



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DA LQB 118**

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**JOÃO PESSOA - PB
2023**

ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DA LQB 118**

Tese apresentada ao
Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, da
Universidade Federal da
Paraíba como requisito para
obtenção do grau de
Doutora em Ciências
Fisiológicas.

Orientadora: Profª Drª Sandra Rodrigues Mascarenhas

**JOÃO PESSOA - PB
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732a Lima, Éssia de Almeida.

Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no
efeito anti-inflamatório da LQB 118 / Éssia de Almeida
Lima. - João Pessoa, 2023.

120 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.
Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Fagocitose. 2. LQB 118 - Atividade
anti-inflamatória. 3. Macrófagos. I. Mascarenhas,
Sandra Rodrigues. II. Título.

UFPB/BC

CDU 591.111.7(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Ata da Sessão de Defesa Pública de Tese de Doutorado do
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba,
realizada em 30 de agosto de 2023.

Na data de trinta de agosto de dois mil e vinte e três, às 08h00 (horário local), por meio de Plataforma Virtual, foi realizada a defesa pública da Tese de Doutorado do(a) discente **Éssia de Almeida Lima**, com o trabalho intitulado “Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da LQB 118”. A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.^ª Dr.^ª Sandra Rodrigues Mascarenhas (UFPB) na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinadora externa) Prof.^ª Dr.^ª Janeusa Trindade de Souto (UFRN), 2º examinador (examinador externo) Prof. Dr. Leonardo Augusto de Oliveira Barbosa (UFSJ), 3º examinador (examinadora externa) Prof.^ª Dr.^ª Marcia Regina Piuvezam (UFPB) e 4º examinador (examinadora interna) Prof.^ª Dr.^ª Tatjana Keesen de S. L. Clemente (UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) APROVADO(A). De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o(a) discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da tese à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Sandra Rodrigues Mascarenhas

Prof.^ª Dr.^ª Sandra Rodrigues Mascarenhas



Documento assinado digitalmente
TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE
Data: 01/09/2023 09:15:00-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Tatjana Keesen de S. L. Clemente

Marcia Regina Piuvezam

Prof.^ª Dr.^ª Marcia Regina Piuvezam



Documento assinado digitalmente
JANEUSA TRINDADE DE SOUTO
Data: 03/09/2023 13:52:06-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^ª Dr.^ª Janeusa Trindade de Souto



Documento assinado digitalmente
LEANDRO AUGUSTO DE OLIVEIRA BARBOSA
Data: 01/09/2023 12:16:15-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Leandro Augusto de O. Barbosa

À minha família e a Deus, por me permitir tê-la.

Agradecimentos

A Deus, por me conceder uma vida cheia de paz, amor e realizações.

Aos meus pais, Edna e Evandes, que são a razão de tudo. Agradeço por todo amor, dedicação e por proporcionarem a mim e às minhas irmãs o privilégio de estudar e também por todos os momentos em que tiveram a paciência e sabedoria para me guiar pelos melhores caminhos. Vocês são meus amores!

Às minhas irmãs, Éssica e Edvania, com quem dividi e ainda divido a mesa de estudos. Apesar das brigas e dos xingamentos, eu amo vocês!

Ao meu esposo, Rogério, por me apoiar em tudo, ter paciência e me fazer acreditar que tudo será como eu sempre quis. Que caminhemos juntos por toda nossa vida. Te amo sempre!

Aos meus tios, primos e amigos, que contribuíram direta ou indiretamente não só para a realização desse trabalho, mas para a realização de um sonho.

Aos amigos da graduação, em especial à Deyse, Eduarda e Rephany, pela amizade sem limites, pela cumplicidade e por estarem sempre presentes, sem me deixar desistir nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Sandra Rodrigues Mascarenhas, por confiar em mim e me deixar fazer parte da sua família científica, pela amizade ao longo desses anos e por me permitir conhecer e fazer ciência. Você é a melhor orientadora que eu poderia ter, além de uma pessoa incrível! Eu quero ser como você! Muito obrigada!

Aos professores do Centro de Biotecnologia, que contribuíram com a minha formação e que mesmo com todas as dificuldades enfrentadas desempenham da melhor forma suas funções. Desejo sucesso a todos!

Aos amigos do Laboratório de Imuno, Deyse, Anna, Mariana, Marreiro, Daniel, Davi, Julliane, José Guilherme e os demais, que tanto ajudaram no decorrer de todos estes anos entre iniciação científica e doutorado. Amávamos nossas bateadeiras de placas de ELISA (só que não). E aos que já não se encontram mais há tanto tempo, mas que foram de igual importância na minha formação científica, Jacqueline, Rachel, Talita e Priscila. Muito obrigada!

À minha grande amiga e vizinha **Fany**, que desde a graduação está presente em minha vida, pela amizade de sempre. Amo vocês (o baby também)!

À minha grande amiga **Eduarda**, que mesmo longe fisicamente está sempre presente em meu coração e que me tornou dinda de uma de suas preciosidades chamada Francisco, além de titia da Helena. Eu amo muito vocês!

À minha grande amiga **Deyse**, que é companheira desde a graduação. Vivemos tantos momentos juntas, foram tantos aprendizados. Que alcancemos todos os nossos objetivos, eu tenho certeza que você vai brilhar muito por esse mundão! Amo tu!

A meu grande amigo **Luiz Agra**, que já não está mais no lab, mas que poderia estar do outro lado do mundo que eu continuaria aperriando, tirando minhas dúvidas e enchendo o saco... Você foi essencial para que esse trabalho se tornasse realidade, aliás, não só esse como todos os demais. Muito obrigada por (quase sempre) ser paciente e ensinar muito do que eu não sabia, ou achava não saber rsrsrs. Gratidão por tudo!

Aos Professores da UFRJ, Paulo Roberto Ribeiro Costa, Chaquip Daher Netto e Vivian Rumjanek, por terem cedido gentilmente a substância que gerou esse trabalho, assim como a aluna de iniciação científica **Ângela** que a trouxe para João Pessoa.

Aos membros da Banca, professoras Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, Márcia Regina Piuvezam, Leandro Augusto de Oliveira Barbosa e Janeusa Trindade de Souza por aceitarem fazer parte da banca e contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

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

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

À funcionária Mônica, pela humildade, conselhos, amizade e companhia ao longo dessa jornada.

A José Crispim Duarte e Roberta Nunes, pela imensa dedicação ao biotério, a fim de fornecer nossos animais sempre saudáveis e em boas condições para

realização dos nossos experimentos.

A UFPB, ao CBiotec e ao PPGMCF por possibilitarem a infraestrutura necessária para execução dos experimentos. **À CAPES**, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

A LQB 118 é uma molécula híbrida sintética pertencente ao grupo das pterocarpanoquinonas, tendo sua estrutura baseada em dois grupos de moléculas naturais bioativas, as naftoquinonas e os pterocarpanos. O papel imunomodulador da LQB 118 vem sendo demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa, no entanto, os mecanismos de ação envolvidos ainda não estão totalmente elucidados. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória da LQB 118 *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, para os experimentos *in vitro*, camundongos *Swiss* receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de tioglicolato (4%). Após quatro dias, os macrófagos peritoneais foram cultivados na concentração de 2×10^5 , 5×10^5 ou $1,5 \times 10^6$ cels/poço. As células foram tratadas com a LQB 118 (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M ou 5 μ M) na presença ou ausência do estímulo inflamatório, zimosan (0,2 mg/mL), por 40 min ou 24h. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos para a quantificação das citocinas IL-10 e IL-12 por ELISA e do NO pelo reagente de Griess. Além disso, a atividade fagocítica às partículas de zimosan também foi quantificada. Por fim, para analisar o mecanismo de ação da molécula, as células foram incubadas com os anticorpos anti-iNOS, anti-NF κ B, anti-P-NF κ B, anti-P-Akt, anti-P-mTOR, CellRox Green e com partículas de zimosan fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. O zimosan induziu aumento das citocinas e do óxido nítrico e o tratamento com a LQB 118 foi capaz de reduzir os níveis de IL-12 (0.1 μ M em 28,7%; 0.5 μ M em 31%; 1 μ M em 36,8% e 5 μ M em 57,6%) e do NO (5 μ M em 60,2%), sem interferir nos níveis de IL-10. Além disso, a LQB 118 modulou negativamente a expressão do NF κ B total (21,7%) e fosforilado (59,4%), reduziu a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais (24,1% na placa e 64,4% por citometria de fluxo), a produção de ROS (23,5%), além de reduzir os níveis de mTOR fosforilado (20,2%). Adicionalmente, foi avaliado o efeito da LQB 118 *in vivo*, em modelo de peritonite induzida por zimosan. Para isso, camundongos *Swiss* foram tratados via i.p. com a LQB 118 nas doses de 10 ou 20 mg/kg. Uma hora após o tratamento, foram estimulados com zimosan (2 mg/mL) de modo a induzir uma inflamação no peritônio. Após 4h o lavado peritoneal foi coletado e utilizado para contagem total e diferencial de células por microscopia óptica, para a quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA e para análise da expressão da MAP quinase p38 por citometria de fluxo. O zimosan, como esperado, induziu aumento da migração de células, dos níveis das citocinas e da fosforilação da p38. O tratamento com a LQB 118, por sua vez, foi capaz de reduzir o número total de células na cavidade peritoneal (32,6% na dose de 10 mg/kg ou 51,1% na dose 20 mg/kg) pela redução na migração das células polimorfonucleares (56,7% para 10 mg/kg ou 80,4% para 20 mg/kg). Além disso, essa molécula foi capaz de reduzir os níveis das citocinas IL-1 β (81,1% ou 78,3% para as doses de 10 mg/kg ou 20 mg/kg, respectivamente), TNF- α (56,2% na dose de 20 mg/kg) e IL-10 (71,6% na dose de 20 mg/kg) e de modular negativamente a fosforilação da p38 induzida por zimosan (51,6%). Dessa forma, esses dados demonstram os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória da LQB 118 e contribuem para o entendimento das potencialidades dessa substância em atuar em processos fisiológicos da inflamação.

Palavras-chave: LQB 118. Macrófagos. Fagocitose.

ABSTRACT

LQB 118 is a synthetic hybrid molecule belonging to the group of pterocarpanquinones, with its structure based on two groups of natural bioactive molecules, naphthoquinones and pterocarpanes. The immunomodulatory role of LQB 118 has been demonstrated by our research group, however, the mechanisms of action involved are not yet fully elucidated. Therefore, the aim of this work was to evaluate the mechanisms involved in the anti-inflammatory activity of LQB 118 *in vitro* and *in vivo*. Initially, for *in vitro* experiments, Swiss mice received an intraperitoneal injection of thioglycolate (4%). After four days, peritoneal macrophages were cultured at concentrations of 2×10^5 , 5×10^5 or 1.5×10^6 cells/well. The cells were treated with LQB 118 (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M or 5 μ M) in the presence or absence of the inflammatory stimulus, zymosan (0.2 mg/mL), for 40 min or 24h. Then, supernatants were collected for the quantification of cytokines IL-10 and IL-12 via ELISA and nitric oxide through the Griess reagent. Additionally, phagocytic activity was assessed towards zymosan particles. Finally, in order to examine the mechanism of action of the molecule, cells were incubated with anti-iNOS, anti-NF κ B, anti-P-NF κ B, anti-P-Akt, anti-P-mTOR, CellRox Green antibodies along with fluorescent zymosan particles and analyzed through flow cytometry. Zymosan induced an increase in cytokines and nitric oxide, and treatment with LQB 118 was able to reduce the levels of IL-12 (0.1 μ M by 28.7%; 0.5 μ M by 31%; 1 μ M by 36.8%; and 5 μ M by 57.6%) and NO (5 μ M by 60.2%) without interfering with IL-10 levels. In addition, LQB 118 negatively modulated the expression of total NF κ B (21.7%) and phosphorylated NF κ B (59.4%), decreased the phagocytic capacity of peritoneal macrophages (24.1% in plate and 64.4% by flow cytometry), ROS production (23.5%), and reduced levels of phosphorylated mTOR (20.2%). Moreover, the effect of LQB 118 was evaluated *in vivo*, in a zymosan-induced peritonitis model. For this, Swiss mice were treated via i.p. with LQB 118 at doses of 10 or 20 mg/kg. One hour after treatment, they were stimulated with zymosan (2 mg/mL) to induce peritoneal inflammation. After 4h, peritoneal lavage was collected and used for total and differential cell counting by light microscopy, for quantification of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 by ELISA, and for analysis of MAP kinase p38 expression by flow cytometry. Zymosan, as expected, induced an increase in cell migration, cytokine levels, and p38 phosphorylation. Treatment with LQB 118, on the other hand, reduced the total number of cells in the peritoneal cavity, by decreasing the migration of polymorphonuclear cells. Furthermore, this molecule was able to reduce the levels of cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-10 and negatively modulate zymosan-induced p38 phosphorylation. Treatment with LQB 118, on the other hand, was able to reduce the total number of cells in the peritoneal cavity (32.6% at a dose of 10 mg/kg or 51.1% at a dose of 20 mg/kg), by decreasing the migration of polymorphonuclear cells (56.7% for 10 mg/kg or 80.4% for 20 mg/kg). Furthermore, this molecule was capable of reducing the levels of the cytokines IL-1 β (81.1% or 78.3% for doses of 10 mg/kg or 20 mg/kg, respectively), TNF- α (56.2% at a dose of 20 mg/kg), and IL-10 (71.6% at a dose of 20 mg/kg), and negatively modulating the phosphorylation of p38 induced by zymosan (51.6%). Thus, these data demonstrate the mechanisms involved in the anti-inflammatory activity of LQB 118 and contribute to the understanding of the potentialities of this substance to act in inflammation physiological processes.

Keywords: LQB 118. Macrophages. Phagocytosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química da LQB 118 e seus precursores.	16
Figura 2. Mecanismo simplificado de produção do NO	24
Figura 3. Visão simplificada das etapas da fagocitose	27
Figura 4. Etapas da migração neutrofílica	29
Figura 5. Resumo do protocolo de isolamento dos macrófagos peritoneais	39
Figura 6. Resumo do protocolo de análise da capacidade fagocítica dos macrófagos.	40
Figura 7. Resumo do protocolo de cultura para quantificação de citocinas e NO	41
Figura 8. Resumo do protocolo de ELISA para determinação dos níveis das citocinas.	43
Figura 9. Resumo do protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de iNOS, NFκB, P-NFκB, P-Akt e P-mTOR	44
Figura 10. Resumo do protocolo para análise da capacidade fagocítica às partículas de zimosan por citometria de fluxo	45
Figura 11. Resumo do protocolo para análise da expressão de ROS	46
Figura 12. Esquema do protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.....	47
Figura 13. Esquema representativo da estratégia de análise dos dados da citometria de fluxo.....	50
Figura 14. Efeitos da LQB 118 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	82
Gráfico 1: Efeito da LQB 118 sobre os níveis das citocinas IL-12 e IL-10 na cultura de macrófagos peritoneais.....	52
Gráfico 2: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de óxido nítrico.....	54
Gráfico 3: Efeito da LQB 118 na capacidade fagocítica dos macrófagos.....	55
Gráfico 4: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão da iNOS.....	57
Gráfico 5: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de NFκB e de P-NFκB.	58
Gráfico 6: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de ROS.....	61
Gráfico 7: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de P-Akt	62
Gráfico 8: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de P- mTOR	64

Gráfico 9: Efeito da LQB 118 na migração de leucócitos totais e diferenciais para o peritônio	66
Gráfico 10: Efeito da LQB 118 nos níveis das citocinas pró e anti- inflamatórias	68
Gráfico 11: Efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação da MAPK p38	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos durante cultura de macrófagos peritoneais murinos	41
Tabela 2. Distribuição dos grupos para protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan	47
Tabela 3. Anticorpos utilizados nos protocolos experimentais	49

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CD69	do inglês " <i>cluster of differentiation 69</i> "
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
c-Myc	Oncone gene c-Myc
ELISA	do inglês " <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> "
e.p.m.	Erro padrão da média
ERK	do inglês " <i>extracellular signal – regulated kinase</i> "
GSK3β	Glicogênio sintase kinase-3-beta
IFN-γ	Interferon gama
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Cinase do N-terminal c-Jun
LFA-1	Antígeno 1 associado à função linfocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NFκB	Fator de transcrição nuclear κ B
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
n	Número de animais
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PE	Ficoeritrina
Pgp	P-glicoproteína
PGE2	Prostaglandina E2
p38	Proteína quinase ativadora de mitógeno p38

PBS	Solução fosfato tamponado
PBST	Solução fosfato tamponado contendo tween
PSGL-1	Glicoproteína ligante de P-selectina 1
mRNA	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura do inglês " <i>Roswell Park Memorial</i> "
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RDM	Reação de desaparecimento dos macrófagos
SFB	Soro fetal bovino
TCR	Receptor de células T
TLRs	Receptores do tipo Toll (<i>Toll-like</i>)
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
XIAP	Inibidor da proteína de apoptose ligada ao X
ZIM	Zimosan

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 LQB 118.....	16
1.1.1 Atividades biológicas da LQB 118	17
1.2 Inflamação	20
1.2.1 As citocinas e o óxido nítrico como mediadores da inflamação.....	22
1.2.2 O papel dos macrófagos na inflamação	25
1.2.3 Os neutrófilos no processo inflamatório.....	28
JUSTIFICATIVA.....	32
2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	33
OBJETIVOS.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
3.2.1 In vitro, em macrófagos peritoneais murinos	35
3.2.2 In vivo, em modelo de peritonite induzida por zimosan.....	35
METODOLOGIA	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 Animais	37
4.2 Obtenção e preparo da LQB 118.....	37
4.3 Experimentos in vitro.....	38
4.3.1 Tratamento com a LQB 118 para os testes in vitro.....	38
4.3.2 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais	38
4.3.3 Cultura de macrófagos para análise da capacidade fagocítica às partículas de zimosan	39
4.3.4 Cultura de macrófagos para quantificação dos níveis de IL-10, IL-12 e NO	40
4.3.5 Quantificação dos níveis de NO	41
4.3.6 Quantificação dos níveis das citocinas IL-10 e IL-12	42
4.3.7 Análise da expressão de iNOS, NFκB, p-NFκB, P-Akt e P-mTOR	43
4.3.8 Análise da capacidade fagocítica às partículas de zimosan por citometria de fluxo	

.....	44
4.3.9 Análise da expressão de ROS	45
4.4 Experimentos in vivo	46
4.4.1 Tratamento com a LQB 118 para os testes in vivo	46
4.4.2 Peritonite induzida por zimosan	47
4.4.3 Coleta e contagem total de células do lavado peritoneal	48
4.4.4 Contagem diferencial de células do lavado peritoneal	48
4.4.5 Determinação dos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10	48
4.4.6 Análise da fosforilação da MAPK p38	49
4.5 Anticorpos monoclonais	49
4.6 Aquisição e análise de dados da citometria de fluxo	49
4.7 Análise estatística	50
RESULTADOS.....	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1 Avaliação do efeito anti-inflamatório da LQB 118 in vitro.....	52
5.1.1 Níveis das citocinas IL-12 e IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais estimulados por zimosan.....	52
5.1.2 Produção de óxido nítrico na cultura de macrófagos peritoneais estimulados por zimosan	53
5.1.3 Capacidade fagocítica dos macrófagos às partículas de zimosan	54
5.1.4 Níveis de expressão da enzima iNOS em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan	56
5.1.5 Níveis de expressão de NF κ B e de P-NF κ B em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan.....	58
5.1.6 Níveis de ROS em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan	60
5.1.7 Níveis de expressão de P-Akt em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan.....	62
5.1.8 Níveis de expressão de P-mTOR em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan	63
5.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório da LQB 118 in vivo	65
5.2.1 Efeito da LQB 118 na migração de células para o peritônio	65
5.2.2 Efeito da LQB 118 nos níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 no peritônio	67
5.2.3 Efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação da MAPK p38.....	70

DISCUSSÃO.....	72
6. DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÃO	81
7. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
8. REFERÊNCIAS	84
ANEXOS	100
ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	101
ANEXO B – Artigo referente à parte da tese publicado na revista International Immunopharmacology (Fator de impacto: 5.714), 2018	102
ANEXO C – Artigos publicados durante o doutorado (colaborações).....	103
ANEXO D – Comprovantes de depósitos de patentes.....	113
ANEXO E – Artigo submetido à publicação (colaboração).....	116
ANEXO F – Parecer do pedido de patente submetido à INOVA-UFPB.....	117

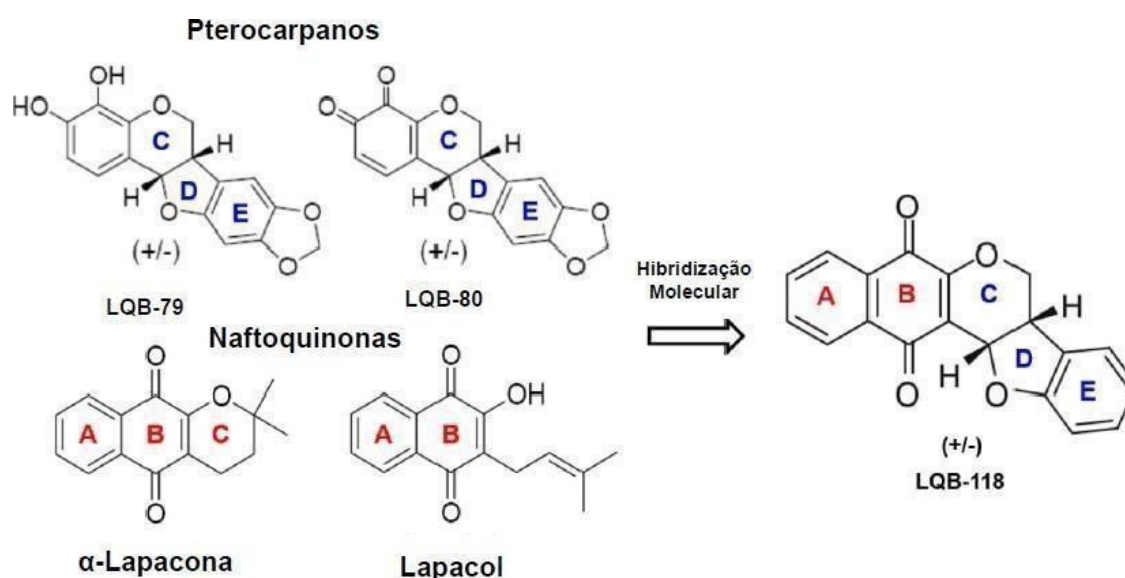
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 LQB 118

A LQB 118 é classificada como uma pterocarpanoquinona, uma molécula híbrida sintética resultante da união de dois grupos de moléculas bioativas: os pterocarpanos e as naftoquinonas. A LQB 118 tem a sua estrutura química baseada no lapacol, uma naftoquinona, conservando a função quinona presente nesta substância, e no pterocarpano LQB 79, conservando seus anéis C, D e E, sendo obtida através do processo de hibridização molecular (Figura 1) (NETTO et al., 2010).

Figura 1. Estrutura química da LQB 118 e seus precursores.



Fonte: Modificado de SALUSTIANO et al., 2016

Os pterocarpanos são metabólitos secundários, mais precisamente pertencentes ao grupo dos isoflavonóides, produzidos principalmente por plantas da família Leguminosae (DIXON; SUMMER, 2003). As quinonas, por sua vez, são moléculas distribuídas amplamente na natureza e que apresentam importantes e diversificadas funções, tais como participação na respiração celular, na fotossíntese e em processos de coagulação (CONKLIN, 2005). Tanto os pterocarpanos como as quinonas apresentam várias atividades biológicas relacionadas, incluindo atividade antioxidante, antidiabética, anticâncer e também atividade anti-inflamatória em diferentes modelos (AHMED et al., 2020; CHAE et al., 2016; KIM et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2011;

KRUK et al., 2005; LEE et al., 2015; MIADOKOVÁ, 2009).

A pterocarpanoquinona LQB 118 teve sua estrutura química planejada e foi sintetizada sob a coordenação do Professor Titular Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costado Laboratório de Química Bio-orgânica do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Desde então, vários estudos vêm sendo realizados com essa molécula, demonstrando que a LQB 118 possui várias atividades biológicas (BUARQUE et al., 2011; RIÇA et al., 2016).

1.1.1 Atividades biológicas da LQB 118

Um dos primeiros trabalhos utilizando a LQB 118 foi desenvolvido em 2010, onde foi descrito o processo de síntese de várias pterocarpanoquinas, incluindo a LQB 118, a atividade antineoplásica em linhagens de células tumorais e a modulação do TNF- α em células mononucleares do sangue periférico. Desde então, outros estudos têm sido feitos avaliando principalmente a capacidade da LQB 118 em interferir na viabilidade de células tumorais, na infecção por *Leishmania* e, mais recentemente, no sistema imunológico, abordando, principalmente, o seu efeito anti-inflamatório.

Foi demonstrado que a LQB 118 apresenta efeito antineoplásico em várias linhagens de células tumorais humanas, incluindo HL-60, K562, K562-Lucena, Jurkat e Daudi, que são células leucêmicas com diferentes características, e GLC-4 e A549, que são células de câncer de pulmão de pequenas e não pequenas células, respectivamente. Em oposição, apresentou baixa toxicidade *in vitro* para células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de doadores normais, sugerindo que o composto é biosseletivo. Além disso, PBMC estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de bactérias gram-negativas, produziram níveis aumentados da citocina TNF- α , o que foi revertido pelo tratamento com a LQB 118 em diferentes concentrações (NETTO et al., 2010).

Em K562 (linhagem de leucemia mieloide crônica sensível a quimioterápicos) e K562-Lucena (linhagem de leucemia mieloide crônica resistente a quimioterápicos), foi observado que a LQB 118 induz apoptose, o que é resultante do aumento da externalização de fosfatidilserina e dos níveis da caspase-3 (MAIA et al., 2011), uma caspase efetora comumente envolvida na execução da apoptose em vários tipos celulares (ZORNING et al., 2001). Vale destacar que ambas as linhagens superexpressam proteínas inibidoras da apoptose, tais como a survivina e XIAP, o que

torna a LQB 118 uma molécula ainda mais promissora. Além disso, na presença dessa molécula, os transportadores de efluxo de drogas P-glicoproteína (Pgp) foram inibidos. Neste mesmo trabalho, também foi observado que o composto foi capaz de induzir apoptose em amostras obtidas de pacientes com leucemia mieloide crônica (MAIA et al., 2011). Outro trabalho recente demonstrou que a LQB 118 também induz apoptose, redução da viabilidade celular e diminuição da expressão de XIAP em linhagem de células de leucemia mieloide aguda resistente a citarabina (HL-60R) (HANCIO et al., 2021).

O processo apoptótico também pode ser induzido por altos níveis de cálcio (Ca^{2+}) dentro da célula (DOLAI et al., 2011; SUN et al., 2011). Foi observado em K562 e Jurkat (linhagem leucêmica de células T) um aumento na concentração intracelular desse íon na presença da LQB 118 em todas as concentrações utilizadas. Além disso, em ambas as linhagens foram observadas a ativação da caspase-12, indicando estresse do retículo endoplasmático nessas células, o que pode induzir morte celular por apoptose mediante ativação de vários mecanismos, como a fosforilação de MAPKs e a ativação de caspases efetoras (caspase-7) (BREDESEN et al., 2004; LIEN et al., 2008). A ativação da caspase-12, por sua vez, pode levar à ativação da caspase-9, o que também foi observado mediante tratamento com o composto (BACELAR et al., 2013).

O tratamento com a LQB 118 também reduziu a viabilidade celular em linhagem de células de câncer de próstata (PC3), de uma maneira dependente da concentração, além de inibir o processo de proliferação destas células. Isto pode estar relacionado à capacidade dessa molécula de induzir parada no ciclo celular na fase S e G2/M. Adicionalmente, avaliando os níveis de expressão dos mRNA para c-Myc e as ciclinas D1 e B1, que são importantes reguladores da progressão do ciclo celular, pode-se observar que estes tiveram a expressão reduzida mediante o tratamento com o composto. Além disso, os níveis de expressão tanto do mRNA como da proteína P21 (reguladora da progressão do ciclo da fase G1 para S) estavam aumentados. Todos estes fatores culminam com a morte programada da célula, o que de fato foi observado na presença da LQB 118 (MARTINO et al., 2014). Essa molécula também foi capaz de modular a localização e a expressão de fatores de transcrição como FoxO3a e FoxM1 em linhagens de leucemia mieloide aguda (HL-60 e U937) (DE MORAES et al., 2014), os quais são importantes por mediar efeitos citotóxicos e citostáticos de várias drogas quimioterápicas (WILSON et al., 2011). Adicionalmente, um estudo

recente revelou que a LQB 118 prejudica a migração e a invasão de células de câncer de próstata pela redução da capacidade de adesão celular, além de reduzir os níveis de metaloproteinase 9 (MMP-9) e a fosforilação da quinase Akt e de GSK3 β , moléculas relacionadas com a progressão da doença (MARTINO et al., 2023).

Em cultura de células tridimensionais e em monocamada de glioblastoma humano, a LQB 118 reduziu a viabilidade celular, promovendo apoptose em monocamada de células resistentes a temozolomida e nos modelos de cultura 3D inibindo a migração celular. Além disso, o tratamento com essa molécula reduziu a expressão e fosforilação de Akt e p38, enquanto reduziu apenas a fosforilação de ERK1/2. A LQB 118 também demonstrou um efeito adicional em combinação com a radiação ionizante e a cisplatina, duas terapias antineoplásicas conhecidas e muito utilizadas (BRNARDO et al., 2020).

Em EAC e B16F10, linhagens de tumores murinos, o tratamento com a LQB 118 também induziu apoptose, além de apresentar efeito sinérgico com a rapamicina, um promotor de autofagia. *In vivo*, o tratamento de camundongos C57BL/6 com este composto foi capaz de reduzir o crescimento do melanoma B16F10, assim como o Erlich sólido e melhorar efeitos colaterais como a perda de peso e a queda de pelos nos animais (SALUSTIANO et al., 2016). Além disso, a administração de LQB 118 não teve efeito tóxico em células da medula óssea de animais saudáveis (DE MORAES et al., 2014).

Outros estudos têm relatado os efeitos da LQB 118 nas infecções por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, onde foi observado que o tratamento com a LQB 118 foi capaz de reduzir a taxa de infecção de macrófagos *in vitro* por estes parasitas. *In vivo*, quando administrada oral, subcutânea ou intraperitonealmente em camundongos BALB/c e hamsters, essa molécula controlou as lesões e reduziu efetivamente a carga parasitária, sem alterar os marcadores sorológicos de toxicidade. Adicionalmente, a LQB 118 levou ao estresse oxidativo, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induziu alterações morfológicas típicas da apoptose, como despolarização da membrana mitocondrial e fragmentação do DNA (COSTA et al., 2014; CUNHA-JÚNIOR et al., 2011; RIBEIRO et al., 2013). Avaliando a toxicidade e a eficácia terapêutica da LQB 118 em leishmaniose visceral experimental, doença causada pela espécie *Leishmania chagasi*, Cunha-Júnior e colaboradores (2016) observaram que o tratamento com a molécula inibiu o crescimento do parasita e diminuiu a carga parasitária, assim como inibiu a hepatoesplenomegalia nos animais.

Além disso, não houve alterações relevantes nos parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e histológicos avaliados, demonstrando que o tratamento com a LQB 118 foi eficaz neste modelo.

Abordando o sistema imunológico, Salustiano e colaboradores (2016) avaliaram os efeitos citotóxicos da LQB 118 no sistema imune de camundongos, onde o tratamento com a molécula não causou alterações significativas no peso ou celularidade da medula óssea, timo, baço, linfonodos axilares, principais órgãos do sistema imunológico, independente da idade dos animais e do tempo de tratamento empregado.

Além da capacidade em reduzir os níveis de TNF- α em PBMC estimuladas com LPS, mais tarde, também foi reportado que a LQB 118 possui efeito anti-inflamatório em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS, onde o tratamento de camundongos C57BL/6 com a molécula em diferentes doses (1, 10 e 100 mg/kg) reduziu o infiltrado de neutrófilos, os níveis de mediadores pró-inflamatórios como a citocina TNF- α e a quimiocina CXCL1, além dos níveis de ativação do NF- κ B, um importante fator de transcrição relacionado com a produção de diversos mediadores (RIÇA et al., 2016).

Adicionalmente, dados recentes do nosso grupo demonstraram que o tratamento com a LQB 118 em diferentes concentrações é capaz de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , L-1 β e IL-6, os níveis de expressão do receptor TLR2, da molécula de ativação CD69 e a fosforilação da MAPK p38, além de não apresentar citotoxicidade em macrófagos peritoneais estimulados ou não por zimosan nas concentrações avaliadas. Esses resultados corroboram o potencial anti-inflamatório da LQB 118, no entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de ação envolvidos no efeito dessa molécula *in vitro* e *in vivo* (LIMA et al., 2020).

1.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica do sistema imune, o qual é formado por uma complexa rede de células e moléculas, a estímulos lesivos ou prejudiciais, como a presença de microrganismos patogênicos, danos celulares, substâncias tóxicas e estresse metabólico (WILSON; TRUMPP, 2006; ANTONELLI; KUSHNER, 2017). Em condições normais, essa resposta elimina os estímulos danosos e promove o restabelecimento da homeostase perdida (NATHAN; DING, 2010). Existem 5 sinais

característicos (ou cardinais) na inflamação: a dor, que resulta da estimulação das terminações nervosas por mediadores; o edema, que resulta do acúmulo de leucócitos no sítio inflamado e do aumento do fluido intersticial; o calor e o rubor (ou vermelhidão), que são resultantes da vasodilatação; e a perda da função, que é resultado da inibição do reflexo muscular e do rompimento da estrutura do tecido (SEDGWICK; LEES, 1986; SCOTT et al., 2004; ALLER et al., 2007; SERHAN, 2010).

Didaticamente, a inflamação pode ser dividida em fase aguda e fase crônica (WEISS, 2008). A fase aguda caracteriza-se por ser de curta duração (no máximo alguns dias) e desencadeada por diferentes estímulos, como infecções e lesões teciduais (RAI; AGRAWAL, 2017; RAJAEI; BARNETT; CHEADLE, 2018). Nessa fase, as células residentes no local inflamado, como macrófagos e células dendríticas produzem vários mediadores solúveis, como as citocinas, os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quimiocinas, dentre outros, iniciando uma série de eventos complexos e coordenados que levam a várias mudanças moleculares, celulares e fisiológicas (BUCKLEY et al., 2015; FULLERTON; GILROY, 2016).

As principais alterações envolvidas na fase aguda são as vasculares, ocorrendo vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e ativação do endotélio, que passa a expressar mais moléculas de adesão celular, o que favorece a migração de leucócitos (principalmente polimorfonucleares) do sangue para o sítio inflamado (POBER, 2007; SESSA, 2007; NOURSHARGH; ALON, 2014; KAMERITSCH; RENKAWITZ, 2020). Os leucócitos polimorfonucleares mais abundantes nessa fase são os neutrófilos, as primeiras células a migrarem para o sítio inflamado, onde utilizam diferentes mecanismos na tentativa de eliminar o agente lesivo e restabelecer a homeostase perdida (NATHAN, 2006; APPELBERG, 2007; OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; CASTANHEIRA; KUBES, 2019). Os principais mecanismos efetores são a produção de citocinas, de espécies reativas de oxigênio e de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (CURI et al., 2020).

Quando o processo de eliminação do estímulo lesivo ocorre de maneira satisfatória ou quando este se esgota, a resposta inflamatória aguda é prontamente resolvida, ocorrendo o restabelecimento da homeostase perdida e um processo de cicatrização. No entanto, se os mecanismos imunológicos não conseguem fazer essa eliminação e o estímulo persiste, a inflamação pode se tornar crônica (HEADLAND;

NORLING, 2015; ROCK et al., 2010; ZHONG; SHI, 2019). A inflamação crônica, por sua vez, se caracteriza por apresentar duração mais longa (pode durar anos) e um infiltrado leucocitário constituído por uma mistura de células mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Além disso, outras características diferenciais da fase crônica são a angiogênese (proliferação de novos vasos sanguíneos), fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Essa divisão do processo inflamatório em fases é apenas didática, visto que a progressão da inflamação combina eventos presentes nas duas fases.

1.2.1 As citocinas e o óxido nítrico como mediadores da inflamação

Vários tipos de células participam da resposta inflamatória. Estas produzem uma infinidade de substâncias que medeiam a inflamação de várias formas distintas e através de mecanismos diferentes (ABDULKHALEQ et al., 2018). As citocinas são pequenas proteínas produzidas por vários tipos celulares, como neutrófilos e macrófagos, que podem atuar na mesma célula que a produziu (ação autócrina), em células vizinhas (ação parácrina) ou em células distantes (ação endócrina) (BERRAONDO et al., 2019; CHAPLIN, 2010). Determinadas citocinas atuam estimulando a resposta inflamatória, sendo, portanto, denominadas, de citocinas pró-inflamatórias; outras atuam a suprimindo e são denominadas de citocinas anti-inflamatórias (DINARELLO, 2007; SOMMER; WHITE, 2010).

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi inicialmente caracterizado pela sua capacidade de induzir necrose em tumores (CARSWELL et al., 1975). Essa citocina é produzida tanto por células mononucleares como por polimorfonucleares e exerce potentes efeitos inflamatórios como a indução da febre por sua ação no hipotálamo, aumento na síntese de proteína C reativa e outros mediadores no fígado, estimula a expressão de moléculas de adesão no endotélio, aumenta a permeabilidade vascular e facilita a infiltração de neutrófilos, monócitos e linfócitos para sítios inflamados (EL ALWANI et al., 2006; GRIFFIN et al., 2012; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). O TNF- α é uma citocina que está amplamente relacionada com o desenvolvimento e manutenção de várias condições patológicas, como a artrite reumatoide, psoríase, câncer, asma, COVID-19, dentre outras (MONTAZERSAHEB et al., 2022; PROPPER; BALKWILL, 2022; SOZZANI et al., 2014).

A interleucina 1 β (IL-1 β) é uma das citocinas primeiro descritas, sendo produzida

por células imunológicas, como fagócitos mononucleares ativados e neutrófilos, e por células não imunológicas, como células endoteliais e fibroblastos, e sua função primordial é coordenar os eventos pró-inflamatórios. Além disso, essa citocina está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (DINARELLO; GOLDIN; WOLFF, 1974; FERRERO-MILIANI et al., 2006; GALOZZI et al., 2021). A IL-1 β tem uma ação bastante ampla, agindo sobre vários tipos celulares, induzindo a produção de moléculas de adesão pelas células endoteliais (favorecendo a migração de células para o sítio da inflamação), de IL-17 por linfócitos T diferenciados, de óxido nítrico (ativando a enzima NO sintetase), o aumento da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e a elevação da temperatura corporal por sua ação no hipotálamo (DINARELLO, 2018; WITKAMP; MONSHOUWER, 2000; YAZDI; GHORESCHI, 2016).

A interleucina 6 (IL-6) age em muitos tipos celulares e possui diferentes e importantes ações (UCIECHOWSKI; DEMPKE, 2020). Essa citocina é produzida por quase todas as células imunológicas, em especial monócitos e macrófagos, e possui efeitos locais e sistêmicos, como a promoção da maturação de macrófagos, proliferação de linfócitos B produtores de anticorpos, ativação de neutrófilos, indução da síntese de mediadores inflamatórios hepáticos (como por exemplo, a proteína C reativa) e age no hipotálamo causando a febre (HUNTER; JONES, 2015; LIN; CALVANO; LOWRY, 2000; SOMMER; WHITE, 2010). Devido à ampla gama de funções que a IL-6 possui, seus níveis sistêmicos estão relacionados com a gravidade de doenças, como diabetes, obesidade e vários tipos de câncer (DMITRIEVA et al., 2016).

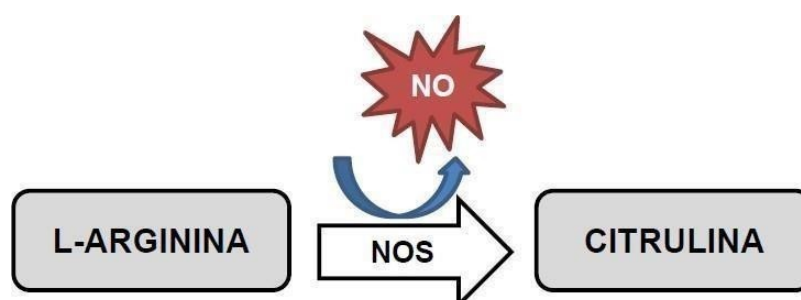
A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina produzida, principalmente, por células apresentadoras de antígenos ou fagocíticas (monócitos/macrófagos e células dendríticas), que possui capacidade de estimular células da imunidade inata e adaptativa (D'ANDREA et al., 1992; LIU et al., 2005; MACATONIA et al., 1995). Essa citocina é secretada em resposta à infecção por patógenos e atua induzindo a produção de IFN- γ em células NK, o que aumenta sua citotoxicidade; a diferenciação de células T CD4⁺ em efectoras Th1; ativando diretamente células T CD8⁺, aumentando seu potencial citolítico através da síntese de granzimas e perforinas; estimulando a produção de imunoglobulinas citotóxicas por células B (GUO et al., 2019; KOBAYASHI et al., 1989; LIU et al., 2005). Além disso, o IFN- γ produzido a partir do estímulo da IL-12 aumenta a capacidade fagocítica e a atividade bactericida dos

macrófagos (MASUDA et al., 2010).

A interleucina 10 (IL-10), diferente das demais citocinas citadas anteriormente, é responsável por potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, sendo uma das mais importantes na regulação da dinâmica da resposta inflamatória (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; IYER; CHENG, 2013). Os receptores da IL-10 estão expressos amplamente entre os leucócitos, por isso sua ação anti-inflamatória pode se estender a diversos tipos celulares (BURMEISTER; MARRIOTT, 2018; MOORE et al., 2001; WOLK et al., 2002). Essa citocina age suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 e TNF- α , e de moléculas relacionadas com a ativação de linfócitos e apresentação de antígenos (MOORE et al., 2001). Adicionalmente, impede a ativação de polimorfonucleares, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a indução de moléculas de adesão e suprime a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (HUET et al., 2013; MARTIRE-GRECO et al., 2013). Apesar da IL-10 ser produzida por muitas células imunológicas, esta é uma citocina chave secretada pelos macrófagos nas fases de reparação e remodelação tecidual, limitando danos causados por respostas inflamatórias exacerbadas (JUNG et al., 2017; NOVAK, 2013; KOH, 2013). Por suas funções imunossupressoras, desordens na produção de IL-10 podem aumentar o risco de desenvolvimento de muitas doenças autoimunes (IYER, 2013; CHENG, 2013).

Além das citocinas, o óxido nítrico (NO) é outro importante mediador inflamatório. O NO é um radical livre produzido a partir da conversão da arginina em L-citrulina pelas enzimas denominadas sintases do óxido nítrico (NOS) (CINELLI et al., 2020) (Figura 2).

Figura 2. Mecanismo simplificado de produção do NO.



Fonte: Autor, 2023.

Existem três isoformas de NOS: a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (TENOPOULOU, 2020; DOULIAS, 2020). Dentre elas, a iNOS é a responsável pela produção do NO durante o processo inflamatório, sendo expressa, principalmente, em macrófagos ativados (BOGDAN, 2015; MACMICKING, 1997; XIE, 1997; NATHAN, 1997). Uma diversidade de estímulos podem promover a expressão de iNOS, a exemplo do zimosan e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (AJUEBOR et al., 1998; GÜHRING et al., 2001; MACMICKING, 1997; XIE, 1997; NATHAN, 1997; CINELLI et al., 2020).

O NO é um dos mediadores capazes de aumentar a atividade citotóxica dos macrófagos, contribuindo para a eliminação de microrganismos patogênicos (CHAKRAVORTTY, 2003; HENSEL, 2003). No entanto, por se tratar de um gás, se difunde livremente pelas membranas celulares e tem efeitos vasculares, ocasionando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (CLANCY; ABRAMSON, 1995). Outro efeito, quando em altas concentrações, é sua associação ao superóxido para formar peroxinitrito, o que pode gerar danos ao DNA e à respiração mitocondrial, contribuindo para o seu efeito citotóxico (CHANNON, 2002; GUZIK, 2002; GUZIK et al., 2002; ISCHIROPOULOS, 1995; AL-MEHDI, 1995). Além disso, o NO pode atuar em muitas proteínas relacionadas à vias de sinalização essenciais para sobrevivência celular, como p38, ERK, JAK/STAT e NF- κ B (BROWNING et al., 2000; CASTELLANO, 2000; ERCOLESI, 2000; PALUMBO, 2014; DORONZO et al., 2011).

1.2.2 O papel dos macrófagos na inflamação

Os macrófagos são células pertencentes à família dos fagócitos mononucleares e têm sua origem na medula óssea, se distribuindo nos tecidos linfoides e não linfoides por todo o corpo e exercem diferentes funções, como fagocitose, apresentação de antígeno e imunomodulação, participando de respostas imunes inatas e adaptativas e da manutenção da homeostase nos tecidos (GORDON, 2003; POLLARD, 2009; GORDON, 2017; PLÜDDEMANN, 2017; ZHANG, 2021; YANG, 2021; ERICSSON, 2021). Desde a primeira identificação destas células por Metchnikoff em 1892 houve várias tentativas de classificação dos fagócitos mononucleares. Atualmente, eles

podem ser classificados em três tipos celulares: os monócitos sanguíneos, macrófagos teciduais e macrófagos teciduais residentes de vida longa (HUME, 2019; IRVINE, 2019; PRIDANS, 2019; MCGRATH, 2015; FRAME, 2015; PALIS, 2015).

Na homeostase em adultos e durante as reações inflamatórias, os macrófagos teciduais derivam de monócitos sanguíneos que amadurecem na medula óssea e migram para os tecidos extravasculares, onde amadurecem ainda mais para formar macrófagos (DAVIES; TAYLOR, 2015; OKABE; MEDZHITOV, 2016). Já os macrófagos teciduais residentes de vida longa, como as células da micróglia (cérebro), as células de Kupffer (fígado), os osteoclastos (tecido ósseo), as células de Langerhans (epiderme) e os macrófagos alveolares (pulmão), se originam a partir de precursores presentes no saco vitelínico, no fígado fetal e no baço durante o desenvolvimento inicial e são mantidos por autorrenovação (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014; GINHOUX; GUILLIAMS, 2016).

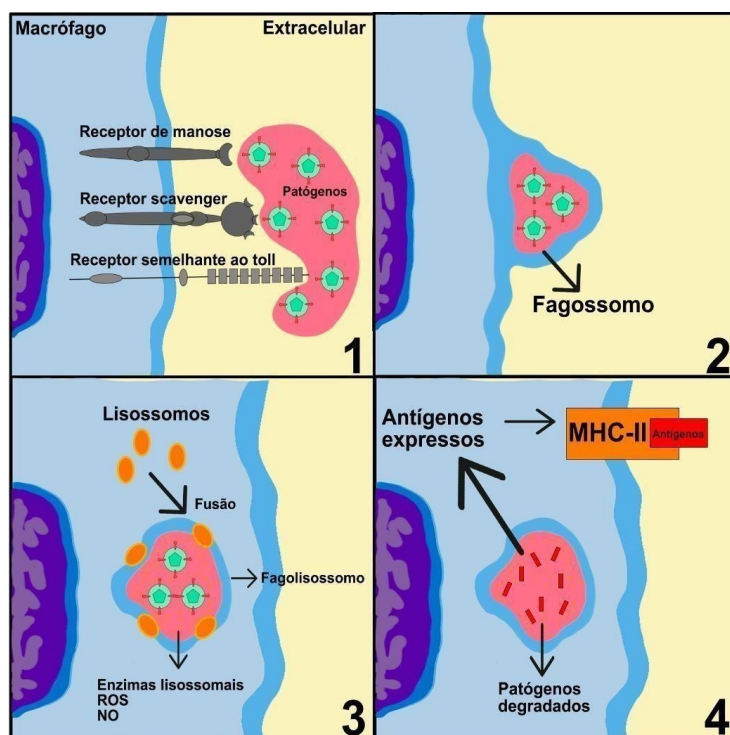
Os macrófagos são células que apresentam considerável plasticidade a depender dos sinais do ambiente extracelular, como dieta e citocinas, mudando constantemente seu estado funcional (LIU et al., 2019; SÁRVARI et al., 2020). Fenotipicamente, existem duas populações de macrófagos bem descritas: os macrófagos M1, também conhecidos como classicamente ativados ou pró- inflamatórios e os macrófagos M2, também designados como alternativamente ativados ou anti-inflamatórios (MOSSER; EDWARDS, 2008; GEISSMANN et al., 2010). Os macrófagos M1 são ativados por citocinas como IFN- γ , TNF- α , LPS, receptores TLRs (GORDON, 2003) e desencadeiam a produção de mais TNF- α , IL-1, IL-12, IL-23, CXCL10, ROS e NO, adquirindo uma potente atividade microbicida e de apresentação de antígenos (CLARK et al., 2007). Já os macrófagos M2, ou alternativamente ativados, são ativados pelas citocinas IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β e PGE₂, o que leva à produção de IL-10 e IL-1RA (um antagonista dos receptores de IL-1), de quimiocinas como CCL17 e CCL22 atribuindo a esses macrófagos baixa capacidade de promover apresentação de antígenos, cicatrização e produção de NO a partir de arginina (MOSSER; EDWARDS, 2008; SOLINAS et al., 2009). Macrófagos M2 subdividem-se ainda em 4 subgrupos: M2a, M2b, M2c e M2d, de acordo com os estímulos que os ativam, padrão de citocinas secretadas e funções biológicas (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018).

A fagocitose é uma das funções efetoras mais importantes dos macrófagos e

consiste no processo de detecção e absorção de partículas maiores que $0,5\ \mu\text{M}$, incluindo microrganismos e células apoptóticas (HIRAYAMA; IIDA; NAKASE, 2017). Esse processo requer a ativação de receptores de superfície celular que reconhecem e se ligam às células-alvos diretamente ou por meio de produtos intermediários, como as opsoninas. Os principais receptores fagocíticos são os receptores scavenger, receptores de manose e os receptores semelhantes ao toll (TLRs) (FU; HARRISON, 2021). Dentre os receptores da superfamília TLR, TLR2, TLR4 e TLR5 são considerados receptores fagocíticos em macrófagos (MCDONALD et al., 1999). Os heterodímeros formados por TLR2 (TLR2/TLR1, TLR2/TLR6) reconhecem diferentes tipos de moléculas, incluindo o zimosan, um componente da parede celular de fungos (KAWAI; AKIRA, 2010; KAWASAKI; KAWAI, 2014). A estimulação desses receptores induz uma forte resposta inflamatória em macrófagos e modula a expressão de citocinas quando outros receptores fagocíticos são concomitantemente estimulados pelo mesmo alvo, um exemplo é a interação do zimosan com o TLR2 e os receptores Dectina-1 (BROWN et al., 2003; GANTNER et al., 2003).

A fagocitose é um processo que ocorre em uma série de etapas (Figura 3).

Figura 3. Visão simplificada das etapas da fagocitose



Fonte: MAGALHÃES, 2023.

Inicialmente, as partículas se ligam aos receptores de membrana e são internalizadas no fagossomo (formado por extensões do citoplasma que recobrem o microrganismo e, em seguida, se fecham em torno dele). O fagossomo passa por um processo de maturação e, por fim, se funde com lisossomos, formando o fagolisossomo. Essa fusão permite que a partícula ingerida seja degradada a partir da ação das enzimas lisossomais e de ROS (CANTON, 2014; LEVIN; GRINSTEIN; CANTON, 2016; ROSALES; URIBE-QUEROL, 2017). Além disso, o macrófago produz NO, que por atravessar livremente as membranas plasmáticas penetra no fagolisossomo e aumenta ainda mais a sua toxicidade (MÖLLER et al., 2005). Adicionalmente, durante a fagocitose, o patógeno é degradado, seus antígenos expressos via MHC e apresentados aos linfócitos T via TCR, o que leva também ao desenvolvimento da imunidade adquirida (HARDING; CANADAY; RAMACHANDRA, 2010; PARHAM, 2005; UNANUE, 1984, 2002).

Várias vias de sinalização podem ser ativadas nos macrófagos durante uma resposta inflamatória a partir da interação de ligantes nos TLRs, incluindo a via das MAPKs, compreendendo as quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) (ERK1/2 ou p42/p44), as quinases N-terminal c-Jun (JNKs) (JNK/SAPK) e a p38 (COHEN, 2002). Uma vez ativadas, essas MAPKs podem fosforilar outros substratos e fatores de transcrição, como o NF- κ B, que pode ativar a transcrição de genes de mediadores pró-inflamatórios e proteínas do citoesqueleto (IMAJO; TSUCHIYA; NISHIDA, 2006), os quais são capazes de regular a atividade fagocítica.

Dada a importância dos macrófagos na manutenção da homeostase e nos processos inflamatórios/infecciosos, uma desregulação na atividade dessas células pode ser responsável pelo surgimento e manutenção de doenças, tais como a asma e a artrite reumatoide (ROSS; DEVITT; JHONSON, 2021). Além disso, muitos processos patológicos dão origem a um maior número de células apoptóticas e necróticas, gerando, por tanto, uma depuração fagocitária aumentada e prejuízos a homeostase (GORDON, 2016).

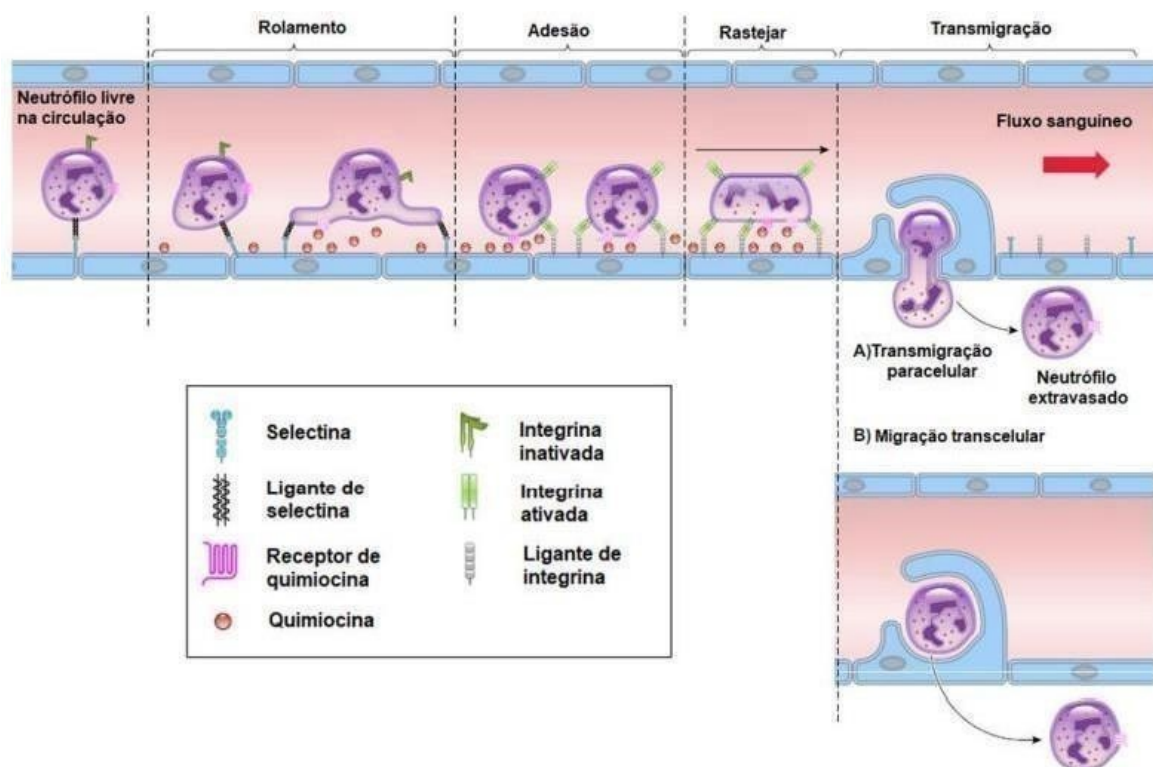
1.2.3 Os neutrófilos no processo inflamatório

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares produzidos na medula óssea que

possuem funções diversificadas no processo inflamatório, além de participarem da manutenção da homeostase do sistema imunológico. Em humanos, os neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes, constituindo em torno de 50-70% do sangue periférico total, já em camundongos esse número é bem menor, variando de 10-25% das células sanguíneas totais (HIDALGO et al., 2019; LIEW; KUBES, 2019; NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020). No geral, são leucócitos que possuem tempo de meia vida curto na circulação sanguínea, sobrevivendo em torno de 8h em humanos e 10h em camundongos (BASU et al., 2002), embora já tenha sido relatado um tempo médio de circulação de 12,5h e 5,4 dias para neutrófilos de camundongos e humanos, respectivamente (BONAVENTURA; MONTECUCCO, 2019).

Os neutrófilos respondem aos estímulos inflamatórios deixando a circulação através de um complexo processo de migração celular, o qual é regulado por sinais intra e extracelulares (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; MÓCSAI; WALZOG; LOWELL, 2015). O recrutamento clássico de neutrófilos ocorre em algumas etapas como a captura, rolamento, adesão, rastejar e posterior transmigração (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013) (Figura 4).

Figura 4. Etapas da migração neutrofílica.



Fonte: CAVALCANTE-SILVA, 2020.

A primeira etapa da migração dos neutrófilos é o rolamento, promovido pela interação com o endotélio, que passa a expressar moléculas de P-selectina e E-selectina, as quais interagem com ligantes presentes na membrana dos neutrófilos (como por exemplo, a glicoproteína ligante de P-selectina 1, PSGL-1), favorecendo o rolamento dessas células ao longo do vaso sanguíneo. A interação entre as selectinas e seus ligantes é de baixa afinidade (IVETIC; HOSKINS GREEN; HART, 2019). Concomitante a isso, a sinalização de quimiocinas nos neutrófilos promove a ativação de moléculas de adesão denominadas integrinas, como a LFA-1 (CD11a/CD18 ou $\alpha\text{L}\beta 2$) e MAC-1 (CD11b/CD18 ou $\alpha\text{M}\beta 2$), que se ligam firmemente aos seus ligantes presentes na membrana das células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1 ou CD45). A interação entre as integrinas e seus ligantes é de alta afinidade e favorece a diapedese ou transmigração, ou seja, a passagem dos neutrófilos do sangue para o sítio inflamado (KOURTZELIS et al., 2017; MAYADAS et al., 2013; SIGAL et al., 2000). Essa passagem dos neutrófilos através do endotélio pode ocorrer por via paracelular (entre as células endoteliais) ou transcelular (através das células endoteliais) (MULLER, 2011; NOURSHARGH; ALON, 2014).

Após a transmigração, os neutrófilos se dirigem ao local da inflamação por quimiotaxia. As principais moléculas quimioatraentes são as quimiocinas, citocinas, produtos bacterianos, proteínas do complemento, dentre outras. Esse processo quimiotático é regulado por vias que incluem a sinalização da PI3K e das MAPK p38 e ERK (LIEW; KUBES, 2019). No sítio inflamatório os neutrófilos utilizam diversos mecanismos, incluindo a fagocitose; a liberação de moléculas microbicidas contidas em grânulos citoplasmáticos; a produção de citocinas, como TNF- α , IL-12, IL-23, dentre outras; de quimiocinas, como CXCL-1, CCL-2, dentre outras; de ROS, etc (MANTOVANI et al., 2011; YANG et al., 2017).

Os receptores de membrana nos neutrófilos têm fundamental importância para ativação de mecanismos antimicrobianos e da fagocitose, a exemplo dos receptores Fc e receptores do complemento, que permitem englobar patógenos opsonizados desencadeando a maquinaria fagocítica (VAN KESSE; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014). Durante a fagocitose, os grânulos presentes nos neutrófilos se fundem com o fagossomo, previamente formado, e liberam conteúdo antimicrobiano ao mesmo tempo em que ocorre a produção de ROS, que são direcionadas ao vacúolo fagocítico e também contribuem para a morte de patógenos (SEGAL, 2005). Além disso, os

receptores do tipo Toll (TLRs) também são de grande importância na resposta dos neutrófilos. Esses receptores são ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como o lipopolissacarídeo (LPS), presente na superfície de membranas de bactérias gram-negativas, e o zimosan, presente na superfície de fungos, iniciando uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (KAWASAKI; KAWAI, 2014; TAKEDA; AKIRA, 2005). Uma vez ativado, esse fator de transcrição induz a expressão de genes de vários mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, dentre outras (TAKADA, 2009).

Apesar de ser a primeira linha de defesa do organismo contra infecções bacterianas e fúngicas, os neutrófilos também contribuem para danos teciduais durante respostas inflamatórias exageradas, doenças autoimunes e progressão do câncer (COFFELT; WELLENSTEIN; DE VISSER, 2016; DENSON et al., 2018; MISHALIAN; GRANOT; FRIDLENDER, 2017; OCANA et al., 2017; TALBOT et al., 2012). Nesses casos, ocorre uma desregulação na ativação/migração dessas células fazendo com que a inflamação seja prejudicial (HIDALGO et al., 2019).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A LQB 118 é uma molécula híbrida sintética com estrutura baseada em dois grupos de moléculas naturais: os pterocarpanos e as naftoquinonas (NETTO et al., 2010). A LQB 118 possui várias atividades biológicas relatadas na literatura, como atividade anti-leishmania (RIBEIRO et al., 2013; COSTA et al., 2014), uma marcante atividade citotóxica para linhagens de células de câncer humano e murino (MAIA et al., 2010; BACELAR et al., 2013; MORAES et al., 2014; SALUSTIANO et al., 2016) e atividade anti-inflamatória em modelo de de inflamação pulmonar induzida por LPS (RIÇA et al., 2016). Além disso, recentemente nosso grupo demonstrou a atividade anti-inflamatória da LQB 118 *in vitro*, utilizando macrófagos peritoneais estimulados por zimosan, onde o tratamento com essa substância modulou negativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias e moléculas que podem estar envolvidas nas vias de sinalização celular desse processo (LIMA et al., 2020).

Embora a inflamação seja uma resposta fisiológica considerada benéfica ao organismo, esta pode se tornar patológica quando desregulada, sendo um fator determinante para o desenvolvimento e manutenção de diversas doenças, como obesidade, asma, hipertensão, câncer, dentre outras (NATHAN; DING, 2010; NETTO et al., 2010; RODRIGUES-MASCARENHAS et al., 2015). Considerando ainda que pouco se sabe sobre as vias de sinalização envolvidas nos efeitos desencadeados pela LQB 118, este trabalho tem como hipótese o envolvimento de mecanismos intracelulares relacionados ao desencadeamento da inflamação e para tal realizamos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, o presente trabalho visou contribuir com novas substâncias com potencial terapêutico contra a inflamação, além de gerar mais entendimento sobre a LQB 118 e a sua capacidade em atuar em processos fisiológicos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-inflamatório da LQB 118 em modelo experimental murino *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 *In vitro*, em macrófagos peritoneais murinos:

- Quantificar os níveis das citocinas IL-10 e IL-12.
- Analisar o efeito da LQB 118 na produção de NO e ROS.
- Avaliar o efeito da LQB 118 na atividade fagocítica
- Determinar o efeito da LQB 118 quanto à expressão da enzima iNOS e do NF-kB total e fosforilado.
- Analisar o efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação das quinases Akt e mTOR.

3.2.2 *In vivo*, em modelo de peritonite induzida por zimosan:

- Avaliar o efeito da LQB 118 na migração de leucócitos encontrados no lavado peritoneal, quanto ao número de células e as subpopulações.
- Analisar os efeitos da administração da LQB 118 na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6 e anti-inflamatória IL-10 no peritônio.
- Investigar o efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação da MAPK p38 nas células do infiltrado inflamatório.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas com idade entre 6-8 semanas e peso entre 25-30 g. Os animais foram provenientes do Biotério Prof. Thomas George localizado na Universidade Federal da Paraíba e do Biotério de Criação SPF da Universidade Estadual da Paraíba e mantidos com livre acesso a água e dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Purina), com ventilação e temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas e constantes e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12h. Todos os procedimentos adotados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o número de protocolo 1278190820 (ID 001216) (ANEXO A).

4.2 Obtenção e preparo da LQB 118

A LQB 118 foi sintetizada no Laboratório de Química Bio-orgânica, do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ segundo a metodologia descrita por Netto et al., 2010 e sob a coordenação do professor titular da UFRJ, colaborador desse trabalho, Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa.

Na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a amostra foi solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 196 mM e armazenada no freezer (-20°C). Para a realização dos experimentos *in vitro*, a partir da solução mãe de LQB 118 foram feitas soluções intermediárias (em diferentes concentrações) em meio de cultura Royal Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) imediatamente antes do uso. Já para a realização dos experimentos *in vivo*, as soluções intermediárias (em diferentes doses) foram feitas utilizando água para injeção. A concentração máxima de DMSO utilizada nos experimentos *in vitro* foi 0,025% e nos experimentos *in vivo* foi 0,05%. Estas concentrações não induzem efeito tóxico (DA SILVA, 2016).

4.3 Experimentos *in vitro*

4.3.1 Tratamento com a LQB 118 para os testes *in vitro*

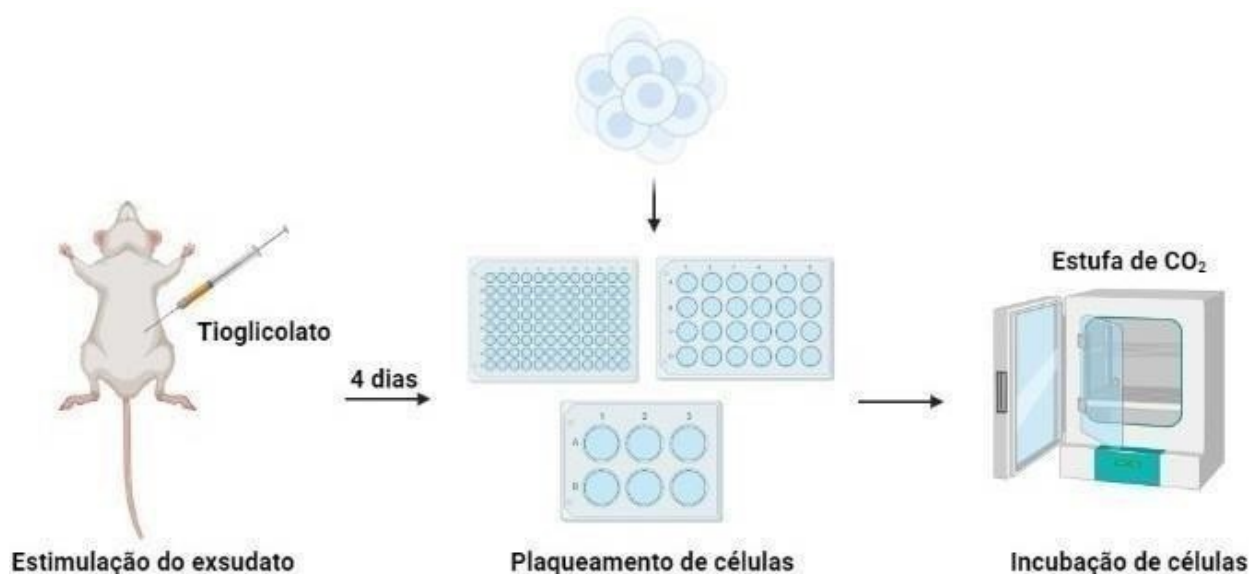
Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes concentrações de LQB 118: 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M ou 5 μ M, contidas em um volume final de 200 μ L, 500 μ L ou 2 mL. Para isso, foi preparada uma solução intermediária na concentração de 50 mM em meio RPMI-1640 estéril, seguindo-se sucessivas diluições até chegar às concentrações utilizadas.

4.3.2 Obtenção e cultura de macrófagos peritoneais

Para a execução dos experimentos foram utilizados macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos swiss fêmeas. No entanto, o número de macrófagos obtido do peritônio de um animal não-elicitado é insuficiente para alguns estudos. Para aumentar esse número, o tioglicolato pode ser injetado nessa cavidade, induzindo o processo de migração dos monócitos do sangue para o sítio peritoneal. Esse processo de elicitação aumenta em até 10 vezes o rendimento de macrófagos para o estudo (LEIJH et al, 1984). Inicialmente, esses animais foram elicitados com 2 mL de tioglicolato de sódio por via intraperitoneal (Figura 5); quatro dias após essa injeção, foram eutanasiados por deslocamento cervical, suas cavidades peritoneais foram expostas e lavadas com 5 mL de PBS gelado e o lavado foi recuperado após 30 segundos de massagem.

O lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm e 4°C durante 5 minutos e as células ressuspendidas em 1 mL de meio RPMI completo (estreptomicina: 10 mg/mL, penicilina: 100 U.I./ml e soro fetal bovino:10%). Em seguida, a viabilidade celular foi determinada utilizando o corante azul de tripan e a câmara de Neubauer. As células peritoneais tiveram suas concentrações ajustadas e foram cultivadas em placas de 6, 24 ou 96 poços a uma concentração de $1,5 \times 10^6$, 5×10^5 e 2×10^5 , respectivamente, em um volume final de 2 mL, 500 μ L e 200 μ L, respectivamente, e incubadas em estufa de CO₂ (atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C) por 2 horas para permitir a aderência dos macrófagos. Após isso, as células não aderentes foram removidas por aspiração com pipeta e os macrófagos aderidos foram submetidos a diferentes protocolos experimentais.

Figura 5. Resumo do protocolo de isolamento dos macrófagos peritoneais.



Fonte: Autor, 2023. BioRender.

De forma resumida, foi elicitado um exsudato peritoneal nos camundongos com uma injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio. Após 4 dias, as células foram coletadas e os macrófagos foram separados por aderência em plástico. Para isso, as células peritoneais foram plaqueadas e incubadas por 2 h com o meio RPMI-1640 completo em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

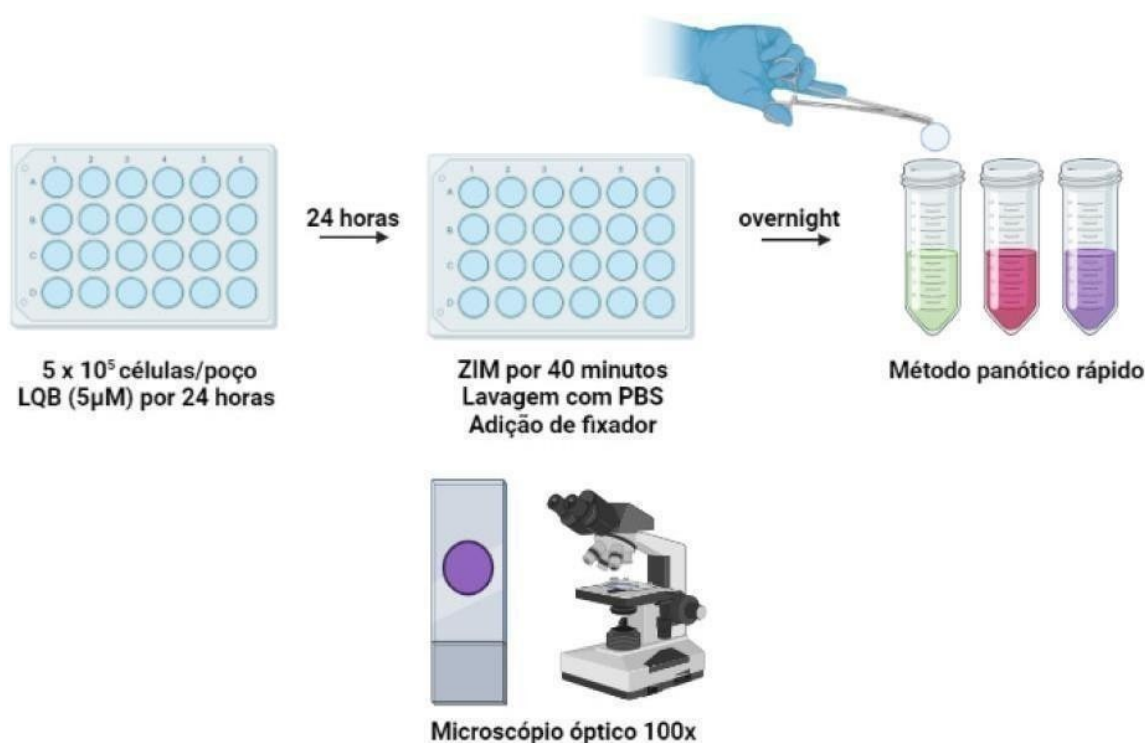
4.3.3 Cultura de macrófagos para análise da capacidade fagocítica às partículas de zimosan

Macrófagos peritoneais murinos foram obtidos como descrito anteriormente (item 4.3.2), plaqueados em placas de 24 poços contendo uma lamínula redonda de 13 mm de diâmetro e, após a adesão, foram incubados durante um período de 24 horas com a concentração de 5 µM de LQB 118. Após isso, o conteúdo dos poços foi aspirado e adicionou-se o zimosan na concentração de 0,2 mg/mL, sendo a placa novamente incubada durante 40 minutos. Depois da incubação, os poços foram novamente lavados com PBS para remover o excesso de partículas não fagocitadas e adicionou-se 500 µL de paraformaldeído 4% overnight para permitir a fixação dos macrófagos às lamínulas para posterior coloração e análise.

No dia seguinte, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente dos poços e coradas utilizando o método de panótico rápido. As lamínulas coradas foram então montadas em lâminas de microscopia com o auxílio do Bálsamo do Canadá e visualizadas por microscopia óptica, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X) (Figura 6). O percentual de fagocitose foi estimado pela contagem de partículas de

zimosan fagocitadas em 100 macrófagos, sendo consideradas células com atividade fagocítica aumentada aquelas que apresentavam pelo menos 3 partículas de zimosan internalizadas (ZULIANI; GUTIÉRREZ; TEIXEIRA, 2018).

Figura 6. Resumo do protocolo de análise da capacidade fagocítica dos macrófagos.



Fonte: Autor, 2023. BioRender.

De forma resumida, as células foram plaqueadas e tratadas por 24 h com a concentração de 5 µM da LQB 118. Após isso, foram estimuladas com 0,2 mg/mL de zimosan por 40 minutos. Os poços foram lavados, as laminulas removidas e coradas pelo corante panótico rápido e por fim visualizadas em microscópio óptico no aumento de 100x.

4.3.4 Cultura de macrófagos para quantificação dos níveis de IL-10, IL-12 e NO

Os macrófagos peritoneais murinos foram obtidos como descrito anteriormente (item 4.3.2) e após a etapa de adesão em placas de 96 poços foram incubados overnight em estufa de CO₂ com meio RPMI completo na presença ou ausência de diferentes concentrações de LQB 118 (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM ou 5 µM) e com adição ou não de zimosan na concentração de 0,2 mg/mL (Tabela 1) Após o tempo em cultura, o sobrenadante foi coletado para dosagem das citocinas IL-10 e IL-12 e do NO (Figura 7).

Tabela 1. Distribuição dos grupos durante cultura de macrófagos peritoneais murinos

GRUPOS	TRATAMENTOS	Estímulo
Controle (CTR)	-	-
LQB 118 0.1 μ M	LQB 118 0.1 μ M	-
LQB 118 0.5 μ M	LQB 118 0.5 μ M	-
LQB 118 1 μ M	LQB 118 1 μ M	-
LQB 118 5 μ M	LQB 118 5 μ M	-
Zimosan (ZIM)	-	Zimosan 0,2 mg/mL
LQB 118 0.1 μ M + ZIM	LQB 118 0.1 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL
LQB 118 0.5 μ M + ZIM	LQB 118 0.5 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL
LQB 118 1 μ M + ZIM	LQB 118 1 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL
LQB 118 5 μ M + ZIM	LQB 118 5 μ M	Zimosan 0,2 mg/mL

Fonte: AUTOR, 2023.

Figura 7. Resumo do protocolo de cultura para quantificação de citocinas e NO.



Fonte: Autor, 2023. BioRender.

De forma resumida, após incubação, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações da LQB118 e posteriormente o sobrenadante foi coletado para análise dos níveis das citocinas e do NO.

4.3.5 Quantificação dos níveis de NO

A produção do óxido nítrico foi quantificada indiretamente pela reação de Griess (GREEN et al., 1982), que dosa o produto mais estável da degradação do NO, o nitrito. Para isso, resumidamente, adicionou-se 50 μ L do sobrenadante da cultura com 50 μ L

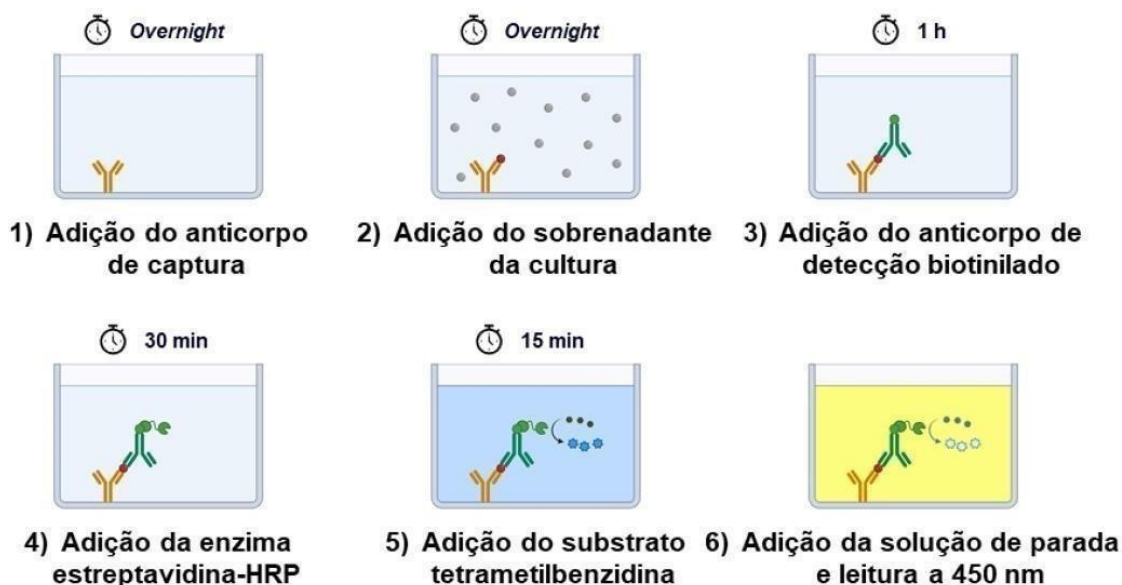
da solução de Griess (ácido orto-fosfórico: 5%, N-[1-naftil] etilenodiamina: 0,1% e sulfanilamida: 1%) e após 10 min de reação à temperatura ambiente a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 540 nm. A preparação da curva padrão foi feita com nitrito de sódio. Por ser um ensaio colorimétrico, quanto maior a intensidade da cor maior será a concentração de nitrito na amostra.

4.3.6 Quantificação dos níveis das citocinas IL-10 e IL-12

A produção das citocinas IL-10 e IL-12 foi quantificada por ELISA sanduíche de acordo com protocolo especificado pelos fabricantes dos kits. De forma resumida, placas de 96 poços de fundo plano foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IL-10 e anti-IL-12 e incubadas overnight a 4°C (Figura 8). Após isso, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com o diluente ELISA\ELISPOT (1x) durante 1 h. Novamente, as placas foram lavadas 5 vezes, o sobrenadante da cultura foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas overnight a 4°C.

Após novas lavagens os anticorpos de detecção biotinilados para cada citocina foram adicionados e as placas permaneceram em temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, as placas foram lavadas 5 vezes e adicionou-se a enzima estreptavidina- HRP e 30 min após foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina e as placas permaneceram por mais 15 min em temperatura ambiente. Por fim, foi adicionada a solução de parada (ácido orto-fosfórico 1M). A densidade óptica foi determinada utilizando um comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro de microplacas.

Figura 8. Resumo do protocolo de ELISA para determinação dos níveis das citocinas.



Fonte: SALES NETO, 2022. BioRender.

Resumidamente, as placas foram sensibilizadas *overnight* com o anticorpo de captura, que se liga especificamente a um determinado epítipo do antígeno. Após isso, foram adicionados *overnight* os sobrenadantes da cultura para imobilização dos antígenos na superfície dos poços da placa para ELISA. Em seguida, foram adicionados os anticorpos de detecção biotilados, que se liga especificamente a outro determinado epítipo do antígeno. Após 1 h, foi adicionada a enzima estreptavidina-HRP. Após 30 min, foi adicionado o substrato tetrametilbenzidina e as placas foram incubadas por 15 min. A enzima estreptavidina-HRP consiste em uma proteína chamada estreptavidina, que se liga especificamente à biotina presente no anticorpo de detecção, conjugada com enzimas HRP, responsáveis pela catálise do substrato tetrametilbenzidina e, conseqüentemente, geração do sinal. Por fim, foi adicionada solução de parada (ácido orto-fosfórico: 1 M) e a densidade óptica foi determinada a 450 nm em espectrofotômetro de microplaca.

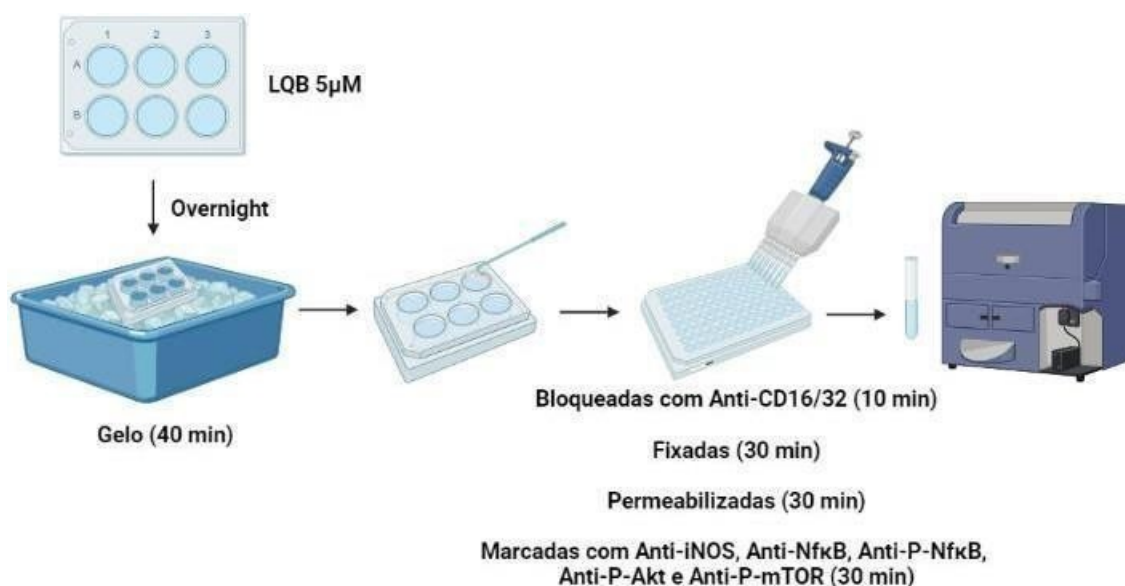
4.3.7 Análise da expressão de iNOS, NFκB, P-NFκB, P-Akt e P-mTOR

Os macrófagos obtidos como descrito anteriormente (item 4.3.2) foram cultivados em placas de 6 poços e tratados com a concentração de 5 μ M da LQB 118 *overnight* na presença ou ausência de 0,2 mg/mL (5% CO₂, 37°C). As placas foram retiradas da estufa, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS.

As placas foram mantidas no gelo durante 40 minutos (Figura 9) e as células foram dissociadas e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e corante azul de tripan, as concentrações ajustadas para 1×10^6 e então foram transferidas para placas de 96 poços de fundo U. Após isso, a placa foi centrifugada a 300 g por 6 min e as células foram bloqueadas com o anticorpo anti-CD16\32 durante 10 minutos para prevenir interações inespecíficas mediadas por Fc. Em seguida, o sobrenadante foi

descartado e adicionou-se 100 μL de Cytofix (BD Cytofix™) para fixar as células. Depois de 30 min em estufa de CO_2 , a placa foi novamente centrifugada, o sobrenadante desprezado e foram adicionados 150 μL de Perm Buffer (BDPhosflow™) a fim de permeabilizar as células e a placa permaneceu 30 min no gelo. Passado este tempo, a placa foi novamente centrifugada e as células marcadas separadamente com os anticorpos anti-iNOS, anti-NF κ B, anti-P-NF κ B, anti-P-Akt e anti-P-mTOR. Após mais 30 min no gelo, a placa foi novamente centrifugada e por fim, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

Figura 9. Resumo do protocolo de citometria de fluxo para avaliação da expressão de iNOS, NF κ B, P- NF κ B, P-Akt e P-mTOR



Fonte: Autor, 2023. BioRender.

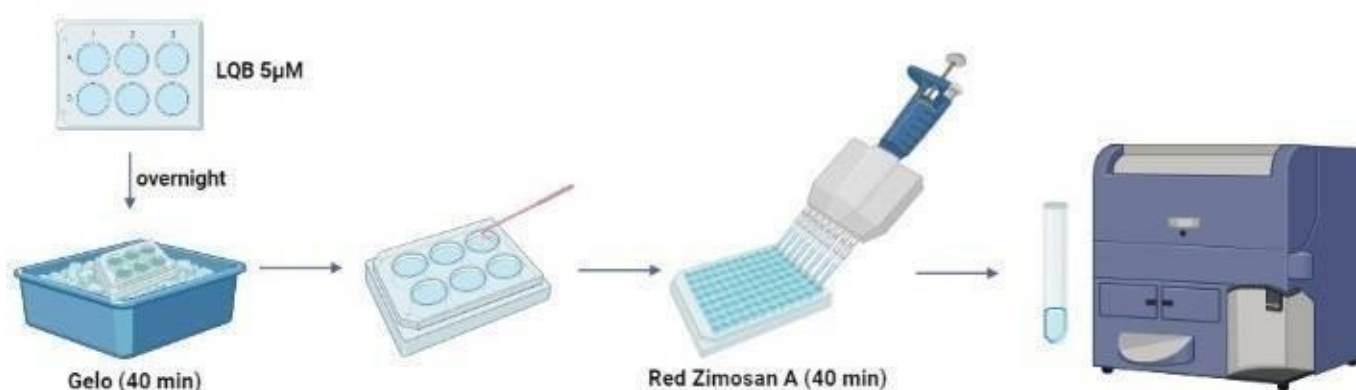
De forma resumida, após a cultura as placas foram colocadas no gelo e dissociadas com o auxílio de um raspador de células. Posteriormente, as células tiveram as concentrações ajustadas, foram bloqueadas, fixadas, permeabilizadas e por fim marcadas com os respectivos anticorpos para análise em citômetro de fluxo.

4.3.8 Análise da capacidade fagocítica às partículas de zimosan por citometria de fluxo

Os macrófagos obtidos como descrito anteriormente (item 4.3.2) foram cultivados em placas de 6 poços e tratados com a concentração de 5 μM da LQB

118 overnight. As placas foram retiradas da estufa, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS. As placas foram mantidas no gelo durante 40 minutos e as células foram soltas e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e corante azul de tripan, as concentrações ajustadas para 1×10^6 e então foram transferidas para placas de 96 poços de fundo U. Após isso, a placa foi centrifugada a 300 g por 6 min e as células foram incubadas com o reagente fluorogênico Red zimosan A durante 40 min (5% CO₂, 37°C). Esse reagente consiste em partículas de zimosan conjugadas com o corante pHrodo™, que aumenta sua fluorescência conforme o pH do ambiente se torna mais ácido. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

Figura 10. Resumo do protocolo para análise da capacidade fagocítica às partículas de zimosan por citometria de fluxo.



Fonte: Autor, 2023. BioRender.

Resumidamente, após a cultura as placas foram colocadas no gelo e soltas com o auxílio de um raspador de células. Posteriormente, as células tiveram as concentrações ajustadas e foram incubadas com o Red Zimosan A por 40 min para posterior análise em citômetro de fluxo.

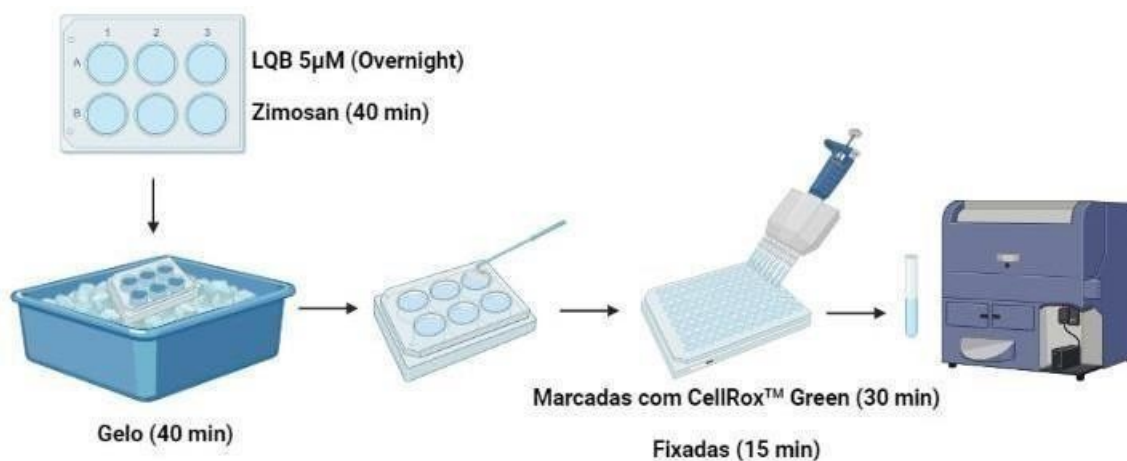
4.3.9 Análise da expressão de ROS

Os macrófagos obtidos como descrito anteriormente (item 4.3.2) foram cultivados em placas de 6 poços e tratados com a concentração de 5 µM da LQB 118 overnight. Após isso, adicionou-se o zimosan (0,2 mg/mL) durante 40 minutos (5% CO₂, 37°C). As placas foram retiradas da estufa, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados

com PBS.

As placas foram mantidas no gelo durante 40 minutos e as células foram soltas e contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e corante azul de tripan, as concentrações ajustadas para 1×10^6 e então foram transferidas para placas de 96 poços de fundo U. Após isso, as células foram marcadas com CellRox™ Green durante 30 minutos em estufa de CO₂. A placa foi centrifugada e adicionados 100 µL de Cytofix (BD Cytofix™) por 15 minutos. Passado este tempo, a placa foi novamente centrifugada e por fim, as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

Figura 11. Resumo do protocolo para análise da expressão de ROS.



Fonte: Autor, 2023. BioRender.

4.4 Experimentos *in vivo*

4.4.1 Tratamento com a LQB 118 para os testes *in vivo*

Inicialmente, os animais foram divididos em 6 grupos: Salina; Zimosan; LQB 118 10 mg/kg; LQB 118 20 mg/kg; LQB 118 10 mg/kg + Zimosan; LQB 118 20 mg/kg + Zimosan (Tabela 2). Cada grupo tinha um n total de pelo menos 7 animais (n=7), o que totalizou 49 animais por experimento. Os camundongos dos grupos LQB 118 10 e 20 mg/kg e LQB 118 10 e 20 mg/kg + zimosan foram pré-tratados 1 h antes do desafio com o zimosan através de injeções intraperitoneais (i.p) contendo 500 µL de LQB 118

nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg. Os animais do grupo controle, por sua vez, foram tratados apenas com salina, com o objetivo de sofrerem o mesmo estresse causado pela injeção dos grupos tratados.

Tabela 2. Distribuição dos grupos para protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.

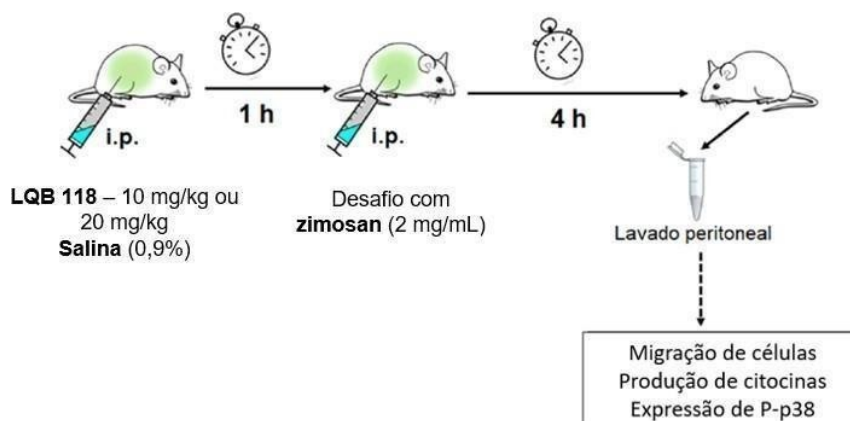
GRUPOS	TRATAMENTOS	DESAFIO
Salina	Salina (0,9%)	-
Zimosan	-	Zimosan 2 mg/mL
LQB 118 10 mg/kg	LQB 118 10 mg/kg	-
LQB 118 20 mg/kg	LQB 118 20 mg/kg	-
LQB 118 10 mg/kg + ZIM	LQB 118 10 mg/kg	Zimosan 2 mg/mL
LQB 118 20 mg/kg + ZIM	LQB 118 20 mg/kg	Zimosan 2 mg/mL

Fonte: Autor, 2023.

4.4.2 Peritonite induzida por zimosan

Com o objetivo de avaliar o efeito imunomodulador da LQB 118 no processo inflamatório agudo os animais foram submetidos ao protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan (DOHERTY et al., 1985). Após 1 h do tratamento com a LQB 118, os camundongos foram desafiados com uma dose de 2 mg/mL de zimosan preparado em 500 µL de salina (0,9%) estéril. O esquema de tratamento e indução da peritonite poder ser observado na figura 12.

Figura 12. Esquema do protocolo experimental de peritonite induzida por zimosan.



Fonte: Modificado de Carvalho, 2018

4.4.3 Coleta e contagem total de células do lavado peritoneal

Após 4 h do desafio com o zimosan foi feita a coleta do lavado peritoneal, onde os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, e em seguida foi realizado o lavado do peritônio através da injeção de 3 mL de PBS gelado nessa cavidade. Após 30 segundos de massagem, o conteúdo foi recuperado e transferido para tubos do tipo eppendorf de 2 mL e centrifugado durante 5 min a 1.500 rpm e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Já os pellets foram ressuspensos, uma alíquota foi corada com o corante azul de turk (0,01% de cristal violeta em 3% de ácido acético) na proporção de 1:10 e a contagem de células totais foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer e do microscópio óptico utilizando objetiva de aumento 40X (BX40, OLYMPUS).

4.4.4 Contagem diferencial de células do lavado peritoneal

Para realização da contagem diferencial das células, centrifugou-se 50 µL da suspensão celular proveniente do lavado peritoneal na citocentrífuga do tipo citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400) por 10 min a 1500 rpm. As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab) e a contagem diferencial foi realizada por microscopia óptica, utilizando objetiva de imersão (100X). As lâminas foram percorridas até a contagem de 100 células. Mononucleares e polimorfonucleares foram identificados segundo características morfológicas e de coloração.

4.4.5 Determinação dos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10

As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram quantificadas a partir do sobrenadante proveniente do lavado peritoneal dos camundongos utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA sanduíche de acordo com as especificações do fabricante, conforme descrito anteriormente no item 4.3.6.

4.4.6 Análise da fosforilação da MAPK p38

As células provenientes do lavado peritoneal tiveram sua concentração ajustada para 1×10^6 e foram transferidas para placas de 96 poços de fundo U. Após isso, a placa foi centrifugada e as células foram bloqueadas, fixadas e permeabilizadas conforme descrito no item 4.3.8. Por fim, as células foram marcadas com o anticorpo anti- P-p38 por 30 min e as células foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II.

4.5 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos utilizados nos protocolos experimentais

ANTICORPOS	FLUORÓFOROS	FABRICANTE
Anti-CD16/32	-	eBioscience
Anti-iNOS	PE	Santa Cruz Biotechnology
Anti-NFκB	PerCP-Cy 5.5	Santa Cruz Biotechnology
Anti-P-NFκB	PE	Invitrogen
Anti-P-p38	PerCP- eFluor	Invitrogen
Anti-P-Akt	PE	Invitrogen
Anti-P-mTOR	PE	Invitrogen

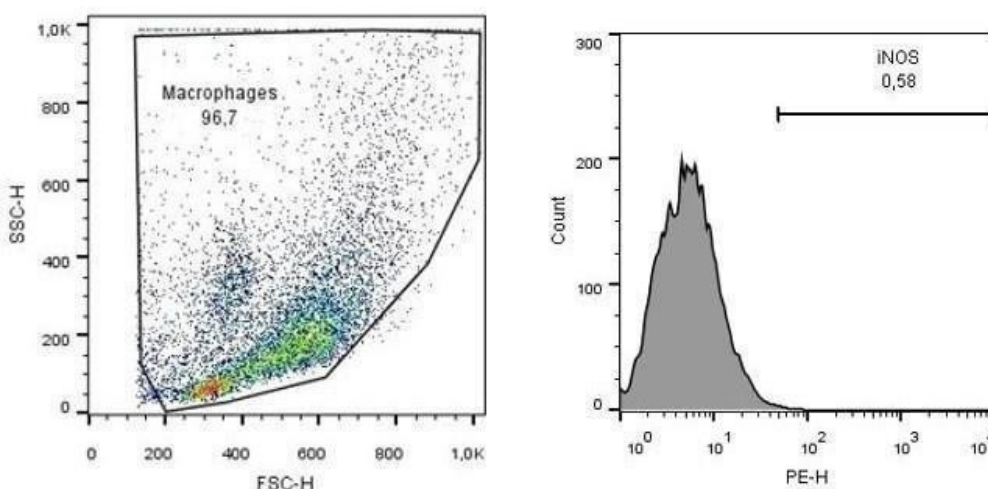
Fonte: Autor, 2023.

4.6 Aquisição e análise de dados da citometria de fluxo

O citômetro de fluxo utilizado para todas as análises foi o BD FACSCanto™ II, que possui três lasers: o azul (488 nm), o violeta (405 nm) e o vermelho (633 nm). Nas análises da expressão dos diferentes marcadores em macrófagos peritoneais murinos todos os dados foram gerados a partir da aquisição de 10.000 eventos e a análise foi baseada na obtenção de um gráfico de tamanho (FSC) vs. Granulosidade (SSC),

fazendo-se um gate na população de macrófagos e excluindo-se a maioria dos debris celulares. Posteriormente, as células foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência e a % de células marcadas, obtendo-se um gráfico do tipo histograma (Figura 13).

Figura 13. Esquema representativo da estratégia de análise dos dados da citometria de fluxo



Fonte: Autor, 2023.

Os macrófagos foram visualizados em um gráfico de tamanho vs. granulosidade (FSC vs. SSC) e foi feito um gate. Em seguida, foi feito um gráfico histograma, onde pode ser observada a intensidade de fluorescência e a % de células marcadas (neste caso, histograma representativo de um controle autofluorescência).

4.7 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida de pós-teste de *Tukey*. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises dos dados foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism versões 5.0 e 7.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para as análises dos dados de citometria de fluxo utilizou-se o software FlowJo versão 10.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

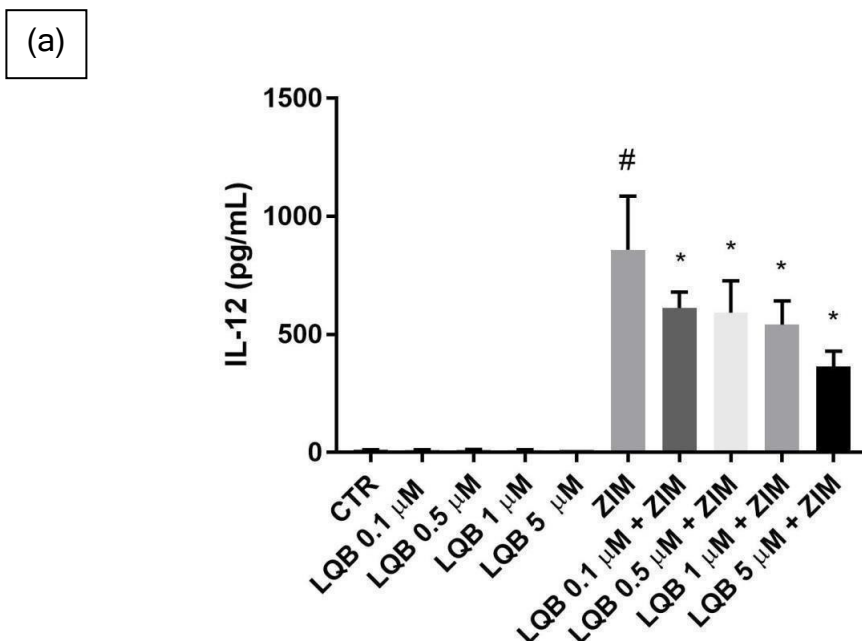
5.1 Avaliação do efeito anti-inflamatório da LQB 118 *in vitro*

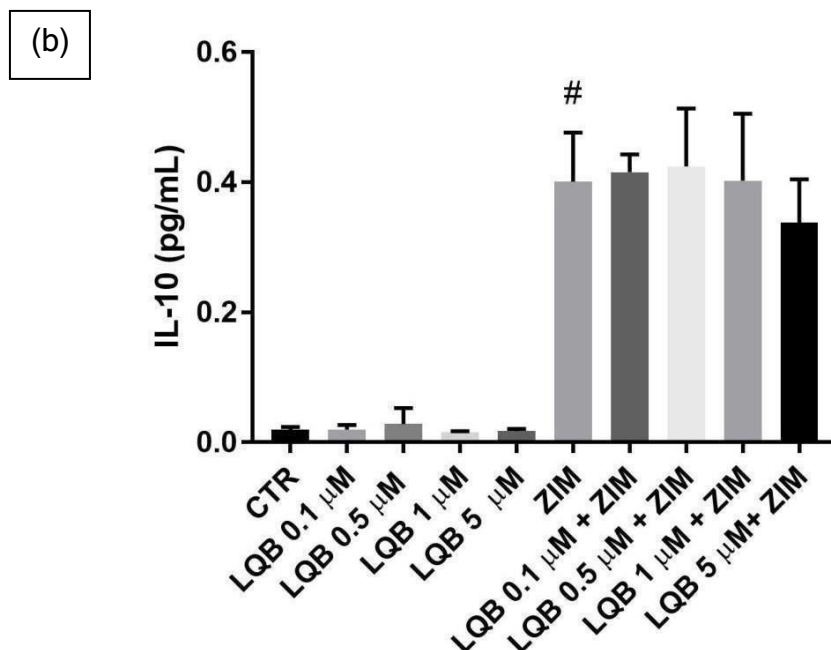
5.1.1 Níveis das citocinas IL-12 e IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

Os macrófagos estimulados com zimosan apresentaram aumento significativo dos níveis das citocinas, IL-12 e IL-10 em comparação ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 em diferentes concentrações (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M ou 5 μ M) não alterou os níveis de produção basal dessas citocinas.

O tratamento com todas as concentrações da LQB 118 em associação com o zimosan foi capaz de reduzir os níveis de IL-12 (0.1 μ M em 28,7%; 0.5 μ M em 31%; 1 μ M em 36,8% e 5 μ M em 57,6%), já os níveis de IL-10 não foram alterados quando comparados ao grupo estimulado com zimosan, como mostrado no gráfico 1.

Gráfico 1: Efeito da LQB 118 sobre os níveis das citocinas IL-12 (a) e IL-10 (b) na cultura de macrófagos peritoneais



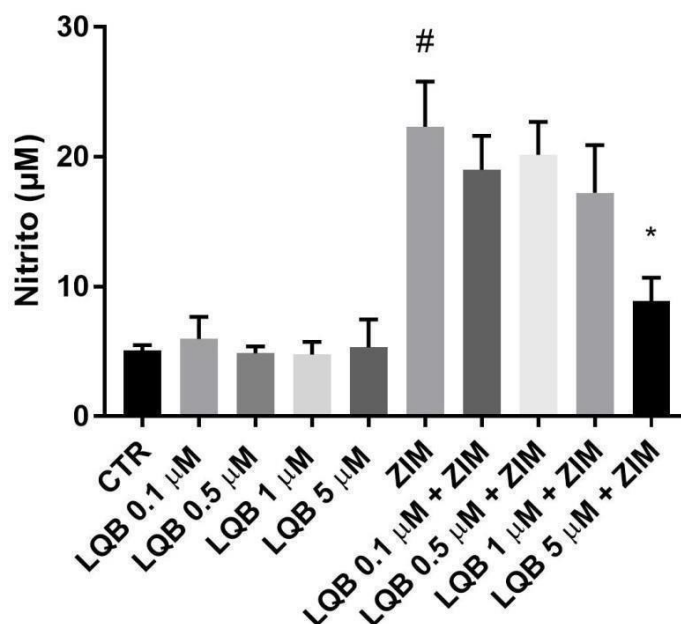


As células foram tratadas com a LQB 118 em diferentes concentrações, na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado e os níveis de citocinas foram quantificados pelo ensaio imunoenzimático ELISA. (a): IL-12. (b): IL-10. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de 3 experimentos em duplicata, e foi feita a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle e aos grupos LQB 118 nas diferentes concentrações. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.2 Produção de óxido nítrico na cultura de macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

Como mostrado no gráfico 2, o zimosan foi capaz de estimular a produção de NO pelos macrófagos em relação ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 nas diferentes concentrações (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M ou 5 μ M) não alterou os níveis de produção basal desse mediador. O tratamento com a concentração de 5 μ M da LQB 118 na presença do zimosan, por sua vez, foi capaz de reduzir os níveis de NO (60,2%), em comparação ao grupo zimosan.

Gráfico 2: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de óxido nítrico



As células foram tratadas com a LQB 118 em diferentes concentrações, na ausência ou presença de zimosan por 24h. Após esse período de incubação, o sobrenadante foi coletado para análise da produção do NO pelo método de Griess. O gráfico representa as concentrações de nitrito de acordo com os grupos de tratamento. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de 3 experimentos em duplicata, e foi feita a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle e aos grupos LQB 118 nas diferentes concentrações.. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

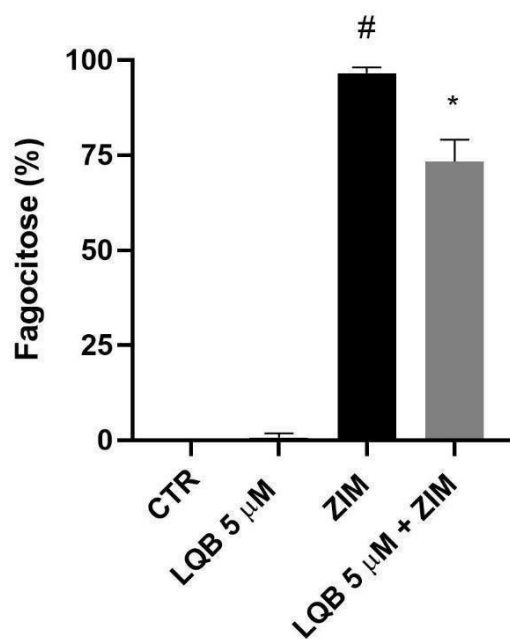
5.1.3 Capacidade fagocítica dos macrófagos às partículas de zimosan

Como pode ser analisado no gráfico 3 (a), o índice de fagocitose analisada por microscopia aumentou no grupo zimosan (97%), em relação ao grupo controle, como esperado. O pré-tratamento apenas com a LQB 118 (5 μ M – dose escolhida para as próximas análises por apresentar melhor resultados na diminuição de IL-12 e NO) não alterou significativamente o índice de fagocitose, já a associação dessa substância com o zimosan, foi capaz de reduzir em 24,1% a fagocitose das partículas de zimosan.

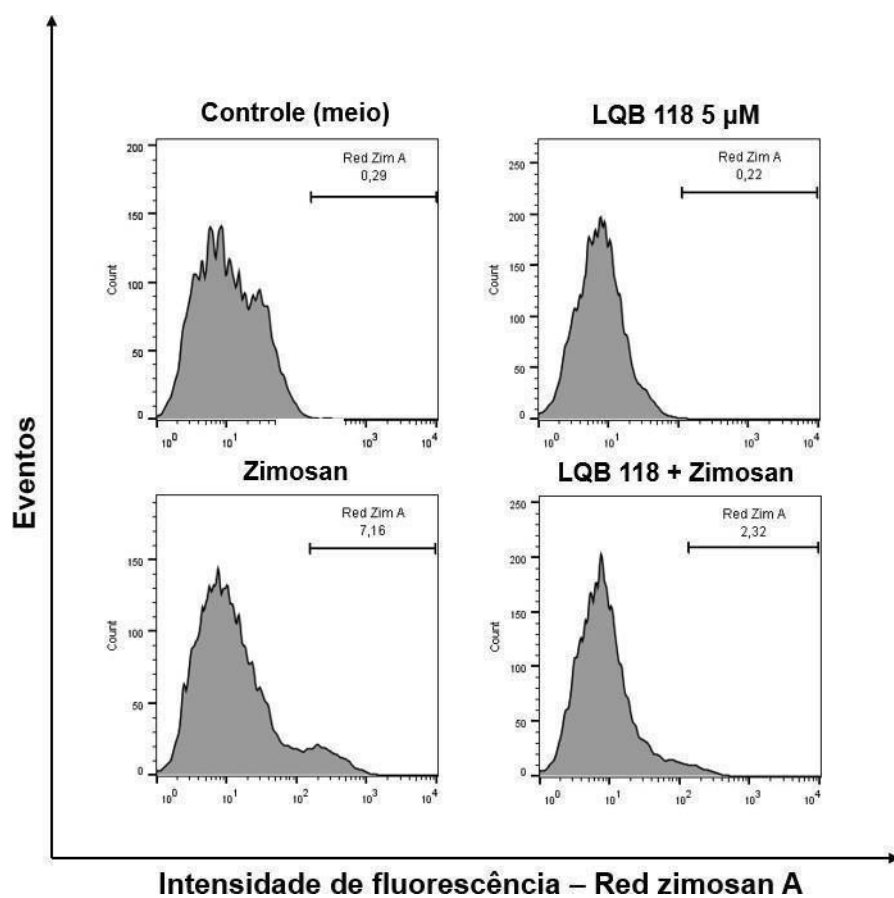
No gráfico 3 (b) e (c), avaliamos o uso de partículas de zimosan fluorescentes por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que a fagocitose foi maior no grupo zimosan, como esperado. O pré- tratamento com a LQB 118 (5 μ M) foi capaz de reduzir em 64,4% a fagocitose das partículas de zimosan.

Gráfico 3: Efeito da LQB 118 na capacidade fagocítica dos macrófagos

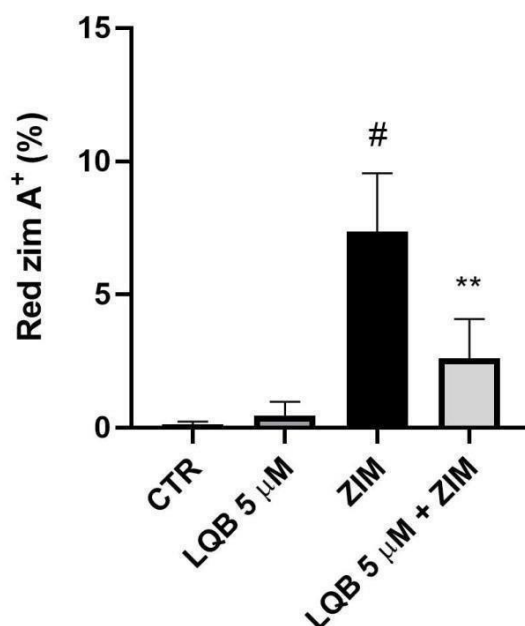
(a)



(b)



(c)

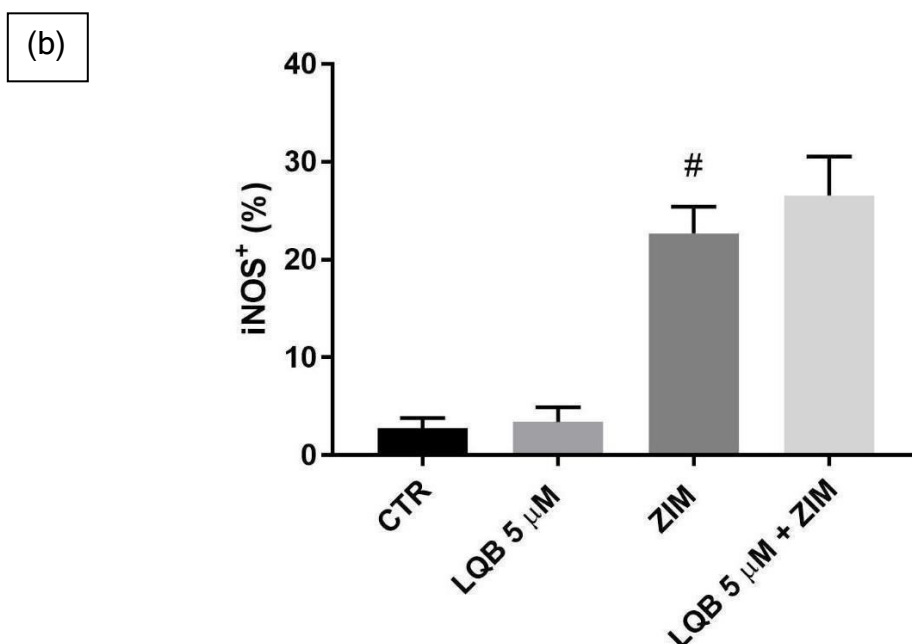
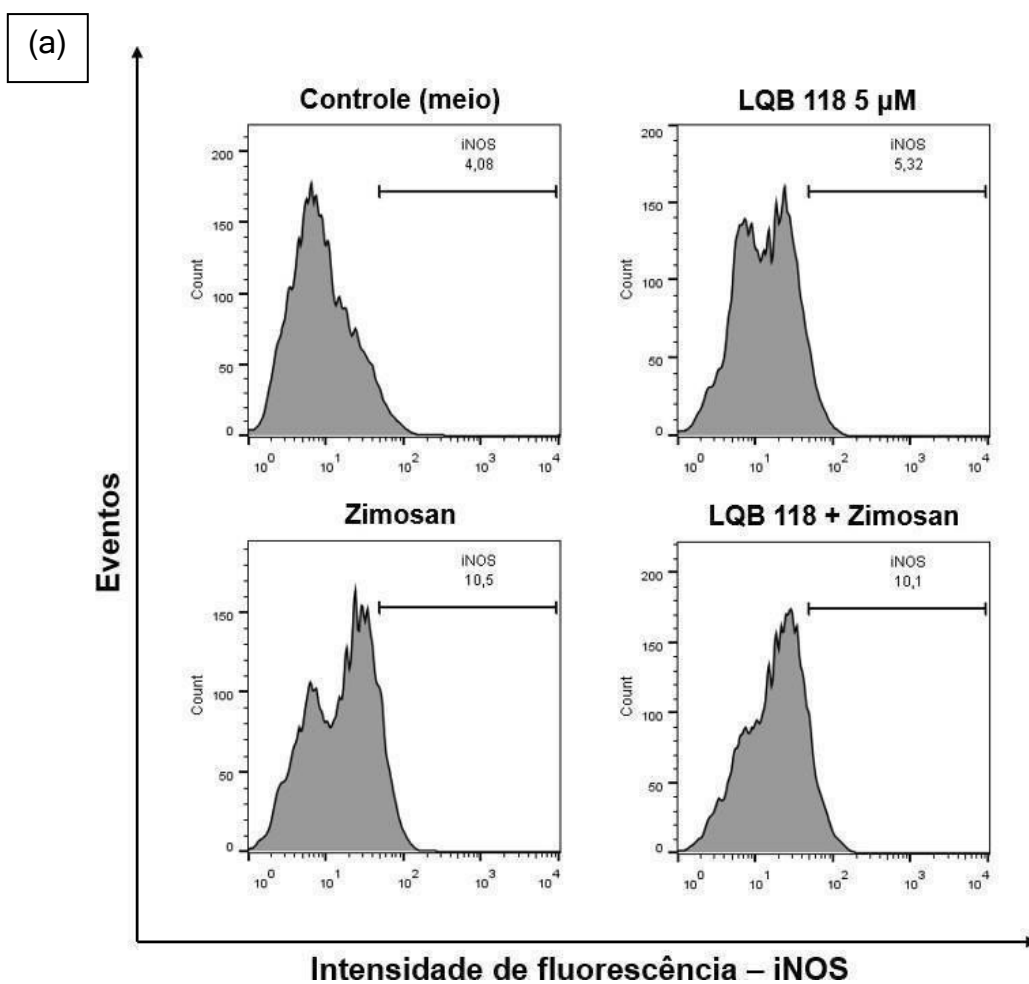


As células foram pré-tratadas overnight com a LQB 118 na concentração de 5 µM e expostas ao zimosan durante 40 min. A fagocitose do Red zimosan A foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando as partículas de zimosan fluorescentes. (a): ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey (n = 5) do percentual de fagocitose. (b): Histograma representativo das células marcadas com Red zimosan A. (c): ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey (n = 4) da fagocitose do Red zimosan. #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle e ao grupo LQB 118 5 µM. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.4 Níveis de expressão da enzima iNOS em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

O zimosan, como esperado, induziu aumento da expressão da enzima iNOS quando comparado ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 (5 µM) não alterou a expressão basal da enzima nos macrófagos peritoneais e em associação com o zimosan a LQB 118 não reduziu a expressão de iNOS, como pode ser observado no gráfico 4.

Gráfico 4: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão da iNOS



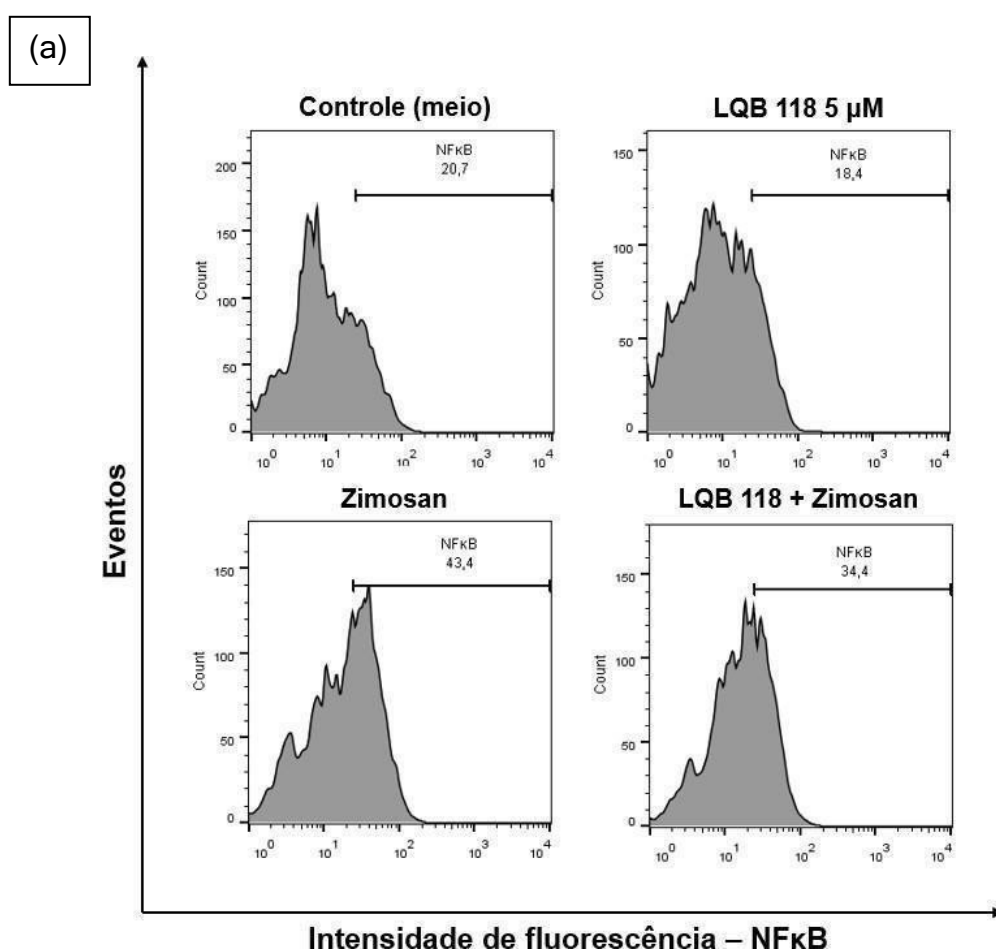
As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 µM, na ausência ou presença de zimosan por 24h. A expressão da iNOS foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-

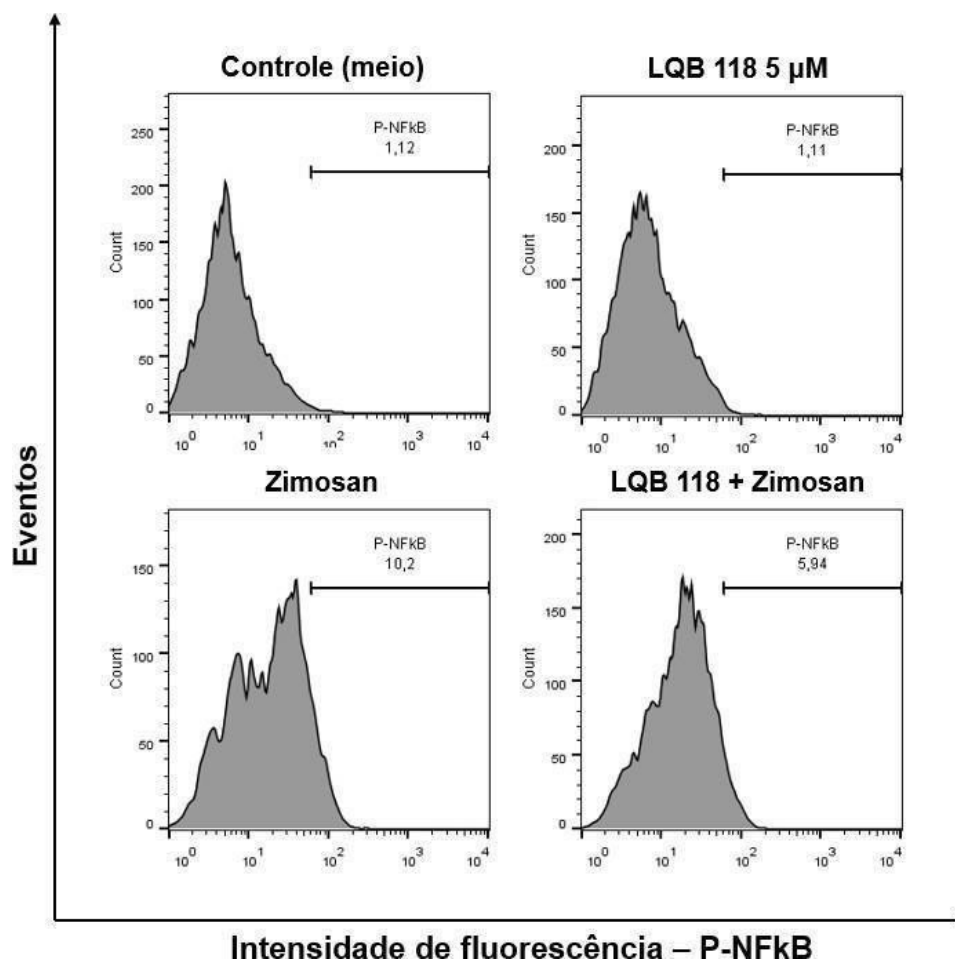
NOS2. (a): Histograma representativo das células marcadas com anti-NOS2. (b): ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey ($n = 4$). #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle e ao grupo LQB 118 5 μM . *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.5 Níveis de expressão de NF κ B e de P-NF κ B em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

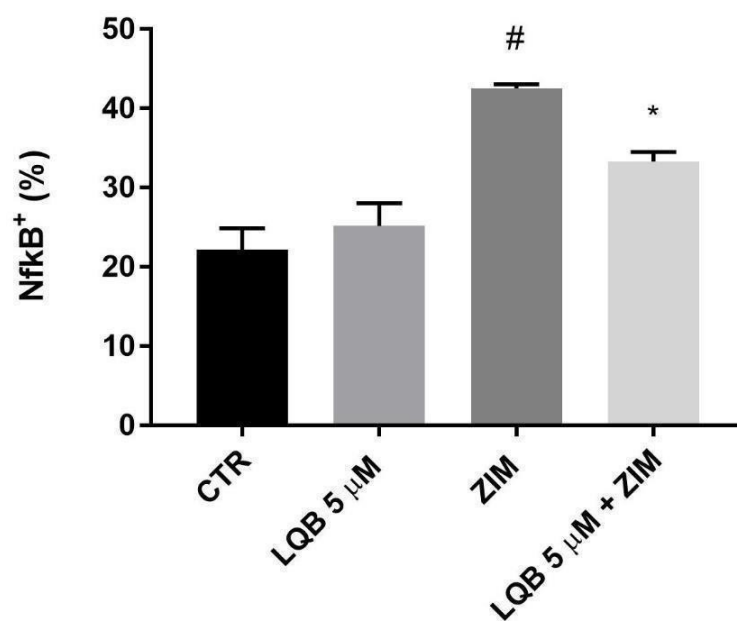
Conforme mostrado no gráfico 5, o grupo controle apresentou expressão basal de NF κ B e de P-NF κ B enquanto o zimosan induziu uma superexpressão dessas proteínas nos macrófagos peritoneais. Por outro lado, a LQB 118 (5 μM) reduziu a expressão do NF κ B (21,7%) e do P-NF κ B (59,4%) na presença do zimosan.

Gráfico 5: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de NF κ B e de P-NF κ B

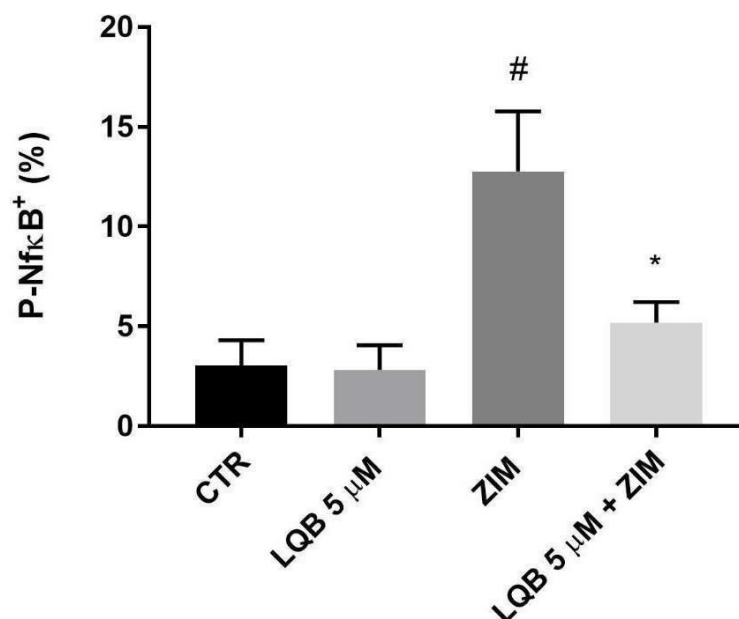




(b)



(c)



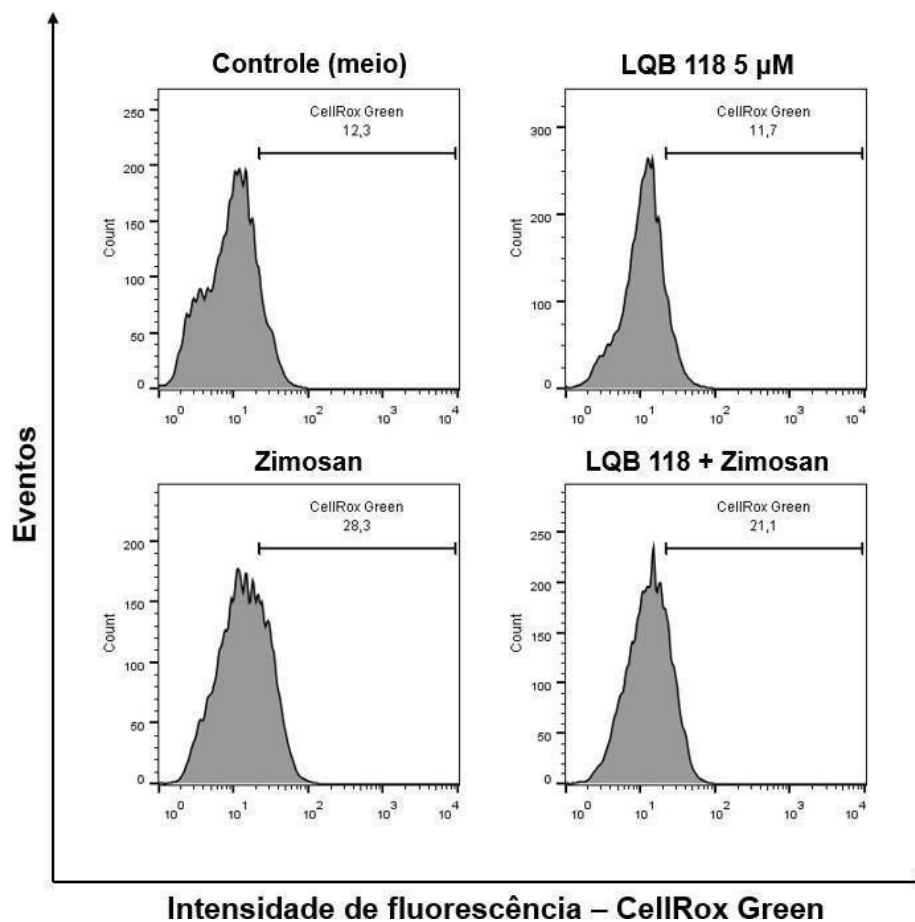
As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 μM, na ausência ou presença de zimosan por 24h. A expressão do NFκB e do P- NFκB foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti- NFκB e anti- P-NFκB. **(a)**: Histogramas representativos das células marcadas com anti- NFκB e anti- P- NFκB. **(b)** e **(c)**: ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey (n = 4). #(*p*<0,05) significativo em relação ao grupo controle e ao grupo LQB 118 5 μM. *(*p*<0,05) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.6 Níveis de ROS em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

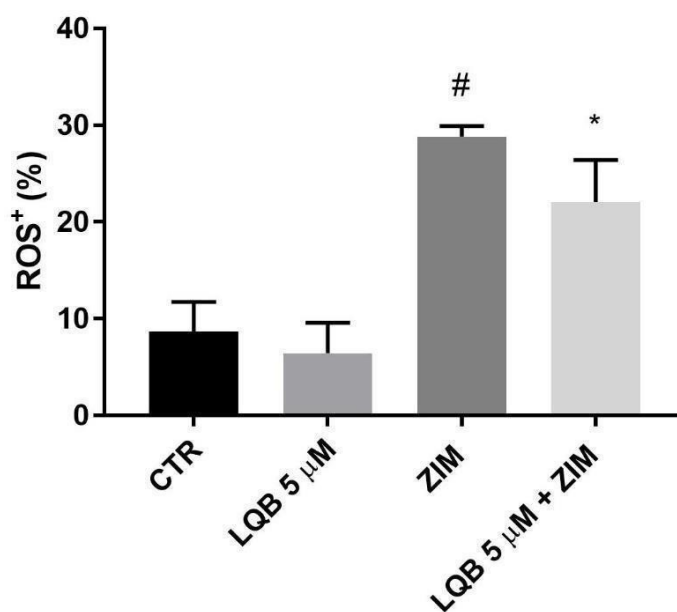
Como pode ser analisado no gráfico 6, o grupo controle apresentou níveis basais de expressão de ROS, enquanto o zimosan induziu um aumento de mais de 3 vezes dessas espécies reativas nos macrófagos peritoneais. O tratamento apenas com a LQB 118 (5 μM) não alterou os níveis basais de ROS. Por outro lado, a LQB 118 (5 μM), em associação com o zimosan, reduziu a expressão de ROS na presença do zimosan em torno de 23,4%.

Gráfico 6: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de ROS

(a)



(b)



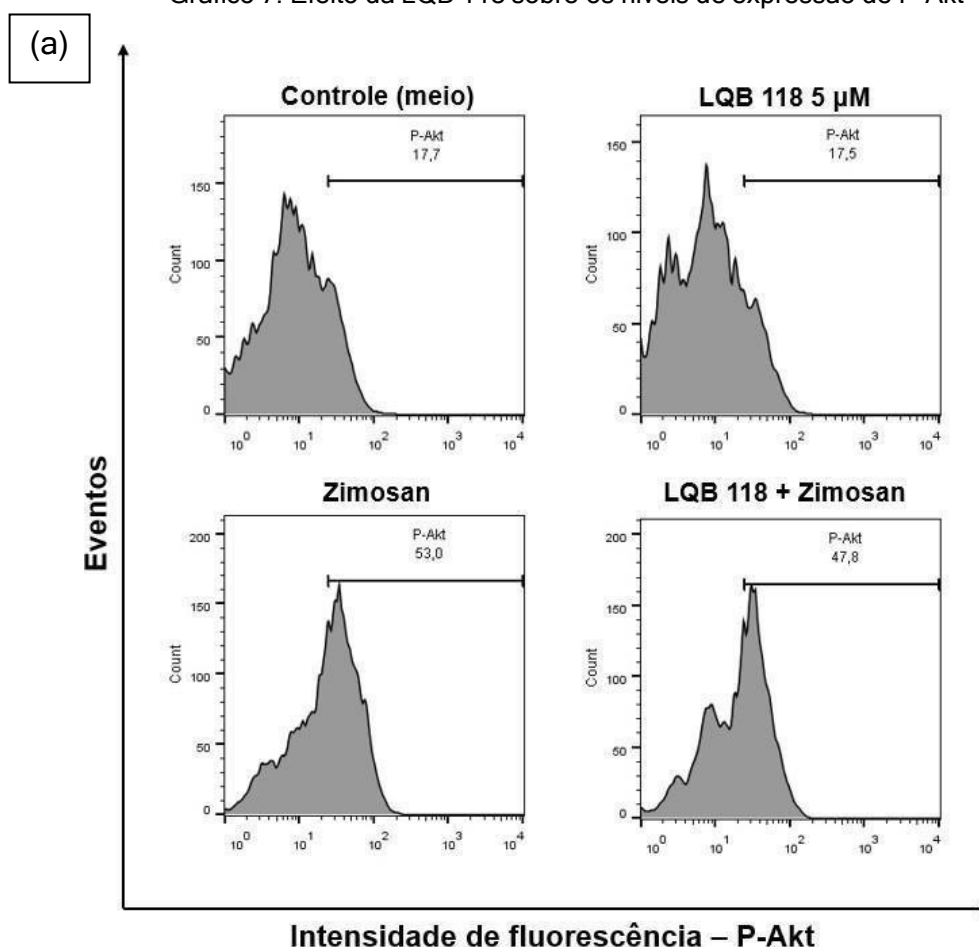
As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 µM overnight. Após isso, o zimosan foi

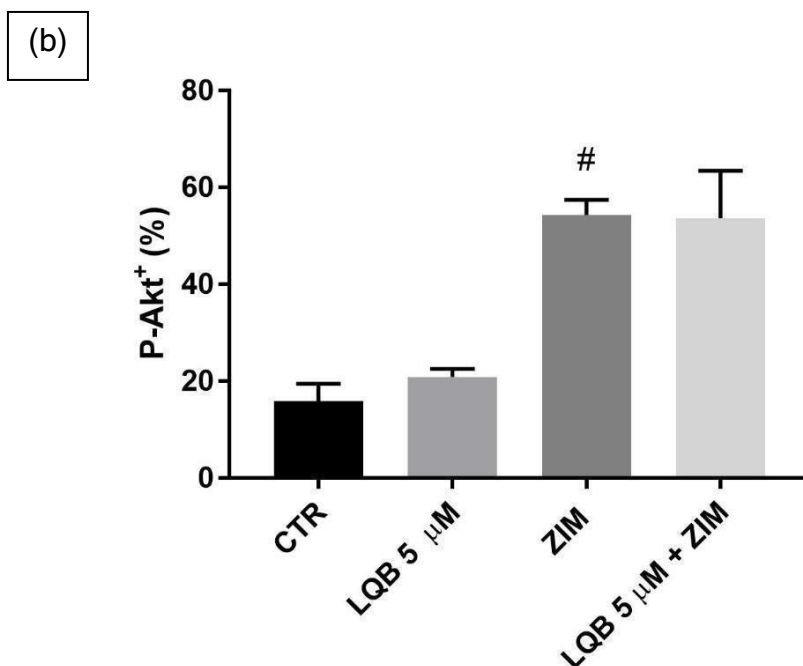
adicionado por 40 minutos. A expressão de ROS foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o reagente CellRox Green. **(a)**: Histogramas representativos das células marcadas com CellRox Green. **(b)**: ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey ($n = 5$). #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle e ao grupo LQB 118 5 μM . *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.7 Níveis de expressão de P-Akt em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

O zimosan induziu aumento de aproximadamente 3 vezes na expressão de Akt fosforilada quando comparado ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 (5 μM) não alterou a fosforilação basal dessa quinase nos macrófagos peritoneais e em associação com o zimosan, a LQB 118 não interferiu na fosforilação de Akt, como pode ser observado no gráfico 7.

Gráfico 7: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de P-Akt





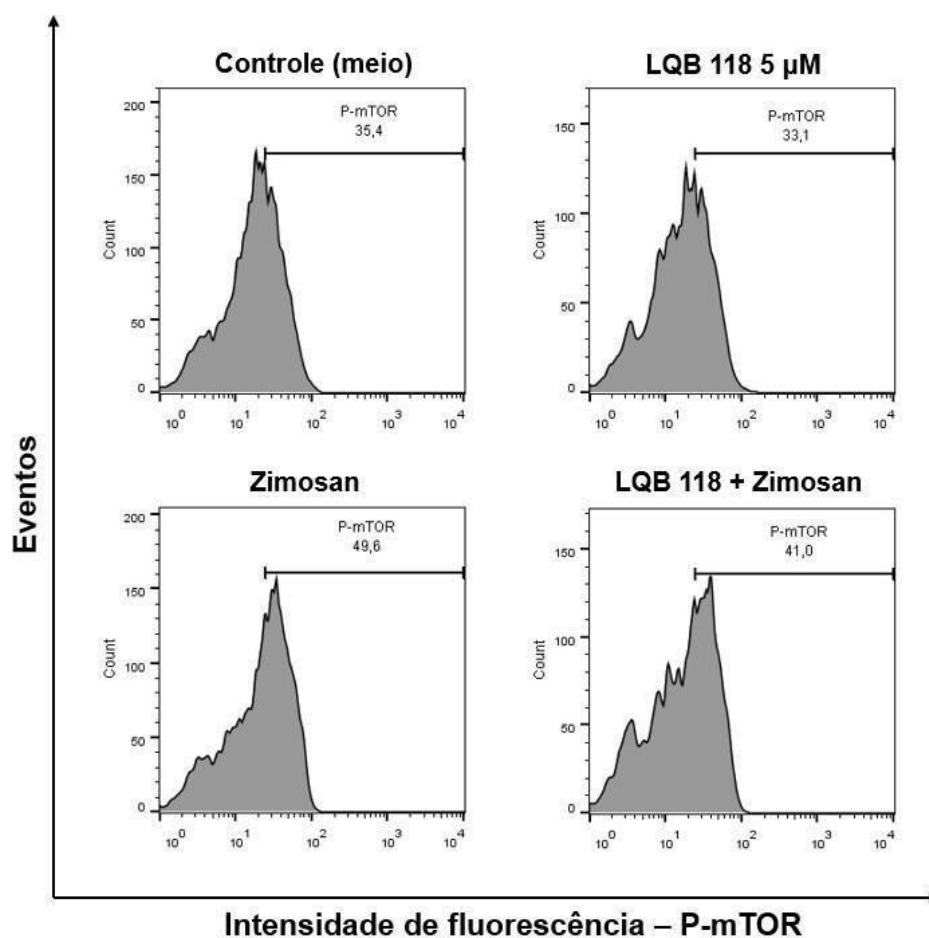
As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 µM, na ausência ou presença de zimosan por 24h. A expressão de P-Akt foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti- P-Akt. **(a)**: Histogramas representativos das células marcadas com anti-P-Akt. **(b)**: ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey (n = 4). [#](p<0,05) significativo em relação ao grupo controle e ao grupo LQB 118 5 µM. * (p<0,05) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.1.8 Níveis de expressão de P-mTOR em macrófagos peritoneais estimulados por zimosan

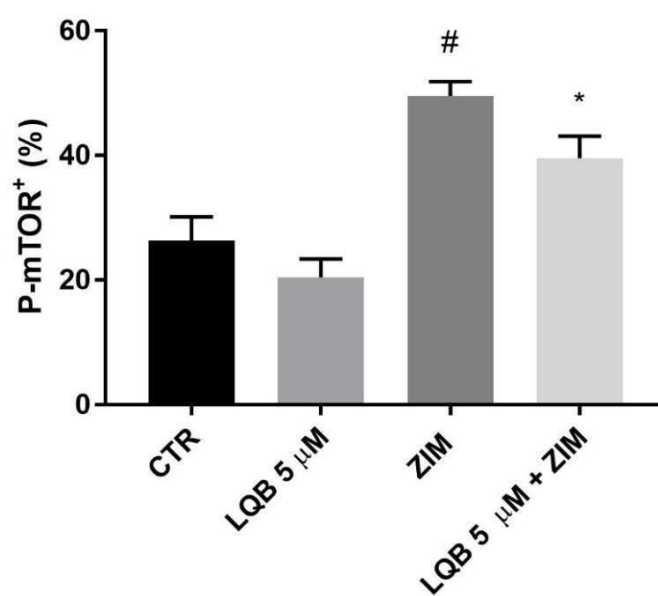
Como pode ser analisado no gráfico 8, o zimosan induziu aumento de quase 2 vezes na expressão de mTOR fosforilada quando comparado ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 (5 µM) não alterou a fosforilação basal dessa quinase nos macrófagos peritoneais, já em associação com o zimosan, a LQB 118 reduziu a fosforilação de mTOR em 20,2%.

Gráfico 8: Efeito da LQB 118 sobre os níveis de expressão de P-mTOR

(a)



(b)



As células foram tratadas com a LQB 118 na concentração de 5 μ M, na ausência ou presença de

zimosan por 24h. A expressão de P-mTOR foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-P-mTOR. **(a):** Histogramas representativos das células marcadas com anti-P-mTOR. **(b):** ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey ($n = 4$). #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo controle e ao grupo LQB 118 5 μ M. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.2 Avaliação do efeito anti-inflamatório da LQB 118 *in vivo*

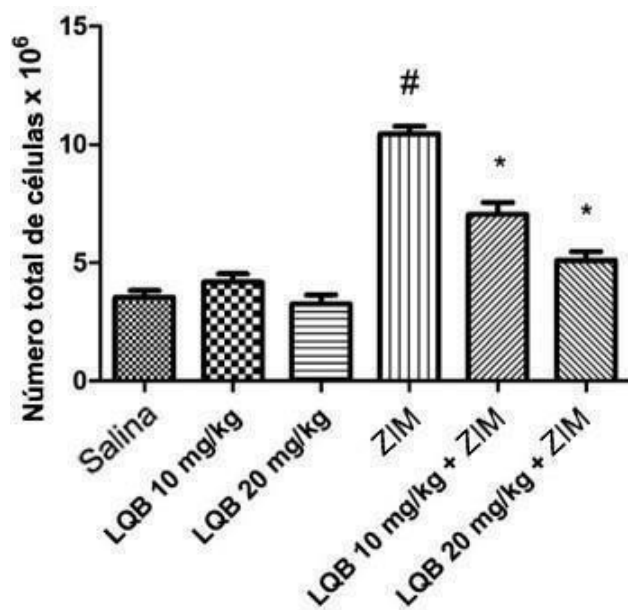
5.2.1 Efeito da LQB 118 na migração de células para o peritônio

Os animais desafiados com zimosan (grupo zimosan) apresentaram aumento na migração de células para o peritônio em relação aos animais que receberam apenas o veículo (grupo salina), demonstrando a funcionalidade do modelo experimental. Essa migração foi reduzida com o pré-tratamento dos animais com a LQB 118 nas doses de 10 mg/kg (redução de 32,6%) e 20 mg/kg (redução de 51,1%), como pode ser visto no gráfico 9a. Além disso, os animais apenas pré-tratados com a LQB 118 e com o solvente (DMSO) não apresentaram diferenças no número de leucócitos totais em comparação ao grupo salina (dados do DMSO não mostrados).

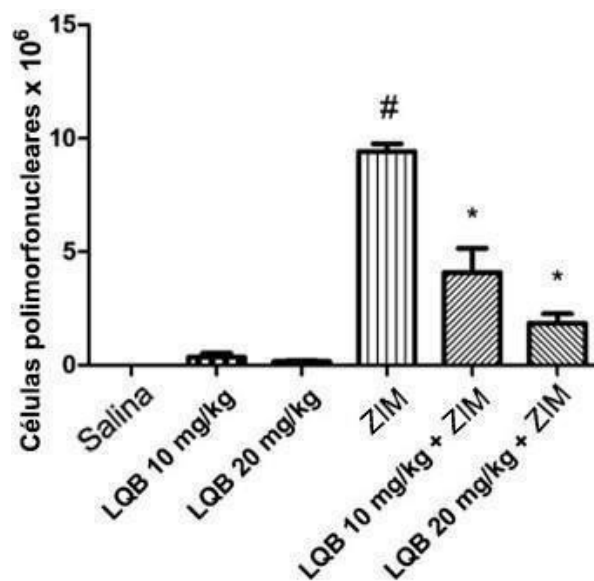
Em relação à análise das células diferenciais, nos animais desafiados com o zimosan, após quatro horas de estímulo as células polimorfonucleares predominaram no exsudato peritoneal com 99% em relação aos animais do grupo salina. O pré-tratamento com a LQB 118 nas doses de 10 mg/kg ou 20 mg/kg reduziu em 56,7% ou 80,4%, respectivamente, a migração dos polimorfonucleares para o peritônio em relação ao grupo zimosan (gráfico 9b). Já em relação às células mononucleares, observou-se que os animais desafiados com o zimosan apresentaram uma redução no número dessas células em relação ao grupo salina, o que é esperado nesse modelo experimental. Adicionalmente, os animais que foram pré-tratados com a LQB 118 e subsequentemente desafiados com o zimosan não apresentaram alteração quanto ao número de mononucleares quando comparados com o grupo salina (gráfico 9c).

Gráfico 9: Efeito da LQB 118 na migração de leucócitos totais e diferenciais para o peritônio

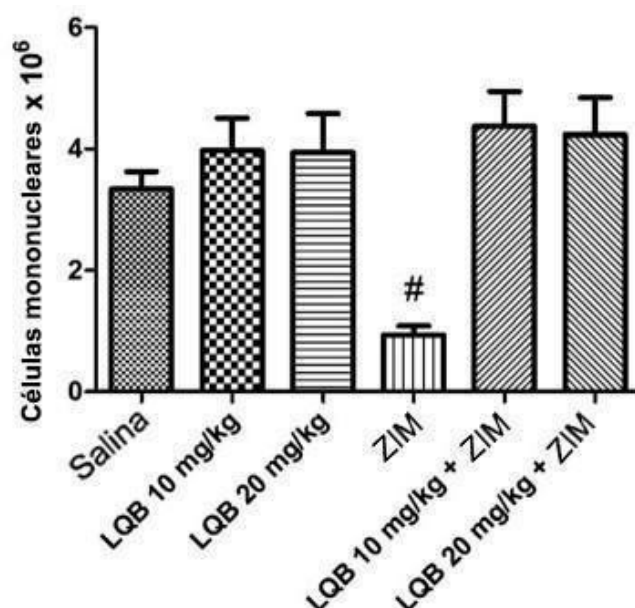
(a)



(b)



(c)



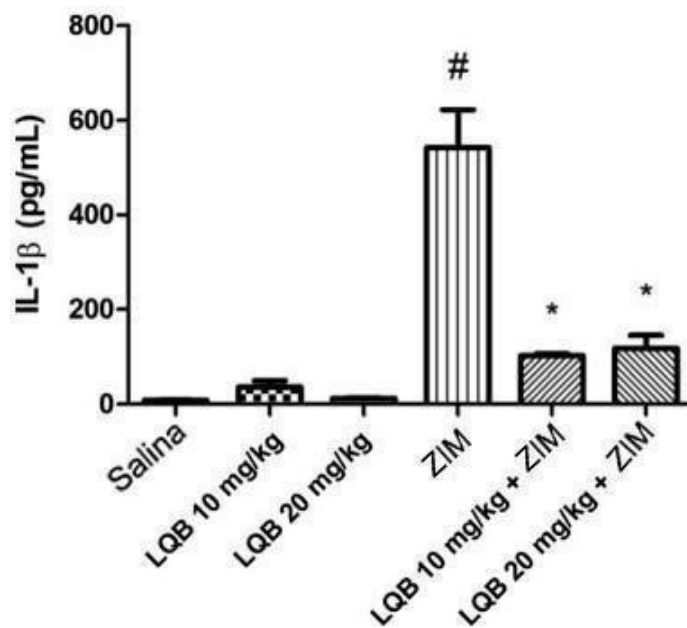
Camundongos Swiss foram pré-tratados com diferentes doses de LQB 118 ou salina. Uma hora após, os animais foram estimulados com zimosan (i.p.) na concentração de 2 mg/mL. Quatro horas após o desafio com zimosan, o exsudato peritoneal foi coletado e o número de leucócitos totais e diferenciais foi avaliado. **(a)**. Número de leucócitos totais. **(b)**. Número de leucócitos polimorfonucleares. **(c)**. Número de leucócitos mononucleares. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m de dois experimentos com $n=5$, e foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. #($p<0,05$) significativo em relação ao grupo salina e aos grupos LQB 118 10 e 20 mg/kg. *($p<0,05$) significativo em relação ao grupo zimosan. ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

5.2.2 Efeito da LQB 118 nos níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 no peritônio

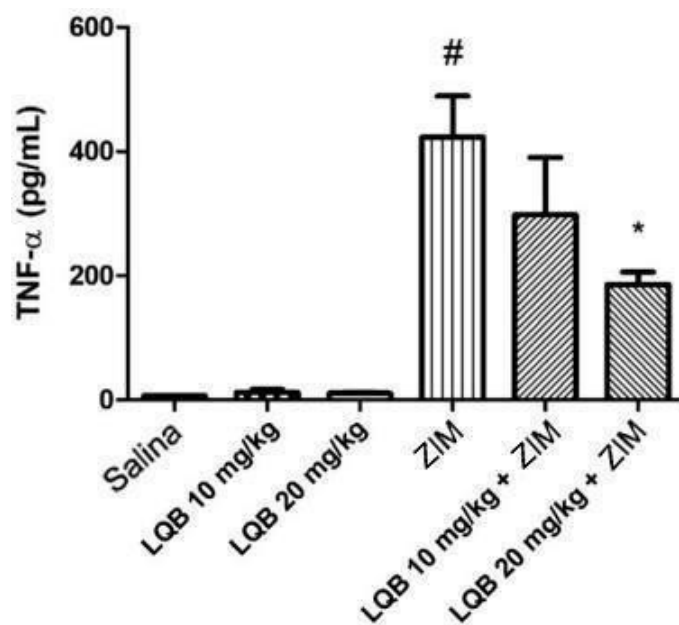
Os animais do grupo zimosan apresentaram aumento significativo das quatro citocinas avaliadas (gráfico 10) em relação ao grupo controle, como esperado e descrito na literatura (CARVALHO et al., 2019; FRANÇA et al., 2021). O pré- tratamento com a LQB 118 em animais desafiados com o zimosan reduziu os níveis de IL-1 β (81,1% ou 78,3% para as doses de 10 mg/kg ou 20 mg/kg, respectivamente). Além disso, a dose de 20 mg/kg reduziu em 56,2% os níveis de TNF- α e em 71,6% os níveis de IL-10. Em contrapartida, os níveis de IL-6 não foram alterados pelo pré- tratamento com nenhuma das duas doses avaliadas.

Gráfico 10: Efeito da LQB 118 nos níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias

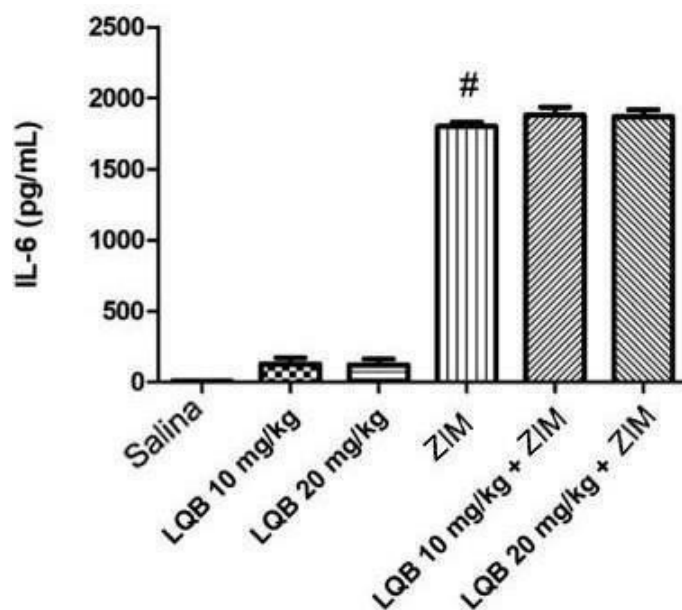
(a)



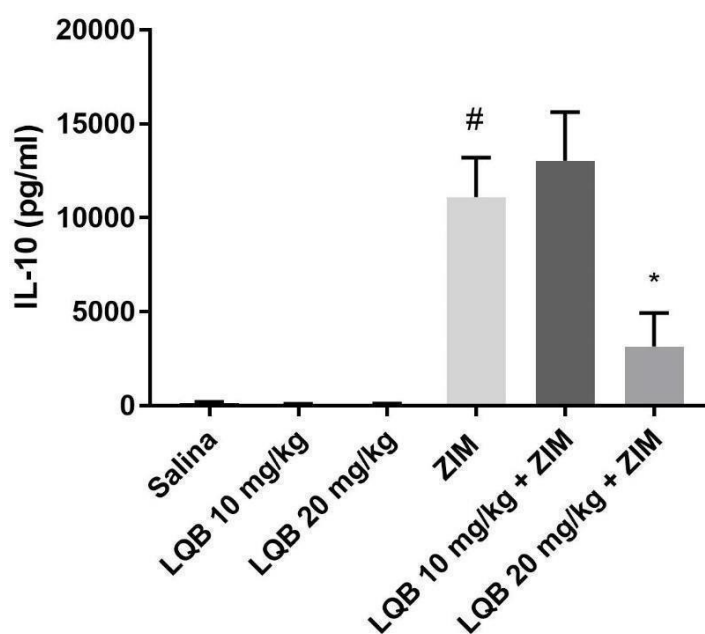
(b)



(c)



(d)

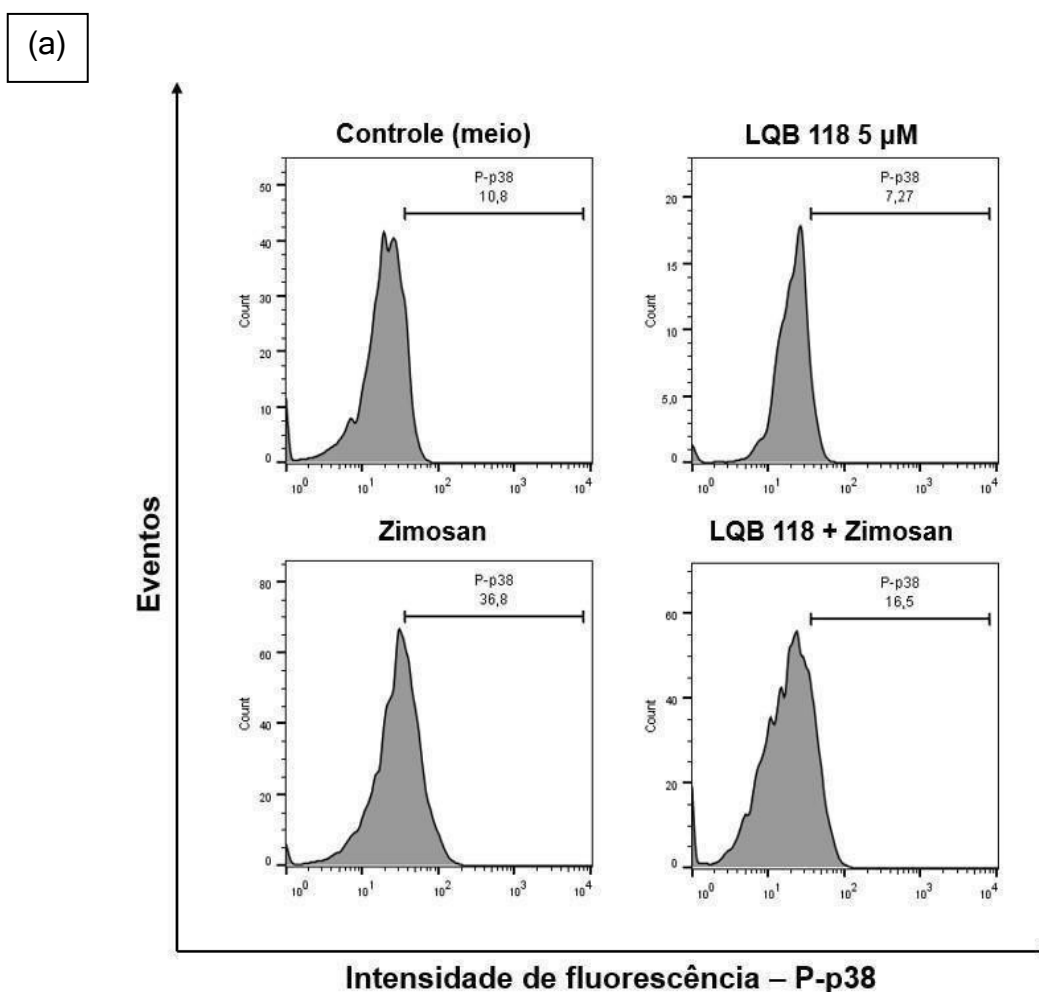


Camundongos Swiss foram pré-tratados com diferentes doses de LQB 118 ou salina. Uma hora após, os animais foram estimulados com zimosan (i.p.) na concentração de 2 mg/mL. Quatro horas após o desafio com zimosan, o exsudato peritoneal foi coletado e centrifugado. Os níveis das citocinas foram quantificados a partir do sobrenadante do exsudato pelo ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche). (a). IL-1 β . (b.) TNF- α . (c). IL-6. (d). IL-10. Os dados numéricos foram apresentados em média $\pm$ e.p.m. de um experimento com n=4, e foi feito a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido de pós-teste de Tukey. [#]($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo salina e aos grupos LQB 118 10 e 20 mg/kg. ^{*}($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo zimosan. ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

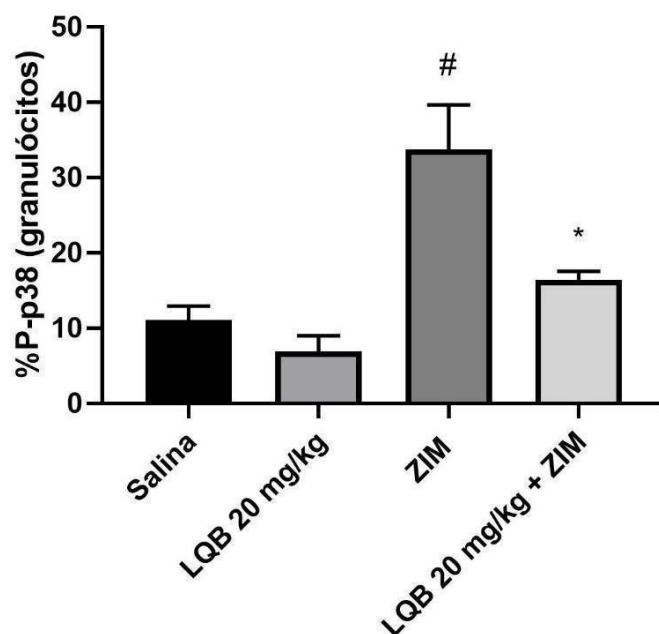
5.2.3 Efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação da MAPK p38

O zimosan induziu aumento de duas vezes na fosforilação da p38 nos granulócitos, quando em comparação ao grupo controle. O tratamento apenas com a LQB 118 (20 mg/kg – dose escolhida para análise do mecanismo de ação por apresentar melhores resultados nos níveis das citocinas e migração de células) manteve a fosforilação basal dessa MAPK. Já em associação com o zimosan, o tratamento com a molécula foi capaz de reduzir a fosforilação da p38 em 51,6% quando comparado ao grupo zimosan (gráfico 11).

Gráfico 11: Efeito da LQB 118 nos níveis de fosforilação da MAPK p38



(b)



Os animais foram pré-tratados com a dose de 20 mg/kg da LQB 118 e 1 h depois estimulados com o zimosan. A expressão da P-p38 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti- P- p38. **(a)**: Histograma representativo das células marcadas com anti-P-p38. **(b)**: ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey ($n = 4$). . #($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo salina. *($p < 0,05$) significativo em relação ao grupo ZIM. CTR=Controle; ZIM=Zimosan; LQB=LQB 118.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, utilizamos como modelo experimental a cultura de macrófagos peritoneais murinos estimulados por zimosan, que constitui um modelo utilizado há mais de 50 anos para a avaliação *in vitro* da ação imunomoduladora e anti-inflamatória de novas drogas. Além disso, também foi utilizado o modelo de peritonite induzida por zimosan, o qual se caracteriza pelo aumento da permeabilidade vascular e produção de mediadores que levam ao acúmulo de leucócitos no peritônio (KOLACZKOWSKA et al., 2008).

Inicialmente, a fim de dar continuidade à investigação do efeito anti-inflamatório da LQB 118 *in vitro*, em macrófagos peritoneais de camundongos, avaliamos se essa molécula é capaz de interferir nos níveis das citocinas IL-12 e IL-10. A IL-12 é uma citocina produzida por células fagocíticas, incluindo os macrófagos, capaz de ativar células NK a produzir IFN- γ , o qual age sobre os macrófagos os ativando e aumentando sua capacidade fagocítica e microbicida (MASUDA et al., 2010). Já a IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória, por suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, de moléculas relacionadas com a ativação de linfócitos, apresentação de antígenos (MOORE et al., 2001), ativação de polimorfonucleares, a produção de ROS, de moléculas de adesão e COX-2 (HUET et al., 2013; MARTIRE-GRECO et al., 2013).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com a LQB 118 é capaz de diminuir os níveis de IL-12, sem alterar os níveis de IL-10. Vale ressaltar que essa diminuição é independente de morte celular, visto que já foi previamente demonstrado que as concentrações utilizadas nesse trabalho não possuem efeito tóxico para os macrófagos peritoneais (LIMA et al., 2020). Esses resultados estão em desacordo com Souza (2011), que demonstrou um decréscimo nos níveis de IL-10 mediante tratamento com a LQB 118 em macrófagos peritoneais infectados por *Leishmania braziliensis*. Além disso, Oliveira e colaboradores (2010) observaram uma redução nos níveis de IL-10 em macrófagos THP-1 quando estimulados com um agonista de TLR2 mediante o tratamento com o lapacol, uma naftoquinona. No entanto, resultado diferente foi obtido em linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS, onde o tratamento com os pterocarpanos cristacarpina e gliceolinas I, II e III promovem o aumento da citocina anti-inflamatória IL-10 (HWANG et al., 2022; YOON et al., 2012). Também foi observado

por Souza (2011) que os níveis de IL-12 aumentaram com o tratamento com a LQB 118 nos macrófagos peritoneais infectados por *L. braziliensis*, o que pode ser um evento chave na eliminação desse parasita. Adicionalmente, há vários relatos que demonstram a capacidade dessa molécula em reduzir os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α *in vitro* (CHAE et al., 2016; LEE et al., 2015; LIMA et al., 2020; NETTO et al., 2010; PINHO et al., 2011; RIÇA et al., 2016).

Além das citocinas, o NO é outro importante mediador inflamatório produzido por macrófagos sob estímulo do zimosan (LI et al., 2022). Esse mediador possui vários efeitos biológicos e nos macrófagos atua aumentando sua atividade citotóxica (CHAKRAVORTTY; HENSEL, 2003), mas por se tratar de um gás, se difunde livremente pelas membranas biológicas e pode ter efeitos deletérios no organismo quando produzido em grandes quantidades, causando dano tecidual (GUZIK, 2003). Nesse trabalho, constatou-se que o tratamento de macrófagos peritoneais estimulados pelo zimosan com a LQB 118 reduziu os níveis de NO. Esses resultados corroboram os obtidos por Yoon e colaboradores (2012), que demonstraram que o tratamento com as gliceolinas I, II e III em RAW 264.7 é capaz de reduzir a produção de NO estimulada por LPS. Chae e colaboradores (2016) e Hwang e colaboradores (2022) também demonstraram o efeito de pterocarpanos, o maackia pterocarpano B e a cristacarpina, em reduzir os níveis desse mediador utilizando o mesmo modelo experimental. Além disso, os pterocarpanos sophotokin, maackiain e medicarpin reduzem os níveis de NO produzidos por linhagem de células de microglia BV-2 estimuladas por LPS (XIA et al., 2019). Adicionalmente, o tratamento de macrófagos infectados por *L. braziliensis* com LQB 118 também é capaz de reduzir os níveis de NO produzidos por essas células (SOUZA, 2011).

O NO é produzido a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina a partir da ação da enzima NOS, que possui três isoformas, sendo a responsável pela produção de NO nos processos inflamatórios a iNOS (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; STUEHR; HAQUE, 2019). Corroborando a literatura e como demonstrado nesse trabalho, o agonismo de TLR2 por zimosan resulta em um aumento da iNOS. O tratamento com a LQB 118 não reduziu a expressão dessa enzima nos macrófagos peritoneais. De forma contrária, o tratamento com maackia pterocarpano B, cristacarpina e gliceolinas I, II e III reduz a expressão de iNOS em macrófagos RAW

264.7 estimulados por LPS (CHAE et al., 2016; HWANG et al., 2022; YOON, 2012). Além disso, outros pterocarpanos como os sophotokin, maackiain e medicarpin reduzem os níveis de iNOS em linhagem de células de microglia BV-2 estimuladas por LPS (XIA et al., 2019). Em macrófagos THP-1 resultados semelhantes são observados mediante o tratamento com a naftoquinona lapacol (OLIVEIRA et al., 2010). O fato de a LQB 118 não reduzir a expressão da iNOS nos macrófagos pode indicar que essa molécula age em outros alvos para promover a redução da produção do NO, ou ainda, interfere em eventos pós traducionais, a exemplo da fosforilação de iNOS pela quinase Src, desestabilizando e diminuindo a meia vida da enzima (TYRYSHKIN et al., 2009).

A partir dos resultados obtidos e tendo em vista que a IL-12 e o NO estão diretamente envolvidos com a fagocitose dos macrófagos, o próximo passo foi avaliar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais frente às partículas de zimosan. A concentração de 5 μ M foi selecionada para dar continuidade aos experimentos, visto que essa foi a única a interferir nos níveis de NO e apresentou maior redução nos níveis de IL-12. Nossos resultados demonstraram que o pré- tratamento dos macrófagos com a LQB 118 foi capaz de reduzir a capacidade fagocítica dos macrófagos às partículas de zimosan utilizando tanto a metodologia de observação ao microscópio óptico como a citometria de fluxo. Esse é o primeiro relato de ação da LQB 118 na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e indica que essa molécula é capaz de interferir nas atividades efetoras dessas células.

A ativação de células imunes pelo zimosan através de receptores de reconhecimento de padrão aumenta a formação de ROS intracelular (DAHLGREN et al., 1999). ROS causam danos celulares e necrose através de vários mecanismos, como desnaturação de proteínas e danos ao DNA (CUZZOCREA et al., 2002), apesar de serem mediadores chave na destruição de patógenos durante a fagocitose (MOGHADAM; HENNEKE; KOLTER, 2021). Avaliamos o efeito da LQB 118 nos níveis de ROS e observou-se que essa molécula reduz os níveis de ROS nos macrófagos peritoneais estimulados por zimosan. Em acordo com nossos resultados, o tratamento com o pterocarpano maackiain em células RAW 264.7 estimuladas por LPS reduz os níveis de ROS (BAI et al., 2022). Martino e colaboradores (2018), de forma contrária, observaram um aumento na produção de ROS em células de câncer de próstata

mediante o tratamento com a LQB 118, o que pode ser benéfico nesse caso, pois altos níveis de ROS podem induzir à apoptose (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Adicionalmente, o tratamento com a molécula induziu a produção de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* (RIBEIRO et al., 2013).

Para que a fagocitose ocorra são necessárias modificações no citoesqueleto dos macrófagos. O citoesqueleto é constituído por actina, microfilamentos e filamentos intermediários, com a actina desempenhando um papel central nesse processo (LEMIEUX et al., 2014). A via de sinalização PI3k-mTOR tem sido descrita como uma das envolvidas no rearranjo do citoesqueleto de macrófagos (FREEMAN et al., 2014; BAO et al., 2015). A quinase Akt, por sua vez, está a montante de PI3k e a jusante de mTOR, nesse sentido, resolve-se avaliar se a LQB 118 interfere na fosforilação de Akt e de mTOR.

Observou-se que o tratamento com a molécula não alterou os níveis de fosforilação de Akt, mas reduziu a fosforilação de mTOR. Ressalta-se que não existem dados na literatura que demonstrem o efeito da LQB 118 na fosforilação de Akt e mTOR em outras células imunológicas. No entanto, em linhagem de células leucêmicas K562 e K562-Lucena, já foi demonstrado que o tratamento com a molécula aumentou a fosforilação de Akt (DE FARIA et al., 2015). Esses diferentes efeitos podem ocorrer em função dos diferentes tipos de células, protocolo experimental ou ainda pela presença de estímulo inflamatório. Já diminuição da fosforilação de mTOR pode indicar que há uma redução na ativação direta da PI3k tipo I sobre o complexo mTOR 2 (mTORC2) (GAN et al., 2020), o que pode levar à regulação negativa de RhoA (membro A da família homóloga de Ras), uma proteína de baixo peso molecular presente a jusante de mTOR que afeta as funções fagocíticas das células, regulando a montagem dos filamentos de actina e miosina, diminuindo a capacidade dos macrófagos em fagocitar (JHANWAR-UNIYAL et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que a inibição de mTOR leva a diminuição da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por macrófagos (XIE et al., 2014), corroborando os resultados de diminuição das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α previamente relatados pelo nosso grupo (LIMA et al., 2020) e também da IL-12 observada nesse trabalho.

O zimosan ao se ligar ao TLR2 inicia uma cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores

de transcrição, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (KAWASAKI; KAWAI, 2014; TAKEDA; AKIRA, 2005). O NFkB, uma vez fosforilado, se liga a regiões específicas do genoma e induz a expressão de genes de vários mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, moléculas de adesão, dentre outros (TAKADA, 2009).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos macrófagos peritoneais com a LQB 118 reduziu os níveis totais assim como a fosforilação do NFkB. Esses resultados corroboram os de Riça e colaboradores (2016), que demonstraram uma redução na fosforilação desse fator de transcrição em modelo de lesão pulmonar induzida por LPS mediante o tratamento com a LQB 118. Em linhagem de células de leucemia mieloide aguda e crônica, o tratamento com a molécula reduziu a ativação do NFkB (FARIA et al., 2015; REIS et al., 2013). Além disso, vários pterocarpanos, como cristacarpina, maackiain, sophotokin, maackia pterocarpano B e as gliceolinas I, II e III também apresentam a capacidade de reduzir os níveis de ativação do NFkB em diferentes modelos experimentais (CHAE et al., 2016; GUO et al., 2020; HWANG et al., 2022; XIA et al., 2019; YOON et al., 2012). Essa habilidade em reduzir os níveis de ativação/fosforilação do NFkB pode estar relacionada com a porção pterocarpano da LQB 118.

A diminuição da fosforilação do NFkB pode estar diretamente relacionada com a redução da IL-12, uma vez que a ativação do TLR2 pelo zimosan de levedura leva à produção dessa citocina (GORIELY et al., 2008; QI; DENNING; SOONG et al., 2003). Além disso, o NO e ROS também podem ser produzidos via ativação do NFkB (ARIAS-SALVATIERRA et al., 2010) e esses mediadores estão diretamente relacionados com a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais, que também foi diminuída pelo tratamento com a LQB 118.

Considerando os resultados obtidos até agora, que demonstram que a LQB 118 interfere em vários aspectos do processo inflamatório agudo *in vitro*, decidiu-se avaliar os efeitos da LQB 118 no processo inflamatório agudo *in vivo*, utilizando o modelo de peritonite induzida por zimosan. Esse modelo foi primeiramente descrito por Doherty em 1985 e desde então vem sendo utilizado para testar compostos anti-inflamatórios e entender seus mecanismos de ação (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

O zimosan, quando administrado intraperitonealmente em camundongos, induz um processo inflamatório com extravasamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, detectáveis após duas horas e com pico máximo após quatro horas de estímulo (CASH; WHITE; GREAVES, 2009).

No modelo de peritonite induzida por zimosan, o pré-tratamento com a LQB 118 nas doses de 10 mg/kg ou 20 mg/kg foi capaz de reduzir a migração de leucócitos, especialmente de neutrófilos, para o peritônio. Esses dados corroboram com os resultados observados por Riça e colaboradores (2016), onde o pré-tratamento com diferentes doses da LQB 118 reduziu a migração de neutrófilos para o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) em modelo de inflamação pulmonar induzida por LPS. Também foi observado nesse mesmo trabalho que os níveis de KC (CXCL-1), uma quimiocina quimioatraente de neutrófilos, são reduzidos mediante o tratamento com a LQB 118, o qual pode ser o mecanismo associado ao efeito dessa molécula em reduzir a migração neutrofílica. Além disso, a naftoquinona β -lapachona inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina para o peritônio (SITÔNIO et al., 2013).

A injeção de zimosan é responsável por causar uma redução inicial no número de macrófagos peritoneais, um fenômeno descrito como reação de desaparecimento dos macrófagos (RDM), causado, possivelmente, devido à ativação dessas células e consequente aumento de sua aderência nas camadas internas do peritônio (AJUEBOR, 1998). A reação de desaparecimento dos macrófagos é um fenômeno já descrito pela literatura, sendo observado também após 24 h de estímulo i.p. com ovalbumina (KOOL et al., 2008) e após 12 h de estímulo i.p. com amido. Nelson (1963) demonstrou que a RDM poderia ser revertida utilizando-se heparina, a qual possui ação anticoagulante e antiadesiva (WOODS et al., 1986). Além disso, o bloqueio da ativação de integrinas também reverte parcialmente a RDM e exame físico da cavidade peritoneal revelou a presença de agregados de tamanhos milimétricos dentro dessa cavidade de 3-5h após a administração i.p. do zimosan. Esses agregados apresentavam fibrina, indicando se tratar de coágulos, que apresentavam macrófagos e poucas células B peritoneais, além de alguns neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o peritônio após a injeção do zimosan, indicando que os coágulos são um local proeminente para o desaparecimento dos macrófagos em resposta aos estímulos inflamatórios. Dessa

forma, fatores de coagulação, como o fator V, estão diretamente relacionados com a RDM (ZHANG et al., 2019).

A RDM foi observada em nosso resultado, onde os animais do grupo zimosan apresentaram uma redução no número de células mononucleares presentes no exsudato peritoneal e o pré-tratamento com a LQB 118 nos animais estimulados foi capaz de reverter esse processo, o que sugere a habilidade dessa molécula em interferir na dinâmica de ativação de integrinas e fatores de coagulação.

No modelo de peritonite induzida por zimosan, citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α participam do recrutamento de neutrófilos e manutenção da inflamação (KOLACZKOWSKA; SELJELID; PLYTYCZ, 2001; KOLACZKOWSKA et al., 2010). Quanto aos níveis de citocinas presentes no lavado peritoneal, observou-se que o tratamento com 10 mg/kg da LQB 118 reduziu os níveis de IL-1 β , enquanto a dose de 20 mg/kg reduziu tanto os níveis de IL-1 β quanto os níveis de TNF- α e IL-10. No entanto, os níveis de IL-6 não foram alterados mediante tratamento com a molécula em nenhuma das doses avaliadas. Esses resultados estão de acordo com resultados anteriores do nosso grupo, que demonstrou que o tratamento de macrófagos peritoneais com a LQB 118 em diferentes concentrações na presença do zimosan é capaz de reduzir os níveis de IL-1 β e TNF- α . Riça e colaboradores (2016) também demonstraram que o pré-tratamento com a LQB 118 reduz os níveis TNF- α no BALF após desafio com LPS. Em modelo experimental de sepse em camundongos foi observado que o tratamento com o maackiain pterocarpano B foi capaz de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α (BAI et al., 2022). Ademais, a naftoquinona 6-metóxi-7-hidróxi- α -dunniona administrada sistemicamente diminui os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e, em oposição aos nossos resultados, IL-6, em modelo de febre induzida por LPS (LOMBA et al., 2017). De forma semelhante, a 1,4-naftoquinona ou o tratamento com β -lapachona diminui os níveis de TNF- α e IL-6 produzidos na inflamação peritoneal induzida por LPS e na peritonite induzida por carragenina (KOBAYASHI et al., 2011; SITÔNIO et al., 2013).

Uma vez que foram obtidos melhores resultados na redução da migração dos leucócitos e níveis das citocinas com a dose de 20 mg/kg, esta foi utilizada para a análise do mecanismo de ação envolvido no efeito anti-inflamatório da LQB 118 *in vivo*.

O receptor TLR2 ao ser ativado por ligante inicia uma cascata de sinalização intracelular recrutando a proteína adaptadora MyD88, que sinaliza para outras proteínas intracelulares e induz fosforilação com consequente ativação de MAPKs, como a p38 (ADEREM; ULEVITCH, 2000; TAKEDA; AKIRA, 2005). A sinalização da p38 regula a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, das enzimas COX-2 e iNOS, assim como a expressão de moléculas de superfície, a exemplo do CD69 (LOMBA et al., 2001; TURPEINEN et al., 2010; LI et al., 2011). Nossos resultados demonstraram que o tratamento dos animais com a LQB 118 foi capaz de reduzir os níveis de expressão da P-p38. Esse resultado corrobora os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo, onde o tratamento dos macrófagos peritoneais com a substância reduziu os níveis de fosforilação dessa MAPK. Em linhagem de células de glioblastoma, o tratamento com a LQB 118 também foi capaz de reduzir os níveis de expressão da P-p38 assim como da P-ERK1/2 (BERNARDO et al., 2020). Além disso, o tratamento de células BV-2 estimuladas por LPS com a LQB 118 reduziu os níveis de expressão das três mapk: P-p38, P-ERK1/2 e P-JNK (XIA et al., 2019). Em oposição, recentemente, Hwang e colaboradores (2022) demonstraram o efeito do maackia pterocarpano em reduzir a expressão de P-JNK, P-ERK1/2, mas sem efeito na P-p38. Nesse contexto, nossos dados demonstram que a LQB 118 afeta diretamente a fosforilação da p38 e isso pode explicar a redução da produção de citocinas observada.

Por fim, uma vez que Riça e colaboradores (2016) demonstraram através de docking molecular que a LQB 118 pode ser um potencial ligante de receptores de estrogênio e que estes receptores estão relacionados com a modulação de genes inflamatórios (HARDING; HEATON, 2022; VEGETO et al., 2001; VILLA et al., 2015) pode-se sugerir que as propriedades anti-inflamatórias deste composto estejam diretamente ligadas à sua interação com os receptores estrogênicos.

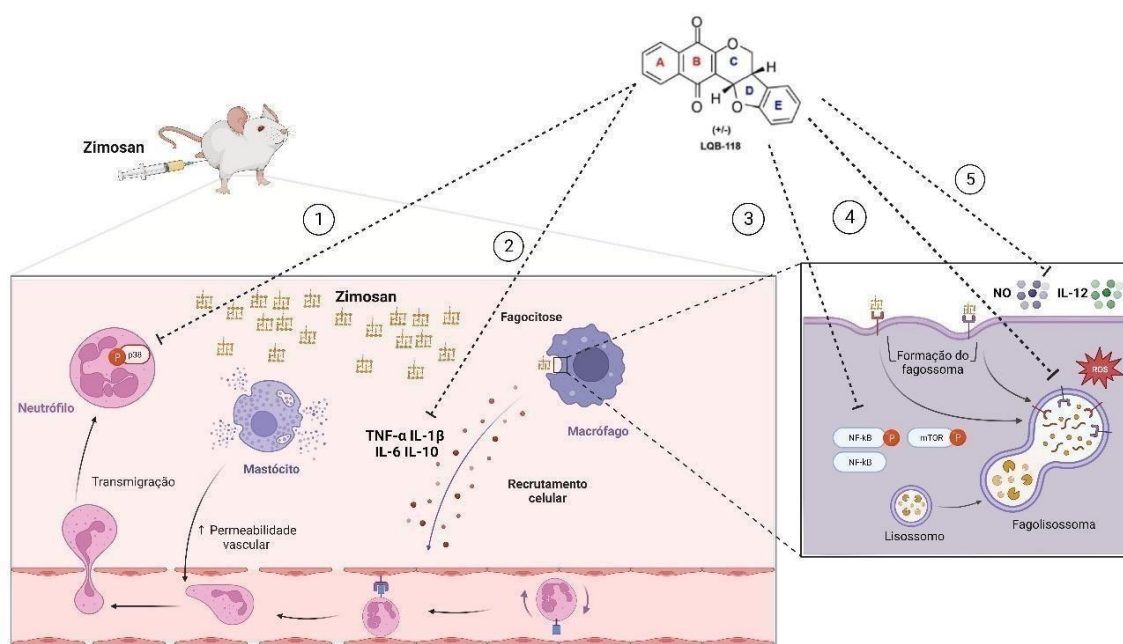
Considerando todos os resultados, o presente trabalho avaliou pela primeira vez o efeito da LQB 118 em modelo murino de peritonite induzida por zimosan, além de demonstrar, de forma inédita, o efeito dessa molécula na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais, investigando ainda os mecanismos de ação envolvidos no seu efeito anti-inflamatório.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram pela primeira vez a atividade anti-inflamatória da LQB 118 em modelo de peritonite induzida por zimosan, onde o tratamento com a molécula reduziu a migração celular e a produção de citocinas, possivelmente pela inibição da via MAPK p38. Adicionalmente, a LQB 118 modulou a função fagocitária dos macrófagos, alterando diferentes parâmetros, com envolvimento da inibição da via mTOR-NFκB. Em conjunto, esses dados demonstram o potencial anti-inflamatório da LQB 118, que pode se tornar um protótipo de novos fármacos para doenças imunomediadas.

Figura 14. Ações da LQB 118 *in vitro* e *in vivo*



Fonte: Autor, 2023.

1. Inibição de P-p38 em neutrófilos e da migração de neutrófilos.
2. Redução de citocinas.
3. Inibição de P-NFκB e P-mTOR.
4. Inibição de fagocitose e ROS.
5. Redução de IL-12 e NO.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627-635, 2018.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- AJUEBOR, M. N. et al. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in zymosan-induced inflammation. **Immunology**, v. 95, n. 4, p. 625, 1998.
- ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202- 209, 2007.
- ANTONELLI, M.; KUSHNER, I. It's time to redefine inflammation. **FASEB Journal**, v. 31, n. 5, p. 1787-1791, 2017.
- APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87-92, 2007.
- ARIAS-SALVATIERRA, D.; SILBERGELD, E. K.; ACOSTA-SAAVEDRA, L. C.; CALDERON-ARANDA, E. S. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide. **Cell Signal**. v. 23, n. 2, p. 425-435, 2011.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.
- BASU, S. et al. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 100, n. 3, p. 854-861, 2002.
- BAI, X. et al. Maackiain protects against sepsis via activating AMPK/Nrf2/HO-1 pathway. **International Immunopharmacology**, v. 108, p. 108710, 2022.
- BAO, H. R.; CHEN, J. L.; LI, F.; ZENG, X. L.; LIU, X. J. Relationship between PI3K/mTOR/RhoA pathway regulated cytoskeletal rearrangements and phagocytic

capacity of macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 53, n. 7, p. e9207, 2020.

BERRAONDO, P. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 6-15, 2019.

BERNARDO, P. S. et al. LQB-118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells. **Oncology Reports**, v. 43, n. 1, p. 346-357, 2020.

BONAVENTURA, A.; MONTECUCCO, F. Inflammation and pericarditis: are neutrophils actors behind the scenes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5390-5398, 2019.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in immunology**, v. 36, n. 3, p. 161-178, 2015.

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119-1124, 2003.

BROWNING, D. D. et al. Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2811-2816, 2000.

BUARQUE, C. D.; Militao, G. C. G.; Lima, D. J. B.; Costa-Lotufo, L. V.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O.; Cunha-Junior, E. F.; Torres-Santos, E. C.; Netto, C. D.; Costa, P. R. R. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 6885-6891, 2011.

BUCKLEY, C. D. et al. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organformation. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 715-745, 2015.

BURMEISTER, A. R.; MARRIOTT, I. The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 12, p. 458, 2018.

CANTON, J. Phagosome maturation in polarized macrophages. **Journal of leukocytebiology**, v. 96, n. 5, p. 729-738, 2014.

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

CARVALHO, D. C. M.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; LIMA, E. A.; GALVÃO, J. G. F. M.; ALVES, A. K. A.; FEIJÓ, P. R. O.; QUINTAS, L. E. M.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Marinobufagenin inhibits neutrophil migration and proinflammatory cytokines. **Immunology Research**, v. 2019, p. e1094520, 2019.

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

CASTELLANO, I.; ERCOLESI, E.; PALUMBO, A. Nitric oxide affects ERK signaling through down-regulation of MAP kinase phosphatase levels during larval development of the ascidian *Ciona intestinalis*. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102907, 2014.

CHAE, H. et al. Maackiapterocarpin B from *Sophora tonkinensis* suppresses inflammatory mediators via nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 2, p. 259-266, 2016.

CHANNON, K. M.; GUZIK, T. J. MECHANISMS OF SUPEROXIDE PRODUCTION IN HUMAN BLOOD. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 515-524, 2002.

CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 621-627, 2003.

CINELLI, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal research reviews**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 2020.

CLANCY, Robert M.; ABRAMSON, Steven B. Nitric oxide: a novel mediator of inflammation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 210, n. 2, p. 93-101, 1995.

COFFELT, S. B.; WELLENSTEIN, M. D.; DE VISSER, K. E. Neutrophils in cancer: neutral no more. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 431-446, 2016.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-891, 2002.

CUNHA-JÚNIOR, E. F.; PACIENZA-LIMA, W.; RIBEIRO, G. A.; NETTO, C. D.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; TORRES-SANTOS, E. C. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel

naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob Chemother**. v. 66, n. 7, p. 1555-1559, 2011.

CURI, R. et al. The critical role of cell metabolism for essential neutrophil functions. **Cell Physiol Biochem**, v. 54, n. 4, p. 629-647, 2020.

CUZZOCREA, S., P.K. CHATTERJEE, E. MAZZON, I. SERRAINO, L. DUGO, T. CENTORRINO, A. BARBERA, A. CICCOLO, F. FULIA, M.C. MCDONALD, A.P. CAPUTI, AND C. THIEMERMANN. Effects of calpain inhibitor I on multiple organ failure induced by zymosan in the rat. **Critical Care Medicine**. v. 30, p. 2284-229, 2002.

CONKLIN, K. A. Coenzyme Q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. **Integr Cancer Ther**, v. 4, p. 110-130, 2005.

D'ANDREA, A. et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 5, p. 1387-1398, 1992.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**. v. 232, p. 3-14, 1999.

DAVIES, L. C.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages: then and now. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 541-548, 2015.

DE FARIA, C. C. et al. NFκB pathway and microRNA-9 and-21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 15, n. 3, p. 345-352, 2015.

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

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **Eur J Immunol**, v. 37, Suppl 1, p. 34-45, 2007.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological reviews**, v. 281, n. 1, p. 8-27, 2018.

DINARELLO, C. A.; GOLDIN, N. P.; WOLFF, S. M. Demonstration and characterization

of two distinct human leukocytic pyrogens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 139, n. 6, p. 1369-1381, 1974.

DMITRIEVA, O. S. et al. Interleukins 1 and 6 as main mediators of inflammation and cancer. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, p. 80-90, 2016.

DORONZO, G. et al. Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signalling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells: influence of insulin resistance and oxidative stress. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 1, p. 44-53, 2011.

EL ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171-83, 2006.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014.

FIorentino, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell.

IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, 1989.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FREEMAN, S. A.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunol Rev.** v. 262, n. 1, p. 193-215, 2014.

FU, Y. L.; HARISSON, R. E. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. **Front Immunol.** v. 12, p. e662063, 2021.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets -Inflammation and allergy.** v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

GALOZZI, P. et al. The revisited role of interleukin-1 alpha and beta in autoimmune and inflammatory disorders and in comorbidities. **Autoimmunity reviews**, v. 20, n. 4, p. 102785, 2021.

GAN, X.; WANG, J.; SU, B.; WU, D. Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. **J Biol Chem.** v. 286, p. 10998-11002, 2011.

GANTNER, B. N. et al. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107-1117, 2003.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GINHOUX, F.; GUILLIAMS, M. Tissue-resident macrophage ontogeny and homeostasis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 439-449, 2016.

GORDON, S. Phagocytosis: an immunobiologic process. **Immunity**, v. 44, n.3, p. 463-475, 2016.

GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. **BMC biology**, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2017.

GORIELY, S.; NEURATH, M. F.; GOLDMAN, M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 1, p. 81-86, 2008.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GRIFFIN, G. K. et al. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6287-6299, 2012.

GÜHRING, H. et al. Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hyperalgesia. **Inflammation Research**, v. 50, p. 83-88, 2001.

GUO, Y.; CAO, W.; ZHU, Y. Immunoregulatory functions of the IL-12 family of cytokines in antiviral systems. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 772, 2019.

GUO, J. et al. Maackiain protects the kidneys of type 2 diabetic rats via modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- κ B/Caspase-3 pathways. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 4339-4358, 2021.

GUZIK, T. J. et al. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. **Hypertension**, v. 39, n. 6, p. 1088-1094, 2002.

GUZIK, T.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation. **J physiol pharmacol**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HARDING, C. V.; CANADAY, D.; RAMACHANDRA, L. Choosing and Preparing Antigen-Presenting Cells. **Current Protocols in Immunology**, v. 88, n. 1, p. 16.1. 1-16.1.30, 2010.

HARDIN, A. T.; HEATON, N. S. The impact of estrogens and their receptors on immunity and inflammation during infection. **Cancers**, v. 14, p. 909, 2022.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2015. p. 149-160.

HIDALGO, A. et al. The neutrophil life cycles. **Trends in immunology**, v. 40, n. 7, p. 584-597, 2019.

HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 92, 2017.

HUET, O. et al. Interleukin 10 antioxidant effect decreases leukocytes/ endothelial interaction induced by tumor necrosis factor α . **Shock**, v. 39, n. 1, p. 83-88, 2013.

HUME, D. A.; IRVINE, K. M.; PRIDANS, C. The mononuclear phagocyte system: the relationship between monocytes and macrophages. **Trends Immunol**, v. 40, n. 2, p. 98-112, 2019.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature immunology**, v. 16, n. 5, p. 448-457, 2015.

HWANG, S. J.; OH, W. K.; LEE, H. Y. Preventive effects of cristacarpin on experimentally induced uveitis by targeting NF- κ B. **Biomed Pharmacother**. v. 145, p. e112474, 2022.

IVETIC, A.; HOSKINS GREEN, H. L.; HART, S. J. L-selectin: a major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1068,

2019.

IMAJO, M.; TSUCHIYA, Y.; NISHIDA, E. Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. **IUBMB life**, v. 58, n. 5-6, p. 312-317, 2006.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS letters**, v. 364, n. 3, p. 279-282, 1995.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 32, n. 1, 2012.

JHANWAR-UNIYAL M, AMIN AG, COOPER JB, DAS K, SCHMIDT MH, MURALI R. Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspects. **Adv Biol Regul.** v. 64, p. 39-48, 2017.

JUNG, M. et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. **Basic research in cardiology**, v. 112, p. 1-14, 2017.

KAMERITSCH, P.; RENKAWITZ, J. Principles of leukocyte migration strategies. **Trends inCell Biology**, v. 30, n. 10, p. 818-832, 2020.

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

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 461, 2014.

KIM, H. J.; SUNG, M. K.; KIM, J. S. Anti-inflammatory effects of glyceollins derived from soybean by elicitation with *Aspergillus sojae*. **Inflammation Research**, v. 60, p. 909-917, 2011.

KOBAYASHI, K. et al. Effects of quinone derivatives, such as 1, 4-naphthoquinone, on DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory action. **Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 37-44, 2011.

KOBAYASHI, M. et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 3, p. 827-845, 1989.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and

inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 1, p. 33-42, 2001.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis. **Immunobiology**, v. 215, n. 6, p. 492-504, 2010.

KOURTZELIS, I. et al. From leukocyte recruitment to resolution of inflammation: the cardinal role of integrins. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 677-683, 2017.

LEE, E. et al. β -Lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2015.

LEMIEUX, M. G.; JANZEN, D.; HWANG, R.; ROLDAN J.; JARCHUM, I.; KNECHT, D. A. Visualization of the actin cytoskeleton: different F-actin-binding probes tell different stories. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 71, p. 157-169, 2014.

LEVIN, R.; GRINSTEIN, S.; CANTON, J. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. **Immunological reviews**, v. 273, n. 1, p. 156-179, 2016.

LI, W. et al. Water extract of Cayratia albifolia CL Li root relieves zymosan A-induced inflammation by restraining M1 macrophage polarization. **Phytomedicine**, v. 96, p. 153901, 2022.

LIEW, P. X.; KUBES, P. The neutrophil's role during health and disease. **Physiological reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223-1248, 2019.

LIMA, E. A.; CAVALCANTE-SILVA, L. H.A.; CARVALHO, D. C. M.; NETTO, C. D.; COSTA, P. R. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. The pterocarpanquinone LQB 118 inhibits inflammation triggered by zymosan in vivo and in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 83, p. 1-9, 2020.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

LIU, D. et al. TSLP promote M2 macrophages polarization and cardiac healing after myocardial infarction. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 516, n. 2, p. 437-444, 2019.

MACATONIA, S. E. et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 154, n. 10, p. 5071-5079, 1995.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.

MARTINO, T.; KUDROLI, T. A.; KUMAR, B.; SALVIANO, I.; MENCALHA, A. L.; COELHO, M. G. P.; JUSTO, G.; COSTA, P. R. R.; SABINO, K. C. C.; LUPOLD, S. E. The orally active pterocarpanquinone LQB-118 exhibits cytotoxicity in prostate cancer cell and tumor models through cellular redox stress. **Prostate**, v. 78, n. 2, p. 140-151, 2018.

MARTIRE-GRECO, D. et al. Interleukin-10 controls human peripheral PMN activation triggered by lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 62, n. 3, p. 426-432, 2013.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 323-350, 1997.

MAHTANI, K. R. et al. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 19, p. 6461-6469, 2001.

MASUDA, T. et al. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 2, p. 329-335, 2010.

MCDONALD, P. P. et al. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 11, p. 6164-6172, 1999.

MISHALIAN, I.; GRANOT, Z.; FRIDLENDER, Z. G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. **Immunobiology**, [s. l.], v. 222, n. 1, p. 82-88, 2017.

MÓCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovascular research**, v. 107, n. 3, p. 373-385, 2015.

MOGHADAM, Z. M.; HENNEKE, P.; KOLTER, J. From flies to men: ROS and NADPH oxidase in phagocytes. **Front. Cell Dev. Biol.** v. 9, p. 1-16, 2021.

MÖLLER, M. et al. Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low-density lipoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 8850-8854, 2005.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.

MONTAZERSAHEB, S. et al. COVID-19 infection: An overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2022.

MULLER, W. A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 323-344, 2011.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.
NELSON, D.S. Reaction to antigens in vivo of the peritoneal macrophages of guinea-pigs with delayed type hypersensitivity. **Lancet**. Effects of anti-coagulants and other drugs. v. 2, p. 175-176, 1963.

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

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Macrophage phenotypes during tissue repair. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 6, p. 875-881, 2013.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 694-707, 2014.

OCANA, A. et al. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 137, 2017.

OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Wormhole travel for macrophages. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 518-519, 2016.

OLIVEIRA, R. A. S. et al. The hydroxy-naphthoquinone lapachol arrests mycobacterial growth and immunomodulates host macrophages. **International**

immunopharmacology, v. 10, n. 11, p. 1463-1473, 2010.

PARHAM, P. Putting a face to MHC restriction. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 3-5, 2005

PINHO, B. R. et al. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e24098, 2011.

PROPPER, D. J.; BALKWILL, F. R. Harnessing cytokines and chemokines for cancertherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 4, p. 237-253, 2022.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions os endothelial cells in inflammation. **Nature Review Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

QI, H.; DENNING, T. L.; SOONG, L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin- 12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infection and immunity**, v. 71, n. 6, p. 3337-3342, 2003.

RAJAEI, A.; BARNETT, R.; CHEADLE, W. G. Pathogen- and danger-associated molecular patterns and the cytokine response in sepsis. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 19, n. 2, p. 107-116, 2018.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**. v. 1863, n.12, p. 2977-2992, 2016.

REIS, F. et al. The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 13, n. 2, p. 341-351, 2013.

RIÇA, I. G. et al. Anti-inflammatory properties of pterocarpanquinone LQB-118 in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4415-4423, 2016.

ROCK, K. L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The sterile inflammatory response. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 321-342, 2010.

ROSALES, C. et al. Phagocytosis: a fundamental process in immunity. **BioMed researchinternational**, v. 2017, 2017.

ROSS, E. A.; DEVITT, A.; JOHNSON, J. R. Macrophages: the good, the bad, and

thegluttony. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 708186, 2021.

SÁRVÁRI, A. K. et al. Plasticity of epididymal adipose tissue in response to diet-induced obesity at single-nucleus resolution. **Cell metabolism**, v. 33, n. 2, p. 437-453. e5, 2021.

SCOTT, A. et al. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? **British journal of sports medicine**, v. 38, n. 3, p. 248-249, 2004.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Action**, v. 18, n. 3-4, p. 439-46, 1986.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **Annual Review of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 1576-91, 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIGAL, A. et al. The LFA-1 Integrin Supports Rolling Adhesions on ICAM-1 Under Physiological Shear Flow in a Permissive Cellular Environment. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 165, n. 1, p. 442-452, 2000.

SITÔNIO, M. M. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3, 4-dihydro-2, 2-dimethyl-2H-naphthol [1, 2-b] pyran-5, 6-dione (β -lapachone). **Inflammation Research**, v. 62, p. 107-113, 2013.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines, and pain. **Pharmacology of pain**, v. 1, p. 279-302, 2010.

SOZZANI, S. et al. Chronic inflammatory diseases: do immunological patterns drive the choice of biotechnology drugs? A critical review. **Autoimmunity**, v. 47, n. 5, p. 287-306, 2014.

TAKADA, Y. et al. Odoroside A and ouabain inhibit Na⁺/K⁺-ATPase and prevent NF- κ B-inducible protein expression by blocking Na⁺-dependent amino acid transport.

Biochemical Pharmacology, [s. l.], v. 78, n. 9, p. 1157-1166, 2009.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TALBOT, J. et al. Role of CCR2 expression in neutrophils on development o arthritis. **Immunology**, p. 586-586, 2012.

TENOPOULOU, M.; DOULIAS, P. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide inthe regulation of metabolism. **F1000Research**, v. 9, 2020.

TURPEINEN, T. et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 333, n. 1, p. 310-318, 2010.

TYRYSHKIN, A.; GORGUN, F. M.; FATTAH, E. A.; MAZUMDAR, T.; PANDIT, L.; ZENG, S.; EISSA, N. T. Src Kinase-mediated Phosphorylation Stabilizes Inducible Nitric-oxide Synthase in Normal Cells and Cancer Cells. **The journal of biological chemistry**. v. 285, no. 1, p. 784-792, 2009.

UCIECHOWSKI, P.; DEMPKE, C. M. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. **Oncology**. v. 98, n. 3, p. 131-137, 2020.

UNANUE, E. R. Antigen-presenting function of the macrophage. **Annual review of immunology**, v. 2, n. 1, p. 395-428, 1984.

UNANUE, E. R. Perspective on antigen processing and presentation. **Immunological reviews**, v. 185, n. 1, p. 86-102, 2002.

UNDERHILL, D. M. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of Endotoxin Research**. v. 9, n. 3, p. 176-180, 2003.

VEGETO, E.; BONINCONTRO, C.; POLLIO, C.; SALA, A.; VIAPPIANI, S.; NARDI, F.; BRUSADELLI, A.; VIVIANI, B.; CIANA, P.; MAGGI, A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. **J. Neurosci**, v. 21, n. 6, p. 1809-1818, 2001.

VILLA, A.; RIZZI, N.; VEGETO, E.; CIANA, P.; MAGGI, A. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-14, 2015.
WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 427, 2008.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93-106, 2006.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **The Veterinary quarterly**, v.22, n. 1, p. 11-16, 2000.

WOLK, K. et al. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5397-5402, 2002.

WOODS, A.; J. R. COUCHMAN.; S. JOHANSSON.; M. HOOK. Adhesion and cytoskeletal organisation of fibroblasts in response to fibronectin fragments. **EMBO J.** v. 5, p.665- 670, 1986.

XIA, W. et al. Discovery of a new pterocarpan-type antineuroinflammatory compound from *Sophora tonkinensis* through suppression of the TLR4/NF κ B/MAPK signaling pathway with PU. 1 as a potential target. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 295-303, 2018.

XIE, L., F. SUN, J.WANG, X. MAO, L. XIE, S.H. YANG, D.M. SU, J.W. SIMPKINS, D. A. GREENBERG, AND K. JIN. mTOR signalling inhibition modulates macrophage/microglia-mediated neuroinflammation and secondary injury via regulatory T cells after focal ischemia. **The Journal of Immunology**. v.192, p. 6009-6019, 2014.

YANG, F. et al. The diverse biological functions of neutrophils, beyond the defense against infections. **Inflammation**, v. 40, p. 311-323, 2017.

YAZDI, A. S.; GHORESCHI, K. The interleukin-1 family. **Adv Exp Med Biol**, v. 941, p. 21-29, 2016.

YOON, E. et al. Soybean glyceollins mitigate inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression levels via suppression of the NF- κ B signaling pathway in RAW 264.7 cells. **International journal of molecular medicine**, v. 29, n. 4, p. 711-717, 2012.

ZHANG, N.; CZEPIELEWSKI, R. S.; JARJOUR, N. N.; ERLICH, E.C.; ESAULOVA, E.; SAUNDERS, B. T.; GROVER, S. P.; CLEUREN, A. C.; BROZE, G. J.; EDELSON, B. T.; MACKMAN, N.; ZINSELMAYER, B. H.; RANDOLPH, G. J. Expression of factor V by resident macrophages boosts host defense in the peritoneal cavity. **Journal of**

Exeprimental Medicine. v. 216, n. 6, p.1291-1300, 2019.

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

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXIERA, C. Signaling pathways involved in zymosan phagocytosis induced by two secreted phospholipases A₂ isolated from Bothrops asper snake venom in macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 113, p. 575-582, 2018.

ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto emitido pelo Comitê de Ética no Usode Animais (CEUA)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Retoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos aspectos moleculares envolvidos no efeito da LQB 118 como moduladora da inflamação: abordagens in vitro e in vivo", protocolada sob o CEUA nº 1278190820 (ID 001216), sob a responsabilidade de **Sandra Rodrigues Mascarenhas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 02/10/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the molecular aspects involved in the effect of LQB 118 as a modulator of inflammation: in vitro and in vivo approaches", utilizing 240 Heterogenics mice (240 females), protocol number CEUA 1278190820 (ID 001216), under the responsibility of **Sandra Rodrigues Mascarenhas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 10/02/2020.

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

Vigência da Proposta: de [10/2020](#) a [08/2023](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

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

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [240](#)

Linhagem: [Mus musculus - Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa, 02 de outubro de 2020

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

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

ANEXO B – Artigo referente à parte da tese publicado na revista International Immunopharmacology (Fator de impacto: 5.714), 2020.

The pterocarpanquinone LQB 118 inhibits inflammation triggered by zymosan *in vivo* and *in vitro*

International Immunopharmacology 83 (2020) 106399



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



The pterocarpanquinone LQB 118 inhibits inflammation triggered by zymosan *in vivo* and *in vitro*



Éssia de Almeida Lima^a, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^b,
Deyse Cristina Madruga Carvalho^a, Chaquip Daher Netto^c, Paulo Roberto Ribeiro Costa^d,
Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{a,*}

^a Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

^b Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

^c Laboratory of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, 27930-560, Brazil

^d Laboratory of Bioorganic Chemistry, Natural Products Research Institute, Federal University of Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil

ARTICLE INFO

Keyword:
Inflammation
Cytokines
Zymosan
Macrophages

ABSTRACT

LQB 118, a hydride molecule, has been described as an antineoplastic and antiparasitic drug. Recently, LQB118 was also shown to display anti-inflammatory properties using an LPS-induced lung inflammation model. However, LQB 118 effects on the inflammatory response induced by zymosan has not been demonstrated. In this study, swiss mice were LQB 118 intraperitoneally (i.p.) treated and zymosan was used to induce peritoneal inflammation. Peritoneal fluid was collected and used for cell counting and proinflammatory cytokines quantification (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) by immunoenzymatic assay (ELISA). For *in vitro* studies, peritoneal macrophages zymosan-stimulated were used. Results demonstrated that LQB 118 treatment reduced polymorphonuclear cell migration and TNF- α , IL-1 β , and IL-6 levels in the peritoneal cavity. In macrophages, LQB 118 treatment display no cytotoxic effect and is also able to reduce cytokines levels. To investigate LQB 118 putative mechanism of action, TLR2, CD69, and P-p38 MAPK expression were evaluated. LQB 118 treatment reduced CD69 expression and p38 phosphorylation induced by zymosan. Furthermore, LQB 118 was able to negatively modulate TLR2 expression in the presence of inflammatory stimulus. Thus, our study provide new evidences for the mechanisms related to the anti-inflammatory effect of LQB 118 *in vivo* and *in vitro*.

ANEXO C – Artigos publicados durante o doutorado (colaborações)

Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils. *Inflammopharmacology* (Fator de impacto: 5.093), 2019.

Inflammopharmacology
https://doi.org/10.1007/s10787-019-00602-8

Inflammopharmacology

SHORT COMMUNICATION



Ouabain reduces the expression of the adhesion molecule CD18 in neutrophils

Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva¹ · Éssia de Almeida Lima² · Deyse C. M. Carvalho² · Sandra Rodrigues-Mascarenhas^{1,2}

Received: 18 December 2018 / Accepted: 30 April 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Ouabain, a hormone that inhibits Na⁺/K⁺-ATPase, modulates many aspects of the inflammatory response. It has been previously demonstrated that ouabain inhibits neutrophil migration in several inflammation models in vivo, but little is known about the mechanisms underlying this effect. Thus, this work aimed to evaluate the effect of ouabain on molecules related to neutrophil migration. For this purpose, neutrophils obtained from mouse bone marrow were treated with ouabain (1, 10, and 100 nM) in vitro. Neutrophil viability was assessed by annexin V/propidium iodide staining. Ouabain treatment did not affect neutrophil viability at different times (2, 4, and 24 h). However, basal neutrophil viability was decreased after 4 h. Thus, we assessed the effect of ouabain on the adhesion molecule CD18, an integrin β2 chain protein, and on the chemokine receptor CXCR2 after 2 h of treatment. CD18 expression was reduced (by 30%) by 1 nM ouabain. However, the expression of CXCR2 on the neutrophil membrane was not affected by ouabain treatment (1, 10, and 100 nM). Moreover, ouabain (1, 10, and 100 nM) did not modulate the zymosan-induced secretion of CXCL1 (a chemokine receptor CXCR2 ligand) in macrophage cultures. These data suggest that the inhibitory effect of ouabain on neutrophil migration is related to reduced CD18 expression, indicating a novel mechanism of action.

Keywords Integrin · CXCR2 · CXCL1 · Neutrophil migration

Introduction

The role of steroid hormones in the inflammatory process has been widely described (Straub and Cutolo 2016; Glezer et al. 2018). Ouabain is an endogenous cardiac steroid hormone (Hamlyn et al. 1991) produced under different conditions, such as hypertension (Hauck and Frishman 2012), pregnancy (Dvula-Levitt et al. 2015), and stress (Antolovic et al. 2000; Bauer et al. 2005). In addition to having an inhibitory effect on Na⁺/K⁺-ATPase, low concentrations of ouabain can interfere with some signalling proteins (e.g., NF-κB and Src kinase) (Aperia 2007). Ouabain has been shown to modulate several immune system cells, such as monocytes (Valente et al. 2009; Teixeira and Rumjanek

2014), dendritic cells (Nascimento et al. 2014), B cells (de Paiva et al. 2011; da Silva et al. 2016), and thymocytes (Echevarria-Lima et al. 2003; Rodrigues Mascarenhas et al. 2003; Rodrigues-Mascarenhas et al. 2008). In addition, ouabain has been described as an inflammatory modulator (Cavalcante-Silva et al. 2017).

Our group has demonstrated that ouabain has an anti-inflammatory effect in several mouse models of acute inflammation. Ouabain treatment (0.56 mg/kg, i.p.) decreases paw edema induced by zymosan, carrageenan, PGE₂, bradykinin, and compound 48/80 (a histamine-depleting agent) (de Vasconcelos et al. 2011). This effect may be related to a reduction in vascular permeability (Leite et al. 2015). Ouabain also decreases TNF-α and IL-1β levels without interfering with IL-6 and IL-10 levels in a zymosan-induced peritonitis model. This effect may

✉ Sandra Rodrigues-Mascarenhas

Marinobufagenin inhibits neutrophil migration and proinflammatory cytokines.
Journal of Immunology Research (Fator de impacto: 4.493), 2019.

Research Article

Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines

**Deyse C. M. Carvalho¹,¹ Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva¹,¹ Éssia de A. Lima,¹
 José G. F. M. Galvão,¹ Anne K. de A. Alves,¹ Priscilla R. O. Feijó,² Luís E. M. Quintas,²
 and Sandra Rodrigues-Mascarenhas¹**

¹Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB 58051-900, Brazil

²Laboratory of Biochemical and Molecular Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

Correspondence should be addressed to Sandra Rodrigues-Mascarenhas; sandra@cbiotec.ufpb.br

Received 4 December 2018; Accepted 28 April 2019; Published 20 May 2019

Academic Editor: Patrice Petit

Copyright © 2019 Deyse C. M. Carvalho et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cardiotonic steroids, such as ouabain and digoxin, are known to bind to Na⁺/K⁺-ATPase and to promote several biological activities, including anti-inflammatory activity. However, there are still no reports in the literature about inflammation and marinobufagenin, a cardiotonic steroid from the bufadienolide family endogenously found in mammals. Therefore, the aim of this work was to analyze, *in vivo* and *in vitro*, the role of marinobufagenin in acute inflammation. Swiss mice were treated with 0.56 mg/kg of marinobufagenin intraperitoneally (i.p.) and zymosan (2 mg/mL, i.p.) was used to induce peritoneal inflammation. Peritoneal fluid was collected and used for counting cells by optical microscopy and proinflammatory cytokine quantification (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) by immunoenzymatic assay (ELISA). Zymosan stimulation, as expected, induced increased cell migration and proinflammatory cytokine levels in the peritoneum. Marinobufagenin treatment reduced polymorphonuclear cell migration and IL-1 β and IL-6 levels in the peritoneal cavity, without interfering in TNF- α levels. In addition, the effect of marinobufagenin was evaluated using peritoneal macrophages stimulated by zymosan (0.2 mg/mL) *in vitro*. Marinobufagenin treatment at different concentrations (10, 100, 1000, and 10000 nM) showed no cytotoxic effect on peritoneal macrophages. Interestingly, the lowest concentration, which did not inhibit Na⁺/K⁺-ATPase activity, attenuated proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α levels. To investigate the putative mechanism of action of marinobufagenin, the expression of surface molecules (TLR2 and CD69) and P-p38 MAPK were also evaluated, but no significant effect was observed. Thus, our results suggest that marinobufagenin has an anti-inflammatory role *in vivo* and *in vitro* and reveals a novel possible endogenous function of this steroid in mammals.

Anti-inflammatory potential of pyocyanin in LPS-stimulated murine macrophages. Immunopharmacology and Immunotoxicology (Fator de impacto: 3.712), 2019.

IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY
2019, VOL. 41, NO. 1, 102–108
<https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1555845>



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Check for updates

Anti-inflammatory potential of pyocyanin in LPS-stimulated murine macrophages

José Marreiro de Sales-Neto^a , É. A. Lima^a, L. H. A. Cavalcante-Silva^a, U. Vasconcelos^b and S. Rodrigues-Mascarenhas^a

^aDepartamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^bDepartamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

ABSTRACT

Context: Pyocyanin is a typical *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor, a common Gram-negative rod responsible for a wide range of severe nosocomial infections. There is evidence indicating that pyocyanin has multiple biological activities, but little is known about anti-inflammatory properties.

Objective: This study investigated pyocyanin effect on nitric oxide and cytokine production in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine peritoneal macrophages.

Materials and methods: Macrophages were incubated in the presence and absence of pyocyanin (1, 5, 10, 50, and 100 μ M) with and without LPS (1 μ g/mL). Nitric oxide production was determined by Griess reagent and tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β production was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, pyocyanin effects on zymosan A-induced peritonitis in mice were evaluated.

Results: Pyocyanin (5 and 10 μ M) decreased nitric oxide, TNF- α , and IL-1 β production independent of macrophage death. On the other hand, *in vivo*, pyocyanin (5 mg/kg) was not able to affect leukocyte migration into the site of inflammation.

Discussion and conclusion: Thus, our findings suggest that pyocyanin exerts anti-inflammatory effects on murine peritoneal macrophages, downregulating nitric oxide, TNF- α , and IL-1 β levels, which seems to be independent of cell migration. These effects may represent a mechanism of immune evasion; nevertheless more detailed studies should be performed to confirm this hypothesis.

ARTICLE HISTORY

Received 11 August 2018
Revised 23 October 2018
Accepted 2 December 2018

KEYWORDS

Inflammation; natural phenazines; *Pseudomonas aeruginosa*; macrophages; immune response

Anticancer effect of a Spiro-acridine compound involves immunomodulatory and anti-angiogenic actions. Anticancer Research (Fator de impacto: 2.435), 2020.

ANTICANCER RESEARCH 40: 5049-5057 (2020)
doi:10.21873/anticancerres.14508

Anticancer Effect of a Spiro-acridine Compound Involves Immunomodulatory and Anti-angiogenic Actions

SÂMIA SOUSA DUARTE¹, DAIANA KARLA FRADE SILVA¹, THAÍS MANGEON HONORATO LISBOA¹,
RAWNY GALDINO GOUVEIA¹, RAFAEL CARLOS FERREIRA¹,
RICARDO OLÍMPIO DE MOURA², JAMIRE MURIEL DA SILVA³,
ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA⁴, SANDRA RODRIGUES-MASCARENHAS^{1,4},
PATRICIA MIRELLA DA SILVA⁵, DAVI FELIPE FARIAS⁶,
JULIANA ALVES DA COSTA RIBEIRO SOUZA⁶, KARINA CARLA DE PAULA MEDEIROS⁷,
JUAN CARLOS RAMOS GONÇALVES⁸ and MARIANNA VIEIRA SOBRAL^{1,8}

¹Post Graduation Program in Bioactive Natural and Synthetic Products,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

²Drug Development and Synthesis Laboratory, Department of Pharmacy,
State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

³Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁵Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁶Laboratory of Risk Assessment for Novel Technologies,
Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil;

⁷Department of Morphology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil;

⁸Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract. *Background/Aim:* Studies with acridine compounds have reported anticancer effects. Herein, we evaluated the toxicity and antitumor effect of the (E)-1'-((4-chlorobenzylidene)amino)-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrole]-4'-carbonitrile (AMTAC-06), a promising anticancer spiro-acridine compound. *Materials and Methods:* The toxicity of AMTAC-06 was evaluated on

and increased sub-G₁ peak, suggesting apoptosis was triggered. Moreover, the compound significantly decreased the density of peritumoral microvessels, indicating an anti-angiogenic action, possibly dependent on the cytokine modulation (TNF- α , IL-1 β and IFN- γ). No significant toxicological effects were recorded for AMTAC-06 on tumor transplanted animals. *Conclusion:* AMTAC-06 has low

Patulin inhibits LPS-induced nitric oxide production by suppressing MAPKs signaling pathway. *Natural Product Research* (Fator de impacto: 2.488), 2021.

NATURAL PRODUCT RESEARCH
https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2021516



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

SHORT COMMUNICATION



Patulin inhibits LPS-induced nitric oxide production by suppressing MAPKs signaling pathway

José Marreiro de Sales-Neto^a , Juliane Santos de França da Silva^a ,
Deyse Cristina Madruga Carvalho^a , Éssia de Almeida Lima^a ,
Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^a , Aline Portantiolo Lettnin^b , Ana
Paula de Souza Votto^b , Ulrich Vasconcelos^c and Sandra Rodrigues-
Mascarenhas^a

^aLaboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil; ^bLaboratory of Cell Culture, Biological Sciences Institute, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil; ^cLaboratory of Environmental Microbiology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

ABSTRACT

Patulin (PAT) is a natural product isolated from several species of fungi. Here, we evaluated the effect of PAT (62.5–4,000 ng/ml) in lipopolysaccharide (LPS)-activated murine peritoneal macrophages. Cell viability assay showed that PAT at concentrations up to 250 ng/ml did not affect macrophage viability. PAT (250 ng/ml) significantly reduced LPS-induced nitric oxide production (by 98.4%), inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression (by 83.5%), and iNOS messenger ribonucleic acid expression (by 100.0%). Moreover, PAT significantly reduced LPS-induced interleukin-1 β (by 80.6%), cluster of differentiation (CD) 69 (by 63.1%), and Toll-like receptor (TLR) 4 (by 91.9%) protein expression. Finally, PAT significantly reduced LPS-triggered phosphorylation of all mitogen-activated protein kinases (MAPK) assessed: extracellular signal-regulated kinase (ERK; by 89.5%), c-Jun N-terminal kinase (JNK; by 77.5%), and p38 (by 72.3%). Taken together, these data suggest that PAT downregulates acute inflammatory response, inhibiting nitric oxide production by suppressing CD69-TLR4/ERK-JNK-p38 MAPKs/Nos2/iNOS signaling pathway.

ARTICLE HISTORY

Received 1 September 2021
Accepted 11 December 2021

KEYWORDS

4-hydroxy-4H-furo(3,2-C)-
pyran-2(6H)-one; clavacin;
macrophage; acute
inflammation

Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process *In vitro* and *In vivo*. Inflammation (Fator de impacto: 4.657), 2021.

Inflammation, Vol. 44, No. 3, June 2021 / © 2020
DOI: 10.1007/s10753-020-01385-9

ORIGINAL ARTICLE



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

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils. Inflammopharmacology (Fator de impacto: 5.093), 2021.

Inflammopharmacology
https://doi.org/10.1007/s10787-021-00882-z

Inflammopharmacology

SHORT COMMUNICATION



Ouabain inhibits p38 activation in mice neutrophils

Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva¹ · Deyse Cristina Madruga Carvalho¹ · Éssia de Almeida Lima¹ · Sandra Rodrigues-Mascarenhas¹

Received: 11 August 2021 / Accepted: 10 October 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

Ouabain is a cardiac steroid hormone with immunomodulatory effects. It inhibits neutrophils migration induced by different stimuli, but little is known about the mechanisms involved in this effect. Thus, the aim of this study was to evaluate the ouabain effect on chemotactic signaling pathways in neutrophils. For that, mice neutrophils were isolated from bone marrow, treated with ouabain (1, 10, and 100 nM) for 2 h, submitted to transwell chemotaxis assay and flow cytometry analysis of Akt, ERK, JNK, and p38 phosphorylation induced by zymosan. Ouabain treatment (1, 10 and, 100 nM) reduces neutrophil chemotaxis induced by chemotactic peptide fMLP, but this substance did not inhibit Akt, ERK, and JNK activation induced by zymosan. However, ouabain (1 and 10 nM) reduced p38 phosphorylation in zymosan-stimulated neutrophils. These results suggest that ouabain may interfere in neutrophil migration through p38 MAPK inhibition.

Keywords Cardiac steroid · Akt · MAPK · Neutrophil migration

Introduction

Ouabain is a cardiac steroid hormone produced mainly by the adrenal gland, that modulates many immune system functions (Rodrigues-Mascarenhas et al. 2009), including the inflammatory response (Cavalcante-Silva et al. 2017). Our group has previously demonstrated that ouabain inhibits mice neutrophil migration induced by zymosan (Leite et al. 2015), ovalbumin (Galvão et al. 2017), *Leishmania amazonensis* (Jacob et al. 2013), and concanavalin A (de Vasconcelos et al. 2011). Other studies have also reported this activity in human neutrophils (Ray and Samanta 1997). The impairment of neutrophil migration by ouabain could be related to reduced CD18 expression, an integrin beta-2 chain (Cavalcante-Silva et al. 2020). Cardiotonic steroids inhibit Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) and alter cellular ion concentration. However, ouabain-NKA interaction, without pump inhibition, can also interfere with cellular signaling (e.g., MAPK pathway) (Cui and Xie 2017), modulating different cellular

functions, such as cell proliferation (Aydemir-Koksoy et al. 2001).

Neutrophils are polymorphonuclear leukocytes classically known to participate in inflammatory processes and play an important role in bacterial and fungal infections (Summers et al. 2010). However, neutrophils also participate in the tumor immune response (Mishalian et al. 2017; Ocana et al. 2017), the stimulation of adaptive immune responses (Minns et al. 2019), and also the resolution of inflammation (Jones et al. 2016) and healing (Phillipson and Kubek 2019). Despite their essential role in immune system homeostasis, neutrophils are also involved in the immunopathology of many inflammatory diseases, such as acute lung injury, chronic obstructive pulmonary disease, arthritis, and COVID-19 (Leliefeld et al. 2016; Juss et al. 2016; Hellebrekers et al. 2018; Bautista-Becerril et al. 2021; Cavalcante-Silva et al. 2021; Parackova et al. 2021). These cells present a dysregulated migration or activation in these clinical conditions (Hidalgo et al. 2019).

Considering that ouabain can reduce neutrophil migration (Leite et al. 2015), but little is known about the molecular mechanisms involved in this effect, this work aimed to evaluate the ouabain effect on cell signaling pathways related to neutrophil migration.

✉ Sandra Rodrigues-Mascarenhas
sandra@cbiotec.ufpb.br

¹ Immunobiotechnology Laboratory, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900,

Neutrophils and COVID-19: The road so far. International Immunopharmacology (Fator de impacto: 5.714), 2021.



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



Review

Neutrophils and COVID-19: The road so far

Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva, Deyse Cristina Madruga Carvalho, Éssia de Almeida Lima, José G.F.M. Galvão, Juliane S. de França da Silva, José Marreiro de Sales-Neto, Sandra Rodrigues-Mascarenhas

Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Jatoí, Paraná, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
Inflammation
Chemokines
NETs
SARS-CoV2

ABSTRACT

The SARS-CoV2 infection triggers a multisystem inflammatory disorder, known as COVID-19, a pandemic disease. This disease is characterized by acute respiratory distress syndrome, cytokine-driven hyperinflammation, and leukocytes count changes. The innate immune response has been linked to COVID-19 immunopathogenesis (e.g., dysfunctional IFN response and myeloid inflammation). In this regard, neutrophils have been highlighted as essential effector cells in the development of COVID-19. This review summarized the significant finds about neutrophils and its effector mechanisms (e.g., neutrophils enzymes and cytokines, neutrophil extracellular traps) in COVID-19 so far.

1. Introduction: COVID-19

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

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

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

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

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

2. COVID-19 and inflammation

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

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

Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice. International Immunopharmacology (Fator de impacto: 5.714), 2022.

International Immunopharmacology 109 (2022) 108908



Contents lists available at ScienceDirect

International Immunopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/intimp



Ouabain modulates airway remodeling caused by Th2-high asthma in mice

José Guilherme Ferreira Marques Galvão^a, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^a,
Éssia de Almeida Lima^a, Deyse C.M. Carvalho^a, Adriano Francisco Alves^b,
Sandra Rodrigues Mascarenhas^{a,*}

^a Laboratório de Imunobiologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia Experimental, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba (UFPB), João Pessoa, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Cytokines
Cell migration
Histopathology
Asthma
Airway remodeling

ABSTRACT

Objective: Ouabain, an inhibitor of Na⁺/K⁺-ATPase, is a type of endogenous hormone synthesized in the adrenal cortex and hypothalamus. Previous studies found that ouabain potentially inhibited acute inflammatory reactions such as type 2 inflammation and regulated immunological processes. In this study, we aimed to investigate ouabain effect on allergic asthma. **Methods:** BALB/c mice were submitted to chronic airway allergic inflammation induced by an ovalbumin (OVA) protocol. The animals were treated with ouabain or standard drug, budesonide. The following parameters were evaluated: cell migration, cytokine profile, IgE levels, lung histological modifications and MAPK activation. **Results:** At first, it was observed that ouabain reduced OVA-induced cell migration into the lung, observed by bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cell counting and lung histological analysis (HE stain). Additionally, ouabain negatively modulated alarmins (IL-33 and TSLP), Th2 high cytokines levels (IL-1 β and IL-4) and tissue remodeling markers such as TNF- α and TGF- β . Treatment with ouabain also reduced OVA-specific IgE titers in BALF and serum, respectively, when compared to the OVA group. Lung histological parameters, including collagen deposition and mucus production induced by OVA were also attenuated by ouabain treatment. Finally, our results showed that p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways were suppressed by ouabain in this model. All these parameters were reduced by budesonide, a steroid anti-inflammatory standard drug. **Conclusion:** These data together suggest that, in addition to its acute anti-inflammatory action, ouabain is also able to modulate allergic asthma.

1. Introduction

Ouabain is a steroid hormone released mainly by the adrenal gland and hypothalamus, which modulates several points of the immune system [1], including the inflammatory process. Our group has demonstrated that ouabain modulates several inflammation aspects prompted by different stimuli [2]. De Vasconcelos et al. demonstrated ouabain inhibitory effects in paw edema induced by carrageenan, compound 48/80, zymosan, prostaglandin E2, and bradykinin [3]. Additionally, ouabain was able to decrease zymosan-induced inflammation, reducing capillary permeability, cytokine release (i.e., TNF- α and IL-1 β), and neutrophil migration. These effects could be related to the reduction of NF- κ B translocation to the nucleus [4]. Ouabain also decreases cell migration and cytokine release in *Leishmania amazonensis*-triggered inflammation in mice [5]. Little is known about the mechanisms involved in cell migration inhibition induced by ouabain but could be

related to the reduction of integrin CD18 [6].

The anti-inflammatory effect of ouabain was also described in lung inflammation models. Ouabain regulates acute lung injury induced by LPS, likely through inhibition of the NF- κ B and MAPK signaling pathways [7]. In addition, our group demonstrated that ouabain reduced the recruitment of inflammatory cells in the lungs of mice sensitized by ovalbumin (OVA) and some other markers of acute allergic inflammation, namely IL-4 and IL-13 concentrations and OVA-specific IgE serum titer [8].

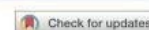
Airway inflammation is one of the major pathological outcomes triggered by heterogeneous conductive airway allergic disorders such as asthma and rhinitis [9]. The inflammatory responses in these cases are unusual and arise from harmful interplay of genetic susceptibility and environmental influences [10,11]. During the allergic pathophysiological process, IgE-dependent mechanisms promote mast cell activation and release of mediators, resulting in bronchoconstriction, exudation,

Morita-Baylis-Hilman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (ISACN) modulates the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury. Immunopharmacology and Immunotoxicology (Fator de Impacto: 3.712), 2023.

IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY
https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2177553



ORIGINAL ARTICLE



Morita-Baylis-Hilman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) modulates the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury

Juliane Santos de França da Silva^a, Deyse Cristina Madruga Carvalho^b, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva^b, Éssia de Almeida Lima^b, José Marreiro de Sales Neto^a , Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira^a, Tayná Rodrigues Olegário^c, Rhuan Karlos Santos Mendes^c, Aline Portantiolo Lettnin^d, Ana Paula de Souza Votto^d, Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos^c, Claudio Gabriel Lima-Junior^c and Sandra Rodrigues-Mascarenhas^b

^aCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil; ^bCentro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil; ^cCentro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil; ^dLaboratório de Cultura Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

ABSTRACT

Background: Despite its homeostatic role, inflammation is involved in several pathologies, such as acute lung injury. Morita-Baylis-Hilman adducts (MBHA) are a group of synthetic molecules and present a wide range of biological activities, including anti-inflammatory action. Thus, this study aimed to assess whether ISACN, an MBHA, modulates inflammation during acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS).

Methods: BALB/c mice were intraperitoneally treated with 24 mg/kg ISACN and challenged with LPS (2.5 mg/kg). On bronchoalveolar lavage fluid (BALF), we assessed the total and differential leukocyte count and measurement of protein leakage, cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α), and chemokine (CXCL-1). Additionally, lung histopathology was also performed (H&E staining). *In vitro* studies were conducted with peritoneal macrophages to assess the possible mechanism of action. They were cultured in the presence of ISACN (5 and 10 μ M) and stimulated by LPS (1 μ g/mL).

Results: ISACN reduced neutrophil migration, protein leakage, and inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) without interfering with the production of CXCL1. In addition, ISACN caused a decrease in LPS-induced lung injury as evident from histopathological changes. In peritoneal macrophages, ISACN diminishes the nitric oxide and cytokine levels (IL-1 β , IL-6, and TNF- α). The treatment with ISACN (10 μ M) also reduced LPS-induced TLR4, CD69, iNOS overexpression, and the LPS-induced ERK, JNK, and p38 phosphorylation.

Conclusion: Thus, this work showed for the first time the immunomodulatory action of MBHA in LPS-induced acute lung injury and provided new evidence for the mechanisms related to the anti-inflammatory effect of ISACN.

ARTICLE HISTORY

Received 6 February 2022
Accepted 31 January 2023

KEYWORDS

ALI; ARDS;
immunomodulation; MBHA;
isatin

ANEXO D – Comprovantes de depósitos de patentes**1. Ouabáína como inibidor da migração de neutrófilos****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 024869 6**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**Inventor 7 de 7****Nome:** ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA**CPF:** 08457560441**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Rua Hélio Rodrigues Ferreira, nº 200, Apto. 208, Bloco B, Cuiá**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58077-125**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 981 305734**Fax:****Email:** essia_almeida@hotmail.com

2. Utilização do aduto de Morita-Baylis-Hillman derivado da Isatina ISACN para o tratamento da inflamação



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

Número do Processo: BR 10 2021 015691 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Inventor 3 de 10

Nome: ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

CPF: 08457560441

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Hélio Rodrigues Ferreira, N° 200, Apto. 208, Bloco B, Cuiá.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58077-125

País: BRASIL

Telefone: (83) 981 305734

Fax:

Email: essia_almeida@hotmail.com

3. Patulina para o tratamento da inflamação



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

Número do Processo: BR 10 2022 015423 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

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

Inventor 5 de 9

Nome: ÉSSIA DE ALMEIDA LIMA

CPF: 08457560441

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Hélio Rodrigues Ferreira, nº 200, Apto. 208, Bloco B, Cuiá

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58077-125

País: BRASIL

Telefone: (83) 981 305734

Fax:

Email: essia_almeida@hotmail.com

ANEXO E – Artigo submetido à publicação (colaboração)

1.Cardiac autonomic dysfunction and blunted morning cortisol concentration in children with obesity and high-stress index



em.nmcd.0.8593c2.80d17ea6@... 24 de ago.

Em nome de Nutrition, Metabolism and Ca...
Para Você

*This is an automated message. *

Journal: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases

Title: Cardiac autonomic dysfunction and blunted morning cortisol concentration in children with obesity and high-stress index

Corresponding Author: Professor Vinicius José Baccin Martins

Co-Authors: Thallyta Alanna Ferreira Viana; Rúbia Cartaxo de Squizato Moraes; Davyson Barbosa Duarte; Joicy Karla Grangeiro Pereira; Paulo César Trindade da Costa; Palloma Karla Cantalice Matias; Cristiane Cosmo Silva Luis; Adélia da Costa Pereira de Arruda Neta; Éssia de Almeida Lima; Sandra Rodrigues Mascarenhas; Francisco Antônio de Oliveira Júnior; José Luiz de Britto Alves

Manuscript Number:

Dear Miss Éssia de Almeida Lima,

Professor Vinicius José Baccin Martins submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, Editorial Manager, and you have been listed as a Co-Author of this submission.

ANEXO F – Parecer do pedido de patente submetido à INOVA-UFPB



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
AGÊNCIA UFPB DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
DIRETORIA DE INCUBAÇÃO DE EMPRESAS DE
BASE TECNOLÓGICA



Ofício	082/2022	Processo	23074.097767/2022-16
Patente	"UTILIZAÇÃO DA LQB 118 PARA O TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO".		

PARECER ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA E ECONÔMICA (EVTE)

Análise e emissão de parecer a respeito do ESTUDO DE VIABILIDADE TÉCNICA E ECONÔMICA (EVTE) do pedido de registro de patente com título provisório "UTILIZAÇÃO DA LQB 118 PARA O TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO"

DO PROCESSO:

O processo nº 23074.097767/2022-16 apresenta o estudo de viabilidade técnica e econômica (EVTE) do produto em estado mínimo viável para as indústrias farmoquímicas e farmacêuticas.

Segundo o item do EVTE que trata de custos, seriam necessários R\$ 20.000,00 para produzir ou realizar ensaios iniciais com o produto.

Conforme Item do EVTE que discute vantagens e desvantagens técnicas, Vantagens: A LQB 118 é uma molécula sintética que tem sua estrutura baseada em moléculas naturais e seu processo de produção é conhecido/consolidado. Desvantagens: O número reduzido de estudos sobre o mecanismo de ação da LQB 118.

Conforme item do EVTE que discute oportunidades e riscos mercadológicos, Oportunidades: Destaca-se a utilização da LQB 118 como princípio ativo com ação anti-inflamatória. Riscos: Possíveis efeitos adversos, como observado em qualquer outro medicamento.

DA ANÁLISE:

O potencial produto mínimo viável "UTILIZAÇÃO DA LQB 118 PARA O TRATAMENTO DA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
AGÊNCIA UFPB DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
DIRETORIA DE INCUBAÇÃO DE EMPRESAS DE
BASE TECNOLÓGICA



INFLAMAÇÃO" apresenta mercado potencial para sua inserção e possui custo de fabricação acessível para constituição de protótipo.

DO PARECER:

Parecer favorável salvo melhor juízo.

João Pessoa, 06/02/2023

Raimundo A Menezes Jr
SIAPE 1866226

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 14/02/2023

DESPACHO. Nº 12/2023 - INOVA - DIBT (11.00.46.21)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 14/02/2023 18:20)
RAIMUNDO APRIGIO DE MENEZES JUNIOR
1866226

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 12, ano: 2023, documento (espécie): DESPACHO., data de emissão: 14/02/2023 e o código de verificação: null