esse processo envolvem a resposta imune, que está atrelada a vários sinais e sintomas clínicos, incluindo calor, rubor, edema, dor e até mesmo perda da função (HERGEMOLLER et al., 2016; MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório é classificado, de acordo com complexidade da lesão, como agudo ou crônico. O processo agudo consiste em desenvolver uma resposta inflamatória rápida, entre minutos, horas ou até mesmo dias, associado a alterações vasculares e celulares. Enquanto o processo crônico é duradouro, com presença de leucócitos e ocorre angiogênese, fibrose e destruição tecidual (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2020; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Nos processos inflamatórios infecciosos ocorrem a liberação de autacóides, substâncias de estruturas químicas e atividades diversas à exemplos da histamina, das cininas, dos eicosanóides, da serotonina e do óxido nítrico, que de maneira sinérgica induzem o aparecimento dos quatro sinais cardinais clássicos da inflamação, dor, calor, rubor e tumor ou edema (BRUNA et al., 2018; SOUZA, 2018). Quando esses mecanismos exacerbam, o organismo entra em diversos estados patológicos, tendo como exemplo a lesão pulmonar aguda (LPA).

A LPA em estágio mais avançado é conhecida como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), uma doença inflamatória, que afeta a região alveolar provocando recrutamento de leucócitos, produção de mediadores inflamatórios, lesão da barreira alvéolo-capilar, formação de edema pulmonar e comprometimento da hematose. A LPA/SDRA pode ser desenvolvida por estímulos pulmonares diretas e indiretas que incluem infecções bacterianas, virais ou fúngicas, ademais inalação de fumaças tóxicas, hemorragia alveolar e até mesmo sepse.

A taxa de mortalidade dessa doença é de 40%-60% com ineficaz controle

farmacológico, pois os medicamentos vêm provocando vários efeitos colaterais, esses tais efeitos instigam a busca de novas moléculas mais eficazes de fontes vegetais ou sintéticas que sejam promissoras para o tratamento da LPA que promovam menos efeitos colaterais e menos toxicidade.

Nesse sentido, podemos destacar os alcaloides, que podem ser classificados de acordo com sua rota metabólica, a exemplo dos alcaloides tetrahydroisoquinolínicos (HAGEL; FACCHINI, 2013a). Estes apresentam diversos caminhos metabólicos que se destinam a uma série de estruturas diferentes, o que molda para síntese orgânica de novas moléculas análogas.

Na literatura foi visto que o alcaloide tetrahydroisoquinolínico sintético, o MHTP, exibiu atividade anti-inflamatória aguda no modelo experimental de peritonite induzido por carragenina, em que foi capaz de reduzir a migração de leucócitos, assim como também a produção de citocinas pró-inflamatórias (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015b).

O efeito imunomodulador do MHTP foi observado quando administrado via instalação nasal, em modelo experimental pulmonar alérgica, o alcaloide sintético foi capaz de inibir a migração de células inflamatórias, bem como a produção de citocinas e muco, parâmetros esses responsáveis por ocasionarem o dano tecidual pulmonar (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Além disso, pesquisas desenvolvidas no laboratório de imunofarmacologia/UFPB, outros alcaloides exerceram atividade farmacológica significativa no tratamento da lesão pulmonar aguda e na inflamação alérgica das vias respiratórias, por exibir diminuição: na migração de neutrófilos para região alvéolo-capilar, produção de citocinas pro-inflamatória, tais como TNF-e IL-6; redução da IL-13 e eosinófilos no tecido pulmonar; infiltração de células inflamatórias na cavidade nasal e IgE (BEZERRA-SANTOS et al., 2012; DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019b; VIEIRA et al., 2018).

O presente estudo se justifica através dos efeitos biológicos pelos alcaloides mencionados acima, e a crescente busca por novas moléculas com efeito anti-inflamatório eficaz, que apresente baixa toxicidade, isso torna crucial a investigação. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tratamento oral com o alcaloide sintético inédito tetrahydroisoquinolínico, Di-MTF,

em modelos inflamatórios agudos de murinos e estudos *in silico* (Docking molecular e predição de propriedades farmacocinéticas)

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO

2.1 Reação inflamatória

Os eventos inflamatórios englobam uma variedade de mecanismos fisiológicos e patológicos, conduzido por moléculas e células do sistema imunológico (ALVES et al., 2017; MEDZHITOV, 2008). Uma vez a inflamação desenvolvida no organismo, o indivíduo apresenta as manifestações clínicas, isto é, os sinais cardinais clássicos da inflamação: calor, rubor (decorrentes de uma vasodilatação), edema (saída de células e fluido do vaso para o interstício), dor (estimulação dos nervos terminais por mediadores) e até mesmo perda da função (estimulação dos nervos terminais por mediadores) (HERGEMOLLER et al., 2016). As quatro primeiras características clínicas foram propostas pelo médico romano Cornelius Celsus no século I. E somente no século XIX, o último sinal cardinal foi apontado no livro *Cellular Pathologie* por Rudolf Virchow (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015; MEDZHITOV, 2008).

Dependendo do estímulo e efetividade da lesão, as reações inflamatórias podem ser compreendidas em: agudas ou crônicas. A inflamação aguda é caracterizada por uma resposta rápida, com permanência de minutos, horas ou até mesmo dias com alterações vasculares (vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular) e celulares (recrutamento de leucócitos para o sítio inflamado) (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2020; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Entretanto, a inflamação crônica é duradoura, com presença dos linfócitos, macrófagos, atrelada pela ocorrência da angiogênese, fibrose e destruição tecidual (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015; LEITE et al., 2016).

A inflamação, portanto, é considerada uma resposta benéfica, mediada inicialmente pela imunidade inata, cuja principal função é a eliminação de agente nocivo e reparo de danos teciduais (MEDZHITOV, 2008; SILVA et al., 2017). Todavia, essa resposta protetora, quando persistente e duradoura, torna-se

prejudicial e evolui para um estágio crônico podendo ocasionar diversos estados doentios. Para que isto não se estabeleça, é importante intervir ou regular o processo inflamatório, por bloqueio das alterações celulares e vasculares que acontecem, pois são eventos cruciais para reação inflamatória (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015b).

2.2 Componentes da inflamação

A reação inflamatória se desenvolve por meio da indução, regulação e resolução, com objetivo de dissipar o agente agressor e restabelecer a homeostase (ROBB et al., 2016).

A inflamação é orquestrada por, no mínimo, quatro componentes tais como: os indutores, sensores, mediadores e tecidos-alvos. Os indutores inflamatórios são moléculas sinais responsáveis por excitar o processo, sendo detectáveis pelos receptores celulares. São representados pelos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), fatores de virulência, fatores de origem não microbiana e padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) (FARZAEI et al., 2019; MEDZHITOV, 2008).

Os sensores celulares, ou melhor, receptores estão presentes em células do sistema imune, tal como macrófagos, células dendríticas e mastócitos que irão reconhecer os padrões moleculares e em seguida produzir uma rede de interações biológicas (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2020; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

Dependendo da natureza, da molécula sinal e do receptor, a resposta inflamatória é conduzida por vias de transdução de sinal, que afetarão o efeito biológico (ZULIANI-ALVAREZ et al., 2017). Por exemplo, após uma invasão por bactéria gram negativa, o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede destas, é detectado pelo receptor do tipo Toll-4 (*Toll-like receptor 4* - TLR4) do sistema imune inato e, sua ativação culminará na ativação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), que transcreverá genes que promoverão a síntese de mediadores pró-inflamatórios, especialmente fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 (IL1- β) e a interleucina-6 (IL-6) (ALAM et al., 2019; BARTON,

2008; YANG et al., 2019). Essas citocinas atuarão em tecidos alvos, como vasos sanguíneos, promovendo vasodilatação, extravasamento de líquido e proteínas plasmáticas, bem como migração de leucócitos, principalmente neutrófilos para o sítio inflamado (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

Em contrapartida, nas infecções por vírus RNA, este é detectável pelos receptores Toll-like (TLR8 e TLR9), e sua ligação ativam fatores de transcrição (as proteínas IRF) que estimulam a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015; KURODA et al., 2020; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015; WANG et al., 2018).

As substâncias relacionadas aos processos inflamatórios são, geralmente, sintetizadas a partir de proteínas do sangue e células imune, estando disponíveis em diferentes fases, como pré-formadas (armazenadas em grânulos) e precursores inativos (DANTAS et al., 2020). Entretanto, é sua organização bioquímica que definirá sua categoria. Por essa razão são ordenados em oito grupos, isto é, as aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos do complemento, mediadores lipídicos, citocinas inflamatórias, quimiocinas, enzimas proteolíticas e, por último, o óxido nítrico (MEDZHITOV, 2008; OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016a; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015b).

2.2.1 Aminas vasoativas: Histamina/ Serotonina

As aminas vasoativas representadas pela histamina e serotonina são produzidas e liberadas via degranulação mastocitária, podem causar vários efeitos dependendo do organismo (VALENZUELA; FLORES, 2021).

A histamina é uma amina biogênica derivada do aminoácido histidina que sofre ação da L-histidina descarboxilase (LIEBERMAN; GARVEY, 2016; THANGAM et al., 2018). Encontrada em vários tecidos do organismo, essa é liberada em segundos ou minutos em resposta a diversos estímulos, como farmacológico, imunológico e mecânico (CHURCH, 2017). A histamina é um potente mediador para o desenvolvimento das reações inflamatórias alérgicas, pois medeia vários processos fisiológicos e patológicos, atuando nos vasos,

promovendo aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou constrição (GARCÍA-POSADAS et al., 2018).

Esses efeitos biológicos ocorrem via seus receptores membranares (H1, H2, H3 H4), nos quais são acoplados à proteína G (receptores acoplados a proteína G, GPCRs) (CRIADO et al., 2010; GROSICKI et al., 2020). O receptor H1, uma vez ativo, desempenha um papel primordial para o desenvolvimento dos sintomas alérgicos, como a rinorreia, broncoespasmo e contração da musculatura lisa (KURIHARA et al., 2020; OHSAWA; HIRASAWA, 2014). Em adição, existem substâncias sintéticas ativadoras de mastócitos, como o composto 48/80. Essa molécula medeia a liberação de histamina via mastócito pelo processo de degranulação (CHURCH, 2017; CHURCH et al., 2022). Após o organismo entrar em contato com essa substância, um dos sinais clínicos são ardor, prurido e vermelhidão, podendo desenvolver uma reação sistêmica. Esse agente indutor é utilizado em modelos experimentais, auxiliando na busca de novas substâncias anti-histamínicas (LEE; LIM, 2010; PATON, 1951; TACHIBANA et al., 2019).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) também é uma amina biogênica, na qual sua estrutura química é semelhante à epinefrina, à norepinefrina, à dopamina e à histamina (ARAGONÈS, 2020; LÓPEZ-ECHEVERRI et al., 2023). Além disso, participa como um neurotransmissor no sistema nervoso central atuando na regulação da emoção, sono, temperatura e processos do controle comportamental (SANZ SEGURA et al., 2019).

No que tange à inflamação, é um dos mediadores inflamatórios liberado no sítio inflamado, indutor de edema (AYERS; WALJEE; SAINI, 2014). Quando liberada por células inflamatórias, a 5-HT, atua em diversos estágios do processo inflamatório, como nas alterações vasculares, com aumento da permeabilidade e promove direta ou indiretamente o recrutamento de leucócitos (RETAMAL et al., 2021). Os receptores serotoninérgicos, tais como 5HT-1 e 5-HT-3, foram descritos por estarem associados à modulação da degranulação de mastócitos (FLANAGAN et al., 2019; SZABO et al., 2018).

2.2.2 Cinina plasmática: Bradicinina

As bradicininas são peptídeos presentes no tecido e no sangue na configuração inativa. Para sua ativação, é necessário, por exemplo, um dano tecidual que irá resultar em uma série de reações proteolíticas (NATARAJAN; NORTHROP; YAMAMOTO, 2015).

Por sua vez, a bradicinina é um mediador inflamatório que está envolvido no sistema das cininas plasmáticas. Ela tem ação pró-inflamatória, além de estabelecer vasodilatação, aumento da permeabilidade, alterações celulares e entre outros atributos (MONDRAGÓN-HERRERA et al., 2022; TELLÍ; KAZKAYASI; UMA, 2021).

Sua ação é estabelecida via ativação dos receptores B1 e B2 acopladas à proteína G contidas nas células endoteliais. O receptor do tipo B1 pode estar mais envolvido na formação e na manutenção dos sinais cardinais da inflamação aguda (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016a).

Nesse caso, quando a bradicinina se liga ao receptor B1, que está acoplado às proteínas Gi/o no endotélio dos vasos, o complexo Bradicinina-B1 leva à ativação das proteínas Gi/o, que após trocar o GDP por GTP se dissociam em dímero Gi/o-βY, que diretamente ativa a fosfolipase A₂ (CARVALHO, 2019; XU et al., 2020).

Uma vez ativada, a proteína converterá o fosfolípido de membrana (forma esterificada) em ácido araquidônico (AA). Então, o AA é convertido em um produto intermediário denominado PGH₂ (prostaglandinas) pelas cicloxigenases (COX). Nessa situação, a PGH₂ é convertida pela prostaglandina sintase em PGE₂, que é indutora da dor, da febre e da inflamação (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

2.2.3 Mediador lipídico: Prostaglandina E₂

A prostaglandina da série E₂ (PGE₂) pertence à família dos eicosanoides, proveniente da metabolização do ácido araquidônico, onde está esterificado nas membranas das células, e é liberado para citosol por meio da PLA₂ (fosfolipase A₂ não esterificada) (ORTIZ et al., 2016). No citosol sofre ação das cicloxigenases (COXs) que catalisam duas reações sequenciais, assim a PGE₂ é gerada a partir do intermediário PGH₂ sob ação da enzima PGES

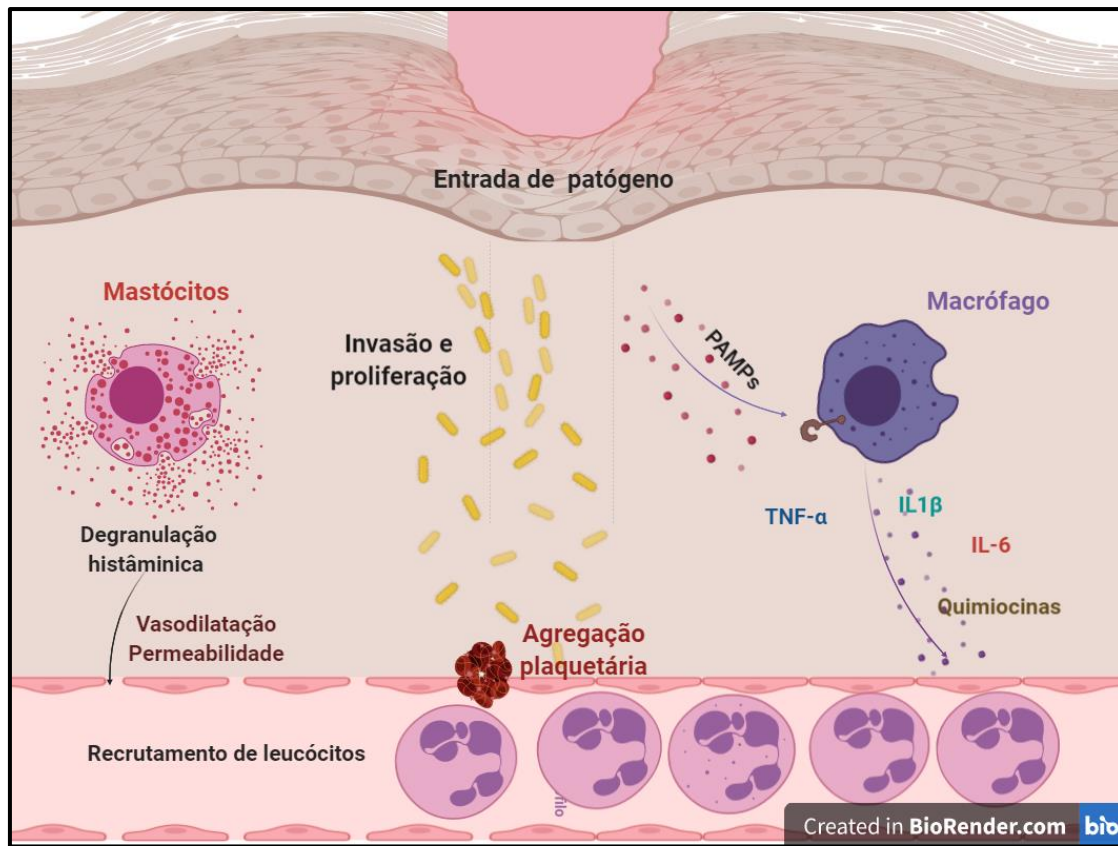
(prostaglandina E sintetase)(DI DATO et al., 2020; GARCÍA-POSADAS et al., 2018).

A produção da PGE_2 é induzida principalmente por estímulos inflamatórios associados a COX-2, na qual desempenha funções tais como: vasodilatação, aumento da permeabilidade e dor, isso ocorre via ativação de seus receptores de superfície celular específico do tipo EP (LEBENDER et al., 2018).

2.3 Mecanismo celular e molecular da resposta inflamatória

No processo infeccioso, quando um microrganismo rompe as barreiras anatômicas e as células imunes fagocíticas são ativadas via o reconhecimento de PAMPs ou até mesmo de DAMPs (FARZAEI et al., 2019; MEDZHITOV, 2008) ocorre a ativação, essas células que produzem e liberam mediadores pró-inflamatórios, tais como o $TNF-\alpha$, a $IL1-\beta$, $IFN-\gamma$, IL-6, IL-12, IL-17, prostaglandinas (PGs), cininas e componentes intracelulares (VESTWEBER, 2015). Em adição, com ativação dos mastócitos ocorre a liberação da histamina, que age nos vasos promovendo alterações vasculares (aumento da permeabilidade vascular/ vasodilatação) e celulares cooperando para o aparecimento dos sinais cardinais característicos desse processo (Figura 1) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015; LEITE et al., 2016).

Figura 1- Esquema representativo dos eventos iniciais processo inflamatório

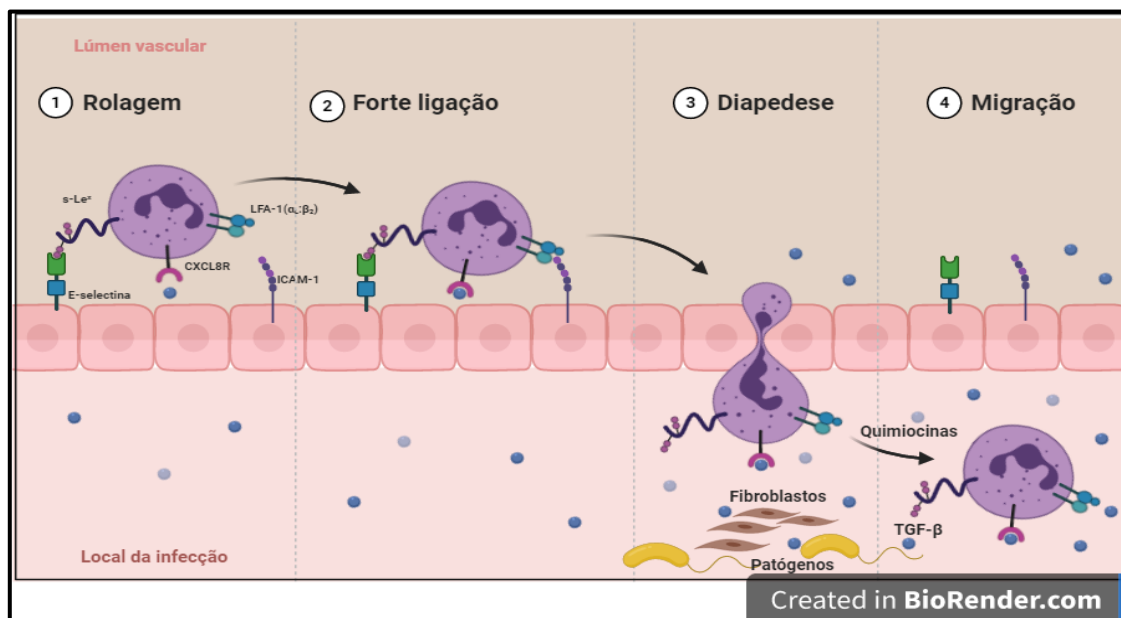


No processo infeccioso, a bactéria invade e prolifera o tecido conjuntivo atingindo o vaso sanguíneo. As plaquetas se agregam no local da lesão promovendo vasoconstrição para suprimir o sangramento. Os macrófagos residentes estimulados pelos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) produzem quimiocinas e citocinas que atraem os leucócitos para o local da infecção. Os mastócitos são ativados e começam a liberar seus grânulos contendo histamina que age sobre o vaso causando vasodilatação que aumenta a permeabilidade vascular. Fonte: VIEIRA, 2023 adaptado de NOLASCO 2020.

Nesse sentido, a liberação dos mediadores ativa as células endoteliais de vênulas próximas que passam a expressar moléculas de adesão como as selectinas, integrinas e quimiocinas (HEEMSKERK et al., 2016). As selectinas medeiam a fraca ligação dos leucócitos sanguíneos ao endotélio e a força de cisalhamento do fluxo sanguíneo faz com que os leucócitos rolem ao longo da superfície endotelial. As quimiocinas produzidas se ligam a receptores nos leucócitos em rolamento, que resulta na ativação das integrinas levando a um estado de alta afinidade de ligação (DINARELLO; SIMON; VAN DER MEER, 2012; RAI, 2020; ROBB et al., 2016). Essas integrinas se ligam às moléculas codificadas pelos genes das superfamílias de Ig ligantes nas células endoteliais, o que medeia a firme adesão dos leucócitos (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

Com isso, os leucócitos passam pelas junções entre as células endoteliais e migram através da parede venular, e, logo em seguida, estabelecem vários mecanismos biológicos, dentre eles, a fagocitose e a secreção de citocinas. Tudo isso, com o propósito de debelar o processo infeccioso (Figura 2) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

Figura 2- Migração de leucócitos (neutrófilos) através dos vasos sanguíneos



A liberação de mediadores ativa as células endoteliais de vênulas próximas, que produzem moléculas de adesão como as selectinas, integrinas e quimiocinas. As selectinas medeiam a fraca ligação dos leucócitos sanguíneos ao endotélio, e a força de cisalhamento do fluxo sanguíneo faz com que os leucócitos rolem ao longo da superfície endotelial. As quimiocinas produzidas se ligam a receptores nos leucócitos em rolamento que resulta na ativação das integrinas do leucócito a um estado de alta afinidade de ligação. Essas integrinas ao serem ativadas se ligam às suas superfamílias de Ig ligantes nas células endoteliais, o que medeia a firme adesão dos leucócitos. Os leucócitos passam pelas junções entre as células endoteliais e migram através da parede venular, e, logo em seguida, estabelecem vários mecanismos biológicos, dentre eles, a fagocitose e a secreção de citocinas, como Fator Transformador do Crescimento (TGF-β) que estimula a proliferação de fibroblasto. Tudo isso, com o propósito de debelar o processo infeccioso. Fonte: VIEIRA, 2023 adaptado de ABBAS 2015.

Todavia, quando o microrganismo persiste no local da inflamação, as citocinas produzidas (TNF-α, IL1-β, IL-6) irão se difundir para os tecidos, ocasionando efeitos sistêmicos, cooperando para defesa do hospedeiro. Em

outros termos, irão atuar, no hipotálamo para induzir o aumento na temperatura corporal (febre), nos hepatócitos estimulando a produção de proteínas de fase aguda e na medula óssea aumentando a produção de leucócitos (LEITE et al., 2016).

Em adição, um dos eventos que acontece na resposta inflamatória é a formação do ácido araquidônico (AA), via fosfolipídios de membrana. A fosfolipase A₂ (PLA₂) catalisam a hidrólise do segundo ácido graxo dos fosfolipídios e, então, o AA, pelas cicloxigenases (COX) é convertido em um produto intermediário denominado prostaglandinas H₂ (PGH₂) e pela 5-lipoxigenase (LOX) em leucotrienos (HARRIS et al., 2002; YOKOMIZO, 2015).

A PGH₂ é convertida pelas prostaglandinas sintases em diversos derivados como PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, prostaciclina (PGI₂) e em tromboxanos (TX) (PALOMER, 2013). As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiopatológicos, como: homeostase, trombose, angiogênese, câncer e ulcerações (JÚLIO et al., 2018). Elas são responsáveis pelo aumento da inflamação em tecidos e o desenvolvimento dos sinais cardinais. As sensações de dor, por exemplo, ocorrem pela ativação de receptores de PGE₂ nos neurônios sensoriais (SYKES et al., 2014). A PGE₂ é sintetizada por diversas células do organismo humano, como, fibroblastos, células endoteliais e musculares lisas. Ela é responsável pelo aumento da permeabilidade microvascular e vasodilatação, acarretando dois sinais cardinais da inflamação: rubor (vermelhidão) e edema (GOMEZ et al., 2013).

2.4 Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e seus aspectos imunológicos

A lesão pulmonar aguda (LPA), em estágio mais avançado, é conhecida como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), isto é, resposta inflamatória do organismo que acomete os alvéolos pulmonares, podendo resultar em edema intersticial pulmonar, deterioração da complacência pulmonar seguido por uma hipoxemia (HUANG et al., 2012; WANG et al., 2018a). Ainda que essa doença tenha uma melhoria nos cuidados de suporte, como estratégias farmacológica e não farmacológica, a taxa de mortalidade ainda perpetua-se apresentando 40%-60% (BELLANI et al., 2016; BERNARDO, 2022).

A LPA/SDRA pode ser provocada por vários estímulos que incluem infecções bacterianas, virais ou fúngicas, ademais inalação de fumaças tóxicas, hemorragia alveolar e até mesmo sepse (FAMOUS et al., 2017; MATTHAY et al., 2019; PHAM; RUBENFELD, 2017).

Estudos evidenciam que o mecanismo fisiopatológico da LPA/SDRA inicia pela presença de patógenos nos alvéolos pulmonares, ativam receptores do tipo Toll-4 (*Toll-like receptor 4* - TLR4) presentes em células imunes fagocíticas, como macrófagos (MASON; DOOLEY; GRIFFITHS, 2016).

Em sequência, essas células induzem uma reação imune através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como o TNF- α , a IL1- β , IL-6, IL-8 que age no endotélio capilar promovendo alterações vasculares e celulares, ou seja, aumento da permeabilidade capilar, atrelado a saída de fluídos proteicos, bem como, migração de células polimorfonucleares para o espaço alveolar, cooperando para formação do edema intersticial pulmonar (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021; JANZ; WARE, 2013). Ademais, essa reação vai propiciar a destruição de células pulmonares responsáveis pela produção de surfactante e síntese do tecido pulmonar causando uma deposição da membrana hialina, conseqüentemente, deterioração da complacência pulmonar seguido por uma hipoxemia (HE et al., 2021; MAJNOONI et al., 2020).

A LPA/SDRA impactou o mundo por meio da disseminação do vírus de RNA, SARS-CoV-2 (Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) (TAY et al., 2020). A humanidade vivenciou uma crise sanitária que iniciou no final de 2019 em Wuhan, Hubei, China. Em março de 2020, a doença coronavírus 2019 (COVID-19) foi alegada pelo OMS como emergência de saúde pública de interesse internacional (CHEN et al., 2020; GUAN et al., 2020). É uma doença heterogênea que afeta inicialmente o sistema respiratório, acarretando sinais e sintomas, de leve à grave, e alguns indivíduos desenvolvem a forma assintomática (PAN et al., 2020).

Segundo as fontes estatísticas do Ministério da Saúde, no Brasil em cinco meses da inserção da doença, mais de 100.000 pessoas vieram a óbitos (FRANÇA et al., 2020).

De maneira abrangente, a COVID-19 advém da desregulação do sistema imunológico pelo SARS-CoV-2, uma vez que, após a introdução da partícula viral no organismo, o sistema imune não consegue o neutralizar, facilitando a entrada e replicação do vírus na célula hospedeira; com isso, favorece o desenvolvimento de uma série de complicações, dentre elas podemos frisar a síndrome respiratória aguda grave. (AYAN; KOVELAMUDI; AL-HAWWAS, 2020; MCGONAGLE et al., 2020; QUE et al., 2021).

Apesar dos avanços nas pesquisas a respeito dos mecanismos fisiopatológicos da LPA/ SDRA, a eficácia de alternativas terapêuticas ainda é restrita, e o tratamento farmacológico não é bem delineado (JIANG et al., 2015). No tempo atual, estudos clínicos empregam como critério terapêutico a ventilação mecânica e a farmacoterapia de ativos anti-inflamatórios, como corticosteroides (HE et al., 2021).

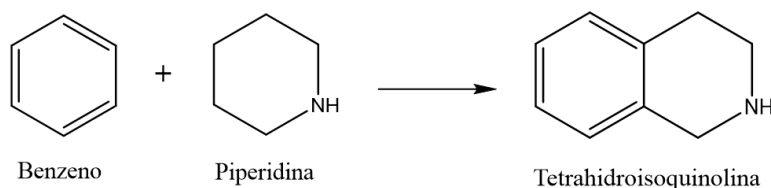
2.5 Alcaloides tetrahydroisoquinolínicos: Di-MTF

Os alcaloides são metabolitos secundários que contém em sua estrutura átomos nitrogenados em estado de oxidação negativa. São vastamente distribuídos no reino vegetal, configurando em diferentes estruturas químicas, rotas metabólicas e diversas atividades terapêuticas importantes (PETRUCZYNIK et al., 2019).

São obtidos através da síntese orgânica ou biossintetizados pelo retículo endoplasmático vegetal (rotas metabólicas), pela via do ácido chiquímico e ácido acético, formando vários aminoácidos precursores (fenilalanina, tirosina, triptofano) (FAHEEM et al., 2021b).

Eles podem ser classificados de acordo com sua rota metabólica, a exemplo dos alcaloides tetrahydroisoquinolínicos, os quais são formados pela junção de um anel benzeno e uma piperidina (ALMEIDA et al., 2009; HAGEL; FACCHINI, 2013b).

Figura 3 – Formação do núcleo tetrahydroisoquinolínico



Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

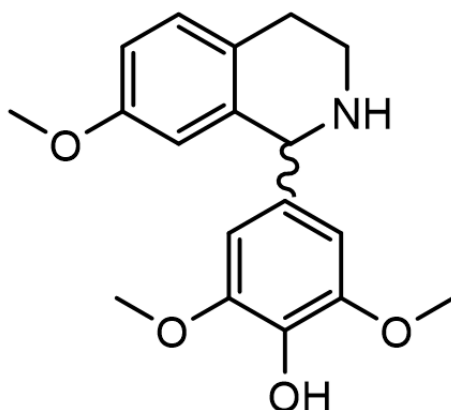
Este núcleo é um importante intermediário com diversos caminhos metabólicos e se destinam a uma série de estruturas diferentes, isso molda para síntese orgânica de novas moléculas análogas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2012).

Os métodos extrativos não têm sido predominantes para sua obtenção, pois além de não adquirir quantidades relevantes do produto, desempenha pouca flexibilidade de modificar a molécula quimicamente, fora o parâmetro de comprometer a conservação vegetal. Assim, as metodologias de síntese orgânica tornam-se predominante, em razão de se obter produto em quantidade significativa, viável e econômico. além disso, fornece uma versatilidade para síntese de compostos análogos, o que pode ceder estudos de estrutura-atividade (LI et al., 2021).

Podemos encontrar alcaloides com núcleo tetrahydroisoquinolínico substituído, averiguado a partir dos isolados da planta *Cryptostylis fulva*. Os grupamentos fenil tetrahydroisoquinolínicos criptostilina I, II e III foram os primeiros a serem isolados. Com essa adição, as substâncias dessa classe começaram serem promissoras, no sentido de desempenhar atividades terapêuticas importantes para tratamento de diversas doenças com efeitos antitumoral, antiviral, antifúngico, antimicrobiana e efeito anti-inflamatório (FAHEEM et al., 2021a; PARK et al., 2013; SINGH; SHAH, 2016; SONG et al., 2023; ZHU et al., 2006).

Desse modo, foi realizado a síntese orgânica do 2, 6-dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolin-1-il) fenol (Di-MTF), um novo derivado sintético de alcaloides tetrahydroisoquinolínicos, com intuito de investigar atividades farmacológicas de interesse.

Figura 4— 2,6dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolin-1-il) fenol (Di-MTF)



Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

Na literatura foi visto que o alcaloide sintético tetrahidroisoquinolínicos, o MHTP, análogo estrutural das criptostilinas, exibiu atividade anti-inflamatória por diminuir *in vitro* da produção e liberação de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatória em cultura de macrófagos peritoneais, bem como, em modelo de edema de pata, por apresentar atividade anti-edematogênica, quando o edema foi induzido por PGE₂, independente da degranulação de mastócitos ou atividade da histamina (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015a).

Para mais, pesquisas desenvolvidas no laboratório de imunofarmacologia/UFPB, esta mesma substância sintética exerceu atividade farmacológica significativa no tratamento da lesão pulmonar aguda (LPA), por exibir diminuição na migração de neutrófilos para região alvéolo-capilar e na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019b).

Além disso, foi observado um efeito imunomodulador do MHTP, quando administrado via instalação nasal, em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica, o alcaloide sintético foi capaz de inibir a migração de células inflamatórias, bem como a produção de citocinas e muco, parâmetros esses responsáveis por participarem do dano tecidual pulmonar (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Diante disso, o presente estudo se justifica através dos efeitos farmacológicos promovido pelos alcaloides mencionando acima, e a crescente busca por novas moléculas com efeito anti-inflamatório eficaz, que apresente baixa toxicidade, isso torna crucial a investigação.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento oral com o alcaloide sintético inédito tetrahidroisoquinolinico, Di-MTF, em modelos inflamatórios agudos murinos e estudos *in silico* (*Docking molecular* e predição de propriedades farmacocinéticas)

3.1.2 Específicos

Realizar a triagem farmacológica do Di-MTF no modelo de edema de pata induzido por carragenina;

Investigar o efeito anti-edematogênico do Di-MTF no modelo de edema de pata induzido por agentes flogísticos, tais como:

Prostaglandina E₂;

Bradicinina;

Serotonina (5-HT);

Composto 48/80;

Histamina;

Investigar o efeito do Di-MTF nos modelos experimentais de: Peritonite induzida por carragenina via:

Recrutamento de células inflamatórias;

Concentração de fluídos proteicos;

Dosagem de citocinas TNF- α , IL1 β e IL-6.

Lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo via:

Migração de células inflamatórias para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF);

Concentração de fluídos proteicos

Edema pulmonar a partir do peso dos pulmões

Parâmetros histopatológicos pulmonares (infiltrado celular, edema, hemorragia);

Produção de citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no BALF e soro;

Estudos *in silico*, abordando os parâmetros via:

Interação molecular do Di-MTF com possível alvo molecular (TLR4/p38 ERK2MAPK/NF κ B)

A predição de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (ADMET-absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade)

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Para os modelos experimentais de edema inflamatório e peritonite foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) com idades entre 6 e 8 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 3432290419.

Para o modelo de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) foram utilizados camundongos BALB/c machos com idades entre 6 e 8 semanas, pesando entre 20 a 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 3432290419.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas com livre acesso à água

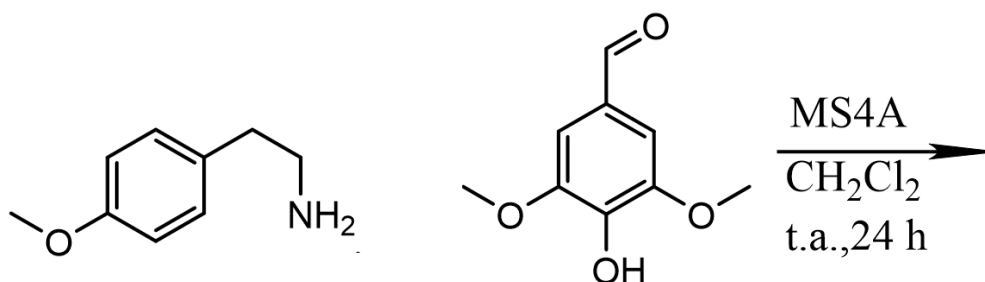
(autoclavada) e uma dieta controlada, a base de ração do tipo pellets (PURINA) durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental foi representado por seis animais que foram eutanasiados com overdose anestésica intramuscular de uma solução de ketamina e xilasina (29 mg/mL, 1,91 mg/mL). 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.

4.2 Preparo da solução do Alcaloide Sintético Di-MTF

O alcaloide tetrahydroisoquinolínico 1- substituído (2, 6-dimetoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolin-1-il) fenol) - Di-MTF, foi fornecido gentilmente pelo prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues, CBIOTEC/UFPB/João Pessoa, PB, Brasil.

O método de obtenção e caracterização do Di-MTF se deu pela síntese orgânica, onde a descrição da obtenção está disponível no estudo intitulado “Novos derivados sintéticos de alcaloides tetrahydroisoquinolínicos” (2016) do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB, João Pessoa, PB. Para efetuar a síntese do Di-MTF empregou-se reagentes, a 4-metoxifeniletilamina (1) e a siringaldeído (2), aplicando a reação de Pictet–Spengler (Figura 5). A reação química foi finalizada obtendo 134 mg do Di-MTF apresentando fórmula molecular $C_{18}H_{21}NO_4$ (4) como característica de um pó vermelho.

Figura 5– Obtenção do Di-MTF pela reação de Pictet–Spengler





Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

Para as doses seriadas do Di-MTF foi realizada uma suspensão mãe para administração do alcaloide por via oral (10 μ L/10 g, em 50 μ L de Ácido Clorídrico (HCl) 1N em 500 μ L de solução salina), e utilizado as doses de 2,5; 1,25; 0,6 mg/kg de Di-MTF. O pH das suspensões foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (NaOH).

4.3 Modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina (CG)

Os camundongos Swiss (n=6/grupo) foram pré-tratados com Di-MTF (2,5 mg/kg, 1,25 mg/kg, 0,6 mg/kg) ou a droga padrão indometacina (Indo 10 mg/kg), e uma hora após receberam, por via intraplantar (ipl), na pata esquerda traseira uma solução contendo, carragenina (CG) (1%), dissolvidos em 20 μ L de uma solução tamponada. A pata direita recebeu o mesmo volume de salina e foi utilizada como controle. Alterações no volume da pata foram medidas por um micrômetro em vários intervalos de tempo (1h, 2h, 3h, 4h, 6h e 24 h). A diferença

entre o tamanho das patas direita e esquerda foi quantificada e tomada como índice do edema (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2017).

4.4 Modelo experimental de edema de pata induzido por prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina (Bk), serotonina (5-HT), histamina e composto 48/80 (48/80)

Os camundongos Swiss (n=6/grupo) foram pré-tratados com a dose farmacológica selecionada do Di-MTF (1,25 mg/kg), a droga padrão indometacina (Indo 10 mg/kg) ou prometazina (Prometa 10 mg/kg). Após 1h do tratamento receberam, por via intraplantar (ipl), na pata esquerda traseira uma solução contendo, PGE₂ (5 µg/pata), bradicinina (6 nmol/pata), serotonina (1%, p/v), histamina (100 µg/pata) ou o composto 48/80 (ng/pata), dissolvidos em 20 µL de uma solução tamponada. Alterações no volume da pata foram medidas por um micrômetro em vários intervalos de tempo (15, 30 e 60 min; 15 e 30 min; 30 e 60 min). A diferença entre o tamanho das patas direita e esquerda foi quantificada e tomada como índice do edema (ALVES et al., 2017; BERNARDO et al., 2023).

4.5 Modelo experimental de peritonite induzida por carragenina

Os animais (n=6/grupo), foram pré-tratados por via oral com a dose farmacológica selecionada do Di-MTF, Indo (10 mg/kg) ou salina e uma hora após foi administrado por via intraperitoneal uma solução de carragenina a 1%. Após quatro horas do estímulo, os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e a cavidade torácica lavada com PBS (BOZZA et al., 1994). O peritônio foi cuidadosamente massageado por 30 segundos. A partir do infiltrado celular, foram realizadas: a contagem total de leucócitos (câmara de Neubauer) e a contagem diferencial de leucócitos (hematoxilina e eosina-HE) para caracterizar a população celular (DE FRANÇA et al., 2020; SILVA et al., 2017)

4.6 Modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

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 a dose farmacológica selecionada do Di-MTF (1,25 mg/kg). Após 24 horas do desafio, ocorreu o desfecho, onde os animais foram eutanasiados, e a coleta do material biológico foi realizada para análises imunológicas (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019b).

4.7 Contagem de células totais e diferenciais no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e no lavado peritoneal

A contagem total das células foi realizada a partir de uma alíquota do BALF (diluição 1:10) e do lavado peritoneal (diluição 1:40) em solução de Turk com o auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga CR422, JONAM), seguida da obtenção do *pellet* e realização da contagem diferencial com lâminas cito-centrifugadas a 1500 rpm por 5-10 minutos (cytospin, FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400), que foram coradas com o kit panótico rápido (Hematoxilina & Eosina; Renylab, Barbacena-MG) e observadas no microscópio óptico com objetiva de 100x. Os dados obtidos da contagem total foram utilizados para a quantificação de polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (macrófagos e linfócitos) (CAVALCANTI et al., 2020; GADELHA et al., 2021; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015a; SILVA et al., 2017).

4.8 Dosagem de proteínas totais do BALF e do lavado peritoneal

Após o processo de centrifugação, o BALF e o lavado peritoneal foram submetidos para quantificação de proteínas totais. A análise desse parâmetro foi realizada por método colorimétrico via o corante vermelho de pirogalol (kit sensiprot da Labtest). Brevemente, o ensaio foi realizado de acordo com as especificações do fabricante, a absorbância foi lida em 650 nm em

espectrofotômetro (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019b; PAIVA FERREIRA et al., 2022; SILVA et al., 2017).

4.9 Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram utilizados os sobrenadantes dos lavados e soro (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

Para a obtenção do índice do edema pulmonar, foi realizada a análise da razão entre o peso úmido (U) e o peso seco (S) dos pulmões. Assim, os pulmões foram retirados e pesados em balança analítica de precisão (Marte mod: SHIMADZU AY220) para obtenção do peso úmido. Posteriormente, os pulmões foram armazenados em estufa de secagem (Socc. Fabbe LTDA, São Paulo - SP) por 48h a uma temperatura de 60 °C, sendo em seguida novamente pesados para obtenção do peso seco (JIANG et al., 2016; PAIVA FERREIRA et al., 2022).

4.11 Análise histológica do tecido pulmonar

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 minutos em diferentes concentrações de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%); xilol por 30 minutos; parafina líquida (parafina histológica-ERVIEGAS, São Paulo, SP). Após solidificação, foi realizado o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior. O corte histológico teve espessura de 5 μ m, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Com os cortes de tecido aderidos nas lâminas, esses foram corados com Hematoxilina & Eosina (H&E), para avaliação da arquitetura pulmonar e parâmetros teciduais

gerais do processo inflamatório. 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 (BEZERRA BARROS et al., 2020; CAVALCANTI et al., 2023; PAIVA FERREIRA et al., 2022).

4.12 Estudos *in silico*

4.12.1 Avaliação do Docking molecular

Para a efetuação da modelagem molecular (Docking), procuramos proteínas alvo referente à doença de lesão pulmonar aguda (LPA) tais como proteína cinase ativada por mitógenos p38 (p38 MPK), receptor do tipo Toll-4 (TLR4), quinase regulada por sinal extracelular ERK2, e Fator Nuclear kappa de aumento de cadeia leve de linfócitos B ativados (NFkB).

Foram desenhadas as estruturas de cada molécula e controle através da ferramenta Marvin Sketch 21.13 e otimizadas no software HyperChem 8.0.6 (RMS 0.1 kcal/mol/Å). Para as configurações padrões usou-se 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 p38 MAPK, 4QPA para ERK 2 e 1K3Z para NFkB – porção p65.

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 de para energia de ligação > -8 kcal/mol; para 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).

Utilizamos o *redocking* para validação da técnica visando os 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). Para mais, avaliamos 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).

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

Para as análises de absorção oral, biodisponibilidade e toxicidade utilizou-se o software Osiris Data Warrior 5.0 (SANDER et al., 2015).

A predição da absorção oral foi analisada pelo parâmetro de porcentagem da taxa de absorção do Di-MTF e da dexametasona por meio do valor da área de superfície topológica total (TPSA) mediante a equação: $\%ABS = (109 - (TPSA \times 0.345)) \times 100 / \text{valor máximo}$.

Posteriormente, foi aplicado a regra dos cinco de Lipinski, tem como objetivo de determinar as chances de biodisponibilidade oral dispondo-se de 5 parâmetros: coeficiente de partição ($\log P$) ≤ 5 , peso molecular ≤ 500 daltons, número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (EMAMI et al., 2021; LIPINSKI et al., 1997; MALIK et al., 2017).

Quanto à predição de atravessar a barreira hematoencefálica foi utilizada a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>). Investigando os parâmetros lipofilicidade (WLOGP) e polaridade (TPSA) atrelada a capacidade de atravessar as membranas biológicas utilizando o Método de Permeação Estimada do Cérebro ou Intestino (BOILED-Egg) (DAINA; ZOETE, 2016).

Os modelos de predição de risco de citotoxicidade foram utilizados quanto as capacidades de mutagenicidade, carcinogenicidade, irritabilidade do tecido e efeito tóxico no sistema reprodutor do Di-MTF e da dexametasona. Tem-se como fundamental a molécula apresentar baixa ou nenhum dos riscos de citotoxicidade (KERZARE et al., 2021).

4.13 Análises estatísticas

Os resultados desse estudo foram analisados pelo software GraphPad Prism versão 9.0 e valores com $p < 0,05$, 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 Triagem da dose farmacológica do Di-MTF no modelo de edema de pata induzido por carragenina

Os camundongos *Swiss* foram pré-tratados, por via oral, com o alcaloide sintético inédito (Di-MTF) nas doses de (2,5; 1,25; 0,6 mg/kg) ou indometacina (Indo), uma hora antes da administração intraplantar de uma solução contendo, carragenina (1%), dissolvidos em 20 μ L de uma solução tamponada.

Observamos que no grupo dos animais desafiados com a carragenina (CG) houve indução ($p < 0,0001$) do edema de pata nos tempos analisados (1, 6 e 24 h), quando comparado ao grupo basal, demonstrando a viabilidade do protocolo experimental. Em contrapartida, no grupo de animais desafiados com a CG, e tratados com o Di-MTF nas doses de 2,5 e 1,25 mg/kg, os animais foram capazes de diminuir ($p < 0,0001$) o edema de pata. Semelhantemente o grupo de animais tratados com indometacina apresentou redução ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$, respectivamente), na formação do edema de pata nos tempos avaliados quando comparado com o grupo CG.

Nessa perspectiva, para a segurança de qualquer molécula candidata a medicamento, é farmacologicamente sugerido que, quando várias doses de uma substância exercem efeito máximo equivalente, é indicado à escolha da menor dose eficaz. Assim, a dose escolhida para dar continuidade no presente trabalho foi a de 1,25 mg/kg do Di-MTF.

Gráfico 1. Triagem da dose farmacológica do Di-MTF no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

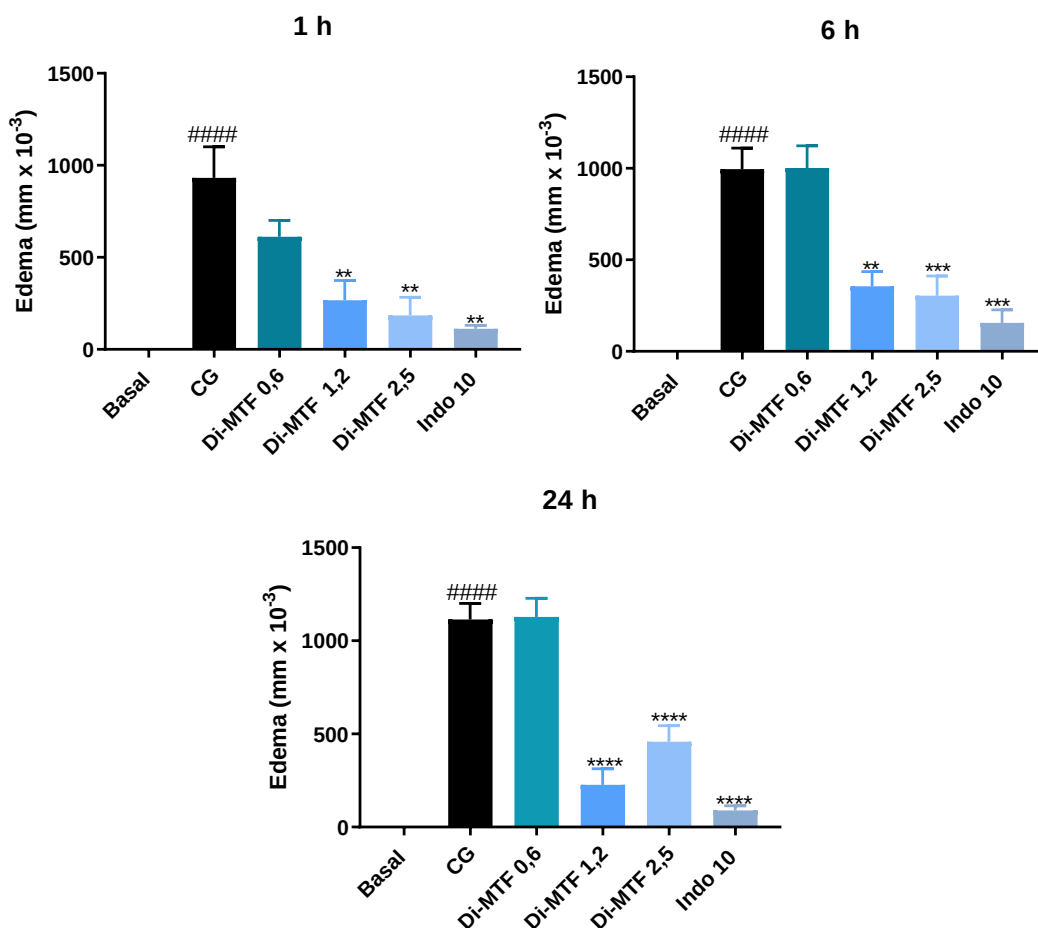


Gráfico 1. Camundongos Swiss (n=6) receberam injeções intraplantar (20µl) de carragenina (1% em salina) na pata traseira esquerda e salina com o mesmo volume na pata traseira direita, 1h após o pré-tratamento oral com Di-MTF nas doses de 2,5; 1,25; 0,6 mg/Kg, Indometacina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 1, 6 e 24 horas após o estímulo com a carragenina. 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. #### $p < 0,0001$ comparação entre grupo

controle e basal; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.2 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por PGE₂

A administração intraplantar (ipl) da PGE₂ (grupo PGE₂) induziu, nos tempos analisados, ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$), o edema de pata quando comparado com os animais do grupo basal. O tratamento com o Di-MTF (1,25 mg/kg) e com a indometacina reduziram ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) o edema inflamatório induzido pelo PGE₂, nos tempos 30 e 60 minutos quando comparados com o grupo PGE₂ (Gráfico 2).

Gráfico 2. Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por PGE₂

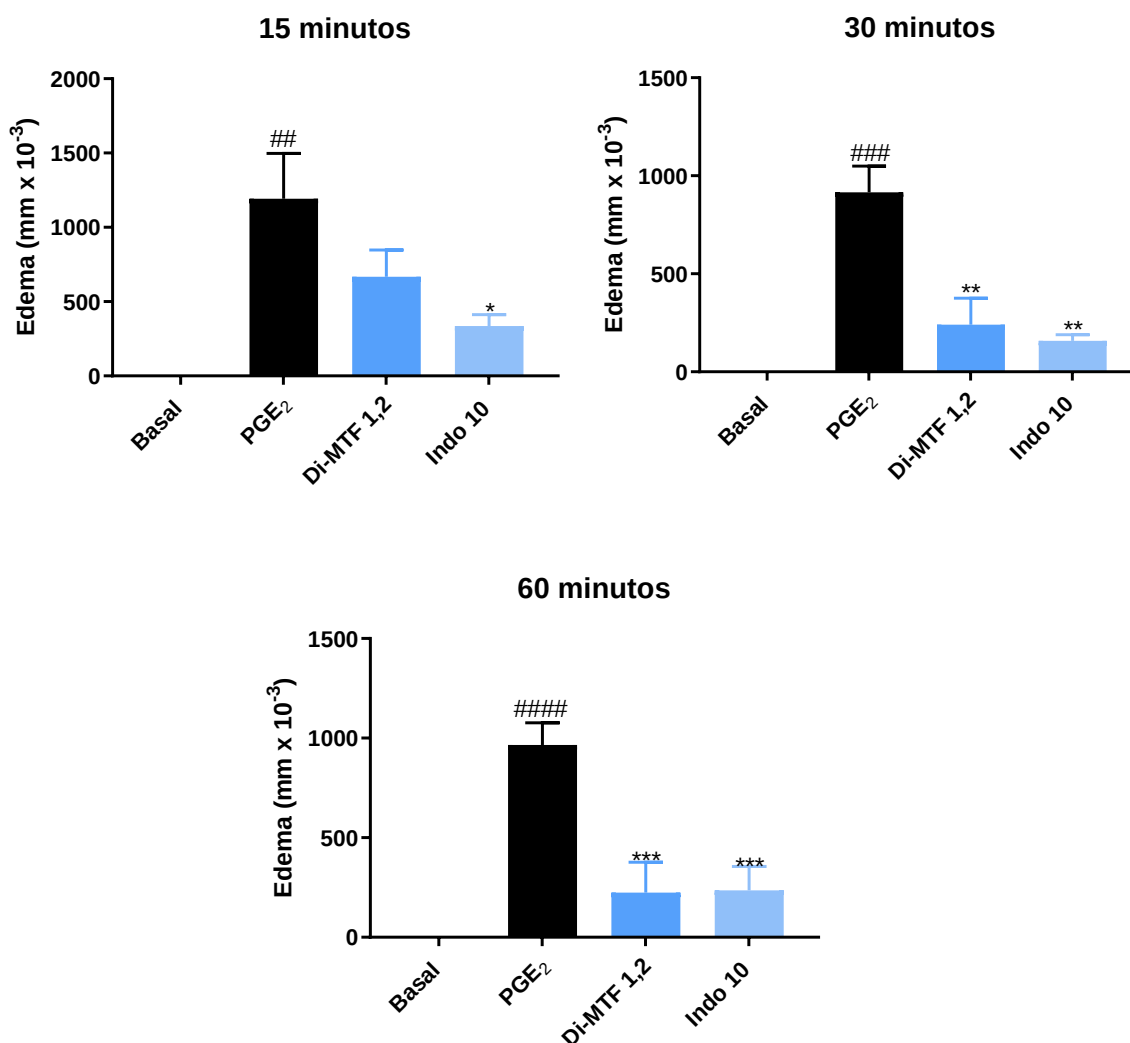


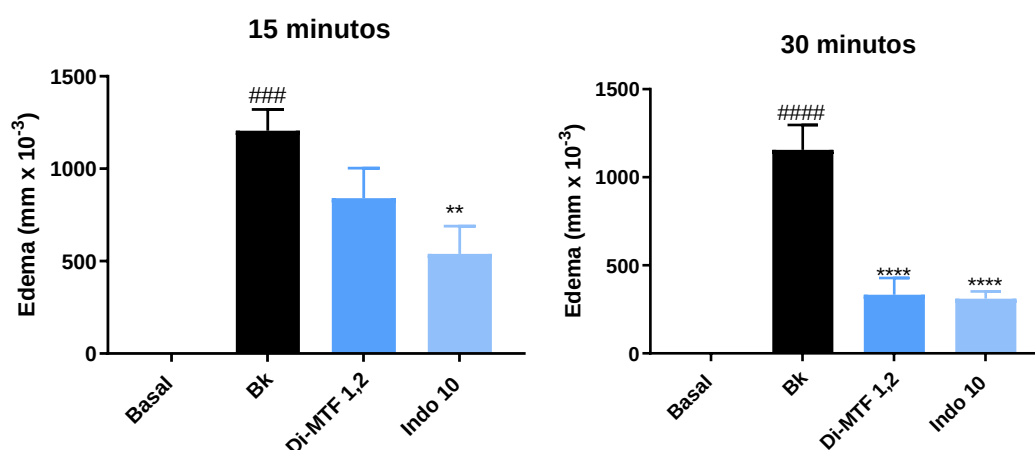
Gráfico 2. Camundongos Swiss (n=6) receberam injeções intraplantar (20µl) de PGE₂ na pata traseira esquerda e salina com o mesmo volume na pata traseira direita, 1h após o pré-tratamento oral com Di-MTF na dose de 1,25 mg/Kg, Indometacina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 15, 30 e 60 minutos após o estímulo com 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. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ comparação entre grupo controle e basal; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.3 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por Bk

A administração intraplantar (ipl) de Bradicinina (grupo Bk) induziu, nos tempos analisados ($p < 0,001$; $p < 0,0001$), o edema de pata, quando comparado com o grupo basal. Nos animais pré-tratados com o Di-MTF (1,25 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg), uma hora antes do desafio com a Bk, não houve redução do edema, nos primeiros 15 minutos quando comparado com os animais do grupo Bk, entretanto nos tempos de 30 e 60 minutos, o tratamento com o Di-MTF foi capaz de reduzir ($p < 0,0001$; $p < 0,001$), o edema de pata dos animais. O tratamento com a indometacina, reduziu o edema de pata em todos os tempos avaliados quando comparado com o grupo BK (Gráfico 3).

Gráfico 3. Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por Bk.



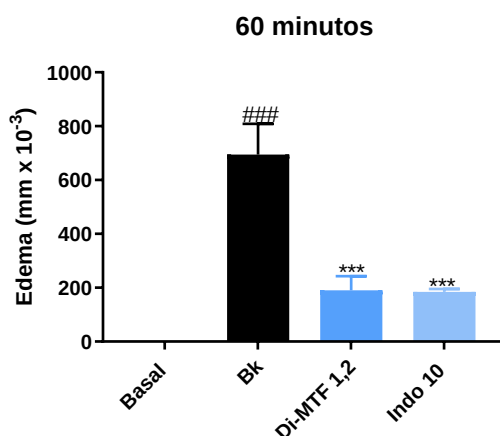


Gráfico 3: Camundongos Swiss (n=6) receberam injeções intraplantar (20µl) de Bk na pata traseira esquerda e salina com o mesmo volume na pata traseira direita, 1h após o pré-tratamento oral com Di-MTF na dose de 1,25 mg/Kg, Indometacina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 15, 30 e 60 minutos após o estímulo com 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. ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ comparação entre grupo controle e basal; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$; $p^{****} < 0,0001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.4 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por serotonina (5-HT)

A administração intraplantar (ipl) da serotonina (grupo 5-HT) induziu ($p < 0,0001$), nos tempos analisados, o edema de pata, quando comparado com o grupo basal. Os tratamentos com o Di-MTF (1,25 mg/kg) ou a indometacina reduziram ($p < 0,0001$) o edema de pata dos animais desafiados com 5-HT, nos tempos analisados, quando comparado com o grupo 5-HT (Gráfico 4).

Gráfico 4. Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por 5-HT.

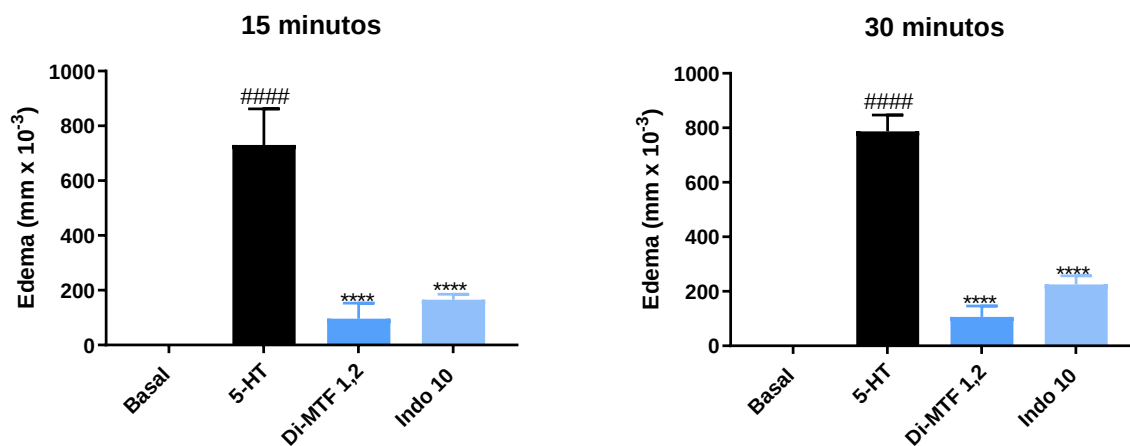


Gráfico 4. Camundongos Swiss (n=6) receberam injeções intraplantar (20µl) de 5-HT na pata traseira esquerda e salina com o mesmo volume na pata traseira direita, 1h após o pré-tratamento oral com Di-MTF na dose de 1,25 mg/Kg, Indometacina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 15 e 30 minutos após o estímulo com 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 < 0,0001 comparação entre grupo controle e basal; ****p < 0,0001 para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.5 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por composto 48/80

Observamos a resposta edematogênica induzida pela aplicação intraplantar do composto 48/80 (grupo 48/80), nos tempos avaliados (30 e 60 minutos) quando comparado com o grupo basal (p < 0,001; p < 0,0001). Todavia, os tratamentos com o Di-MTF ou com a prometazina foram capazes de reduzir (p < 0,001; p < 0,0001) o edema de pata nos tempos analisados, quando comparado com grupo 48/80 (Gráfico 5).

Gráfico 5. Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por composto 48/80.

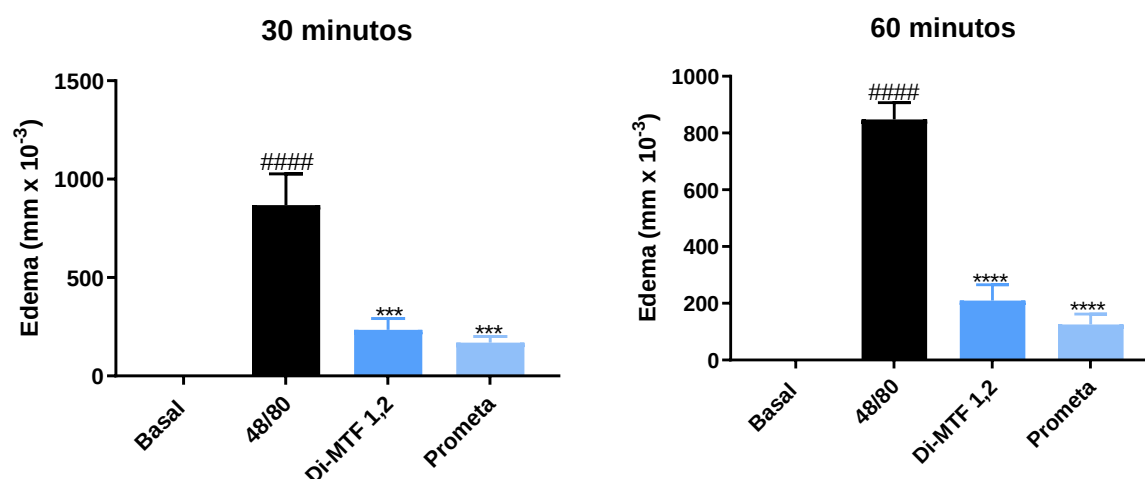


Gráfico 5. Camundongos Swiss (n=6) receberam injeções intraplantar (20µl) do composto 48/80 na pata traseira esquerda e salina com o mesmo volume na pata traseira direita, 1h após o pré-tratamento oral com Di-MTF na dose de 1,25 mg/Kg, Prometazina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 30 e 60 minutos após o estímulo com 48/80. 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. ##### $p < 0,0001$ comparação entre grupo controle e basal; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.6 Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por histamina

A administração intraplantar com a histamina induziu ($p < 0,0001$) o edema de pata nos tempos analisados (30 e 60 minutos), quando comparado ao grupo basal. Nos animais pré-tratados com o Di-MTF (1,25 mg/kg) uma hora antes da administração da histamina, não observamos diminuição na formação do edema de pata nos tempos avaliados quando comparados com os animais do grupo histamina. Contudo, o pré-tratamento com a droga padrão prometazina reduziu ($p < 0,0001$) o edema inflamatório, como esperado (Gráfico 6).

Gráfico 6. Efeito do Di-MTF no edema de pata induzido por histamina.

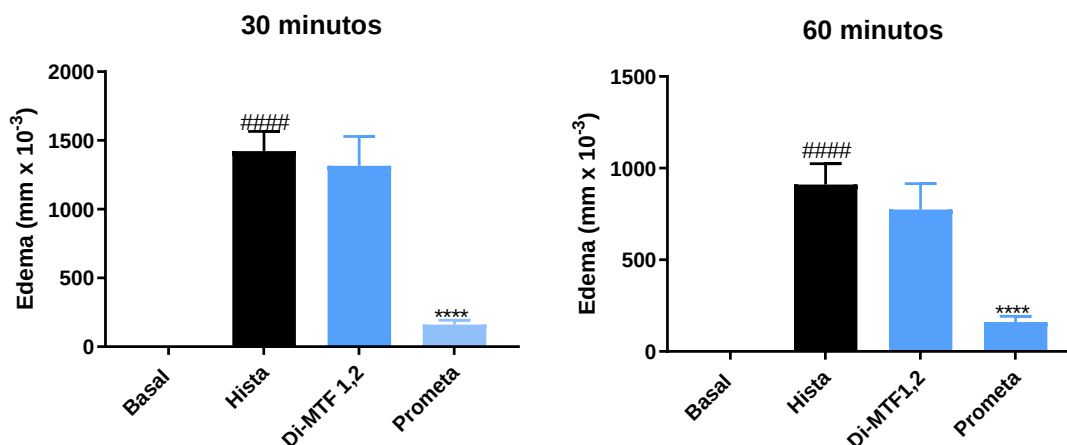


Gráfico 6. Camundongos Swiss (n=6) receberam injeções intraplantar (20µl) da histamina na pata traseira esquerda e salina com o mesmo volume na pata traseira direita, 1h após o pré-tratamento oral com Di-MTF na dose de 1,25 mg/Kg, Prometazina 10 mg/kg ou veículo (grupo controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina em ambas as patas. O edema foi medido nos tempos 30 e 60 minutos após o estímulo com 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. ##### $p < 0,0001$ comparação entre grupo controle e basal; **** $p < 0,0001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.7 Efeito do Di-MTF na migração de leucócitos no modelo experimental de peritonite induzida por carragenina

O gráfico 7 mostra que a carragenina (grupo CG) induziu no peritônio dos animais aumento ($p < 0,0001$) no número de leucócitos, quando comparado ao do grupo basal. Porém, esse efeito foi diminuído nos grupos dos animais pré-tratados com Di-MTF (1,25 mg/kg) e indometacina com redução ($p < 0,001$) da migração leucocitária quando comparado com o grupo CG.

Com relação aos polimorfonucleares (PMN), especificamente neutrófilos houve intensa migração ($p < 0,001$) para cavidade peritoneal após o estímulo com a CG (Gráfico 7B) quando comparado aos do grupo basal. Entretanto, os pré-tratamentos com o Di-MTF (1,25 mg/kg) ou indometacina diminuíram ($p < 0,001$; $p < 0,0001$) a migração de PMN nas cavidades peritoneal dos animais em relação ao grupo CG.

Em contrapartida, a migração das células mononucleares (MN) não sofreu alteração nos grupos tratados quando comparados com o grupo CG (Gráfico 7C).

Gráfico 7. Efeito do Di-MTF na migração de células inflamatórias para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com carragenina.

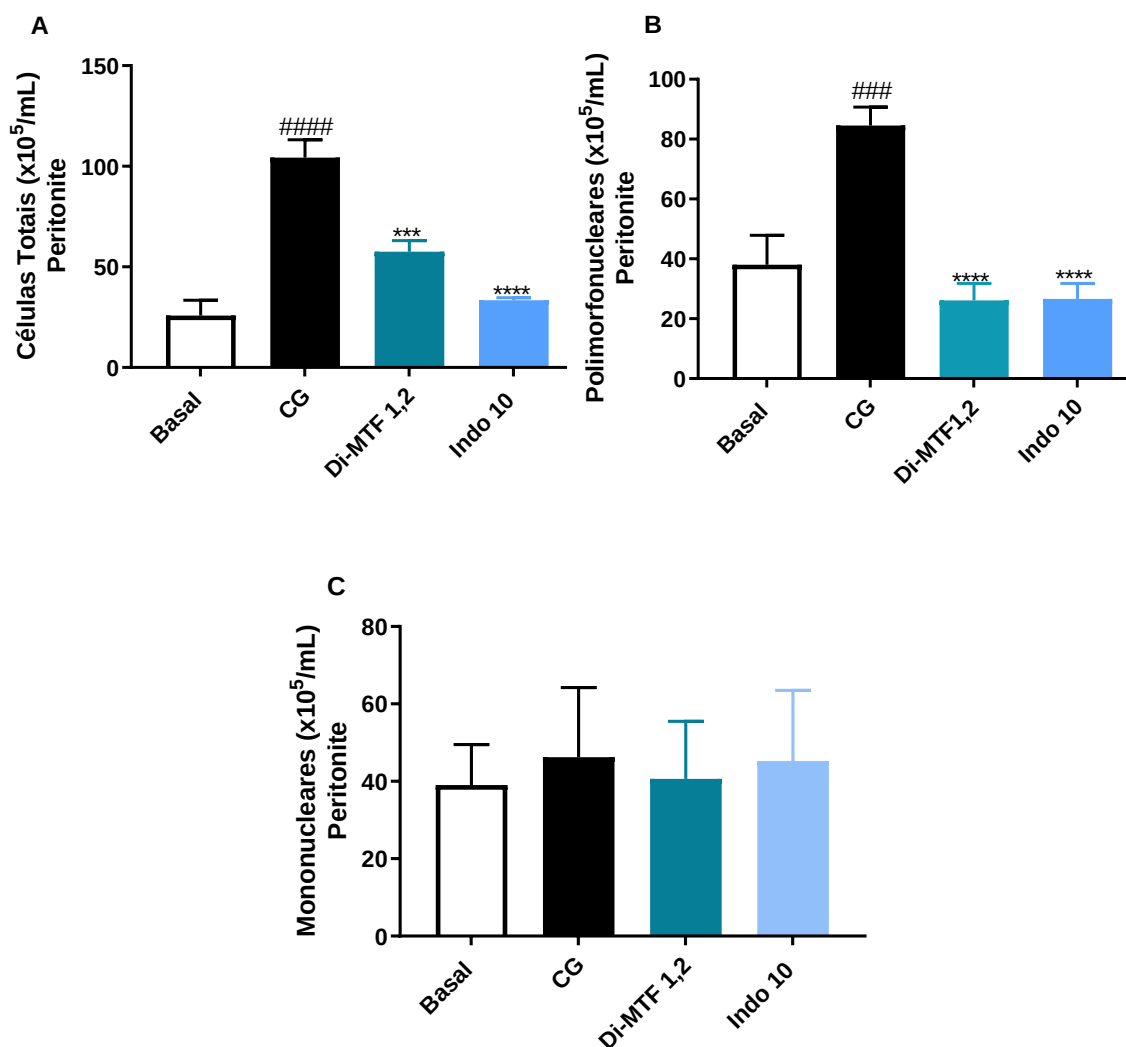


Gráfico 7. Camundongos Swiss (n=6) receberam na cavidade peritoneal (300 µl) carragenina (1%) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, Indo 10 mg/kg ou veículo (controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 4h do estímulo com carragenina foi realizado o lavado peritoneal para determinar a celularidade total **(A)**, polimorfonucleares (PMN) **(B)** e mononucleares (MN) **(C)**. O gráfico representa a média ± E.P.M. da contagem total e diferencial do lavado peritoneal, em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey. ^{###} $p < 0,001$; ^{####} $p < 0,0001$ comparação entre grupo basal; ^{***} $p < 0,001$; ^{****} $p < 0,0001$ para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborada pelo autor VIEIRA, 2023.

5.8 Efeito do Di-MTF no extravasamento proteico na peritonite induzida por carragenina.

A administração intraperitoneal da carragenina (grupo CG) nos animais desencadeou aumento ($p < 0,001$) do conteúdo proteico na cavidade peritoneal, quando comparado com os animais do grupo basal. No entanto, os pré-tratamentos dos animais com o Di-MTF (1,25 mg/kg) ou indometacina diminuíram ($p < 0,05$) a formação do exsudato proteico no peritônio dos animais desafiados com CG (Gráfico 8).

Gráfico 8. Efeito do Di-MTF na formação de fluido proteico para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com carragenina

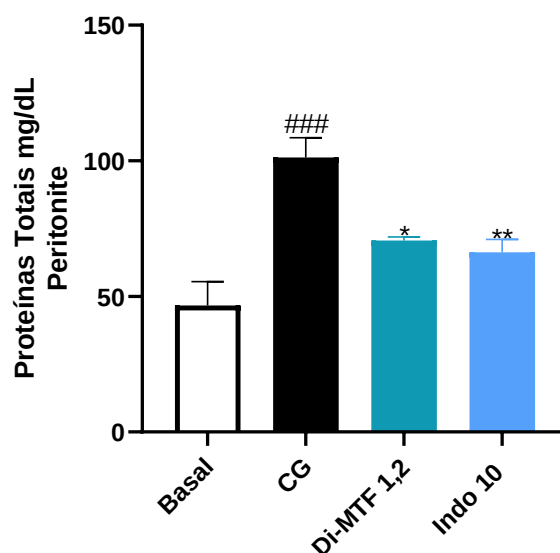


Gráfico 8. Camundongos Swiss ($n=6$) receberam na cavidade peritoneal (300 μ l) carragenina (1%) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, Indo 10 mg/kg ou veículo (controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 μ l). Após 4h do estímulo com carragenina foi realizado o lavado peritoneal para determinar o extravasamento de fluido proteico. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da concentração de proteínas totais, em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey. ### $p < 0,001$; comparação entre grupo basal; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.9 Efeito do Di-MTF na liberação de citocinas na peritonite induzida por carragenina

.

A administração intraperitoneal da carragenina (grupo CG) nos animais elevou os níveis ($p < 0,001$) das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), quando comparadas as do grupo basal (Gráficos 9 A, B e C respectivamente). Entretanto, os animais pré-tratados com o Di-MTF (1,25 mg/kg) ou indometacina apresentaram redução ($p < 0,01$; $p < 0,001$) nos níveis dessas citocinas (Gráfico 9).

Gráfico 9. Efeito do Di-MTF sobre os níveis de citocinas pro-inflamatórias para o peritônio de camundongos Swiss desafiados com carragenina

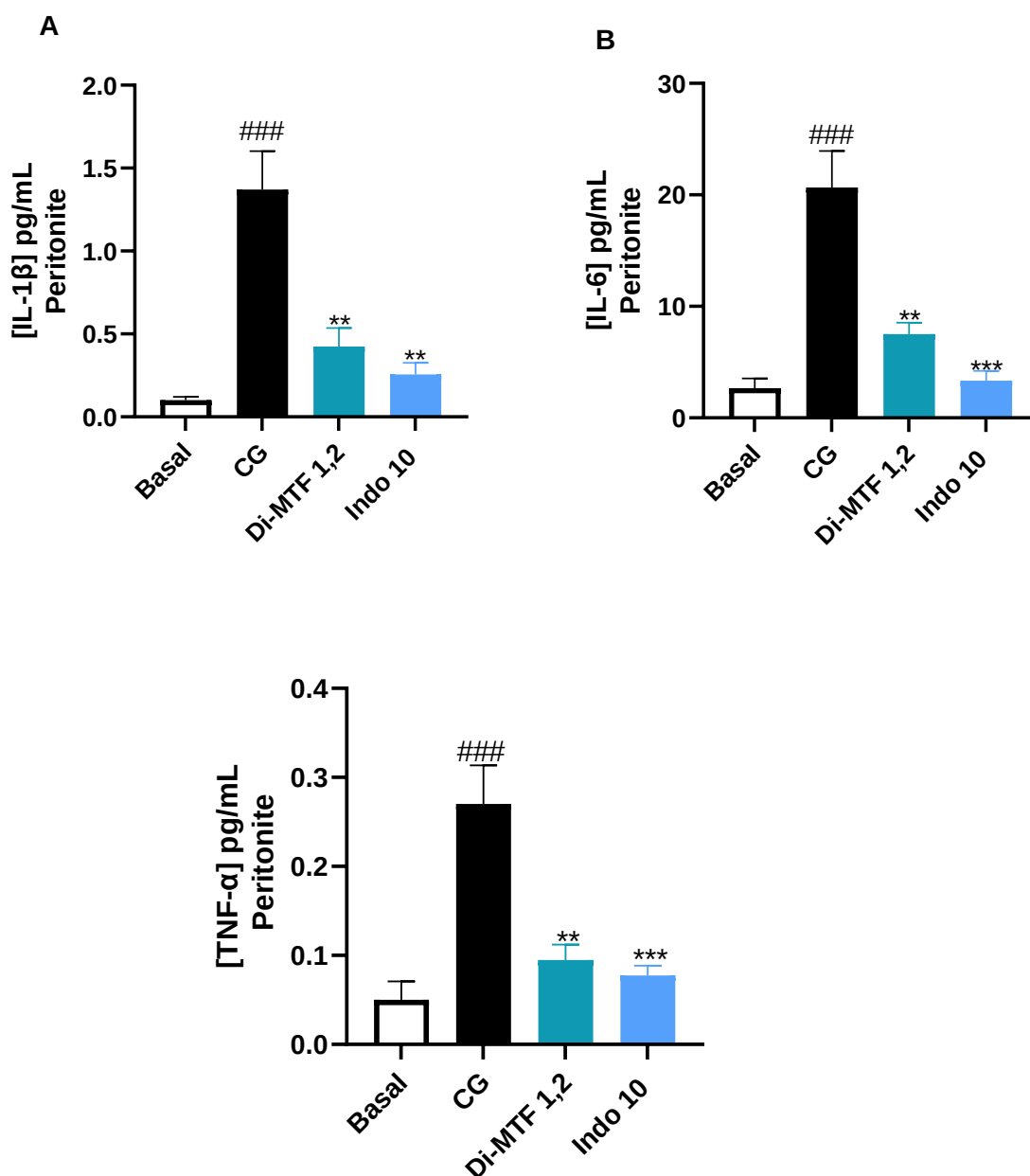


Gráfico 9. Camundongos Swiss (n=6) receberam na cavidade peritoneal (300 µl) carragenina (1%) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, Indo 10 mg/kg ou veículo (controle). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 4h do estímulo com carragenina foi realizado a quantificação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α (A, B e C). O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da concentração de citocinas, em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey. #### $p < 0,001$; comparação entre grupo basal; ** $p < 0,01$; para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

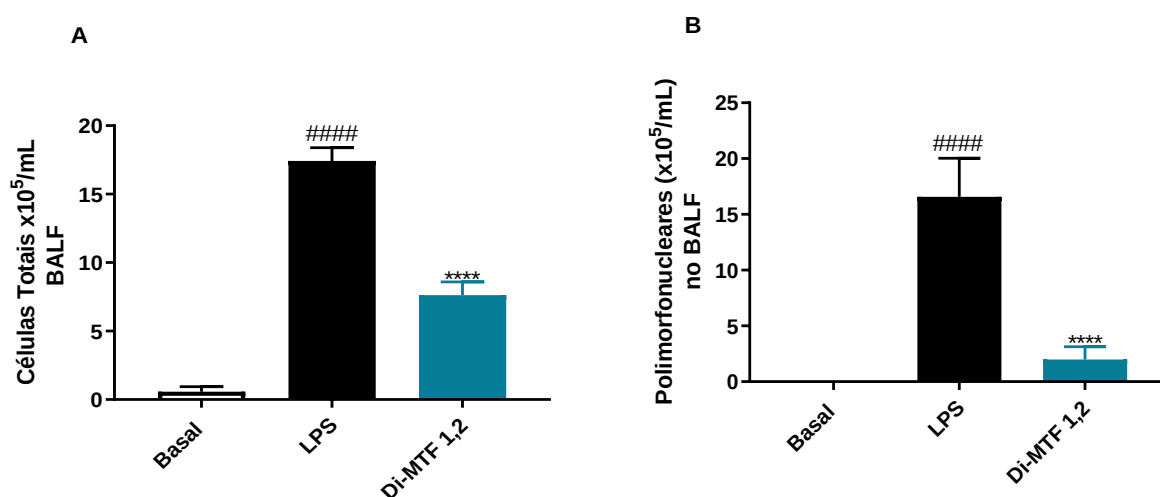
Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.10 Efeito do Di-MTF sobre migração de células total e diferencial em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por LPS

A administração via instilação nasal do Lipopolissacarideo (Grupo LPS) nos animais apresentou aumento ($p < 0,0001$) no número de células totais no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), quando comparados aos do grupo basal, apontando viabilidade do protocolo experimental. Contudo, os animais pré-tratados com Di-MTF (1,25 mg/kg) apresentaram redução ($p < 0,0001$) nas células totais quando comparado com o grupo LPS.

A migração dos polimorfonucleares (PMN), especificamente neutrófilos para região pulmonar após o estímulo com LPS foi aumentada ($p < 0,0001$), quando comparado aos do grupo basal. Todavia, o tratamento com o Di-MTF (1,25 mg/kg), diminuiu ($p < 0,0001$) essa migração celular na região pulmonar. Quanto as células mononucleares (MN) não houve alterações no grupo tratado quando comparado com o grupo LPS (gráfico 10C).

Gráfico 10. Efeito do Di-MTF sobre a migração de células total e diferencial para o BALF em modelo experimental lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



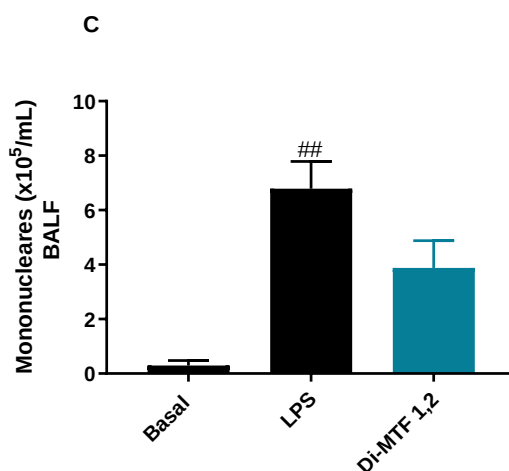


Gráfico 10. Camundongos BALB/c(n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg;i.n) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, ou veículo (Grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 24h do estímulo com LPS foi realizado a coleta do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) para determinar a celularidade total **(A)**, polimorfonucleares (PMN) **(B)** e mononucleares (MN) **(C)**. Os gráficos representam a média ± E.P.M. da contagem total e diferencial do lavado peritoneal, em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. ##### p < 0,0001 comparação entre grupo basal; **** p < 0,0001 para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.11 Efeito do Di-MTF na permeabilidade pulmonar via extravasamento de fluido proteico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Observa-se que administração via instilação nasal do Lipopolissacarídeo (Grupo LPS) nos animais aumentou ($p < 0,001$) a concentração de fluido proteico para a região broncoalveolar quando comparado ao grupo basal. Entretanto, o grupo Di-MTF (1,25 mg/kg) apresentou diminuição ($p < 0,001$) na concentração de proteínas quando comparado com o grupo LPS (gráfico 11).

Gráfico 11. Efeito do Di-MTF sobre extravasamento de fluido proteico no modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

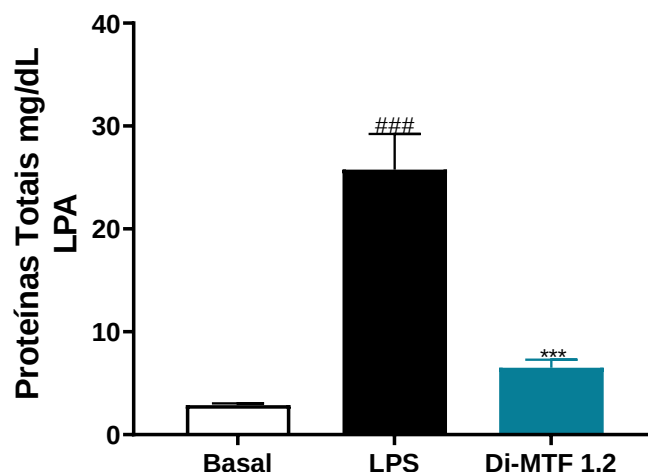


Gráfico 11. Camundongos BALB/c(n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg;i.n) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, ou veículo (Grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 24h do estímulo com LPS foi realizado a coleta do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) para analisar o extravasamento de fluido proteico da região pulmonar. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da concentração de proteínas totais, em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey. ### $p < 0,001$; comparação entre grupo basal; *** $p < 0,001$; para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.12 Efeito do Di-MTF no edema pulmonar via razão úmido/seco (u/s) do pulmão em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

Com administração via instilação nasal do Lipopolissacarídeo (Grupo LPS) nos animais induziu aumento ($p < 0,0001$) na razão úmido/seco (u/s) dos pulmões quando comparados ao do grupo basal e, o tratamento com o Di-MTF (1,25 mg/Kg) diminuiu ($p < 0,0001$) a razão u/s quando comparado com o grupo LPS (Gráfico 12).

Gráfico 12. Efeito anti-inflamatório do Di-MTF no edema pulmonar via razão úmido/seco (u/s) do pulmão em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

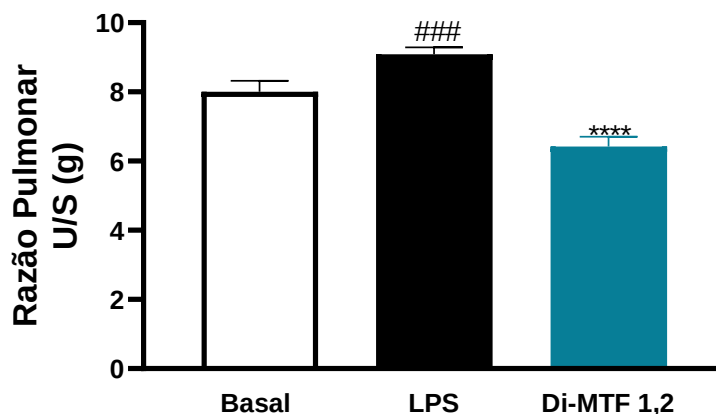


Gráfico 12. Camundongos BALB/c(n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg;i.n) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, ou veículo (Grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 24h do estímulo com LPS foi realizado a coleta do órgão pulmonar, pesado e armazenado em estufa por 48h e, em seguida, os pulmões foram novamente pesados, obtendo-se a razão do peso pulmonar úmido/seco (u/s). O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da razão do peso pulmonar úmido/seco (u/s) em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey. ### $p < 0,0001$; comparação entre grupo basal; **** $p < 0,0001$; para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.13 Efeito do Di-MTF sobre níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e no soro em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

A administração via instilação nasal do Lipopolissacarídeo (grupo LPS) nos animais elevou ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$) os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no BALF, quando comparado ao do grupo basal e, o tratamento com o Di-MTF (1,25 mg/kg) reduziu ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) os níveis dessas citocinas quando comparado com o grupo LPS. Em adição, a nível sistêmico observamos que os animais desafiados com LPS (grupo LPS) aumentaram ($p < 0,05$; $p < 0,05$; $p < 0,001$) os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Porém, quando os animais foram pré-tratados com Di-MTF (1,25 mg/kg), apenas os níveis de IL-6 e TNF- α foram reduzidos ($p < 0,001$; $p < 0,05$) (Gráfico 13).

Gráfico 13. Efeito do Di-MTF sobre níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e no soro em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS

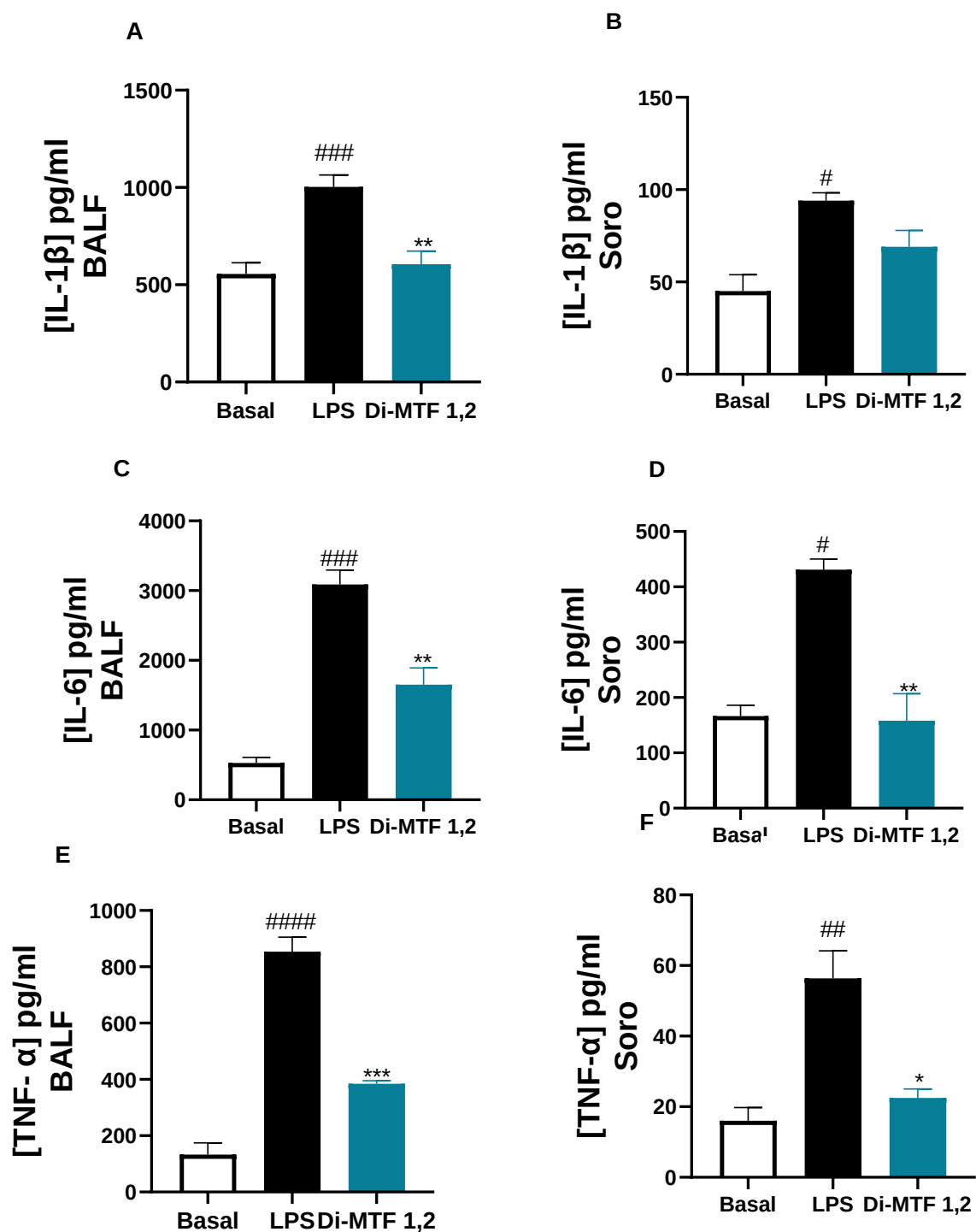


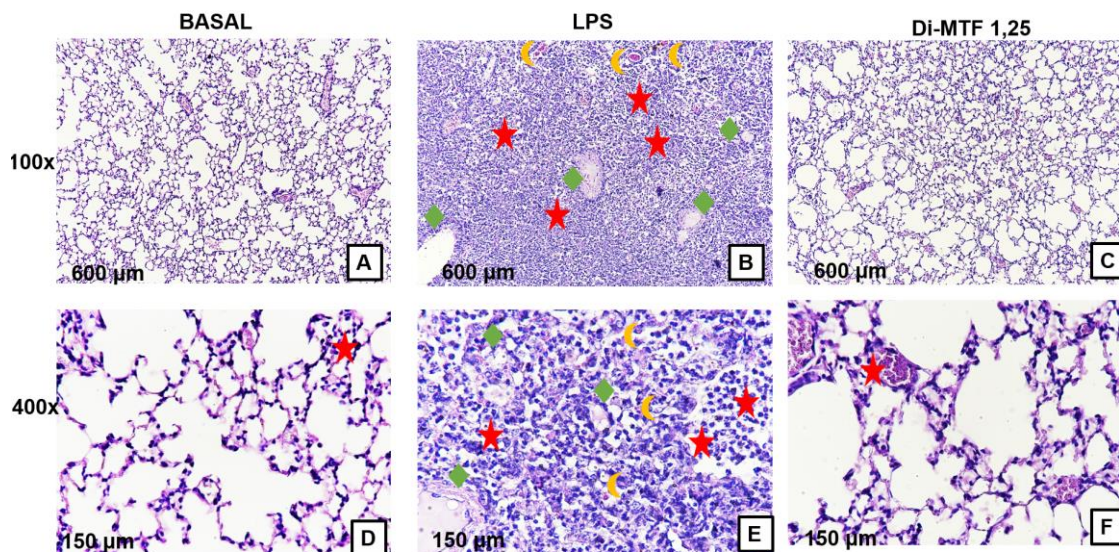
Gráfico 13. Camundongos BALB/c(n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg;i.n) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, ou veículo (Grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 24h do estímulo com LPS foi realizado a coleta do fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e o sangue para quantificar os níveis de citocinas (A, B) IL-1 β ; (C, D) IL-6; (E, F) TNF- α ; no BALF e no soro, respectivamente. O gráfico representa a média $\pm$ E.P.M. da concentração de citocinas, em função dos tratados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, seguida do pós-teste de Tukey. # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ #### $p < 0,0001$; comparação entre grupo basal; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; para comparação dos grupos tratados com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.14 Efeito do Di-MTF sobre parâmetros histopatológicos da região pulmonar em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

Na figura 6 observa-se que os animais do grupo basal apresentaram tecido pulmonar com aspecto histológico normal, sem alterações na arquitetura alveolar e estruturas conservadas. Porém, quando os animais foram desafiados, intranasal com o LPS (grupo LPS), apresentaram parâmetros inflamatórios como infiltração celular (★), edema alveolar (◆)(decorrente do aumento da permeabilidade da membrana alveolar com presença de membranas hialinas e espessamento da parede alveolar) e dano alveolar difuso, marcado por aglomerados de hemácias (hemorragia ☾). Os animais tratados com o Di-MTF (1,25 mg/kg) apresentaram redução nos parâmetros inflamatórios analisados tais como redução na migração celular, edema e hemorragia com consequente diminuição do dano alveolar difuso.

Figura 6: Efeito anti-inflamatório do Di-MTF sobre parâmetros histopatológicos da região pulmonar em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.



Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

Figura 6. As imagens de A-F são cortes histológicos da região pulmonar corados com H&E, x100 (600 μm), aproximados x400 (150 μm). ★ indica infiltração celular ◆ edema alveolar ☾ hemorragia. O grupo Basal (A e D) foi tratado apenas com salina. O grupo LPS (B e E) foi desafiado com LPS (2,5 mg/kg; i.n) / tratado com salina. O grupo Di-MTF (C e F) foi tratado com a molécula teste (1,25 mg/kg v.o) e desafiado com LPS (2,5 mg/kg; i.n).

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

Gráfico 14. Score histológico do efeito anti-inflamatório do Di-MTF sobre parâmetros histopatológicos da região pulmonar em modelo experimental da lesão pulmonar aguda induzida por LPS.

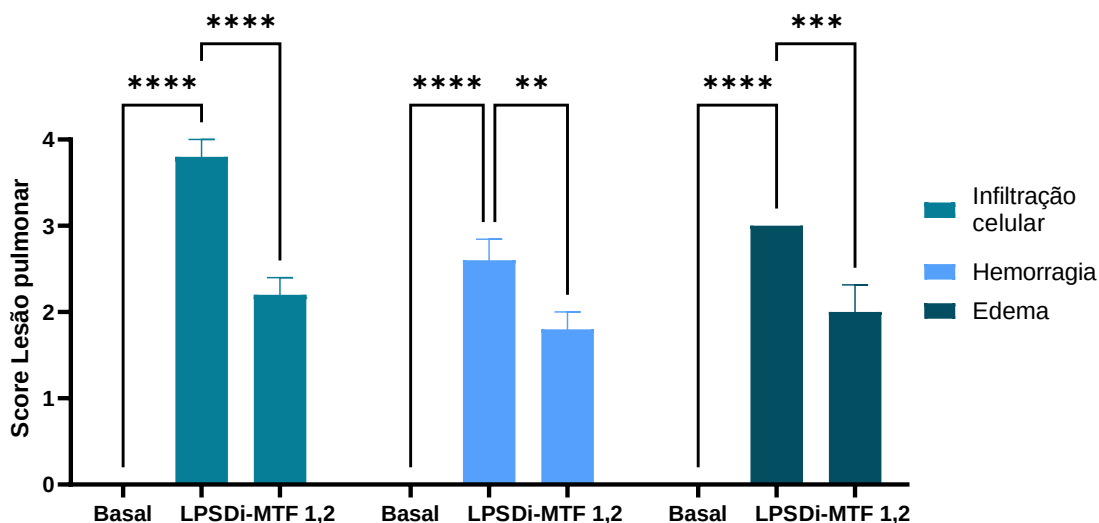


Gráfico 14. Camundongos BALB/c(n=6) foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg; i.n) 1h após o tratamento com o Di-MTF 1,25 mg/kg, ou veículo (Grupo LPS). O grupo basal foi desafiado apenas com salina (300 µl). Após 24h do estímulo com LPS foi realizado a coleta do pulmão, e seguida submetido ao protocolo de coloração com Hematoxilina & Eosina (HE). Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Turkey ##### $p < 0,0001$; comparação entre grupo LPS e salina; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; para comparação do grupo tratado com o grupo LPS.

Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

5.15 Análise de estudos *in silico* do Di-MTF sobre interação com proteínas alvos MAPK p38, Toll-like 4 (TLR4), ERK2 e NF-kB

O *docking* molecular foi realizado para investigar um provável mecanismo farmacológico do Di-MTF pela sua interação com os possíveis alvos farmacológico (p38MAPK, TLR4, ERK 2 e NF-kB).

Dessa forma, com auxílio da técnica *re-docking* obtivemos os seguintes resultados de validação: Ancoragem do alvo MAPK p38 valor do RMSD foi de 0,214 Å; o Toll-4 foi de 0,732 Å e o ERK2 foi de 0,168 Å. Vale enfatizar que o alvo para o NF-kB não possuía nenhum ligante previamente ancorado, logo não foi possível fazer a validação por meio do *re-docking*.

Os resultados da energia de ligação foram realizados pelo consenso de dois scores de energia o *MolDock score* e o *Rerank score* (Tabela 1). Desta forma, resultado mais plausível foi entre interação do Di-MTF com MAPK p38 e Toll-4, em que observamos energia de ligação -66,680 kcal/mol e -37,577 kcal/mol, respectivamente. Deste modo, verifica-se que ultrapassou a energia de ligação da droga padrão, a dexametasona (Dexa) que teve como resultados MAPK p38 de -53,035 kcal/mol e o Toll-4 de -9,478 kcal/mol. Embora o valor do consenso para a dexametasona tenha sido menor que -8 kcal/mol, o *Rerank score* não passou no valor de corte, por conseguinte não possui significância.

Quanto a ancoragem do Di-MTF sobre ERK 2 (Tabela 1), a interação gerou energia de ligação de -53,735 kcal/mol, entretanto a energia de ligação do dexametasona foi superior, sendo de -81,763 kcal/mol. De maneira semelhante, observamos a ancoragem do alcaloide (Di-MTF) com o NF-kB, resultando em uma energia de ligação de -67,491 kcal/mol, sendo inferior à da droga padrão, dexametasona (-85,147 kcal/mol).

Alvos	Di-MTF			Dexa		
	<i>MolDock Score</i> (kcal/mol)	<i>Rerank Score</i> (kcal/mol)	<i>Consenso Score</i> (kcal/mol)	<i>MolDock Score</i> (kcal/mol)	<i>Rerank Score</i> (kcal/mol)	<i>Consenso Score</i> (kcal/mol)
MapK p38	-91,685	-41,674	-66,680	-79,803	-26,266	-53,035
Toll-4	-45,156	-29,997	-37,577	-39,498	20,5419	-9,47805
ERK 2	-89,518	-17,951	-53,735	-97,239	-66,288	-81,763
NF-kB	-111,676	-23,305	-67,491	-95,042	-75,251	-85,147

Tabela 1. Resultados da energia de ligação por *docking* molecular

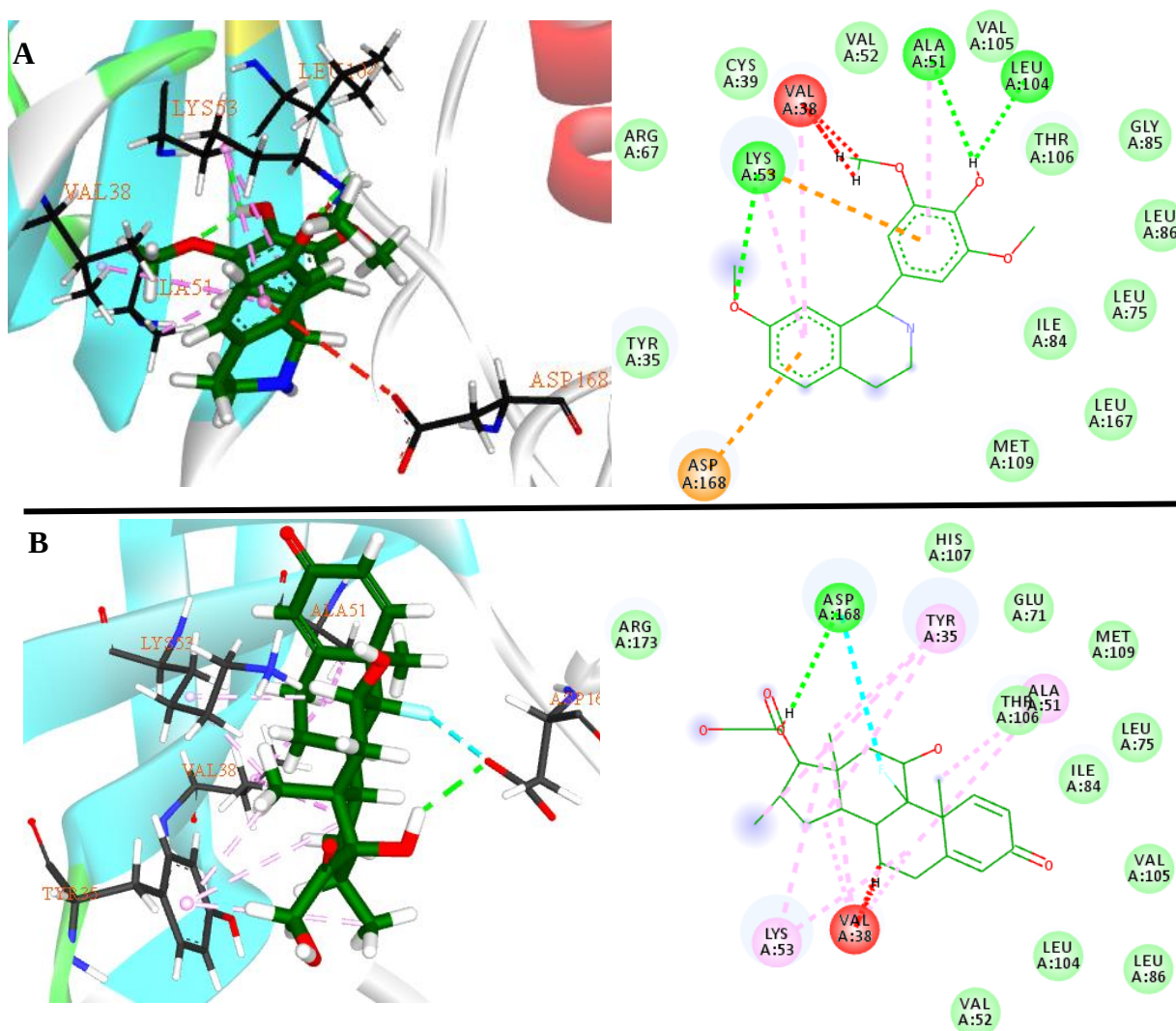
Fonte: Elaborado pelo autor VIEIRA, 2023.

Em adição, analisamos as interações entre os alvos proteicos e o Di-MTF no formato de 2D e 3D. A figura 7A mostra que o Di-MTF complexado com MAPK p38 exibiu ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos: LEU104, ALA51 e LYS53. Realizou também interações do tipo pi-cation, pi-alquil e pi-anion com os resíduos LYS53; ALA51, VAL38; ASP168. Para mais, observou-se interações de van der Waals com os resíduos: ILE84, VAL105, VAL52, LEU86, LEU75, THR106, LEU167, MET109, CYS39, ARG67, TYR35 e GLY85.

A respeito, da análise de interação da droga de referência, dexametasona com MAPK p38 (Figura 7B), observamos que houve apenas uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido ASP168. Nesse mesmo resíduo também exibiu uma interação halogênica. A dexametasona apresentou interações alquil com ALA51, VAL38 e LYS53; interações de van der Waals com GLU71, THR106, ARG173, HIS107, MET109, LEU104, VAL105, VAL52, ILE84, LEU75 e LEU86; e interações pi-alquil com TYR35.

Dessa forma, ambas as moléculas estudadas apresentaram somente uma interação desfavorável com o resíduo do tipo VAL38, esta acarreta uma diminuição das energias de ancoragem que ocorrem em razão de choques estéricos intermoleculares.

Figura 7: Interações entre MAPK p38 e o Di-MTF-A/Dexa-B em 2D e 3D

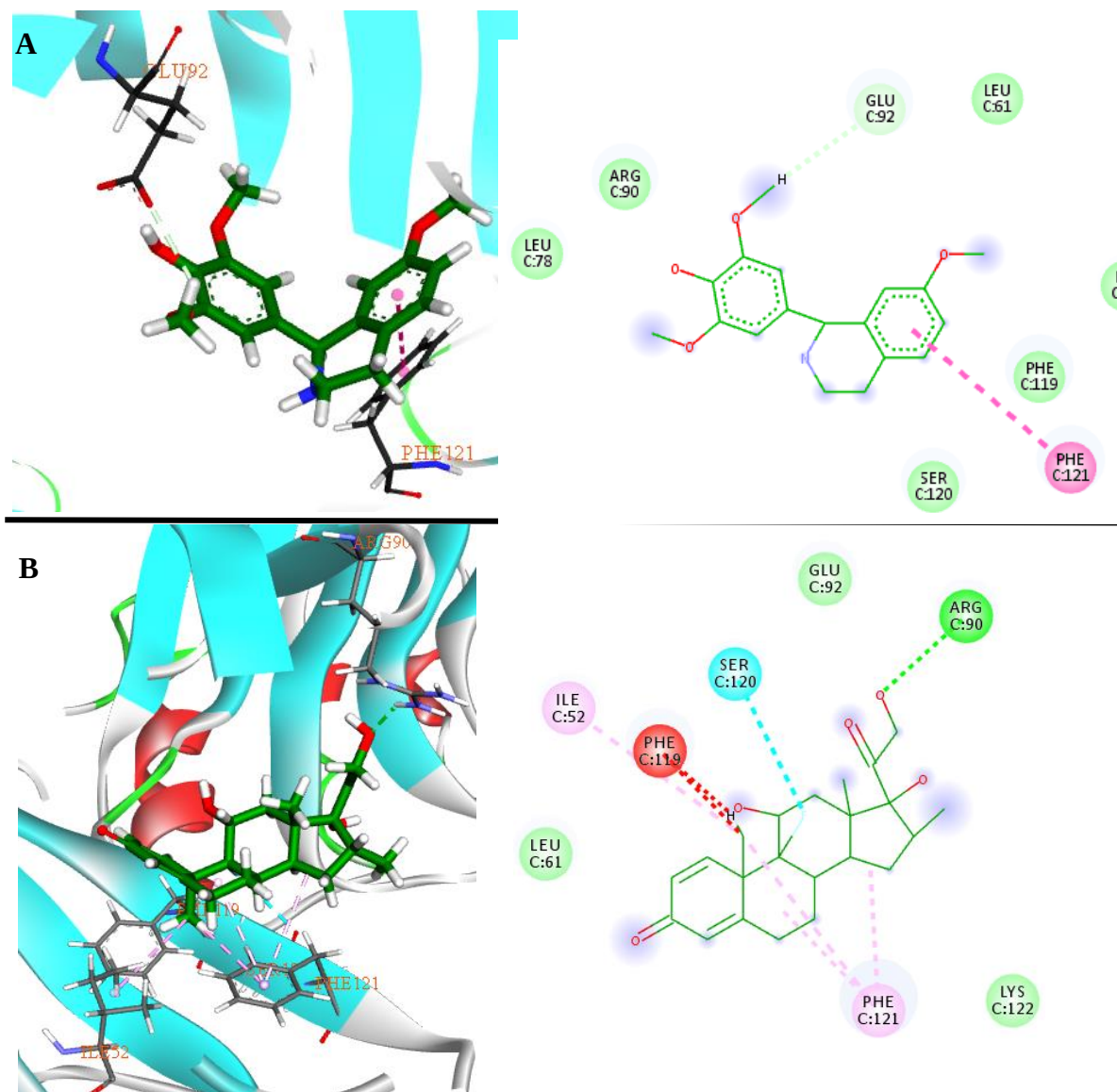


Com relação as análises de interação do Di-MTF com alvo, Toll-4 (Figura 8A), observa-se que a molécula teste interagiu através de ligações carbono-hidrogênio com o resíduo de aminoácido: GLU92, além de fazer o emparelhamento pi-pi com o anel da PHE121 e fez interações de van der Waals com os resíduos: ARG90, LEU78, LEU61, ILE52, PHE119 e SER120.

Por sua vez, a dexametasona (Figura 8B), interagiu por meio de ligação de hidrogênio com a ARG90; realizou interações pi-alquil com a PHE121; interações halogênicas com a SER120; interações alquil com a ILE52; E interações de van

der Walls com os resíduos LEU61, GLU92 e LYS122. E por fim, o fármaco controle também apresentou interações desfavoráveis com a PHE119.

Figura 8: Interações entre Toll-4 e o Di-MTF-A/Dexa-B no formato 2D e 3D

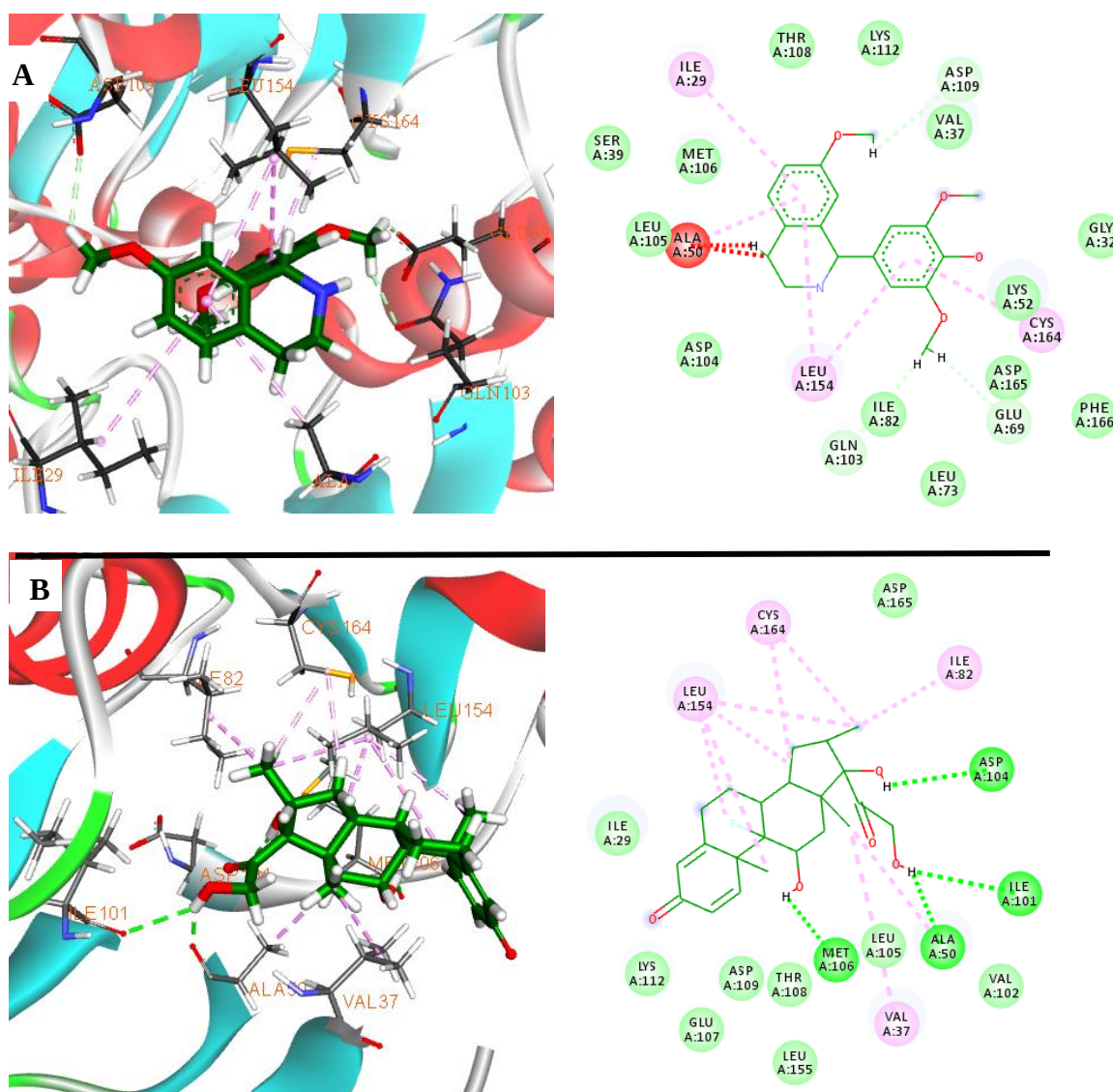


As interações obtidas entre o Di-MTF e a proteína ERK 2 (Figura 9A) constatamos a presença de ligações carbono-hidrogenio com os resíduos de aminoácidos ASP109, GLN103 e GLU69; interações pi-alquil com os LEU154, CYS164 e ILE29; interações de van der Waals com SER39, LEU105, ASP165,

LYS52, LEU73, PHE166, ILE82, GLY32, VAL37 e LEU112. Entretanto, a molécula teste apresentou 2 ligações desfavoráveis com a ALA50.

Observando o complexo dexametasona/ERK2 (Figura 9B) identificamos ligações de hidrogênio com mesmos resíduos de aminoácido que a molécula testada: MET106 e ASP104, além disso com ALA50 e ILE101; ainda fez interações de van der Waals com THR108, LEU155, ILE29, VAL102, GLU107, ASP109, LEU105 e LYS112; E por fim, fez interações de alquil com CYS164 VAL37, LEU154, ILE82 e ALA50.

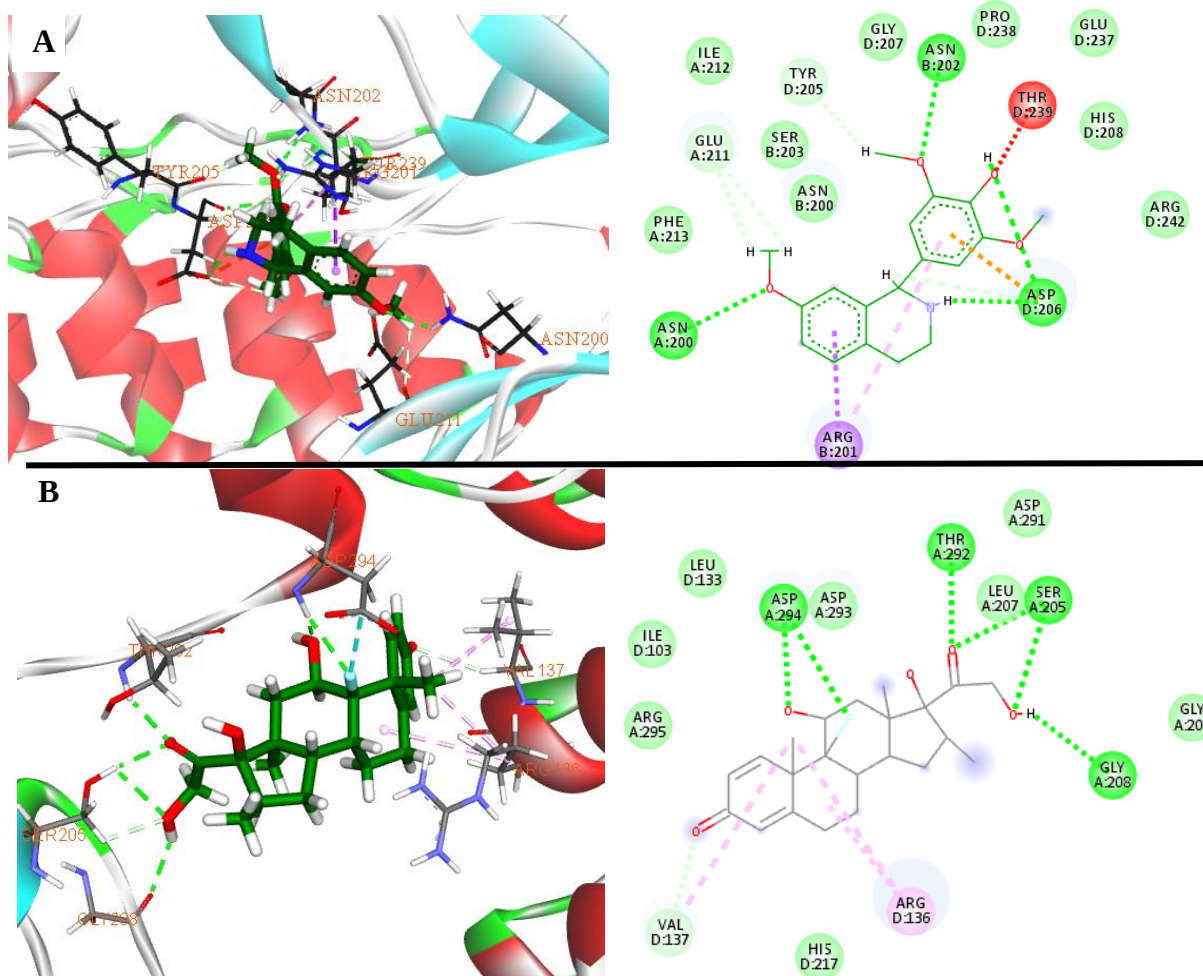
Figura 9: Interações entre ERK2 e o Di-MTF-A/Dexa-B em 2D e 3D



No encaixe com o NFkB, e o Di-MTF (Figura 10A) podemos verificar a interação por meio de ligações de hidrogênio com o resíduo ASN202, ASP206 e ASN200(A); ligações carbono-hidrogênio com os resíduos de aminoácidos GLU211, TYR205 e ASP206. A molécula teste também interagiu com o ASP206 através da interação pi-anion e fez interações pi-sigma e pi-alquil com ARG201; Observamos a presença de interações de van der Waals com PHE213, ASN200(B), SER103, ILE212, GLY207, PRO238, GLU237, HIS208 e ARG242. Ademais, a molécula apresentou 1 ligação desfavorável com THR239.

Já a dexametasona (Figura 10B) apresentou 6 ligações de hidrogênio, sendo 1 ligação com os resíduos: GLY208 e THR292, e 2 ligações com cada resíduo de aminoácido: SER205 e ASP294. O fármaco controle também demonstrou uma ligação carbono-lidrogênio com a VAL137 e interações de alquil com: ARG136 e VAL137. Por fim, o encaixe estrutura-ligante teve interações de van der Waals com HIS217, ARG295, ASP293, GLY209, LEU207 LEU133, ILE103 e ASP291.

Figura 10: Interações entre NFkB e o Di-MTF-A/Dexa-B em 2D e 3D



5.16. Predição de propriedade farmacocinética (ADMET)

O Di-MTF foi sujeito a várias ferramentas preditivas de bioinformática para investigar suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, examinando parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET).

Com base nas características físico-químicas, buscamos prever parâmetros de absorção do alcaloide sintético de acordo com violação das cinco regras de Lipinski, além de analisar a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. No modelo de predição da absorção oral, o Di-MTF demonstrou uma boa predição para absorção oral de 93,27% (Tabela 2), sendo semelhante à taxa de absorção oral da dexametasona, que foi de 94,83%.

Ademais, observamos que as substâncias não violaram nenhuma regra de Lipinski.

Sobre a investigação dos parâmetros de lipofilicidade (WLOGP) e polaridade (tPSA), analisamos BOILED-Egg através do SwissADME. Verificamos que o Di-MTF possivelmente atravessa a BHE e é eliminada do sistema nervoso central pela Glicoproteína P (Figura 10).

Moléculas		
	Di-MTF	Dexametasona
Peso Molecular g/mol	315,368	392,47
cLogP	2,6979	1,288
Aceptor-H	5	5
Doador-H	2	2
TPSA	59,95	80,56
%ABS	93,27	94,83

Tabela 2: Propriedades farmacocinéticas do Di-MTF

Analisamos, o possível risco de citotoxicidade das moléculas (Di-MTF/Dexa) pelo programa OSIRIS DataWarrior. Os resultados demonstraram que as moléculas não apresentam risco tóxico nos quatro parâmetros avaliados: carcinogenicidade, mutagenicidade, efeitos tóxicos e irritabilidade da pele.

6. DISCUSSÃO

A inflamação aguda em aspecto fisiopatológico engloba uma variedade de eventos conduzidos por células e moléculas do sistema imunológico que agem no organismo de maneira exacerbado. Em outros termos, aumentam proteínas imunorreguladoras, quimiocinas, permeabilidade vascular e recrutamento de

leucócitos para o local inflamado (HAN et al., 2021). Deste modo, tem sido definido os cinco sinais cardinais da inflamação: dor, calor, edema, rubor e reparo. Entretanto, esses mecanismos, se persistirem, podem evoluir para diversos estados doentes, tendo como exemplo a lesão pulmonar aguda, que é uma resposta imunológica do organismo, acometendo os alvéolos pulmonares resultando em edema intersticial pulmonar, deterioração da complacência pulmonar seguido por uma hipoxemia (WU et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

De acordo com os estudos realizados pelo grupo de pesquisa no laboratório de imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba, os alcaloides tetrahydroisoquinolínicos têm sido considerados marcadores químicos promissores para possíveis alternativas terapêuticas em processos inflamatórios pulmonares (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015a; PAIVA FERREIRA et al., 2018, 2021; XAVIER, 2018). Com base nisso, é considerável o estudo do novo alcaloide sintético tetrahydroisoquinolínicos, o Di-MTF, devido seus efeitos biológico, e a crescente busca por novas moléculas com efeito anti-inflamatório, que apresente menores efeitos colaterais.

Para compreender melhor atividade farmacológica do alcaloide inédito (Di-MTF), preliminarmente investigamos seu possível efeito anti-edematogênico; seu papel na permeabilidade vascular, migração celular e modulação de citocinas pro-inflamatórias em modelos experimentais de inflamação.

Para a triagem da dose farmacológica do Di-MTF, o modelo de edema de pata induzido por carragenina foi utilizado.

O edema de pata induzido por carragenina é um evento bifásico, idade e peso dependentes e que se desenvolve nas primeiras -6 h, seguido por uma segunda fase (6 às 24 h), na qual várias moléculas e células auxiliam no processo inflamatório (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Nas primeiras 6 horas do processo, os mediadores identificados são os eicosanoides (PGE_2), as aminas vasoativas (histamina e serotonina), bradicinina e óxido nítrico (NO) (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016b). Esses mediadores agem no local da inflamação, promovendo o aumento da permeabilidade vascular. Estudos demonstraram aumento nos níveis da PGE_2

na primeira fase (até 6 h), no qual atinge o pico às 2h. Esse mediador é produzido mediante ação das enzimas cicloxigenases (COX), que colaboram para manutenção dos níveis de PGE_2 , nos tecidos inflamados (HUANG et al., 2012).

Na segunda fase do processo (6 às 24 h), ocorre migração leucocitária, principalmente neutrófilos, bem como os níveis de mieloperoxidase (MPO) que são considerados marcadores da migração neutrofílica. Essas informações corroboram com os estudos realizados por PHAM et al. (2023) os quais observaram elevação nos níveis de MPO na fase inicial às 6 h e atingem seu máximo às 24 h, sugerindo que a infiltração celular atinge o pico entre 6 e 24hs. Em adição, estudos apontam que nessa fase a carragenina pode atuar sobre NF- κ B, aumentando níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e COX-2, pois esses mediadores podem permanecer elevados até 24 horas (CALDAS DA SILVA DANTAS VIEGAS et al., 2022).

No presente estudo, os animais desafiados, por via intraplantar com o carragenina e tratados com as doses de 1,25 ou 2,5 mg/kg do Di-MTF apresentaram inibição na formação do edema de pata nos tempos analisados (1h, 6h e 24h), indicando efeito anti-edematogênico. Esses dados corroboram com os estudos de SILVA et al. (2017) que observaram que a milonina, um alcaloide quando utilizado em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina reduziu o edema. Esse efeito pode estar correlacionado com ação sobre as células e mediadores do tecido inflamado entre eles a PGE_2 .

Nessa perspectiva, para a segurança de qualquer molécula candidata a medicamento, é farmacologicamente sugerido que várias doses de uma substância, ao exercerem efeito terapêutico, seja escolhido a menor dose eficaz. Assim, a dose escolhida, neste estudo, para dar continuidade foi a de 1,25 mg/kg do Di-MTF, pois promoveu efeito farmacológico eficaz e duradouro.

Considerando a atividade anti-edematogênica promovida pelo Di-MTF no edema de pata induzida por carragenina, o próximo parâmetro investigado foi seu possível efeito sobre os mediadores que orquestram a fase inicial da reação inflamatória, tal como os eicosanoides (PGE_2), cininas (bradicinina), serotonina (5-HT) e histamina, para assim traçarmos seus mecanismos de ação.

A prostaglandina da série E2 (PGE₂) pertence à família dos eicosanoides, proveniente da metabolização do ácido araquidônico, onde está esterificado nas membranas das células e é liberado para citosol por meio da PLA₂ (fosfolipase A2 não esterificada) (KOMATSU et al., 2023). No citosol sofre ação das cicloxigenases (COXs) que catalisam duas reações sequenciais. Assim, a PGE₂ é gerada a partir do intermediário PGH₂ sob ação da enzima PGES (prostaglandina E sintetase) (DI DATO et al., 2020; POSADAS et al., 2004). A produção da PGE₂ é induzida principalmente por estímulos inflamatórios associados à ativação COX-2, a qual desempenha funções tais como: vasodilatação, aumento da permeabilidade e dor, isso ocorre via ativação de seus receptores de superfície celular específico do tipo EP (LEBENDER et al., 2018).

Portanto, observamos que o tratamento com Di-MTF reduziu o edema de pata induzido por PGE₂, de maneira semelhante à indometacina, um reconhecido bloqueador da COX. O alcaloide Di-MTF pode estar interferindo na ação da PGE₂ via direta ao receptor EP ou na via de sinalização induzida pela PGE₂ necessitando, portanto, estudos adicionais para comprovar seu mecanismo de ação.

Resultado semelhante foi descrito para fração do alcaloide das partes aéreas da *W. viscosissima*, em que a dose de 100 mg/kg, administrada antes da inoculação da PGE₂, inibiu o edema de pata (CALDAS DA SILVA DANTAS VIEGAS et al., 2022).

A bradicinina é um mediador inflamatório que está envolvida no sistema das cininas plasmáticas e tem ação pró-inflamatória, pois estabelece vasodilatação, aumento da permeabilidade e alterações celulares. Em adição, sua ação é via ativação dos receptores B1 e B2 acopladas à proteína G nas células endoteliais. O receptor do tipo B1 está diretamente envolvido na formação e na manutenção dos sinais cardinais da inflamação aguda (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016c). Nesse caso, a bradicinina ligada ao receptor B1, presente no endotélio dos vasos, leva ativação da proteína G (Gi/o) resultando na ação da PLA₂ que leva a formação da PGE₂, que intensifica os sinais inflamatórios, como na indução da dor e febre.

O Di-MTF foi capaz de reduzir a formação do edema induzido por Bk, indicando que o alcaloide pode estar inibindo a Bk, impedindo sua ligação com receptor B1. Corroborando com essa hipótese LEITE et al., (2016) certificaram o efeito anti-edematogênico induzida por BK da curina, alcaloide bisbenzilisoquinolínico da planta *Chondodendron platyplylum*.

A serotonina (5-HT) é um dos mediadores inflamatórios liberada no sítio inflamado, indutora de edema. Quando liberada por células inflamatórias, a 5-HT atua em diversos estágios do processo inflamatório, como nas alterações vasculares, com aumento da permeabilidade e promove direta ou indiretamente o recrutamento de leucócitos (RETAMAL et al., 2021). Os receptores serotoninérgicos, tais como 5HT-1 e 5-HT3, foram descritos por estarem associados com a modulação da degranulação de mastócitos (FLANAGAN et al., 2019; SZABO et al., 2018). Dessa forma, este mediador atua na fase inicial do processo inflamatório.

O pré-tratamento com o Di-MTF dos animais desafiados com a 5-HT promoveu redução da formação do edema de pata, demonstrando que esse efeito está associado à inibição das vias de sinalização induzidas por 5-HT. Já estudos apontados por SILVA et al. (2017) mostram que o tratamento com a milonina não reduziu o edema induzido por 5-HT indicando sua não interferência nas vias de sinalização serotoninérgicas.

O composto 48/80 é um agente flogístico capaz de liberar seletivamente a histamina, via degranulação de mastócitos. Esse processo ocorre quando o agente indutor é injetado no tecido conjuntivo, atravessa a membrana dos mastócitos e ativa a proteína G do tipo Gi. Dessa maneira, forma o dímero Gi/ $\beta\gamma$, ativando diretamente a fosfolipase C do tipo $\beta 2$, que fosforila os canais de cálcio com influxo desse íon, resultando em uma translocação e fusão das vesículas contendo histamina e consequentemente sua liberação (ARTHUR et al., 2020; PATON, 1951).

A redução do edema induzido pelo composto 48/80 pelo Di-MTF indica que o alcaloide esteja inibindo a degranulação dos mastócitos, portanto, atuando no estágio inicial do processo inflamatório. Estudos apontados por PACHECO DE OLIVEIRA et al. (2015) mostram que o tratamento com o MHTP, molécula

análoga do Di-MTF, não reduziu a formação do edema induzido por composto 48/80, tornando seu análogo, o Di-MTF, uma molécula interessante nos processos inflamatórios regidos por mastócitos.

A histamina é uma amina biogênica derivada da histidina, presente em seres procariotos, tecidos de animais e plantas, que medeia vários processos fisiológicos e patológicos. Seus efeitos ocorrem pela sua ligação com seus receptores (H_1 , H_2 , H_3 , H_4) (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014; HAAS et al., 2018). No receptor H_1 , presente no endotélio do vaso, a histamina ativa a proteína G do tipo $G_q/11$, propiciando um aumento de inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) intracelulares. O IP_3 ocasiona a liberação de Ca^{2+} intracelulares, aumentando a concentração citosólica de Ca^{2+} . O aumento desse íon no citosol possibilita a contração e separação das células endoteliais e isso vai culminar na formação do edema. Em adição, a ativação do receptor H_1 leva à ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), o qual está envolvido na expressão de moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias (DÍAZ NEBREDÁ et al., 2019; O'MAHONY; AKDIS; AKDIS, 2011).

O pré-tratamento com o Di-MTF dos animais desafiados com histamina não diminuiu o edema de pata, demonstrando que o alcaloide não atua a nível de receptor de histamina, conseqüentemente, não interferindo na sua via de transdução de sinal. PACHECO DE OLIVEIRA et al. (2015) reforçam esses resultados e observam que os animais tratados com o MHTP na dose de 2,5 mg/kg não inibiu a formação do edema induzido por histamina.

Com base ao efeito anti-edematogênico, promovido pelo Di-MTF, investigamos se essa atividade estaria atrelada ao extravasamento proteico e acúmulo de leucócitos via modulação de proteínas imunorregulatórias, (TNF- α , IL-1 β , IL-6).

O aumento da permeabilidade vascular no local inflamado resulta no exsudato, assim como também, no influxo de células do sistema imunológico, polimorfonucleares e mononucleares (SILVA et al., 2017). O modelo experimental de peritonite induzida por carragenina, como agente flogístico, foi utilizado para avaliar o Di-MTF.

A carragenina quando injetada no peritônio de um animal desencadeia um processo inflamatório local que envolve a liberação ordenada de mediadores como histamina, serotonina, tromboxanos, cininas, prostaglandinas, agentes quimiotáticos e, principalmente, os leucotrienos e o influxo de neutrófilos (COSTA et al., 2020). A migração dos neutrófilos no sítio inflamado ocorre por fases, como marginação e rolamento, aderência e processo de passagem da célula entre células endoteliais para o local inflamado (BEZERRA RODRIGUES DANTAS et al., 2020; SILVA et al., 2017).

O pré-tratamento com Di-MTF nos animais desafiados com a carragenina reduziu o número de leucócitos peritoneais, em especial os polimorfonucleares (neutrófilos) sem alterar o número de células mononucleares. Consequentemente, reduziu o extravasamento peritoneal de proteínas. Deste modo, podemos sugerir que a molécula em estudo pode estar atuando na inibição da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e células endoteliais, que consequentemente reduzem o processo de diapedese, além de induzirem a produção fluido proteico de fase aguda.

Pesquisa semelhante foi descrita para o tratamento oral com curina, um alcaloide bisbenzilisoquinolínico. Como resultado, identificaram que a dose de 2,5 mg/kg reduziu o número de leucócitos totais e pode ser atribuída a uma redução na migração de neutrófilos (RIBEIRO-FILHO et al., 2019).

Para reforçar nossa hipótese, investigamos o efeito da molécula teste, Di-MTF sobre a modulação de citocinas pro-inflamatórias.

Observamos que no lavado peritoneal de animais tratados com Di-MTF apresentou redução de TNF- α , IL1- β , IL-6, indicando seu efeito imunomodulador em modelo experimental de peritonite. A curina, um dos alcaloides presentes na planta *Chondodendron platyphyllum* também foi capaz de reduzir a produção de IL-6, IL- β e TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais (RIBEIRO-FILHO et al., 2019).

De acordo com os resultados apresentados acima podemos inferir que o DI-MTF promoveu efeito anti-inflamatório, reduzindo a migração de leucócitos

para região inflamada, bem como permeabilidade vascular e redução de citocinas pró-inflamatórias.

Para dar respaldo à atividade anti-inflamatória do Di-MTF, optou-se por investigar seu potencial efeito frente a doença inflamatória aguda estabelecida, denominada lesão pulmonar aguda experimental.

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma resposta inflamatória exacerbada do organismo que lesiona a região alveolar, ocasionando aumento de vários protótipos inflamatórios, tais como: aumento da permeabilidade capilar alveolar, aumento de fluidos proteicos (edema), acúmulo de células inflamatórias (polimorfonucleares), citocinas pró-inflamatórias e perda de tecido pulmonar aerado (HE et al., 2021; SHAH et al., 2021).

Com o desenvolvimento da LPA há uma intensa estimulação do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) na medula óssea para ampla produção de neutrófilos (polimorfonucleares - PMN) (ARCHANGELO, 2021). Após seu processo de maturação, essas células efetoras migram para cavidade pulmonar e auxiliam no agravamento da doença, por meio da degranulação via liberação de substâncias tóxicas como proteinases, citocinas, espécies reativas de oxigênio e polipeptídios catiônicos (YI, MIIAJG et al., 2015).

O acúmulo dessas substâncias nocivas provoca danos teciduais, deteriorando a forma arquitetônica dos alvéolos. Com isso, propicia apoptose e necrose de células pulmonares (pneumócitos tipo I ou II) responsáveis pela produção de surfactante e síntese do tecido pulmonar, causando uma deposição da membrana hialina, consequentemente, deterioração da complacência pulmonar (UNMENG et al., 2018).

Além do mecanismo de liberação de grânulos, os neutrófilos expõem armadilha extracelular de neutrófilos (NETs), organizado por conteúdo nuclear associado a várias proteínas (PAPAYANNOPOULOS, 2017). Este mecanismo captura e inibe crescimento de patógenos. Contudo, na LPA a intensa migração de neutrófilos e liberação das (NETs) acontecem de forma excessiva, resultando em dano na região alveolar, que é característica da fisiopatologia (CAVALCANTE-SILVA et al., 2021). Deste modo, torna-se crucial busca de

condutas farmacológicas para atenuar migração de neutrófilos para região pulmonar, consequentemente redução do agravamento da doença.

Em nossa pesquisa, observamos que os animais desafiados com LPS apresentaram elevada migração de neutrófilos no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e, o tratamento com o Di-MTF reduziu esse recrutamento, corroborando com nossos dados histológicos do tecido pulmonar.

Pesquisa realizada por DO NASCIMENTO XAVIER et al. (2019), em modelo experimental de LPA, demonstrou que o alcaloide tetraidroisoquinolínico sintético MHTP (2,5;5;10;20 mg/kg) diminuiu influxo de neutrófilos no BALF. Diante desses dados, indicamos previamente que o Di-MTF pode atenuar o processo inflamatório da LPA via redução do infiltrado de neutrófilos na cavidade pulmonar.

Em paralelo, analisamos o efeito do Di-MTF sobre a migração de células mononucleares (macrófagos) para região pulmonar. Entretanto não observamos alteração nesse perfil celular.

Os fagócitos mononucleares se formam na medula óssea, circulam no sangue e migram para os tecidos, originando os macrófagos. Eles migram para os tecidos por estímulos inflamatórios onde respondem a patógenos modulando respostas inflamatórias. Por essa razão, são consideradas células nas quais configuram uma alta plasticidade (BAHARUN et al., 2022).

Uma vez ativados, dependendo do microambiente, pode se configurar em dois tipos celulares: M1 e M2. M1 é ativação clássica, induzida por mediadores inflamatórios, resultando em produção e liberação de fatores pró-inflamatórios $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-23 , ROS e NO. Enquanto a ativação dos macrófagos reguladores M2 produzem e liberam fatores anti-inflamatórios como a IL-10 e fator de crescimento transformador- β ($\text{TGF-}\beta$)(YUAN et al., 2017).

O Di-MTF não alterou o número de fagócitos mononucleares na cavidade pulmonar sugerindo que sua ação possa estar interligada à plasticidade, ou seja, estimulando essas células a se configurarem para o perfil M2 que exercem efeito de reparo tecidual e anti-inflamatória.

O processo inflamatório gerado na LPA induz os neutrófilos e macrófagos a liberarem mediadores inflamatórios, os quais agem no endotélio capilar,

rompendo sua integridade, tal como aumentando permeabilidade capilar, atrelado à saída de fluídos proteicos (ZHANG et al., 2023). Esse mecanismo acarreta a formação do edema pulmonar, onde podemos mensurar via a metodologia da razão Úmido/Seco do pulmão e a quantificação de fluidos proteicos, que irão determinar a integridade da barreira alveolar-capilar e a extensão do edema pulmonar.

Em nossa pesquisa, constatamos que os animais desafiados com o LPS apresentaram aumento de fluidos proteicos pulmonar e da razão pulmonar U/S (Úmido/Seco) e, o tratamento com o Di-MTF foi capaz de reduzir esses dois parâmetros, inferindo atividade anti-edematogênica do alcaloide sintético.

Essa atividade exercida pelo Di-MTF ratifica nossos resultados expressos anteriormente referentes à atividade anti-edematogênica em modelo de edema de pata induzido por diversos agentes flogísticos, e o modelo peritonite associado à quantificação de proteínas, em que o mesmo alcaloide deprimiu esses dois fatores.

Para consolidar nossos achados referentes à integridade e à extensão do edema pulmonar na LPA, investigamos via escores semiquantitativos da lesão histológica do tecido pulmonar corados com H&E. Sendo assim, observamos que os animais com LPA apresentaram, no tecido pulmonar, infiltrado celular, espaçamento da parede alveolar (edema) e dano alveolar com presença de hemácias, caracterizando processo hemorrágico. Contudo, o tratamento com Di-MTF reverteu esses parâmetros de dano tecidual, o que corrobora com nossos resultados obtidos do fluido do lavado broncoalveolar, referente à redução do recrutamento de neutrófilos, fluído proteico e edema.

À frente desses resultados, pode-se concluir que o Di-MTF minimiza os parâmetros patológicos da LPA induzido por LPS, atenuando a migração de células inflamatórias, concentração de fluídos proteicos, edema pulmonar, a partir do peso dos pulmões, e parâmetros histopatológicos pulmonares (infiltrado celular, edema e hemorragia).

No decorrer da evolução da lesão pulmonar aguda, temos atuação das proteínas imunorregulatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 na cavidade pulmonar) que

auxiliam na severidade da doença desenvolvendo um estado hiper inflamatório (ROOT-BERNSTEIN; STAFFORD, 2021).

A citocina IL-1 β é liberada após estímulos inflamatórios como LPS no desenvolvimento da LPA, auxiliando na manutenção do processo inflamatório pulmonar e na sinalização de migração de neutrófilos atrelado à liberação de mais citocinas. Além disso, essa citocina diferencia os linfócitos T auxiliares (CD4+)(CAVALLI; DINARELLO, 2015; WANG et al., 2020; YE; WANG; MAO, 2020).

O TNF- α modula a resposta inflamatória na LPA onde ocorre uma exacerbação da resposta imune nos alvéolos pulmonares, esse mediador pode atuar na disfunção dos canais de sódio em células epiteliais e endoteliais pulmonares, colaborando com formação do edema pulmonar (OLIVEIRA NADER et al., 2023).

Associadamente, a atuação da IL-6 é crucial na LPA, sendo maciçamente expressa na severidade da doença. Desenvolve várias funções, como: estimula a produção de proteínas de fase aguda, diferencia linfócitos T auxiliares, produz linfócitos T citotóxicos, além de estimular a síntese de mais citocinas de forma excessiva (OLIVEIRA NADER et al., 2023; SLAATS et al., 2016; ZHU et al., 2020). Estudos evidenciaram que os pacientes com COVID-19/SDRA em estado severo apresentaram uma forte expressão dessa citocina (IL-6) indicando que a IL-6 pode ser um importante marcador da lesão pulmonar observado nessa infecção viral, sendo capaz de prever a mortalidade intra-hospitalar dos indivíduos acometidos (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017; HASANVAND, 2022; QIN et al., 2020).

Em nosso estudo verificamos aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no BALF e soro dos animais com LPA. Quando esses animais foram tratados com o Di-MTF houve redução dessas citocinas no BALF. Contudo, na análise do soro, somente o TNF- α e a IL-6 foram reduzidas. Assim, considerando a super expressão do TNF- α e IL-6 na LPA, o fato de que um alcaloide tem o efeito em diminuir essas citocinas no soro nos levar a sugerir que essa molécula tem efeito benéfico na resolução da LPA.

Fundamentando nossas hipóteses, pesquisa realizada por PAIVA FERREIRA et al. (2022) utilizando modelo experimental de LPA, identificaram que a curina, um alcaloide, foi capaz de suprimir os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no BALF.

Posto isto, sugerimos que o Di-MTF está modulando a produção dessas citocinas interferido nas suas vias intracelulares de sinalização, aliviando, portanto, o desenvolvimento da LPA.

Para compreender a atuação do Di-MTF sobre as vias de sinalização na produção das citocinas, investigamos, via estudos *in silico* (*docking* molecular) seu possível mecanismo de ação. Os alvos proteicos estudados foram: Toll-like 4 (TLR4), p38 MAPK, ERK 2 e NF κ B.

As citocinas são produzidas e liberadas por mecanismos intracelulares, em diversas células do sistema imune. Esse processo pode ter início a partir da ligação do lipopolissacarídeo (LPS) ao Toll-like 4 (TLR4), onde ocorrerá uma interação e dimerização, na qual proporcionará ativação de diferentes proteínas adaptadoras, como p38 MAPK e ERK. Elas irão controlar a fosforilação do inibidor do NF κ B e a translocação nuclear, para síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias (CHEN et al., 2015; JIANG et al., 2018; LEE et al., 2017).

Em nossos estudos *in silico* avaliamos a energia de ligação entre o Di-MTF e esses alvos proteicos e, observamos, que o resultado mais plausível foi entre interação do Di-MTF com a p38 MAPK e Toll-like 4 (TLR4), pois apresentaram uma energia de ligação de -66,680 kcal/mol e -37,577 kcal/mol, respectivamente.

Em adição, a formação desse complexo (Di-MTF-MAPK p38) exibiu ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações do tipo pi-cation.

Com relação as análises de interação do Di-MTF com Toll-like 4 (TLR4), observou-se que interagiu via ligações carbono-hidrogênio além de fazer o emparelhamento pi-pi com o anel da PHE121 e fez interações de van der Waals com os resíduos de aminoácidos.

Portanto, propomos que os efeitos imunorregulatórios na LPA promovido pelo Di-MTF, estejam associados a interrupção das vias de sinalização de Toll-like 4 (TLR4), p38 MAPK.

Por fim, avaliamos as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas do Di-MTF, examinando parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) e identificamos que o Di-MTF não violou as regras de Lipinski. Em adição, nas análises de lipofilicidade e polaridade, verificamos que o Di-MTF possivelmente atravessa a BHE e é eliminada do sistema nervoso central pela Glicoproteína P. Portanto, esses dados pressupõem que a molécula estudada possui propriedades físico-químicas e farmacocinéticas relevantes relacionado a sua absorção e permeabilidade em membranas biológicas.

Avaliar a toxicidade de qualquer substância candidata a medicamento é relevante, pois pode impedir falhas no decorrer do desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos. Por meio de metodologias computacionais, pode-se identificar a probabilidade de o Di-MTF desenvolver efeitos tóxicos. Assim, os resultados demonstraram que o alcaloide não apresentou risco tóxico nos quatro parâmetros avaliados: carcinogenicidade, mutagenicidade, efeitos tóxicos e irritabilidade da pele.

Sendo assim, diante desses resultados podemos pressupor, que o alcaloide sintético Di-MTF apresenta condições satisfatórias, no que tange as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicidade.

Em resumo, os nossos achados indicam que o Di-MTF apresentou atividades imunofarmacológicas em modelos experimentais de inflamação aguda, atenuando parâmetros como: edema, permeabilidade vascular, migração celular e citocinas pró-inflamatórias. Ademais, em estudo *in silico*, o alcaloide apresentou boa interação com Toll-like 4 (TLR4) e p38 MAPK, além dos parâmetros ADMET aceitáveis.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, inferimos que o tratamento com o alcaloide tetrahydroisoquinolínico sintético Di-MTF em estados inflamatórios experimentais apresenta:

- Atividade anti-edematogênica, pela redução do edema de pata induzido por CG, PGE2, Bk, 5-HT e composto 48/80.
- Atividade anti-inflamatória reduzindo a migração de células polimorfonucleares para o peritônio de animais desafiados com carragenina, além de reduzir os fluidos proteicos e citocinas.
- Potencial efeito anti-inflamatório por atenuar parâmetros na lesão pulmonar aguda como: migração de células inflamatórias; fluídos proteicos, bem como o edema pulmonar; níveis de IL-1- β , TNF- α , IL-6 no BALF, sendo a IL-6 e o TNF- α diminuídos a nível sistêmico; com preservação da arquitetura alveolar reduzindo o número de leucócitos nos espaços alveolares.

Em nossos estudos *in sílico* o Di-MTF apresentou condições satisfatórias, no que tange as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicidade. Além disso, promoveu boa interação com Toll-like 4 (TLR4) e p38 MAPK.

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.
- ALAM, M. B. et al. Protopine attenuates inflammation stimulated by carrageenan and LPS via the MAPK/NF- κ B pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110583, 1 set. 2019.
- ALMEIDA, M. R. et al. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 942–952, 2009.
- 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, 15 dez. 2017.
- ARAGONÈS, E. Determinación de serotonina plasmática y otros neurotransmisores en el diagnóstico de la depresión: Evidencia y falsedades. **FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria**, v. 27, n. 3, p. 131–133, 1 mar. 2020.
- ARCHANGELO, B. S. Expressão do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em sistema *Pichia pastoris* e otimização do bioprocesso. 24 jul. 2021.
- ARTHUR, G. K. et al. The Fc ϵ RI β homologue, MS4A4A, promotes Fc ϵ RI signal transduction and store-operated Ca²⁺ entry in human mast cells. **Cellular Signalling**, v. 71, 1 jul. 2020.

AYAN, M.; KOVELAMUDI, S.; AL-HAWWAS, M. Subacute stent thrombosis in a patient with COVID-19 pneumonia. <https://doi.org/10.1080/08998280.2020.1812792>, v. 34, n. 1, p. 175–177, 2020.

AYERS, K.; WALJEE, A. K.; SAINI, S. D. Short-Term Use of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Increases Risk of Gastrointestinal Bleeding in Men With Psychiatric Diagnoses. **Gastroenterology**, v. 147, n. 5, p. 1173–1174, 1 nov. 2014.

BAHARUN, B. N. B. et al. The influence of macrophage polarisation status and IL-6 in breast carcinoma invasion. **Revista de Senologia y Patología Mamaria**, v. 35, n. 2, p. 100–108, 1 abr. 2022.

BARTON, G. M. **A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system.** **Journal of Clinical Investigation** American Society for Clinical Investigation, , 1 fev. 2008.

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.

BERNARDO, L. R. Avaliação do mecanismo de ação da milonina no modelo murino de lesão pulmonar aguda e estudos in silico. 16 fev. 2022.

BERNARDO, L. R. et al. 4-Carvomenthenol, a monoterpene of essential oils, and its underlying effects on anti-inflammatory activity and immediate hypersensitivity reaction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, p. e20780, 6 jan. 2023.

BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Effectiveness of Cissampelos sympodialis and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 148–155, 2012.

BEZERRA BARROS, G. C. et al. 4-Carvomenthenol ameliorates the murine combined allergic rhinitis and asthma syndrome by inhibiting IL-13 and mucus production via p38MAPK/NF-κB signaling pathway axis. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106938, 1 nov. 2020.

BEZERRA RODRIGUES DANTAS, L. et al. Nootkatone Inhibits Acute and Chronic Inflammatory Responses in Mice. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2181, 7 maio 2020.

BOZZA, P. T. et al. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. **European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 270, n. 2–3, p. 143–149, 4 abr. 1994.

BRUNA, G. et al. MOLÉCULAS BIOATIVAS DERIVADAS DE LIPÍDIOS RELACIONADAS À RESPOSTA INFLAMATÓRIA. **ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION**, v. 7, 2018.

CALDAS DA SILVA DANTAS VIEGAS, C. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of the crude ethanolic extract and alkaloid fraction of *Waltheria viscosissima* A. St. - Hil. (Malvaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 292, 28 jun. 2022.

CARVALHO, M. S. Participação de receptores serotoninérgicos e noradrenérgicos espinais no efeito antinociceptivo da corrente interferencial em modelo animal de inflamação articular. 8 out. 2019.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International immunopharmacology**, v. 90, 1 jan. 2021.

CAVALCANTI, R. F. P. et al. Warifteine and methylwarifteine inhibited the type 2 immune response on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) experimental model through NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 85, p. 106616, 1 ago. 2020.

CAVALCANTI, R. F. P. et al. Limosilactobacillus fermentum modulates the gut-airway axis by improving the immune response through FOXP3 activation on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **Immunobiology**, v. 228, n. 5, p. 152721, 1 set. 2023.

CAVALLI, G.; DINARELLO, C. A. Treating rheumatological diseases and co-morbidities with interleukin-1 blocking therapies. **Rheumatology**, v. 54, n. 12, p. 2134–2144, 1 dez. 2015.

CHANNAPPANAVAR, R.; PERLMAN, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. **Seminars in Immunopathology** 2017 39:5, v. 39, n. 5, p. 529–539, 2 maio 2017.

CHEN, T. et al. Effects of esculetin on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via regulation of RhoA/Rho Kinase/NF- κ B pathways in vivo and in vitro. <http://dx.doi.org/10.1593/periodicos.capes.gov.br/10.3109/10715762.2015.1087643>, v. 49, n. 12, p. 1459–1468, 2 dez. 2015.

CHURCH, M. K. Allergy, histamine and antihistamines. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 241p. 321–331.

CHURCH, M. K. et al. The Pharmacology of Antihistamines. **Comprehensive Pharmacology**, p. 515–535, 1 jan. 2022.

COSTA, L. E. C. et al. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from Gracilaria intermedia algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 966–975, 15 set. 2020.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241–256, 20 jul. 2009.

CRIADO, P. R. et al. **Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: Novos conceitos. Anais Brasileiros de Dermatologia** Sociedade Brasileira de Dermatologia, , 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962010000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 31 out. 2020

DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117–1121, jun. 2016.

DANTAS, L. B. R. et al. Nootkatone inhibits acute and chronic inflammatory responses in mice. **Molecules**, v. 25, n. 9, 1 maio 2020.

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.

DI DATO, V. et al. Variation in prostaglandin metabolism during growth of the diatom *Thalassiosira rotula*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2020.

DÍAZ NEBRED, A. et al. Involvement of histamine H1 and H2 receptor inverse agonists in receptor's crossregulation. **European Journal of Pharmacology**, v. 847, p. 42–52, 15 mar. 2019.

DINARELLO, C. A.; SIMON, A.; VAN DER MEER, J. W. M. **Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases**. **Nature Reviews Drug Discovery** Nature Publishing Group, , 1 ago. 2012. Disponível em: <www.nature.com/reviews/drugdisc>. Acesso em: 8 dez. 2020

DO NASCIMENTO XAVIER, B. M. et al. MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 68, n. 12, p. 1061–1070, 1 dez. 2019a.

DO NASCIMENTO XAVIER, B. M. et al. MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- κ B signaling pathway-TLR4 dependent. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 68, n. 12, p. 1061–1070, 1 dez. 2019b.

EMAMI, S. et al. Synthesis, in silico, in vitro and in vivo evaluations of isatin aroylhydrazones as highly potent anticonvulsant agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 112, n. September 2020, p. 104943, 2021.

FAHEEM et al. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline (THIQ) as privileged scaffold for anticancer de novo drug design. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1916464>, v. 16, n. 10, p. 1119–1147, 2021a.

FAHEEM et al. Medicinal chemistry perspectives of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline analogs – biological activities and SAR studies. **RSC Advances**, v. 11, n. 20, p. 12254, 3 mar. 2021b.

FAMOUS, K. R. et al. Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 195, n. 3, p. 331–338, 1 fev. 2017.

FARZAEI, M. H. et al. **Targeting inflammation by flavonoids: Novel therapeutic strategy for metabolic disorders**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 out. 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6801776/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3501776/)>. Acesso em: 2 jul. 2020

FLANAGAN, T. W. et al. Activation of 5-HT₂ Receptors Reduces Inflammation in Vascular Tissue and Cholesterol Levels in High-Fat Diet-Fed Apolipoprotein E Knockout Mice. **Scientific Reports** 2019 9:1, v. 9, n. 1, p. 1–10, 17 set. 2019.

FRANÇA, E. B. et al. Óbitos por COVID-19 no Brasil: quantos e quais estamos identificando? **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. e200053, 22 jun. 2020.

GADELHA, F. A. A. F. et al. Immunomodulatory properties of *Musa paradisiaca* L. inflorescence in Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome (CARAS) model towards NF κ B pathway inhibition. **Journal of Functional Foods**, v. 83, p. 104540, 1 ago. 2021.

GARCÍA-GARCÍA, E. et al. Histamine regulates the inflammatory response of the tunicate *Styela plicata*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 382–391, 1 out. 2014.

GARCÍA-POSADAS, L. et al. Context-Dependent Regulation of Conjunctival Goblet Cell Function by Allergic Mediators. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12162, 15 dez. 2018.

GOMEZ, I. et al. The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, n. 2–3, p. 55–63, ago. 2013.

GROSICKI, M. et al. Eosinophils adhesion assay as a tool for phenotypic drug screening - The pharmacology of 1,3,5 – Triazine and 1h-indole like derivatives against the human histamine H4 receptor. **European Journal of Pharmacology**, p. 173611, 2 out. 2020.

HAAS, M. J. et al. Regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the histamine H1 receptor: Requirement for NF- κ B. **Life Sciences**, v. 208, p. 102–110, 1 set. 2018.

HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 5, p. 647–672, maio 2013a.

HAGEL, J. M.; FACCHINI, P. J. Benzylisoquinoline Alkaloid Metabolism: A Century of Discovery and a Brave New World. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 5, p. 647–672, maio 2013b.

HAN, Y. et al. Sophoraflavanone M, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens* Ait., suppresses pro-inflammatory mediators through both NF- κ B and JNK/AP-1 signaling pathways in LPS-primed macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 907, p. 174246, 15 set. 2021.

HANNOODEE, S.; NASURUDDIN, D. Resposta inflamatória aguda. **StatPearls [Internet]**, 2020.

HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in immunology**, v. 23, n. 3, p. 144–50, mar. 2002.

HASANVAND, A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 789, 1 jun. 2022.

HE, Y. Q. et al. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 163, p. 105224, 1 jan. 2021.

HEEMSKERK, N. et al. F-actin-rich contractile endothelial pores prevent vascular leakage during leukocyte diapedesis through local RhoA signalling. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 27 jan. 2016.

HERGEMOLLER, J. G. et al. EVOLUÇÃO DE ABCESSO PERIAPICAL AGUDO EM PACIENTE JOVEM – RELATO DE CASO. **Anais do Salão de Ensino e de Extensão**, v. 0, n. 0, p. 114, 2016.

HUANG, S. Y. et al. Sinularin from indigenous soft coral attenuates nociceptive responses and spinal neuroinflammation in carrageenan-induced inflammatory rat model. **Marine Drugs**, v. 10, n. 9, p. 1899–1919, set. 2012.

JANZ, D. R.; WARE, L. B. Biomarkers of ALI/ARDS: Pathogenesis, discovery, and

relevance to clinical trials. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 34, n. 4, p. 537–548, 2013.

JIANG, K. et al. Barbaloin protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated PI3K/AKT/NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 64, p. 140–150, 1 nov. 2018.

JIANG, Q. et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- κ B pathway. **International immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 370–376, 1 dez. 2015.

JIANG, W. et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state. **Chemico-Biological Interactions**, v. 243, p. 127–134, 5 jan. 2016.

JÚLIO, " et al. **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (UNESP), 24 maio 2018. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/154350>>. Acesso em: 10 out. 2020.

KERZARE, D. R. et al. Development of novel indole-linked pyrazoles as anticonvulsant agents: A molecular hybridization approach. **Archiv der Pharmazie**, v. 354, n. 1, p. 2000100, 2021.

KOMATSU, M. et al. Aristolochic acid induces an inflammatory response with prostaglandin E2 production and apoptosis in NRK-52E proximal tubular cells. **Toxicology Letters**, v. 378, p. 39–50, 1 abr. 2023.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins and Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2015.

KURIHARA, F. et al. Cutaneous manifestations due to histamine H1 antagonist. **World Allergy Organization Journal**, v. 13, n. 8, p. 100231, 1 ago. 2020.

KURODA, M. et al. Identification of interferon-stimulated genes that attenuate Ebola virus infection. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2020.

LEBENDER, L. F. et al. Selectively targeting prostanoid E (EP) receptor-mediated cell signalling pathways: Implications for lung health and disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 49, p. 75–87, abr. 2018.

LEE, J.; LIM, K. T. Inhibitory effect of phyto glycoprotein (24 kDa) on allergy-related factors in compound 48/80-induced mast cells in vivo and in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 5, p. 591–599, 1 maio 2010.

LEE, J. M. et al. Inhibition of neutrophil elastase contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury during neutropenia recovery in mice. **Journal of Anesthesia**, v. 31, n. 3, p. 397–404, 1 jun. 2017.

LEITE, F. C. et al. Cissampelos sympodialis has anti-viral effect inhibiting dengue non-structural viral protein-1 and pro-inflammatory mediators. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 4, p. 502–506, jul. 2016.

LI, W. S. et al. Enantioselective synthesis of 1-aryl tetrahydroisoquinolines by the rhodium-catalyzed reaction of 3,4-dihydroisoquinolinium tetraarylborates. **Organic Letters**, v. 23, n. 3, p. 1141–1146, 5 fev. 2021.

LIEBERMAN, P.; GARVEY, L. H. Mast Cells and Anaphylaxis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, n. 3, p. 1–7, 2016.

- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3–25, 1997.
- LÓPEZ-ECHEVERRI, Y. P. et al. Efectos de los Polimorfismos del Transportador y de los Receptores de Serotonina en la Depresión. **Revista Colombiana de Psiquiatría**, v. 52, n. 2, p. 130–138, 1 abr. 2023.
- LUO, M. et al. Antitumor and Adjuvant Activity of λ -carrageenan by Stimulating Immune Response in Cancer Immunotherapy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 22 jun. 2015.
- MAJNOONI, M. B. et al. Phytochemicals: Potential Therapeutic Interventions Against Coronavirus-Associated Lung Injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 18 nov. 2020.
- MALIK, R. et al. Pharmacophore modeling, 3D-QSAR, and in silico ADME prediction of N-pyridyl and pyrimidine benzamides as potent antiepileptic agents. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 37, n. 3, p. 259–266, 2017.
- MASON, C.; DOOLEY, N.; GRIFFITHS, M. Acute respiratory distress syndrome. **Clinical Medicine**, v. 16, n. Suppl 6, p. s66, 1 dez. 2016.
- MATTHAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature Reviews Disease Primers** 2019 5:1, v. 5, n. 1, p. 1–22, 14 mar. 2019.
- MCGONAGLE, D. et al. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 6, p. 102537, 1 jun. 2020.
- MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation**. Nature Publishing Group, , 24 jul. 2008.
- MONDRAGÓN-HERRERA, J. A. et al. Triptófano-5-hidroxilasa, transportador de serotonina y receptores serotoninérgicos en miocardiopatía dilatada. **Cirugía y Cirujanos**, v. 90, n. 6, p. 781–788, 22 nov. 2022.
- NATARAJAN, R.; NORTHROP, N. A.; YAMAMOTO, B. K. Protracted effects of chronic stress on serotonin-dependent thermoregulation. <http://dx.doi.org/10.3109/10253890.2015.1087502>, v. 18, n. 6, p. 668–676, 2 nov. 2015.
- NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 6, p. 327–340, 3 jun. 2011.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013.
- O'MAHONY, L.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. **Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors**. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** Mosby Inc., , 1 dez. 2011.
- OHSAWA, Y.; HIRASAWA, N. **The role of histamine H1 and H4 receptors in atopic dermatitis: From basic research to clinical study**. **Allergology International** Japanese Society of Allergology, , 1 jan. 2014.
- OLIVEIRA, S. L. DE; OLIVEIRA, S. L. DE. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* dosemiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides

tropânicos, flavonoides e diterpenos. 3 fev. 2012.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. DE; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 35–42, 2016c.

OLIVEIRA NADER, T. et al. Covid-19: o papel das Citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α na resposta inflamatória. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 225–256, 4 jan. 2023.

ORTIZ, M. I. et al. Naproxen, paracetamol and pamabrom versus paracetamol, pyrilamine and pamabrom in primary dysmenorrhea: a randomized, double-blind clinical trial. **Medwave**, v. 16, n. 9, p. e6587, 24 out. 2016.

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

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

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** 2022 32:1, v. 32, n. 1, p. 111–121, 28 jan. 2022.

PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid, Induces IFN- γ Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation. **Inflammation**, v. 41, n. 6, p. 2116–2128, 22 dez. 2018.

PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. MHTP, a synthetic alkaloid, attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome through downregulation of the p38/ERK1/2 MAPK signaling pathway in mice. **International Immunopharmacology**, v. 96, p. 107590, 1 jul. 2021.

PALOMER, X. **Involvement of prostaglandin (PG)E2 and the cAMP signaling pathway in the induction of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 microsomal-synthase 1 in macrophages activated with lipopolysaccharide.** *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis* Elsevier Doyma, , 1 jan. 2013.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology** 2017 18:2, v. 18, n. 2, p. 134–147, 9 out. 2017.

PARK, E. J. et al. The Heme Oxygenase-1 Inducer THI-56 Negatively Regulates iNOS Expression and HMGB1 Release in LPS-Activated RAW 264.7 Cells and CLP-Induced Septic Mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76293, 3 out. 2013.

PATON, W. D. M. **COMPOUND 48/80: A POTENT HISTAMINE LIBERATORJ.** *Pharmacol.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1476-5381.1951.tb00661.x>>. Acesso em: 29 jun. 2019.

PETRUCZYNIK, A. et al. Determination of Selected Isoquinoline Alkaloids from Mahonia aquifolia; Meconopsis cambrica; Corydalis lutea; Dicentra spectabilis; Fumaria officinalis; Macleaya cordata Extracts by HPLC-DAD and Comparison of Their Cytotoxic Activity. **Toxins** 2019, Vol. 11, Page 575, v. 11, n. 10, p. 575, 2 out. 2019.

PHAM, T.; RUBENFELD, G. D. Fifty years of research in ARDS. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome. A 50th birthday review. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 195, n. 7, p. 860–870, 1 abr. 2017.

PHAM, T. V. et al. The anti-inflammatory activity of the compounds isolated from *Dichroa febrifuga* leaves. **Saudi journal of biological sciences**, v. 30, n. 4, 1 abr. 2023.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331–338, maio 2004.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 1 ago. 2020.

QUE, Y. et al. Cytokine release syndrome in COVID-19: a major mechanism of morbidity and mortality. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1884248>, v. 41, n. 2, p. 217–230, 2021.

RAI, R. C. Host inflammatory responses to intracellular invaders: Review study. **Life Sciences**, v. 240, p. 117084, 1 jan. 2020.

RETAMAL, J. S. et al. Serotonin-induced vascular permeability is mediated by transient receptor potential vanilloid 4 in the airways and upper gastrointestinal tract of mice. **Laboratory Investigation** 2021 101:7, v. 101, n. 7, p. 851–864, 15 abr. 2021.

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

ROBB, C. T. et al. **Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. Seminars in Immunopathology** Springer Verlag, , 1 jul. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC4896979/?report=abstract>. Acesso em: 2 jul. 2020

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.

ROOT-BERNSTEIN, R.; STAFFORD, J. L. Innate Receptor Activation Patterns Involving TLR and NLR Synergisms in COVID-19, ALI/ARDS and Sepsis Cytokine Storms: A Review and Model Making Novel Predictions and Therapeutic Suggestions. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 2108, v. 22, n. 4, p. 2108, 20 fev. 2021.

SANDER, T. et al. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. **Journal of chemical information and modeling**, v. 55, n. 2, p. 460–473, 2015.

SANZ SEGURA, P. et al. Hemorragia digestiva alta secundaria a sobreingesta de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y antiinflamatorios no esteroideos. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 42, n. 10, p. 622–623, 1 dez. 2019.

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.

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.

SHAH, D. et al. Small Immunomodulatory Molecules as Potential Therapeutics in Experimental Murine Models of Acute Lung Injury (ALI)/Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–20, 1 mar. 2021.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of the inflammatory response. Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology** Baillière Tindall, , 1 set. 2004.

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.

SINGH, I. P.; SHAH, P. Tetrahydroisoquinolines in therapeutics: a patent review (2010-2015). <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1236084>, v. 27, n. 1, p. 17–36, 2 jan. 2016.

SLAATS, J. et al. IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1005973, 15 dez. 2016.

SONG, J. et al. Synthesis and biological evaluation of atropisomeric tetrahydroisoquinolines overcoming docetaxel resistance in triple-negative human breast cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 137, p. 106573, 1 ago. 2023.

SOUZA, G. M. DE. **UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI Programa de Pós-Graduação em Odontologia Glaciele Maria de Souza ADMINISTRAÇÃO PREEMPTIVA DO TRAUMEEL S[®] VERSUS DEXAMETASONA EM CIRURGIAS DE TERCEIROS MOLARES INFERIORES: ENSAIO CLÍNICO**. [s.l.] UFVJM, 19 jul. 2018. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1844>>. Acesso em: 8 dez. 2020.

SYKES, L. et al. Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour. **Reproduction**, v. 148, n. 2, p. R29–R40, jun. 2014.

SZABO, A. et al. Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT2B in a subset of human dendritic cells. **Scientific Reports** **2018 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 29 jan. 2018.

TACHIBANA, T. et al. Compound 48/80 reduces the crop-emptying rate, likely through a histamine-associated pathway in chicks. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 66, p. 57–63, 1 jan. 2019.

TELLI, G.; KAZKAYASI, I.; UMA, S. The effects of 5-hydroxytryptophan on carrageenan-induced mouse paw oedemas. **Revista de Nutrição**, v. 34, p. e200119, 2 jun. 2021.

THANGAM, E. B. et al. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1873, 13 ago. 2018.

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, jun. 2006.

UNMENG, L. et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways. **Molecular immunology**, v. 94, p. 7–17, 1 fev. 2018.

VALENZUELA, F.; FLORES, R. Antihistamínicos: Usos clásicos, nuevos y anecdóticos en dermatología. Parte 1: Histamina, sus receptores y antagonistas. **Piel**, v. 36, n. 2, p. 95–103, 1 fev. 2021.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 11, p. 692–704, 16 nov. 2015.

VIEIRA, G. C. et al. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 50–56, 2018.

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.

WANG, C. et al. Ouabain Protects Mice Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury. **Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 24, p. 4455, 28 jun. 2018a.

WANG, J. et al. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 17–41, 1 jul. 2020.

WANG, P. et al. Inflammatory mediators mediate airway smooth muscle contraction through a G protein-coupled receptor–transmembrane protein 16A–voltage-dependent Ca²⁺ channel axis and contribute to bronchial hyperresponsiveness in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 4, p. 1259–1268.e11, 1 abr. 2018b.

WU, H. et al. Plantamajoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing NF- κ B and MAPK activation. **International immunopharmacology**, v. 35, p. 315–322, 1 jun. 2016.

XAVIER, B. M. DO N. Efeito imunomodulador do 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il)fenol (mhtp) em um modelo de lesão pulmonar aguda. 16 fev. 2018.

XU, D. et al. Enhanced production of 5-hydroxytryptophan through the regulation of L-tryptophan biosynthetic pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 6, p. 2481–2488, 1 mar. 2020.

YANG, C. Y. et al. Discovery of 2-substituted 3-arylquinoline derivatives as potential anti-inflammatory agents through inhibition of LPS-induced inflammatory responses in macrophages. **Molecules**, v. 24, n. 6, 23 mar. 2019.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 607–613, 1 jun. 2020.

YI, MIAJG, Q. et al. Protective effects of polydatin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through TLR4-MyD88-NF- κ B pathway. **International immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 370–376, 1 dez. 2015.

YOKOMIZO, T. Two distinct leukotriene B4 receptors, BLT1 and BLT2. **Journal of Biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 65–71, fev. 2015.

YUAN, R. et al. Reversing the polarization of tumor-associated macrophages inhibits tumor metastasis. **International Immunopharmacology**, v. 49, p. 30–37, 1 ago. 2017.

ZHANG, F. et al. Huashibaidu formula attenuates sepsis-induced acute lung injury via suppressing cytokine storm: Implications for treatment of COVID-19. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 109, 1 jan. 2023.

ZHANG, X. et al. Kegan Liyan oral liquid ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway and MMP-9 expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 186, p. 91–102, 20 jun. 2016.

ZHU, J. et al. Design, synthesis, and antifungal activities in vitro of novel tetrahydroisoquinoline compounds based on the structure of lanosterol 14 α -demethylase (CYP51) of fungi. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 20, p. 5285–5289, 15 out. 2006.

ZHU, Z. et al. From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. **Respiratory Research**, v. 21, n. 1, 27 ago. 2020.

ZULIANI-ALVAREZ, L. et al. Mapping tenascin-C interaction with toll-like receptor 4 reveals a new subset of endogenous inflammatory triggers. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2017.

ANEXOS

ANEXO I: Certificação do CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba
Comissão de Ética no
Uso de Animais

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 (10.001064), 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 (10.001064), 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			Quantidade: 351
				Peso: 20 a 25 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPEFarM			
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos	Idade: 6 a 8 semanas
Linhagem:	Mus musculus - Balb/C			Quantidade: 325
				Peso: 20 a 25 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPEFarM			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	Idade: 6 a 8 semanas
				Quantidade: 312

ANEXO II: Produção científica (2021-2023)

- Artigos em periódicos internacionais:



An Acad Bras Cienc (2022) 94(Suppl. 4): e20211327 DOI 10.1590/0001-376520220211327
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



**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

Recebimento dos originais: 23/08/2022

Aceitação para publicação: 20/09/2022

Cosmo Isaías Duvirgens Vieira

Farmacêutico, Mestre em Produtos Sintéticos Naturais e Bioativos
Laboratório de Imunofarmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal
da Paraíba,
Endereço: CEP: 58051-900, João Pessoa - PB, Brasil
E-mail: cosmoisaías@lftf.ufpb.br

BJPS

Brazilian Journal of
Pharmaceutical Sciences

<http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902022e20780>

Article

**4-Carvomenthenol, a monoterpene of essential oils,
and its underlying effects on anti-inflammatory
activity and immediate hypersensitivity reaction**

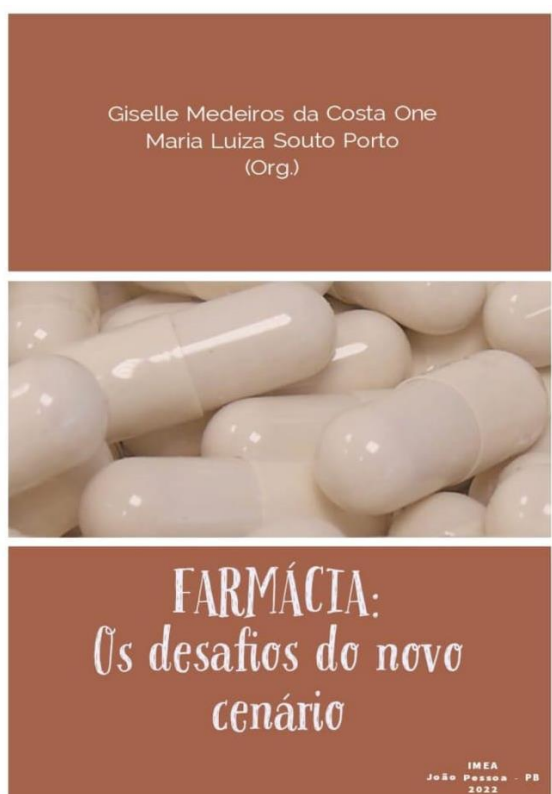
Larissa Rodrigues Bernardo¹, Laércia Karla Diega Paiva Ferreira¹,
Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira¹, Cosmo Isaías Duvirgens Vieira¹,
Adriano Francisco Alves², Pedro Thiago Ramalho Figueiredo³,
Marcia Regina Piuvezam^{1*}

1. 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, Mayara dos Santos Maia, Marcus Tullius Scotti, José Maria Barbosa Filho, Marcia Regina Piuvezam. "Milonine protects against acute lung injury by modulating the Akt and NF-κB signaling pathway". Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 2021.

2. Ferreira, Laércia Karla Diega Paiva; Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva; Lima, Louise Mangueira de ; Oliveira, João Batista de ; Vieira, Cosmo Isaías Duvirgens ; Bernardo, Larissa Rodrigues ; Piuvezam, Marcia Regina. Brazilian Journal of Development, v.8, n.9, p.63781-63794, sep., 2022.

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

- Capítulos de livros publicados:



USO DA INDOMETACINA COMO DROGA PADRÃO ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELOS MURINO DE DESORDENS INFLAMATÓRIAS AGUDAS NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB

CAPÍTULO 17

USO DA INDOMETACINA COMO DROGA PADRÃO ANTI-INFLAMATÓRIA EM MODELOS MURINO DE DESORDENS INFLAMATÓRIAS AGUDAS NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB

Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA ¹

João Batista de OLIVEIRA ¹

Larissa Rodrigues BERNARDO ²

Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA ^{3,4}

Marcia Regina PIUEZAM ⁵

¹ Pós Graduandos do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPGPN-UFPB); ² Pós Graduanda do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPgDITM-UFPB); ³ Pós Doutoranda do PPGPN-UFPB; ⁴ Professora substituta da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural em Patos, UFCG; ⁵ Orientadora/Professora do PPGPN ou PPgDITM; c.isaias@outlook.com

RESUMO: A inflamação aguda é um processo fisiológico mediada inicialmente pela imunidade inata, cuja função é a eliminação de agentes nocivos e reparo de danos teciduais. Entretanto, quando se torna persistente e duradoura, pode ser prejudicial. Dessa forma, pesquisas em modelos animais de inflamação submetidos a tratamentos com moléculas bioativas têm sido executadas buscando alternativas terapêuticas. Para tal, é necessário utilizar fármacos de referência, visando comparar os efeitos terapêuticos das novas moléculas. Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar e padronizar o

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 ²
Laércia Karla Diega Paiva FERREIRA ²
Márcia Regina PIUVEZAM ³

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

RESUMO: A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma condição patológica que antecede a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), uma doença pulmonar caracterizada pela acentuada resposta inflamatória, que danifica e compromete as funções dos pulmões. Vários são os estudos para elucidar potenciais alvos moleculares no manejo da LPA, porém o arsenal terapêutico ainda se mostra deficiente. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que possam mimetizar a doença em humanos, podendo identificar alvos importantes para o manejo terapêutico dos pacientes. Logo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no processo fisiopatológico inicial da LPA. Para tal, camundongos machos BALB/c foram desafiados com LPS (2,5 mg/kg, via intranasal). Após 24 horas do desafio, os animais foram eutanasiados e

67

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 Manguiera de LIMA ²
Cosmo Isaías Duvirgens VIEIRA ²
Marcia Regina PIUVEZAM ³

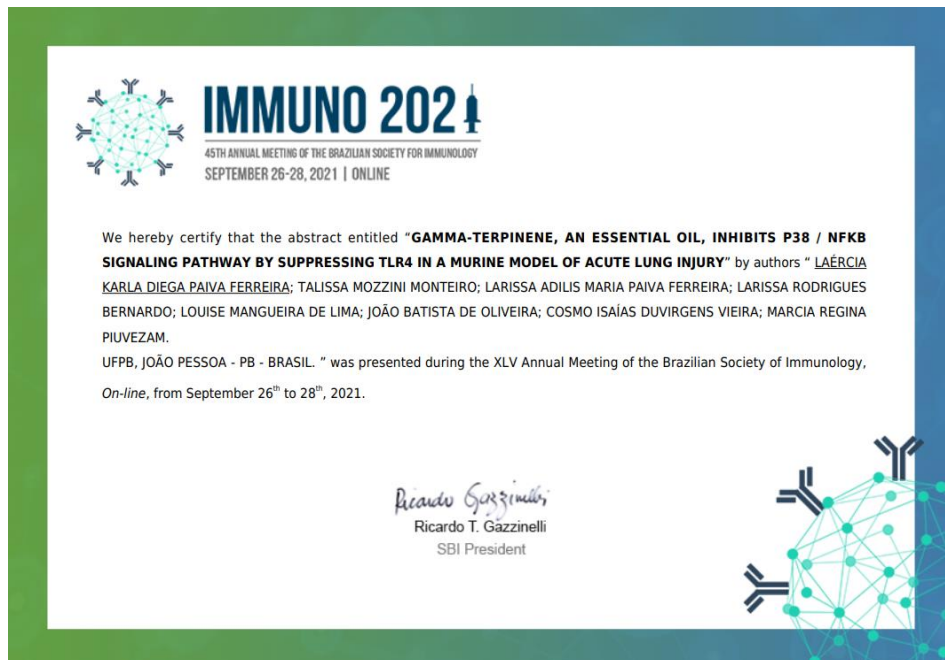
¹ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM/UFPB); ² Pós-graduandos no Programa em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPNSB/UFPB); ³ Orientadora/Professora no DITM e PPNSB.
rs.larissa@hotmail.com
mpiuvezam@itf.ufpb.br

RESUMO: A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma patologia de origem inflamatória com infiltrado celular, lesão da barreira alvéolo-capilar e edema pulmonar levando a insuficiência respiratória aguda. A complexidade dos eventos fisiológico/imunológicos, dificulta a farmacoterapia específica. Assim, os protocolos experimentais auxiliam na avaliação de parâmetros inflamatórios na LPA com intuito de desvendar marcadores moleculares para desenvolver estratégias terapêuticas na resolução da inflamação. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o edema pulmonar e mecanismos moleculares intracelulares, utilizando o modelo murino de LPA induzido por lipopolissacarídeo (LPS) no laboratório de Imunofarmacologia/UFPB. Para tal, camundongos BALB/c foram desafiados com LPS e 24 h após os animais foram eutanasiados e o lavado broncoalveolar (BAL) e os pulmões foram coletados para as análises. Os resultados mostraram a formação do edema pulmonar que, em parte, está relacionado

119



- Comunicações em pôster em eventos científicos:



- Comunicações orais em eventos científicos:



- Patentes:



**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

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 22/12/2021 às 12:28, Petição 870210119472

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): 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 morfínâmico 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.

Figura a publicar: 1

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 22/12/2021 às 12:28, Petição 870210119472