

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

JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO ALCALOIDE SINTÉTICO INÉDITO
TETRAHIDROISOQUINOLÍNICO 2-(7-METOXI-1,2,3,4-
TETRAHIDROISOQUINOLINA-1-IL) FENOL (MTF) EM MODELOS MURINOS DE
INFLAMAÇÃO AGUDA**

JOÃO PESSOA – PB

2023

JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA

**Avaliação anti-inflamatória do alcaloide sintético inédito
tetrahydroisoquinolínico 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-il) fenol
(MTF) em modelos murinos de inflamação aguda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Área de concentração: **Farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam

Co-orientadora: Profa. Dra. Láercia Karla Diega de Paiva Ferreira

JOÃO PESSOA – PB

2023



PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

Ata da 485ª (quadringentésima octogésima quinta) Dissertação de Mestrado do aluno do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos João Batista de Oliveira, candidato ao Título de “Mestre” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às quatorze horas (14h00) do dia dezenove de setembro do ano de dois mil e vinte e três (19/09/2023), em ambiente virtual de videoconferência através do aplicativo Google Meet, link: <https://meet.google.com/gjy-smhs-buh>, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno João Batista de Oliveira, candidato ao Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Giciane Carvalho Vieira, Ph.D em Farmacologia, Marianna Vieira Sobral, Ph.D em Farmacologia e Márcia Regina Piuvezam, Ph.D em Microbiologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, a Presidente da Comissão, professora Márcia Regina Piuvezam, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato João Batista de Oliveira, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado “Avaliação do potencial anti-inflamatório do alcaloide sintético 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolina-1-il) fenol (MTF) em modelos experimentais de inflamação aguda”. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação, declarou a Presidente achar-se o examinado João Batista de Oliveira legalmente habilitado a receber o Título de “MESTRE” em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Piuvezam (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIA REGINA PIUVEZAM
Data: 04/10/2023 09:03:03
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Giciane Carvalho Vieira (Examinadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br GICIANE CARVALHO VIEIRA
Data: 01/10/2023 23:35:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIANNA VIEIRA SOBRAL
Data: 02/10/2023 13:55:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

João Batista de Oliveira (Discente)

Documento assinado digitalmente
gov.br JOAO BATISTA DE OLIVEIRA
Data: 12/03/2024 13:34:45-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48a Oliveira, Joao Batista de.

Avaliação anti-inflamatória do alcaloide sintético inédito tetrahydroisoquinolínico 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-il) fenol (MTF) em modelos murinos de inflamação aguda / Joao Batista de Oliveira. - João Pessoa, 2023.

86 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.

Coorientação: Láercia Karla Diega de Paiva Ferreira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Farmacologia - Anti-inflamatório. 2. Alcaloide tetrahydroisoquinolina. 3. Lesão Pulmonar Aguda - LPA. 4. Peritonite. 5. Edema de pata. 6. Docking molecular. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Ferreira, Láercia Karla Diega de Paiva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615(043)

JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA

Avaliação do potencial anti-inflamatório do alcaloide sintético 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol (MTF) em modelos experimentais de inflamação aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Aprovado em 19 de setembro de 2023.

Orientadora - Dra. Márcia Regina Piuvezam
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Coorientadora - Dra. Láercia Karla Diega de Paiva Ferreira
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Avaliadora interna – Dra. Marianna Vieira Sobral
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Avaliadora externa – Dra. Giciane Carvalho Vieira
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

AGRADECIMENTOS

Eu passei a vida planejando a tão sonhada aprovação no mestrado. E mais uma vez, dois anos após a conclusão da minha graduação em farmácia, estou aqui escrevendo os agradecimentos para a minha dissertação. Eu consegui! De onde eu saí, sem dúvidas, inúmeros foram os momentos que pensei que não conseguiria chegar até aqui, mas muitos me deram o suporte que precisei.

Preciso começar agradecendo a Deus, foi ele que me foi base quando tudo que eu construí começou a desmoronar. Seu amor fraterno e eterno foi o combustível que mais precisei para chegar onde estou chegando. Também preciso agradecer logo de início a Santíssima Virgem Maria, minha mãe, protetora, intercessora, amiga e companheira. Foi resguardado em seu véu, no aconchego do seu colo, que pude ter coragem para caminhar e seguir meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Antônio Ribeiro de Oliveira Neto, conhecido como Seu Totô Barbeiro, e Maria de Fátima da Cruz, a Fátima de Dona Nair, por nunca terem desistido de mim. Obrigado por terem feito o possível e o impossível para que eu pudesse seguir nos meus estudos. Nunca foi fácil, ainda não será, mas farei o possível para recompensar cada dia que meu pai passou na barbearia para trazer o sustento para casa, nunca deixando faltar nada para minha mãe, meus irmãos e eu. À minha mãe, nem todo esforço do mundo seria suficiente para agradecer o tão quanto ela fez e faz por mim. Amo vocês e serei eternamente grato.

Aos meus irmãos Adriana, Conceição, Erivano, Flávio, João Paulo, Luiza, Pedro e Tiago, por me apoiarem e torcerem por mim. Mesmo de longe, guardo-os em meu coração.

À minha Vó Dona Nair, uma das maiores incentivadoras que tenho. Não apenas torce por mim, como confia em mim como farmacêutico. Toda gratidão!

Às minhas amigas Para a vida toda: Antonielle, Fabyelle, Jheniffer e Mayslla. Que o elo que construímos na infância permaneça sempre forte. Vocês são luz de Deus na minha vida, e serei sempre grato por poder compartilhar da amizade e companheirismo de cada uma de vocês.

Aos colegas de mestrado, agradeço pelo companheirismo durante as disciplinas, pelo apoio durante os trabalhos e provas realizadas. Vocês são excelentes profissionais e torço muito por cada um de vocês. Sucesso na jornada!

Aos meus irmãos que o EJC me fez conhecer, Ádylla, Gilvan e Luanna. Agradeço a Deus por terem colocado vocês no meu caminho, tornando os meus dias

mais leves, mais alegres, com muito mais histórias e risadas. Sou muito grato a Deus por vocês.

À Davi, um irmão que a vida me deu. Obrigado por ser paciente, compreensivo, amigo e tão especial. Mais que um parceiro para dividir o aluguel, você é um cúmplice de muitas aventuras. Nunca desista dos seus sonhos e nunca duvide do seu potencial. Você é grande e vai muito longe! Obrigado por tanto!

À Francisco agradeço pela cumplicidade, carinho, paciência, cuidado e amor compartilhado. Nos últimos anos, tão cheios de adversidades, você foi um suporte para que eu pudesse estar aqui hoje. Você sabe tudo o que tenho para lhe dizer. Obrigado por tanto, pelo ontem, pelo hoje e por todos os dias que estaremos compartilhando a vida. Sou grato.

À minha orientadora neste trabalho, Dra. Márcia Regina Piuvezam. Obrigado por tanto, professora. Mais que uma orientadora, você é um exemplo de honestidade, seriedade, ética e amor ao que faz. Não posso descrever o tão quanto já aprendi com seus ensinamentos nesses anos enquanto seu orientando. Saiba que és uma referência ímpar para cada um de nós que temos a honra de compartilhar conhecimento e fazer ciência com a senhora. Minha eterna gratidão por ter me aceitado enquanto orientando e ter me capacitado tanto.

A minha coorientadora neste trabalho e em toda jornada científica, Dra. Laércia Paiva. Obrigado por ter topado o desafio de me fazer cientista, e mais ainda, por não ter desistido de mim, mesmo havendo tantos tropeços neste nosso caminho. Você é uma referência de profissional e sou muito feliz de ter sido seu orientando na construção desse trabalho e na bancada, foi assim que aprendi tanto.

Agradeço à minha banca avaliadora: Marianna Sobral e Giciane Carvalho. Obrigado por terem aceitado o convite e por contribuírem para o aprimoramento deste trabalho. Vocês são pessoas que me inspiro muito. Obrigado por me tocarem com sua missão de vida, a de ensinar.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Imunofarmacologia – LIMFA: Alisson, Raquel, Bruno e Vinicius. Destaco ainda, Larissa Rodrigues, por toda compreensão, paciência e disponibilidade para me aperfeiçoar enquanto aluno apaixonado pela imunologia.

Agradeço a Cosmo e a Louise, meus amigos e parceiros de luta nesse caminho da iniciação científica e mestrado. Obrigado pelo suporte, pela amizade, pelo companheirismo e por compartilharem das loucuras que todo caminho nos

proporcionou, das noites mal dormidas às crises de ansiedade, do experimento que deu certo ao almoço lá no bloco de geografia. Obrigado!

Por fim, agradeço à Universidade Federal da Paraíba, por ter me acolhido, me dado oportunidades únicas e por ter me capacitado para ser um farmacêutico de excelência, um mestre de qualidade e agora, um professor apaixonado pelo faz. Farei o possível para honrar esse título.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda

Figura 2: Estrutura química do MTF

Figura 3: Esquema do protocolo de LPA induzida por LPS

Figura 4: Esquema do protocolo de peritonite induzida por carragenina

Figura 5: Esquema do protocolo de edema de pata

Figura 6: Modelo de *BOILED-Egg* do MTF

Figura 7: Análise histológica dos pulmões de camundongos com LPA

Figura 8: Interações 3D e 2D do MTF e dexametasona com a MAP quinase p38

Figura 9: Interações 3D e 2D do MTF e dexametasona com o receptor Toll like 4

Figura 10: Interações 3D e 2D do MTF e dexametasona com a MAP quinase ERK2

Figura 11: Interações 3D e 2D do MTF e dexametasona com o NFκB

Figura 12: Efeito do MTF sobre a manifestação de sinais inflamatórios

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da violação das regras de Lipinski para o MTF

Tabela 2: Resultados da energia de ligação por *docking* molecular

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: Percentual

µg: Micrograma

µL: Microlitro

5-HT: Serotonina

AA: Ácido Araquidônico

ABS: Absorbância

ADMET: Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

AECC: American-European Consensus Conference

AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais

ALI: Acute Lung Injury

AM1: Austin Model 1

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome

BALF: Fluido do Lavado Broncoalveolar

BHE: Barreira Hematoencefálica

BK: Bradicinina

CEUA: Comitê de Ética no Uso Animal

CG: Grupo Carragenina

clog P: Coeficiente de Partição

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX: Ciclooxygenase

DAD: Dano Alveolar Difuso

DAMPs: Padrões Moleculares Associados ao Dano

DEXA: Dexametasona

ERK: Quinase Regulada por Sinal Extracelular

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

FiO₂: Fração Inspirada de Oxigênio

g: Grama

h: Hora

HCl: Ácido Clorídrico

HE: Hematoxilina-Eosina

Hist: Histamina

i.m.: Intra-muscular

Ie: Índice de Edema

IL-10: Interleucina 10

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

Indo: Indometacina

IPeFarM: Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

kcal: Quilocaloria

kg: Quilograma

LPA: Lesão Pulmonar Aguda

LPS: Lipopolissacarídeo

M: Molar

M1: Macrófago tipo 1

M2: Macrófago tipo 2

MAPK-p38: Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno p38

mg: Miligramas

MIF: Macrophage Migration Inhibitory Factor

min: Minuto

mL: Mililitro

mmHg: Milímetro de Mercúrio

MTF: 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol

MVD: Molegro Virtual Docker

NaOH: Hidróxido de Sódio

NETs: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

NFkB: Fator Nuclear kappa B

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

nmol: Nanomol

P&D: Pesquisa e Desenvolvimento

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PaO₂: Pressão Parcial de Oxigênio

PB: Paraíba

PBS: Solução tampão-fosfato

PDB: Protein Data Bank

PGE₂: Prostaglandina

PGE₂: Prostaglandina E₂

pH: Potencial Hidrogeniônico

PKC: Proteína Quinase C

PLC: Fosfolipase C

PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão

Ps: Peso Seco

Pu: Peso Úmido

RPM: Rotação por Minuto

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

T_H17: Linfócito T helper 17

TLR: Receptor Toll-like

TLR4: Receptor Toll-like 4

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

TPSA: Área De Superfície Topológica Total

Treg: Linfócitos T Regulatórios

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UTI: Unidades de Terapia Intensiva

v.o: Via Oral

VM: Ventilação Mecânica

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Fundamentação Teórica	21
2.1. Lesão Pulmonar Aguda	21
2.2. Mediadores inflamatórios na inflamação aguda	26
2.3. 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol (MTF)	27
2.4. Estudos não clínicos	28
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. Material e métodos	33
4.1. Estudo da absorção oral e biodisponibilidade do MTF <i>in sílico</i>	33
4.2. Permeabilidade pela barreira hematoencefálica e riscos de toxicidade <i>in sílico</i>	33
4.3. Preparação do MTF para os ensaios <i>in vivo</i>	33
4.4. Animais	34
4.5. Protocolo de Lesão Pulmonar Aguda	34
4.6. Protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina	37
4.7. Quantificação de proteínas totais no BALF e no lavado peritoneal	38
4.8. Quantificação de citocinas	38
4.9. Protocolo de edema de pata induzido por agentes flogísticos	38
4.10. <i>Docking</i> molecular para avaliação da interação do MTF com alvos farmacológicos de interesse terapêutico	39
4.11. Análises estatísticas	40
5. Resultados	41
5.1. Análises do risco de toxicidade e parâmetros farmacocinéticos <i>in sílico</i> (ADMET) do MTF	41
5.2. Efeito do tratamento com MTF na migração de células totais no BALF de animais com LPA induzida por LPS	42
5.3. Efeito do tratamento com MTF na migração de células diferenciais no BALF de animais com LPA induzida por LPS	43
5.4. Efeito do tratamento com MTF na quantificação de proteínas totais no BALF e peso dos pulmões de animais com LPA induzida por LPS	45

5.5. Efeito do tratamento com MTF na imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias no BALF e no soro do sangue dos animais com LPS induzida por LPS	46
5.6. Efeito do tratamento com MTF na lesão tecidual pulmonar nos animais com LPS induzida por LPS	48
5.7. Efeito do tratamento com MTF na migração de células totais para o peritônio de animais com peritonite induzida por carragenina	49
5.8. Efeito do tratamento com MTF na migração de células diferenciais para o peritônio de animais com peritonite induzida por carragenina	50
5.9. Efeito do tratamento com MTF na imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias no lavado peritoneal dos animais com peritonite induzida por carragenina	51
5.10. Efeito do tratamento com MTF na quantificação de proteínas totais no lavado peritoneal dos animais com peritonite induzida por carragenina	53
5.11. Efeito do tratamento com MTF no edema de pata induzido por carragenina	54
5.12. Efeito do tratamento com MTF no edema de pata induzido por prostaglandina E2 (PGE2)	56
5.13. Efeito do tratamento com MTF sobre o edema de pata induzido por bradicinina (BK)	56
5.14. Efeito do tratamento com MTF no edema de pata induzido por serotonina (5-HT)	57
5.15. Efeito do tratamento com MTF sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80	58
5.16. Efeito do tratamento com MTF sobre o edema de pata induzido por histamina (Hist)	59
5.17. Alvos farmacológicos do MTF avaliados através de <i>Docking</i> molecular	59
6. Discussão	65
7. Conclusões	76
8. Referencial bibliográfico	77
9. Anexos	82

OLIVEIRA, J.B. Avaliação do potencial anti-inflamatório do alcaloide sintético 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-il) fenol (MTF) em modelos experimentais de inflamação aguda. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2023.

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo para a manutenção homeostática tecidual frente a estímulos lesivos. A lesão pulmonar aguda (LPA), condição inflamatória que precede a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), ganhou evidência em pacientes com COVID-19, pois, devido ao acúmulo de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias nos pulmões, ocorre disfunção pulmonar. Até o momento, não há uma farmacoterapia padrão para essa patologia, e inúmeros estudos estão direcionados a elucidar novos fármacos com potencial anti-inflamatório. Assim, o alcaloide sintético 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-il) fenol (MTF), surge como uma molécula promissora para agregar ao arsenal terapêutico de drogas anti-inflamatórias. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito anti-inflamatório do MTF, em modelos murinos de LPA, peritonite e edema de pata. No modelo experimental de LPA, camundongos BALB/c machos foram desafiados, por instilação nasal, com lipopolissacarídeo (LPS) e, uma hora após, foram tratados, oralmente, com MTF (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg ou 5 mg/kg) e, 24 horas após, foram coletados o fluido do lavado broncoalveolar (BALF), o soro e os pulmões. O tratamento com o MTF (2,5 mg/kg) reduziu a migração de neutrófilos independente de linfócitos e macrófagos no BALF, e diminuiu a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no BALF e no soro. Reduziu a formação do edema pulmonar e atenuou alterações histopatológicas, como edema, infiltrado celular e hemorragia. Para o modelo de edema de pata, camundongos Swiss fêmeas foram pré-tratadas com o MTF (2,5 mg/kg) e desafiados, via intraplantar, com os agentes flogísticos carragenina, prostaglandina (PGE₂), bradicinina (BK), serotonina (5-HT), composto 48/80 ou histamina e, para o modelo de peritonite os animais foram desafiados, via intraperitoneal, com carragenina (1%). O pré-tratamento com o MTF reduziu o edema de pata induzido pelos agentes flogísticos e, no peritônio, houve diminuição da migração de neutrófilos e células mononucleares, da permeabilidade vascular e das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Em adição, análises *in silico* mostraram que o MTF possui boa biodisponibilidade oral, com baixa toxicidade teórica, e que os efeitos anti-inflamatórios da molécula podem estar associados à inibição da via de sinalização TLR4/MAPK-p38. Logo, os resultados apresentados neste trabalho demonstram o potencial anti-inflamatório do MTF, colocando-o como uma molécula promissora no desenvolvimento de um fármaco que agregue ao arsenal terapêutico anti-inflamatório.

Palavras chaves: Alcaloide tetrahydroisoquinolina. Lesão Pulmonar Aguda. Peritonite. Edema de pata. Docking molecular.

OLIVEIRA, J.B. Evaluation of the anti-inflammatory potential of the synthetic alkaloid 2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl)phenol (MTF) in experimental models of acute inflammation. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2023.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological response of the body to maintain tissue homeostasis in the face of harmful stimuli. Acute lung injury (ALI), an inflammatory condition that precedes acute respiratory distress syndrome (ARDS), has gained evidence in patients with COVID-19 because the accumulation of neutrophils and pro-inflammatory cytokines in the lungs, promoting pulmonary dysfunction. So far, there is no standard pharmacotherapy for this pathology, and numerous studies are aimed at elucidating new drugs with anti-inflammatory potential. Thus, the synthetic alkaloid 2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol (MTF) appears as a promising molecule to add to the therapeutic arsenal of anti-inflammatory drugs. Therefore, the objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory effect of MTF in murine models of ALI, peritonitis and paw edema. In the experimental model of ALI, male BALB/c mice were challenged, by nasal instillation, with lipopolysaccharide (LPS) and, one hour later, they were orally treated with MTF (1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg or 5 mg/kg) and, 24 hours later, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), serum and lungs were collected. Treatment with MTF (2.5 mg/kg) reduced neutrophil migration, independent of lymphocytes and macrophages in BALF and decreased production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in BALF and serum. It reduced the formation of pulmonary edema and attenuated histopathological changes, such as edema, cellular infiltrate and hemorrhage. For the paw edema model, female Swiss mice were pre-treated with MTF (2.5 mg/kg) and challenged, intraplantar, with the phlogistic agents carrageenan, prostaglandin (PGE₂), bradykinin (BK), serotonin (5-HT), compound 48/80 or histamine and, for the peritonitis model, the animals were challenged intraperitoneally with carrageenan (1%). Pre-treatment with MTF reduced paw edema induced by phlogistic agents and, in the peritoneum, there was a decrease in the migration of neutrophils and mononuclear cells, in vascular permeability and in the cytokines TNF- α , IL-1 β and IL-6. In addition, *in silico* analyzes showed that MTF has good oral bioavailability, with low theoretical toxicity, and that the anti-inflammatory effects of the molecule may be associated with the inhibition of the TLR4/MAPK-p38 signaling pathway. Therefore, the results presented in this work demonstrate the anti-inflammatory potential of MTF, placing it as a promising molecule in the development of a drug that adds to the anti-inflammatory therapeutic arsenal.

Keywords: Tetrahydroisoquinoline alkaloid. Acute Lung Injury. Peritonitis. Paw edema. Molecular docking.

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório caracteriza-se como resultado de uma injúria tecidual, a qual é sucessiva à produção de mediadores, que provocam alterações bioquímicas, celulares e vasculares, a fim de restaurar a homeostase (FREITAS et al., 2019). Basicamente, inicia-se por uma fase aguda, na qual há aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, estimulando a migração e ativação de leucócitos, e a produção de mediadores pré e pós-formados, como citocinas, prostaglandinas, bradicinina, serotonina, histamina, dentre outros. Quando o estímulo agressor persiste, o processo torna-se crônico e adquire características diferentes, orquestrado pelas respostas adaptativas humoral e celular de alta especificidade e memória imunológica (FREITAS et al., 2019).

Em adição, quando observamos o processo inflamatório em sistemas isolados, verificamos danos teciduais importantes que comprometem o funcionamento correto dos processos fisiológicos. Como na Lesão Pulmonar Aguda (LPA), que é uma fase patológica que antecede a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), uma doença inflamatória pulmonar, na qual as manifestações clínicas observadas nos pacientes variam de dispneia, a curto prazo, até insuficiência respiratória refratária (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020). E, embora a taxa de mortalidade tenha diminuído desde a sua definição, estudos mais recentes indicam um risco de mortalidade de 29% a 42% (G et al., 2016); (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

A partir de estudos de SDRA, as alterações patológicas parecem prosseguir consistentemente por meio de fases discretas, mas sobrepostas: uma fase exsudativa precoce (aguda), uma fase proliferativa subaguda (em organização) e uma fase fibrótica tardia (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020). Quando os pulmões são submetidos a agentes lesivos, as células residentes teciduais do sistema imune inato, os macrófagos, reconhecem os antígenos invasores e liberam diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), onde essas desenvolvem funções importantes e determinantes no desenvolvimento da doença (MOKRA; KOSUTOVA, 2015). Dentre elas, podemos citar o recrutamento e ativação de neutrófilos, que são as células efetoras para o agravamento da LPA/SDRA (CASER et al., 2014; SIEGEL M, PARSONS P, 2018; I et al., 2019).

O manejo de doenças inflamatórias com drogas esteroides ou não esteroides é uma prática clínica tradicional. Os AINES inibem as etapas iniciais da biossíntese de prostaglandinas por meio da inibição da ciclooxigenase (COX), portanto são importantes drogas utilizadas para reduzir as consequências indesejáveis da inflamação. Todavia, o uso crônico de AINES está associado a toxicidades cardiovasculares, gastrointestinais e renais (PATIL et al., 2019).

Quando observamos a LPA/SDRA, como medida farmacoterapêutica, atualmente, emprega-se a utilização de broncodilatadores β 2-agonistas, que são capazes também de melhorar a depuração de fluidos (NIEMAN et al., 2015), como também o uso corticosteroides, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, especialmente durante a sua fase inicial (ARTIGAS et al., 2017).

Todavia, estudos com modelos experimentais de LPA/SDRA já mostram que algumas das diferentes doses de corticosteroides comumente usadas na clínica não apresentam os resultados almejados (SONG et al., 2019), na qual a segurança terapêutica ainda se mostra controversa (MOKRA et al., 2019). Considerando o exposto acima, o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios mais seguros continua a ser um assunto de grande interesse (PATIL et al., 2019).

A classe molecular dos alcaloides tem sido relatada por manejar vias pró-inflamatórias importantes para o desenvolvimento da LPA/SDRA (YQ et al., 2021). Porém, a sua obtenção e purificação exige um grande extrativismo vegetal, colocando as preparações sintéticas como uma proposta atraente do ponto de vista econômico (HALEY et al., 2021).

Dentre as preparações sintéticas, surgiu o alcaloide 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol (MTF) (SILVA, 2016). Sua estrutura química se assemelha ao MHTP, que também possui um núcleo tetrahidroisoquinolínico, e é conhecido por atividades biológicas importantes tanto em protocolos de inflamação aguda (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015; DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019), como em protocolos de inflamação pulmonar crônica (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Sintetizado por uma metodologia simples e de baixo custo, o estudo do MTF tem como finalidade avaliar se esse alcaloide pode ativar vias anti-inflamatórias, com ação melhorada dentro de protocolos experimentais de diferentes patologias.

Logo, esse trabalho teve como finalidade avaliar os efeitos do tratamento com MTF em diferentes modelos experimentais murinos de inflamação, buscando contribuir para o arsenal literário e terapêutico acerca das drogas com potencial ação anti-inflamatória. Em adição, buscou-se avaliar, *in silico*, parâmetros farmacocinéticos da molécula em estudo e também indicar possíveis alvos farmacológicos responsáveis por sua atividade biológica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Lesão Pulmonar Aguda

As doenças pulmonares afetam, de diversas maneiras, a qualidade de vida de milhões de indivíduos no mundo todo. Anualmente, cerca de 7,5 milhões de pessoas morrem em decorrências de complicações por doenças pulmonares (GBD 2015 CHRONIC RESPIRATORY DISEASE COLLABORATORS et al., 2017). Entre essas, inclui-se uma ampla gama de patologias, como infecções respiratórias agudas, pneumonia, doenças pulmonares obstrutivas, doença pleural, além de malignidades do trato respiratório. Há anos que novas terapêuticas vêm sendo investigadas para reduzir esses dados e garantir um melhor prognóstico para essas comorbidades.

A *Acute Respiratory Distress in Adults* foi um termo cunhado em 1967 para classificar cerca de 272 pacientes com uma forma particular de insuficiência respiratória, onde estavam sendo tratados com ventilação mecânica, e 12 desses pacientes manifestaram sinais de dispneia grave, taquipneia, cianose, baixa complacência pulmonar, como também apresentaram infiltrados difusos no exame radiológico do tórax (ASHBAUGH et al., 1967).

Entre esses 12 pacientes, sete vieram a óbito e a análise microscópica mostrou que ao menos cinco morreram em decorrência do curso da doença, mostrando condições histológicas de microatelectasias, congestão vascular, hemorragia, edema pulmonar e formação de membranas hialinas que revestem a superfície alveolar (ASHBAUGH et al., 1967).

A classificação dessa doença não foi nada simples e diversas frentes de pesquisadores debateram sobre o melhor termo para nomenclatura de tal enfermidade. Foi em 1992, quase vinte e cinco anos após a sua primeira classificação, na Espanha, em um evento chamado *American-European Consensus Conference on Acute Respiratory Distress Syndrome* (AECC) (BERNARD et al., 1994), que o termo e os critérios para diagnóstico clínico foram então estabelecidos e, por sua vez, para atender as exigências do acometimento epidemiológico da doença, o termo “adulto” foi substituído para “agudo”, visto que essa patologia acometia também crianças e jovens, ficando então Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (BERNARD et al., 1994).

Em 1994, a AECC publicou as condições clínicas para definição e diferenciação da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e da SDRA, onde ambas apresentam início agudo e são caracterizadas por hipoxemia refratária à oxigenoterapia, como pelo achado de infiltrados pulmonares bilaterais no exame radiológico de tórax, diferenciando-se de acordo com sua relação da pressão parcial de oxigênio – $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg na LPA e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mmHg para a SDRA (BERNARD et al., 1994).

As condições clínicas dos pacientes acometidos com a síndrome ainda levaram especialistas a subdividir a SRDA de acordo com sua gravidade, baseando-se também nas condições dos sinais vitais, classificando essa em leve, grave e moderada (RANIERI et al., 2012). Aos poucos, o termo LPA foi descontinuado na prática clínica, visto a dificuldade dos atendentes em diferenciar a SDRA leve da LPA, considerando a última como uma condição mais leve da síndrome, logo a LPA é usada quando a intenção é avaliar as alterações morfológicas presentes na enfermidade (RANIERI et al., 2012).

Existem diversos fatores que podem pré-dispor a LPA/SRDA, tais como doenças vasculares de colágeno, sepse, drogas e álcool, inalantes, choque, hemorragia pulmonar, vasculite por irradiação e pneumonia (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016; LONG; MALLAMPALLI; HOROWITZ, 2022).

Porém, evidências já mostraram que indivíduos conseguiram desenvolver a SRDA sem fatores definidos, embora sua melhora seja mais rápida e com maior facilidade de responder às terapêuticas atualmente utilizadas para melhora do quadro (HARRINGTON et al., 2018). E os dados são relevantes, visto que a taxa de mortalidade é de 27% para SDRA leve, 32% para SDRA moderada e 45% para SDRA grave (FANELLI; RANIERI, 2015).

Uma situação emergente para a situação atual é a possível piora para os pacientes que são acometidos com SARS-CoV-2, visto que a doença grave de COVID-19 é caracterizada pelo desenvolvimento da SDRA, para a qual o suporte principal do tratamento é representado pela ventilação mecânica (ZAREIFOPOULOS et al., 2020).

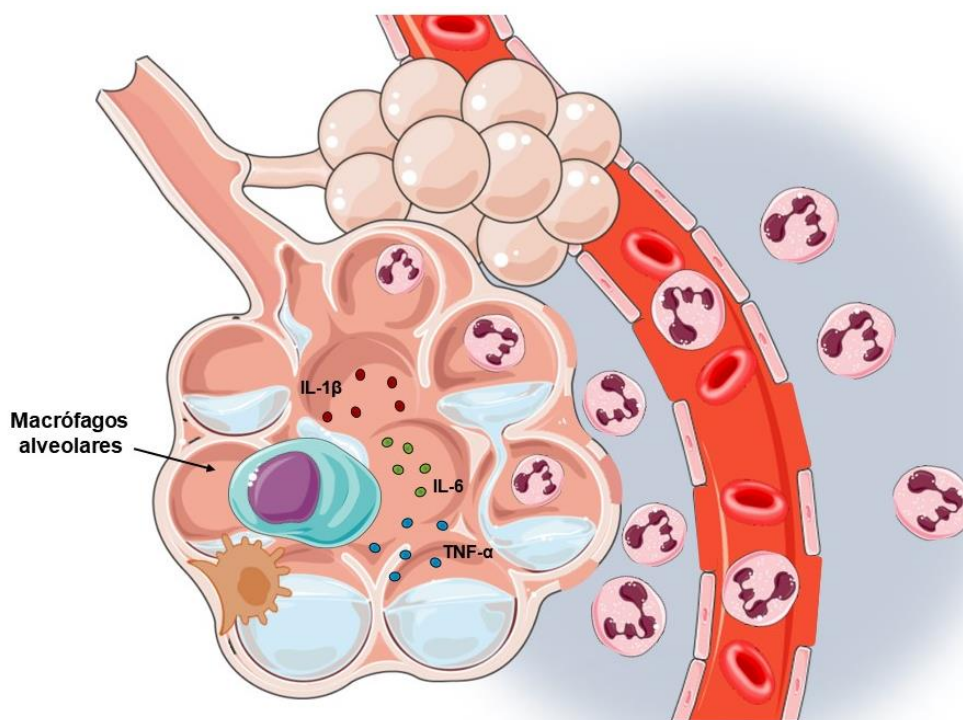
Os dados epidemiológicos de ocorrência e mortalidade de LPA/SRDA são alarmantes, quando observados a urgência do atendimento para um bom prognóstico, esses tornam-se ainda mais preocupantes. Além do óbito em decorrência da gravidade da doença (FANELLI; RANIERI, 2015), estudos mostraram, ainda, que a

taxa de mortalidade hospitalar gira em torno de 40% (MOKRA et al., 2019), onde, nos Estados Unidos, a LPA é diagnosticada em 150 mil pacientes por ano, observando de 38,5 a 50% de mortes, e de 41,1 a 57,9% para SDRA, além de acometer um em cada dez pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016).

Nacionalmente, estudos prospectivos, mostram que a incidência no Brasil é em torno de 6,3/100.000 hab/ano para SDRA e cerca de 3,8/100.000 hab/ano para LPA, onde a mortalidade para esses pacientes foi de 38,5%, em torno de 28 dias, e a mortalidade intra-hospitalar foi de 49,2% e não diferindo entre os pacientes com LPA sem SDRA e SDRA (CASER et al., 2014b).

A disfunção epitélio-endotelial se mostra como um ponto importante no desenvolvimento da Lesão Pulmonar Aguda (Figura 1, descrição no decorrer do texto). Quando submetido à exposição de agentes lesivos, as células teciduais são capazes de liberar diversos mediadores inflamatórios importantes para o processo inflamatório e desenvolvimento da doença, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (LONG; MALLAMPALLI; HOROWITZ, 2022; MOKRA; KOSUTOVA, 2015).

Figura 1: Fisiopatologia da Lesão Pulmonar Aguda



Fonte: Elaborado pelo autor. Descrição no decorrer do texto.

A IL-1 β e o TNF- α já possuem suas atividades bem definidas no desenvolvimento da patologia (MOKRA; KOSUTOVA, 2015; MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020). São liberadas por células residentes teciduais, os macrófagos, os quais são membros importantes da imunidade inata e destacam-se por serem a primeira linha de defesa contra microrganismos, reconhecendo agentes indutores como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), a exemplo dos receptores do tipo toll (TLR) (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

Além disso, os macrófagos são capazes de liberar exossomos, onde esses podem contribuir para o desenvolvimento da LPA devido a sua capacidade de interromper a expressão de proteínas de junção das células, o que favorece a resposta inflamatória e o rompimento da barreira estrutural (YUAN; BEDI; SADIKOT, 2018). A liberação dessas citocinas pelos macrófagos é capaz de ativar o endotélio dos vasos sanguíneos, aumentando a expressão de moléculas de adesão, recrutando e ativando neutrófilos (CHENG; LI; CHEN, 2021; WANG et al., 2023).

Os neutrófilos ativados são recrutados e se acumulam no espaço aéreo, em seguida, liberam diversos mediadores como proteinases, espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento e citocinas. Somado à liberação de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), liberado dentro do ambiente local, favorece ainda mais a resposta pró-inflamatória, causando mais lesão endotelial e epitelial alveolar, colocando esse evento como o centro patológico da LPA (PARK et al., 2019).

A disseminação de excesso de líquido nos espaços aéreos dos alvéolos, decorrente do aumento da permeabilidade vascular e do dano alveolar difuso, juntamente com o declínio na produção do surfactante, resulta no colapso alveolar, aumento do espaço morto e dificulta as trocas gasosas (SIEGEL M, PARSONS P, 2018).

O dano alveolar difuso (DAD), é um evento dividido em três fases: fase aguda/precoce ou exsudativa, organizadora ou proliferativa e tardia ou fibrótica. Em uma fase exsudativa, o DAD faz com que as células epiteliais e endoteliais produzam fatores que reagem à lesão e à morte, é possível verificar a presença de membranas hialinas distintivas que alinham espaços alveolares, além de edema, que também é frequentemente identificado, podendo haver ainda hemorragia alveolar aguda. Devido

à perda da integridade celular, os alvéolos são preenchidos com fluido de edema proteico, o que resulta em comprometimento das trocas gasosas (LONG; MALLAMPALLI; HOROWITZ, 2022).

As membranas hialinas começam a se organizar à medida que o DAD continua na fase de organização e o tecido de granulação se desenvolve nos espaços alveolares. A diluição e a disfunção do surfactante pulmonar levam ao colapso dos alvéolos e à diminuição da complacência pulmonar. Dentro de alguns dias, o fluido do edema é gradualmente eliminado e a fase proliferativa segue-se, com proliferação de células alveolares tipo II e fibroblastos, podendo ser encontrado metaplasia escamosa (CHENG; LI; CHEN, 2021).

A LPA contínua pode ocorrer mostrando fases agudas e de organização simultaneamente. Na ausência de recuperação, alguns pacientes podem evoluir para um estágio fibrótico caracterizado por fibrose difusa e outras alterações na estrutura pulmonar, densa do colágeno e hialinização das paredes alveolares (KAUKONEN et al., 2015; MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

Embora a mortalidade seja elevada, os avanços na terapêutica e intervenções ainda não se mostram eficazes a curto prazo e, a principal intervenção é o manejo do paciente. No que tange as medidas não farmacológicas, o uso de ventilação mecânica (VM) é comumente utilizado, porém, com configurações inadequadas da ventilação, pode causar uma lesão pulmonar secundária induzida pelo ventilador que, quando combinada com uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica, pode atuar no agravamento da lesão pulmonar evoluindo para SDRA (JIN et al., 2021).

A administração de terapêuticas farmacológicas também é realizada na busca da melhoria das condições patológicas, juntamente com o uso da VM. Para tal, atualmente, são utilizados broncodilatadores β 2-agonistas, que são capazes também de melhorar a depuração de fluidos e de favorecer folga mucociliar, embora não tenham estudos que apresentem aumento na sobrevida dos pacientes (ARTIGAS et al., 2017; SINGH et al., 2014; WU; LIN; ZHAO, 2015).

Também são usados na prática clínica os corticosteroides, considerados a terapia ideal para SDRA devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, especialmente durante a fase exsudativa inicial (ARTIGAS et al., 2017; DEQUIN et al., 2023) e no dano hemorrágico alveolar difuso, além de promover efeitos antifibróticos do cortisol. Porém, o uso desses medicamentos não se mostrou uma proposta eficaz para

pacientes de alto risco (LONG; MALLAMPALLI; HOROWITZ, 2022; MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020; PANNU; O’GARA, 2018)

O uso dessas classes de medicamentos, embora inalados, pode ainda levar a uma série de efeitos colaterais, tais como tremor muscular e desequilíbrio da ventilação-perfusão, além disso, a SDRA enfrenta três desafios farmacológicos relativamente únicos. Primeiramente, os pacientes com SDRA são vulneráveis devido à disfunção de múltiplos órgãos concomitantemente, portanto eles podem não tolerar os efeitos indesejados das drogas; segundo, a administração de medicamentos inalatórios é impedida pelo fluido proteico nos alvéolos lesados e pela distribuição não homogênea da ventilação, onde a área do pulmão lesada não é ventilada; e, por último, a SDRA é heterogênea em sua fisiopatologia subjacente, portanto é improvável que o direcionamento a uma via melhore os resultados da maioria dos pacientes (ARTIGAS et al., 2017; BERNARD et al., 1994).

2.2. Mediadores inflamatórios na inflamação aguda

A inflamação é um componente complexo e necessário da resposta a estímulos biológicos, químicos ou físicos, e os eventos celulares e moleculares que iniciam e regulam as interações entre os vários atores do processo inflamatório (GERMOLEC et al., 2018).

De forma geral, a inflamação pode ser desencadeada por diferentes fatores, incluindo um coágulo sanguíneo, distúrbios do sistema imunológico, câncer, infecção, exposição química, lesão física ou condições neurológicas prévias, como Alzheimer ou depressão. Em particular, muitas infecções por patógenos virais, bacterianos, fúngicos e protozoários podem causar a inflamação (ROE, 2021).

Na fase aguda da resposta inflamatória, as células do sistema imunológico migram para o local da lesão em uma sequência de eventos cuidadosamente orquestrados, facilitados por mediadores solúveis, como citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda. Dependendo do grau da lesão, esta fase aguda pode ser suficiente para sanar o dano e iniciar os processos de cicatrização (GERMOLEC et al., 2018).

Sob certas condições, diferentes fatores podem facilitar a inflamação pela indução da produção de interleucina IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , proteína C-reativa, aminas vasoativas, dentre outras moléculas pró-inflamatórias. Assim, anormalidades do

“feedback anti-inflamatório sistêmico” e/ou “hiperatividade” dos fatores pró-inflamatórios locais podem desempenhar um papel na patogênese de diferentes doenças (ELENKOV et al., 2005). Essas anormalidades e a falha dos sistemas adaptativos em resolver a inflamação afetam o bem-estar do indivíduo, incluindo parâmetros comportamentais, qualidade de vida e sono, além de índices de saúde metabólica e cardiovascular (ELENKOV et al., 2005).

A inflamação persistente, seja como resultado da exposição prolongada a estímulos ou de uma reação inadequada contra auto moléculas, pode levar à fase crônica, em que danos teciduais e fibrose podem ocorrer (GERMOLEC et al., 2018). Essas condições podem ter consequências médicas de longo alcance, porque a inflamação crônica ou frequente pode propiciar um ambiente favorável para o desenvolvimento de neoplasias e/ou iniciar doenças autoimunes (ROE, 2021).

2.3. 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol (MTF)

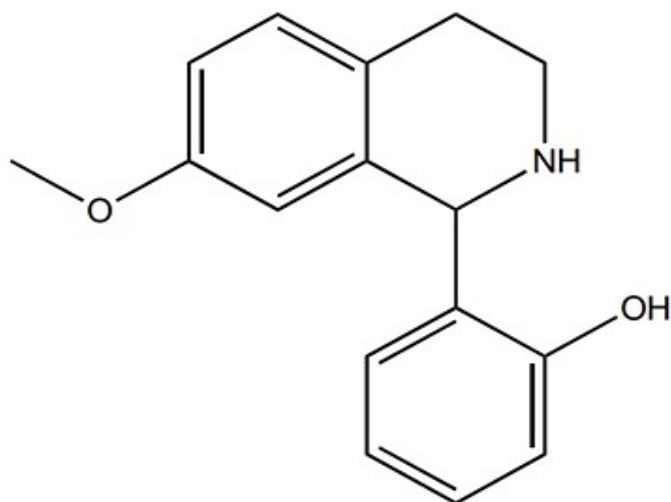
Os alcaloides são considerados as drogas mais antigas usadas no tratamento de muitas doenças e, algumas moléculas, atualmente, ainda são usadas na medicina moderna, como a morfina e a escopolamina (BHATTACHARYA et al., 2014; YQ et al., 2021). Entretanto, a obtenção de alcaloides através de meios naturais, extraído de espécies botânicas exige um grande extrativismo vegetal e, muitas vezes, a purificação das amostras exige um alto custo para o processo, inviabilizando, muitas vezes, a utilização dessas moléculas. Logo, as preparações sintéticas surgiram como uma proposta bastante atraente do ponto de vista econômico e sustentável (HALEY et al., 2021).

Novos alcaloides são descobertos e desenvolvidos por meio da síntese química e, dentre as preparações sintéticas, o MTF 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol (Figura 2), codificado MTF, apresenta-se como uma molécula inédita de estrutura química promissora para o desenvolvimento de estudos, a fim de verificar sua atividade biológica.

O esqueleto molecular do MTF possui a estrutura semelhante de outro alcaloide sintético, o MHTP, que possui atividades anti-inflamatórias já relatadas em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015; PAIVA FERREIRA et al., 2018). O MHTP também foi capaz de atenuar a LPA induzida por LPS, via sinalização p38MAPK/p65-NFκB-TLR4 dependente (DO NASCIMENTO

XAVIER et al., 2019), direcionando a investigação da atividade farmacológica do alcaloide em estudo.

Figura 2: Estrutura química do MTF



Fonte: Elaborado pelo autor

2.4. Estudos não clínicos

As pesquisas iniciais se baseiam na triagem de espécies ou moléculas potencialmente ativas biologicamente, que possam tornar-se atrativas para o desenvolvimento de uma nova terapia, ou de uma terapia melhorada. Para tanto, esses estudos podem ser realizados *in silico*, *in vitro* ou *in vivo*, como instruído no “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, criado pela ANVISA (ANVISA, 2013).

Os estudos *in silico*, expressão usada com o significado “executado em computador”, são empregados nos estágios iniciais da Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), na seleção e otimização de moléculas com maior potencial de atividade terapêutica. Todavia, não são estudos conclusivos, mas sim direcionadores, excluindo alvos não promissores e apontando possíveis sítios de ação com melhor eficácia, redução de efeitos toxicológicos e seletividade em mecanismos de ação (MODA; ANDRICOPULO, 2007).

O principal objetivo dos estudos *in silico* é avaliar os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), investigando a farmacocinética, que é a fase responsável pelo insucesso de até 30% do desenvolvimento de novos medicamentos. Dessa forma, pode-se traçar um bom perfil no que tange a absorção e distribuição, para alcançar o órgão alvo em uma concentração apropriada; também no metabolismo, onde pode ocorrer a inativação/modificação do fármaco; e excreção, na qual o fármaco é liberado do corpo para que o mesmo não venha, posteriormente, provocar toxicidade (PEREIRA, 2019).

Outra perspectiva desses ensaios é investigar sítios de ligação de moléculas já conhecidas, a fim de projetar e sintetizar moléculas com efeitos colaterais reduzidos e/ou efeitos terapêuticos otimizados (DIZDAROGLU et al., 2020). O *docking* molecular, ou modelagem molecular, é uma perspectiva em evidência na área da química medicinal (LI; FU; ZHANG, 2019). Trata-se de uma abordagem computacional baseada em um processo natural celular, envolvendo pequenas moléculas como ligantes em configurações apropriadas para interagir com um receptor para a formação de um complexo estável, mostrando um método fácil, barato, eficaz e que viabiliza a economia de tempo e material (SALMASO; MORO, 2018).

O uso de métodos alternativos *in vitro* em substituição a estudos *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente, são recomendados em diversos protocolos de avaliação farmacológica e toxicológica (ANVISA, 2013). Os métodos *in vitro* são utilizados com células isoladas, a fim de avaliar a toxicidade, tolerância local, produção e liberação de mediadores da comunicação celular, como citocinas, bem como avaliar a interação de ligantes com receptores celulares específicos. Diversos são os protocolos experimentais de avaliação *in vitro*, dentre eles, podemos citar a interação de hormônios em células de diferentes sistemas (ROSSI et al., 2020), identificação de alvos terapêuticos em oncologia (ZHANG; XIE, 2019), avaliação da concentração molecular citotóxica em modelos de viabilidade celular (LEITE et al., 2016), dentre muitos outros.

Já os ensaios *in vivo*, embora sejam alvos de diversas discussões éticas, mostram-se ainda como uma das principais ferramentas para validação da segurança, eficácia e tolerância de novos candidatos a fármacos e formulações (CASTRO MORENO, 2019; ANVISA, 2013). É um importante recurso que possibilitou inúmeras

contribuições para o cuidado à saúde, como a descoberta de vacinas e tratamentos para doenças que possuem impactos na saúde pública (PELUCI et al., 2017).

Diversas espécies são empregadas na pesquisa biomédica, e a escolha da espécie mais adequada depende do objetivo do estudo e deve ser baseada nas características do animal, sendo que camundongos e ratos são os animais mais utilizados nesses estudos (ANVISA, 2013; PELUCI et al., 2017). Embora tenham limitações, o emprego dos modelos *in vivo* favorece uma observação mais robusta dos efeitos biológicos de moléculas investigadas, tais como as reações adversas características de efeitos toxicológicos (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015), alterações metabólicas sistêmicas (COLLAUD et al., 2019), alteração de processos fisiológicos importantes, tais como frequência respiratória e cardíaca (SCHIEFER et al., 2020), mortalidade, dentre muitos outros que não podem ser observados com precisão em outros modelos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o alcaloide inédito 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-1-il) fenol, codificado MTF, em estudos *in sílico* e seu efeito anti-inflamatório em modelos experimentais murinos de inflamação aguda.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Predizer, *in sílico*, os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), bem como, as possíveis interações do MTF em alvos moleculares de vias de sinalização envolvidas na resposta inflamatória aguda;
- Avaliar os efeitos do tratamento oral com MTF, em diferentes doses, no modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS), buscando:
 - ✓ Quantificar as células inflamatórias totais e diferenciais (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) que migram para o espaço alveolar via o fluido do lavado broncoalveolar (BALF);
 - ✓ Determinar a permeabilidade vascular pulmonar pelo influxo de proteínas para o espaço broncoalveolar dos animais;
 - ✓ Quantificar a liberação local e sistêmica de citocinas importantes no desenvolvimento da doença, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α ;
 - ✓ Analisar as lesões teciduais pela avaliação histológica dos tecidos pulmonares dos camundongos com LPA experimental;
 - ✓ Determinar a dose farmacológica para atenuar o processo inflamatório na LPA em camundongos.
- Investigar o efeito antiedematogênico do MTF, utilizando o modelo experimental de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos, tais como: carragenina, PGE2, bradicinina, serotonina, composto 48/80 e histamina;

- Analisar o efeito antiedematogênico e anti-inflamatório do MTF em modelo experimental de peritonite induzida por carragenina, observando o lavado peritoneal dos animais desafiados através da quantificação de:
 - ✓ Células migratórias para a cavidade peritoneal;
 - ✓ Concentração de proteínas totais;
 - ✓ Liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Estudo da absorção oral e biodisponibilidade do MTF *in silico*

Para as análises de absorção oral, biodisponibilidade e toxicidade utilizou-se o software Osiris Data Warrior 5.0 (SANDER et al., 2015). A predição da absorção oral foi analisada pelo parâmetro de porcentagem da taxa de absorção do MTF e da dexametasona por meio do valor da área de superfície topológica total (TPSA) mediante a equação: $\%ABS = (109 - (TPSA \times 0.345)) \times 100 / \text{valor máximo}$. Em seguida, aplicou-se a regra dos cinco de Lipinski, a qual consiste em determinar as chances de biodisponibilidade oral utilizando 5 parâmetros: coeficiente de partição ($\log P$) ≤ 5 , peso molecular ≤ 500 daltons, número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 e número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (EMAMI et al., 2021; LIPINSKI et al., 1997; MALIK et al., 2017).

4.2. Permeabilidade pela barreira hematoencefálica e riscos de toxicidade *in silico*

Para a análise de predição de atravessar a barreira hematoencefálica foi empregada a plataforma SwissADME, sendo observados os parâmetros lipofilicidade (WLOGP) e polaridade (TPSA) para determinação da capacidade de atravessar as membranas biológicas, utilizando o Método de Permeação Estimada do Cérebro ou Intestino (BOILED-Egg) (DAINA; ZOETE, 2016).

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

4.3. Preparação do MTF para os ensaios *in vivo*

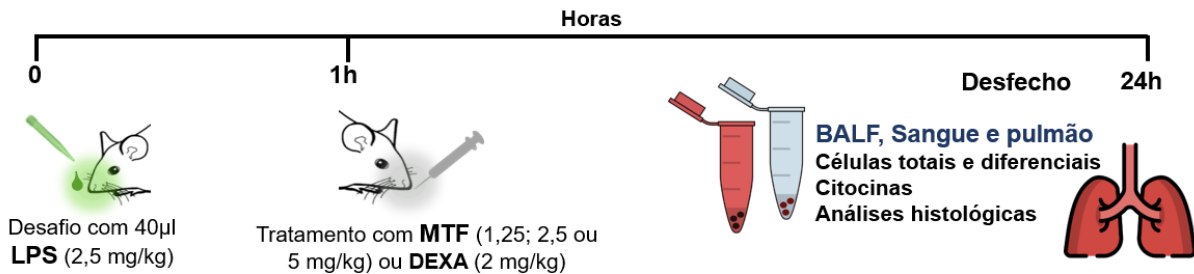
Para administração oral do alcaloide MTF (100 $\mu\text{L}/10$ g animal), foi realizada uma suspensão, onde à concentração de 0,25 mg/mL (doses 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg) de MTF foram adicionados 50 μL de Ácido Clorídrico (HCl) 1M e, em seguida, 500 μL de solução salina. O pH das suspensões foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (NaOH).

4.4. Animais

Para o protocolo de Lesão Pulmonar Aguda induzida por lipopolissacarídeo, foram usados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c machos. Já para os protocolos de peritonite induzida por carragenina e edema de pata induzida por agentes flogísticos, foram usados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem Swiss. Ambas as linhagens com idade entre 6-8 semanas, pesando de 20 a 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, à base de ração do tipo pellets (PURINA) durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental foi constituído de 6 animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia e a anestesia dos animais foram realizadas por administração intra-muscular (i.m.) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de cetamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais utilizados nesse trabalho foram fornecidos pela Unidade de Produção Animal Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM/UFPB, João Pessoa, PB. Os procedimentos experimentais desse trabalho foram submetidos ao Comitê1 de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) e aceitos sob a certidão de nº 3432290419.

4.5. Protocolo de Lesão Pulmonar Aguda (Figura 3)

Figura 3: Esquema do protocolo de LPA induzida por LPS



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.1. Protocolo experimental de indução da LPA com LPS

Para induzir a lesão pulmonar aguda, os animais foram previamente anestesiados como descrito anteriormente (item Animais) e receberam por instilação nasal, 40 µL de uma solução contendo LPS (LPS de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich®) na dose de 2,5 mg/kg diluído em salina estéril e preparado imediatamente antes do uso.

4.5.2. Tratamento dos animais no protocolo de LPA induzida por LPS

Para o protocolo experimental de LPA, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=6): Basal, que representam os animais saudáveis, desafiados e tratados com solução salina (veículo da molécula teste); LPS, que representam os animais doentes, desafiados com solução contendo LPS e não tratados; MTF nas doses de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg ou 5 mg/kg, que representam os animais desafiados com LPS e tratados com o MTF nas distintas doses; DEXA, que representam os animais desafiados com LPS e tratados com a droga padrão dexametasona (2 mg/kg). Todos os tratamentos ocorreram 1 hora após o desafio com LPS.

4.5.3. Coleta do Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) nos animais no protocolo de LPA induzida por LPS

Para coleta do BALF, 24 horas após o desafio com LPS, os animais foram eutanasiados, em seguida a traqueia foi exposta com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e, então, foi inserido um cateter periférico IV-18G de poliuretano (Descarpack) para a coleta do BALF. No cateter, foi conectada uma seringa contendo 0,5 mL de PBS gelado, onde este foi administrado na traqueia e direcionado para o pulmão, fazendo três lavagens consecutivas. O BALF coletado foi então transferido para um tubo tipo eppendorf, onde foi centrifugado (centrífuga CR422, JONAM) em 1500 RPM a 4°C por 6 minutos. O sobrenadante foi então coletado para quantificação.

4.5.4. Coleta do sangue pelo plexo braquial nos animais no protocolo de LPA induzida por LPS

Para quantificação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, o sangue foi coletado pelo plexo braquial dos animais experimentais para a obtenção do soro. Após a anestesia dos animais, foi realizado um corte no plexo braquial, e o sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur, com a qual foi aspirado cerca de 500 a

1000 µL de sangue. O sangue foi armazenado em tubos do tipo eppendorf e estocados em geladeira por cerca de 4 horas para facilitar formação dos coágulos e coleta dos soros, que foi feita após a centrifugação do sangue (amostra de 300g), a uma temperatura de 4°C, por 10 min. Os soros foram alicotados, etiquetados e congelados a -20 °C para as dosagens das citocinas.

4.5.5. Razão do peso úmido/peso seco dos pulmões nos animais no protocolo de LPA induzida por LPS

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

4.5.6. Processamento histológico do tecido pulmonar dos animais no protocolo de LPA induzida por LPS

Para avaliar as características histológicas pulmonares dos camundongos, ambos os lóbulos direito e esquerdo do pulmão de cada animal foram coletados 24 horas após o desafio com LPS. Para isso, após a eutanásia, o tórax do animal foi aberto com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e, então, os pulmões foram coletados.

O órgão foi embebido em fixadores: formalina tamponada por 72 horas e, logo após, em álcool etílico 70% até o momento do corte histológico. Os pulmões fixados foram inicialmente hidratados. Após esse procedimento, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%). Após a remoção do álcool, o tecido pulmonar passou duas horas imersos em xilol e, em seguida, em parafina líquida (parafina histológica - ERVIEGAS, São Paulo, SP), e, posteriormente, o tecido foi transferido para o molde (fôrma histológica) contendo parafina líquida. Os blocos de parafina assim formados foram retirados das fôrmas e realizados cortes histológicos, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300) para obtenção da confecção das lâminas.

Com os cortes aderidos às lâminas, estes foram, então, corados com Hematoxilina-Eosina (HE), e, depois, foi realizada a montagem das lâminas,

preparando-as para as análises histológicas. Como meio de montagem, foi utilizado o bálsamo do Canadá. Cada grupo de animais teve seis lâminas coradas e analisadas.

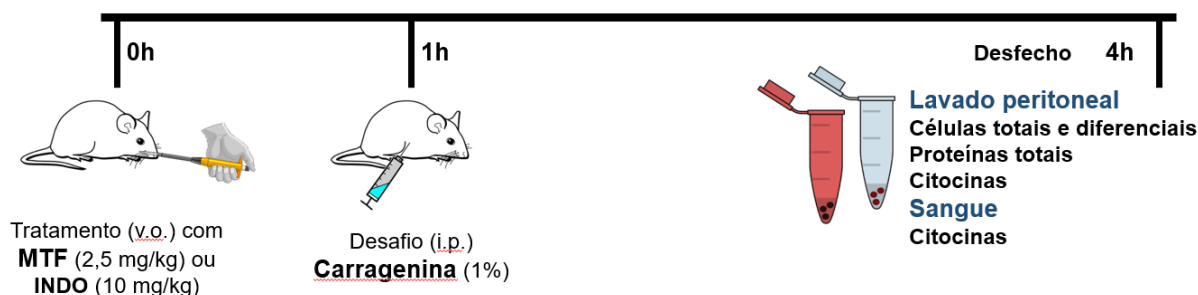
Os parâmetros analisados foram: infiltrado celular, hemorragia alveolar e edema intersticial. Para quantificação, foi considerado o score histológico com as seguintes pontuações: 0 - Ausência de alterações histológicas; 1 = Suave: menos de 25% do campo analisado; 2 = Moderado: 25-49% do campo analisado; 3 = Acentuado: 50-75% do campo analisado; e 4 = Muito acentuado: mais de 75% do campo.

4.6. Protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina

Camundongos fêmeas *Mus musculus* da linhagem Swiss foram divididos nos grupos (n=6): Basal, que correspondem aos animais do controle negativo, não desafiados com carragenina, apenas com salina; o grupo controle positivo corresponde aos animais que foram submetidos ao desafio com carragenina, mas não foram tratados; MTF, pré-tratados por via oral (v.o) com o alcaloide na dose de 2,5 mg/kg e desafiados com carragenina; e o grupo Indo, que representa os animais pré-tratados com a droga padrão indometacina (10 mg/kg) e desafiados com carragenina.

Inicialmente, todos os animais foram pré-tratados e, 1 hora após ao pré-tratamento, foi administrado por via intraperitoneal uma solução de carragenina a 1%. Após 4 horas do desafio com o agente flogístico, os animais foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com PBS, massageada por 30 segundos e coletado o fluido do lavado peritoneal. O fluido foi tratado de forma semelhante ao BALF dos animais no protocolo de LPA induzida por LPS. A amostra biológica foi utilizada para quantificação de células inflamatórias, citocinas pró-inflamatórias e edema intersticial através da quantificação de proteínas totais (Figura 4).

Figura 4: Esquema do protocolo peritonite induzida por carragenina



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7. Quantificação de proteínas totais no BALF e no lavado peritoneal

Os sobrenadantes obtidos da centrifugação das amostras biológicas foram usados para quantificar as proteínas nas regiões broncoalveolar e/ou peritoneal, utilizando o kit SENSIPROT (LabTest. Lagoa Santa - MG). O ensaio foi realizado em conformidade com as especificações do fabricante. A absorbância foi lida em 650 nm em espectrofotômetro (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices).

4.8. Quantificação de citocinas

O sobrenadante obtido pelo BALF e pelo lavado peritoneal, bem como os soros dos animais dos diferentes grupos foram dosados pelo método do ensaio imunoenzimático ELISA para as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 (eBioscience, Inc. Science Center Drive, San Diego - USA).

4.9. Protocolo de edema de pata induzido por agentes flogísticos

4.9.1. Tratamentos dos animais no protocolo de edema de pata

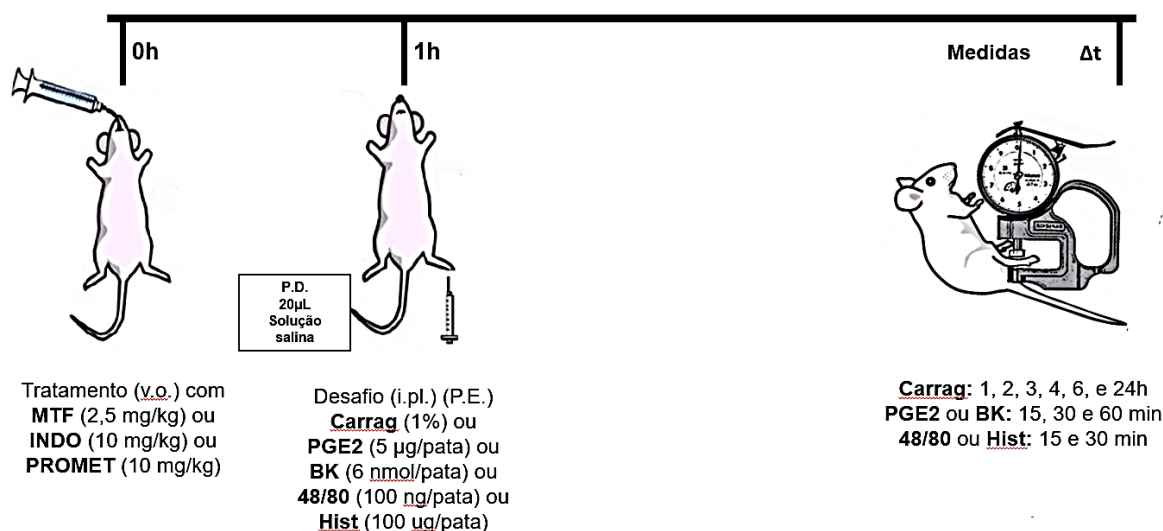
Para o protocolo experimental de edema de pata, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=6): Basal, que correspondem aos animais do controle negativo, não desafiados com agentes flogísticos, apenas com salina; o grupo controle positivo corresponde aos animais que foram submetidos ao desafio com os agentes flogísticos (carragenina, prostaglandina E2, bradicinina, composto 48/80, histamina ou serotonina) e que não foram tratados; MTF, pré-tratados por via oral (v.o) com o alcaloide na dose de 2,5 mg/kg e, posteriormente, desafiados com os agentes flogísticos citados; e o grupo com a droga padrão (indometacina ou prometazina na dose 10 mg/kg cada), em que os animais também foram desafiados. Todos os tratamentos ocorreram 1 hora antes do desafio com o agente flogístico.

4.9.2. Protocolo experimental de indução de edema de pata por diferentes agentes flogísticos

Os camundongos Swiss foram pré-tratados e, uma hora após, receberam, por via intraplantar, na pata esquerda traseira uma solução contendo carragenina (1%), prostaglandina E2 (5 μ g/pata), bradicinina (6nmol/pata), composto 48/80 (100ng/pata)

ou histamina (100ug/pata) dissolvidos em 20 μ L de uma solução tamponada. A pata direita recebeu o mesmo volume de salina e foi utilizada como controle. Alterações no volume da pata foram medidas por um micrômetro em vários intervalos de tempo de acordo com cada agente flogístico (1h, 2h, 3h, 4h, 6h e 24 h; 15, 30 e 60 min; 15 min e 30 min; 30 min e 60 min; 30 min e 60 min, respectivamente). A diferença entre o tamanho das patas direita e esquerda foi quantificada e tomada como índice do edema (Figura 5) (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2017).

Figura 5: Esquema do protocolo edema de pata



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10. **Docking molecular para avaliação da interação do MTF com alvos farmacológicos de interesse terapêutico**

As estruturas da molécula e do controle foram desenhadas no Marvin Sketch 21.13 e otimizadas no software HyperChem 8.0.6 (RMS 0.1 kcal/mol/Å). Foram usadas as configurações padrões, aplicando o método de campo de força da mecânica molecular MM+ e o método quântico semi-empírico AM1 (Austin Model 1) (ABBASI; FERREIDONNEZHAD; MIRVEIS, 2021; RODRIGUES et al., 2021; SCOTTI et al., 2009). As estruturas cristalinas das proteínas foram obtidas do RCSB Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) com resolução até 3 Å, sob os códigos 1A9U para MAP quinase p38, 4QPA para ERK 2 e 1K3Z para NFkB – porção p65.

A ancoragem das moléculas com os alvos foi executada no software Molegro Virtual Docker (MVD), os parâmetros utilizados para configurar o software foram, para os valores de scores de energia: MolDock Score e Rerank Score seguido do consenso por meio da média aritmética dos dois com valor de corte para energia de ligação > -8 kcal/mol; para o GRID, foi determinado com resolução de 0,3 Å e um raio esférico de 15 Å; para a avaliação do ligante, foi selecionado o ES interno, HBond interno, torções Sp2–Sp2; foi utilizado algoritmo MolDock Simplex Evolution (MolDock SE) com um número de corridas de 10 e máximas iterações de 1500 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Para a validação da técnica, foram realizados o *redocking* e analisados valores para o desvio quadrático médio (RMSD - Root Mean Square Deviation) < 2 Å para a determinação da distância média da sobreposição dos átomos dos ligantes das proteínas (SCHLOSSER; RAREY, 2009). Outros parâmetros avaliados foram a energia de ancoragem e os tipos de interações com o sítio de ligação do alvo. Por fim, as imagens em 2D e 3D das interações dos ligantes com os alvos foram visualizadas no programa Biovia Discovery Studio Visualizer 19.1.0.18287 (VIJAYAKUMAR et al., 2020).

4.11. Análises estatísticas

Os resultados do edema de pata foram analisados e expressos utilizando os testes estatísticos necessários (ANOVA *one-way*, seguido do pós teste de Tukey ou Bonferroni), utilizando-se do programa GraphPadPrism versão 9.0 e foram considerados significantes os valores com $p < 0,05$ (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

5. RESULTADOS

5.1. Análises do risco de toxicidade e parâmetros farmacocinéticos *in silico* (ADMET) do MTF

O MTF foi submetido, junto com o fármaco controle (dexametasona), ao modelo de predição de riscos de citotoxicidade no software *OSIRIS DataWarrior*. Quando considerados os parâmetros de carcinogenicidade, mutagenicidade e efeitos tóxicos no sistema reprodutivo, irritabilidade para a pele, a molécula não apresentou risco.

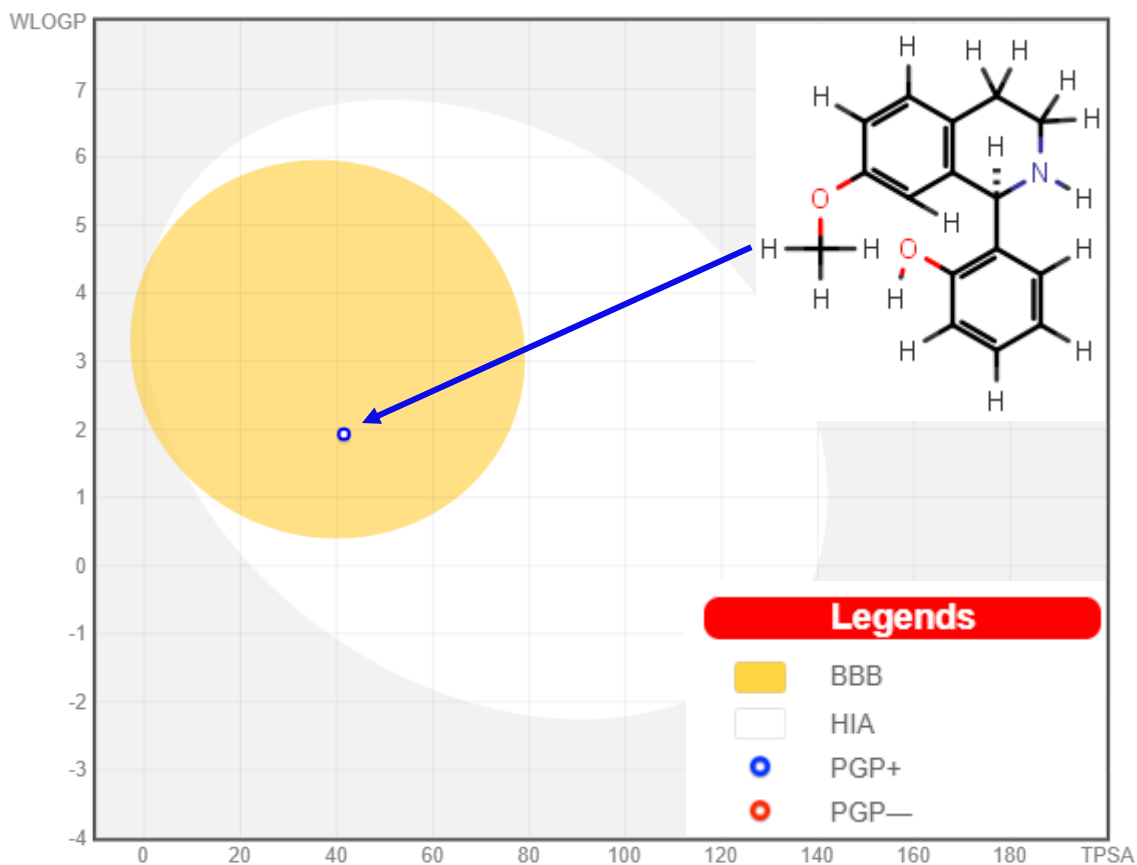
Em adição, foi averiguada a porcentagem de absorção oral. Nessa análise, a molécula exibiu um valor preditivo de 100,0% (Tabela 1). Enquanto a dexametasona apresentou valor de 80,56%. Foi também investigado se a molécula não violou as 5 regras de Lipinski, o que não ocorreu.

Tabela 1: Avaliação da violação das regras de Lipinski para o MTF

AVALIAÇÕES	MOLÉCULAS	
	MTF	Dexametasona
Peso Molecular g/mol	255,316	392,47
cLogP	2,8379	1,288
Aceptor-H	3	5
Doador-H	2	2
TPSA	41,49	80,56
%ABS	100,00	94,83

Em adição, foi analisado se a molécula poderia atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Esse parâmetro foi investigado na plataforma *SwissADME* pela metodologia *do BOILED-Egg*, que é expressa em gráfico pelos parâmetros lipofilicidade (WLOGP) e área de superfície polar topológica (TPSA). O resultado mostrou que a molécula possivelmente atravessa a BHE e consegue passar pela glicoproteína P, sendo eliminada do sistema nervoso central (Figura 6).

Figura 6: Modelo de *BOILED-Egg* do MTF

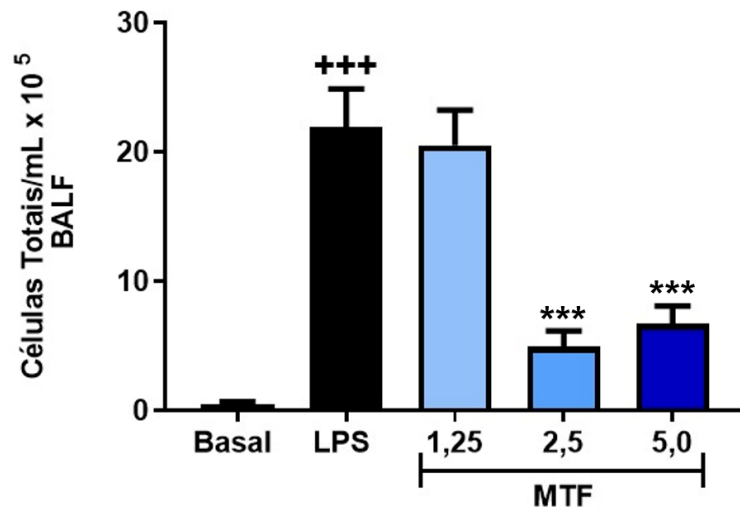


Região amarela: predição da molécula ser passivamente absorvida pela BHE; Região branca: predição da molécula ser passivamente absorvida pelo TGI; Ponto azul: predição da molécula ser efluída do sistema nervoso central pela glicoproteína P; e Ponto vermelho: predição da molécula não ser efluída do sistema nervoso central pela glicoproteína P.

5.2. Efeito do tratamento com MTF na migração de células totais no BALF de animais com LPA induzida por LPS

Os animais do grupo LPS apresentaram aumento ($p < 0,001$) no número de células totais no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) quando comparados aos animais do grupo Basal. Os tratamentos com MTF, nas doses 2,5 mg/kg ou 5 mg/kg, realizados uma hora após o desafio com LPS, foram capazes de reduzir a migração leucocitária ($p < 0,001$), entretanto, a dose de 1,25 mg/kg não reduziu a migração celular quando comparados aos animais do grupo LPS (Gráfico 1).

Gráfico 1: Quantificação da migração de células totais para o BALF



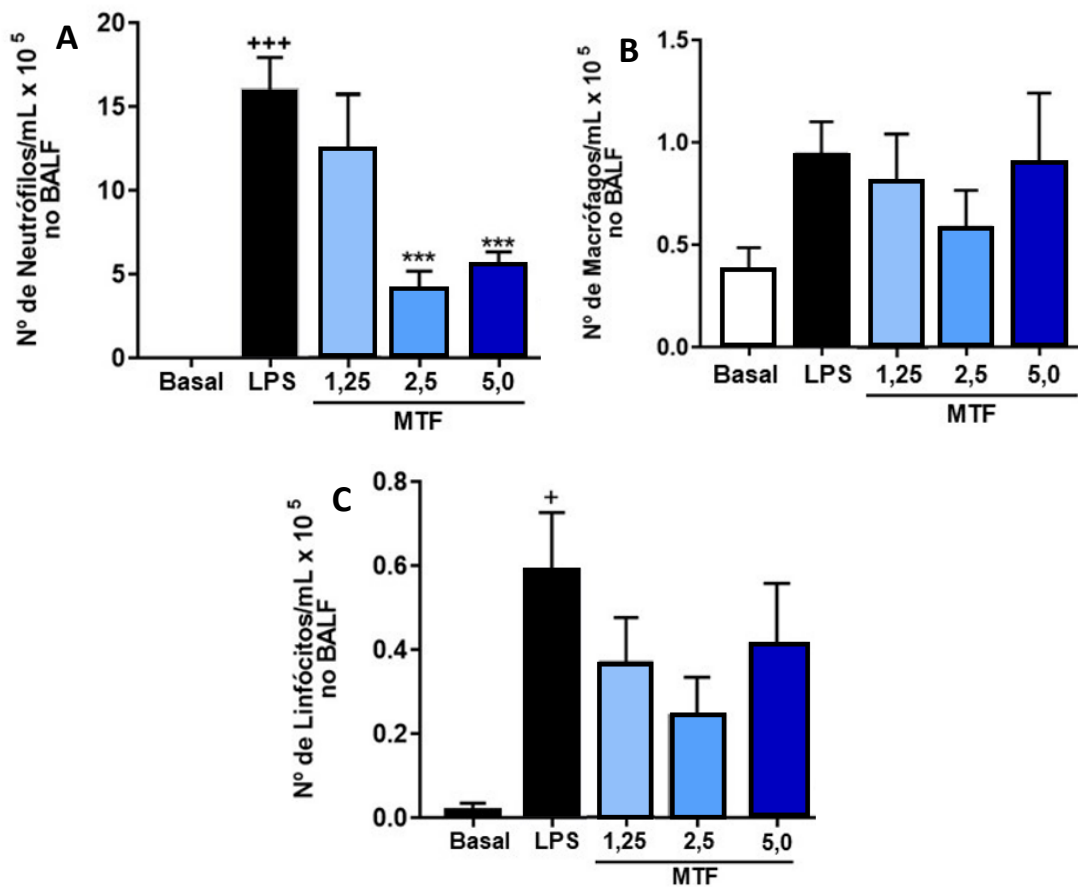
Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Dentre as células que migram para o órgão lesionado, se faz necessário a identificação dos perfis celulares presentes, bem como o perfil predominante, a fim de identificar as melhores estratégias para seu manejo. Dessa forma, buscamos então, identificar e quantificar os perfis celulares presentes no BALF desses animais.

5.3- Efeito do tratamento com MTF na migração de células diferenciais no BALF de animais com LPA induzida por LPS

O número aumentado de leucócitos nos camundongos desafiados com LPS é em decorrência da migração de linfócitos ($p < 0,05$) e principalmente neutrófilos ($p < 0,001$) sem alterar a migração de macrófagos. Os tratamentos com MTF, nas doses de 2,5 ou 5,0 mg/kg, foram capazes de diminuir a migração de neutrófilos ($p < 0,001$) sem interferir no número de macrófagos e linfócitos. Como esperado, os animais tratados com MTF na dose de 1,25 mg/kg não apresentaram redução da migração células quando comparados aos animais do grupo LPS (Gráficos 2 A, B e C).

Gráficos 2: Quantificação da migração de (A) neutrófilos, (B) macrófagos e (C) linfócitos para o BALF



Valores de +(p<0,05) e +++(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

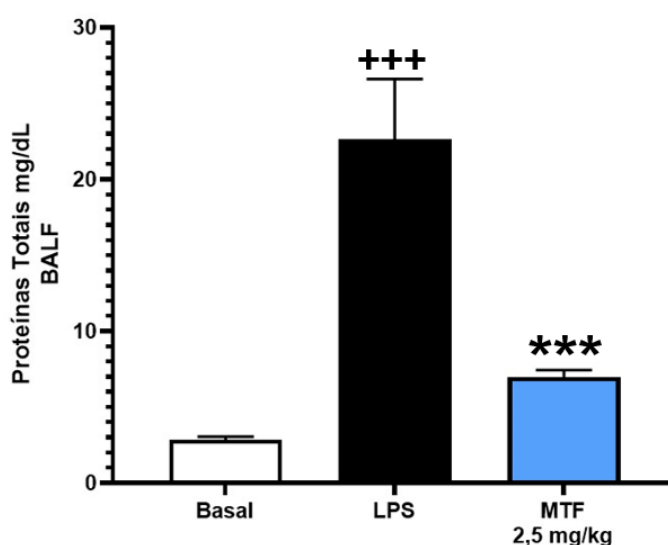
Diante dos resultados observados na quantificação das células totais e diferenciais, decidimos dar continuidade às demais análises com a dose de 2,5 mg/kg, pois essa foi a dose mínima eficaz com efeito anti-inflamatório no protocolo experimental utilizado.

Nesse processo de avaliação do efeito anti-inflamatório do MTF, buscamos avaliar sua atividade sobre a formação de edema pulmonar no protocolo de LPA induzida por LPS, via a quantificação de proteínas totais no BALF, além da quantificação da razão do peso úmido/peso seco dos pulmões dos animais com LPA induzida por LPS.

5.4. Efeito do tratamento com MTF na quantificação de proteínas totais no BALF e peso dos pulmões de animais com LPA induzida por LPS

No que tange às proteínas totais, é possível observar que houve um aumento dessas no BALF dos camundongos desafiados com LPS ($p < 0,001$) quando comparado aos animais do grupo Basal. O tratamento com MTF foi capaz de diminuir ($p < 0,001$) a concentração de proteínas totais quando comparado aos animais do grupo LPS (Gráfico 3).

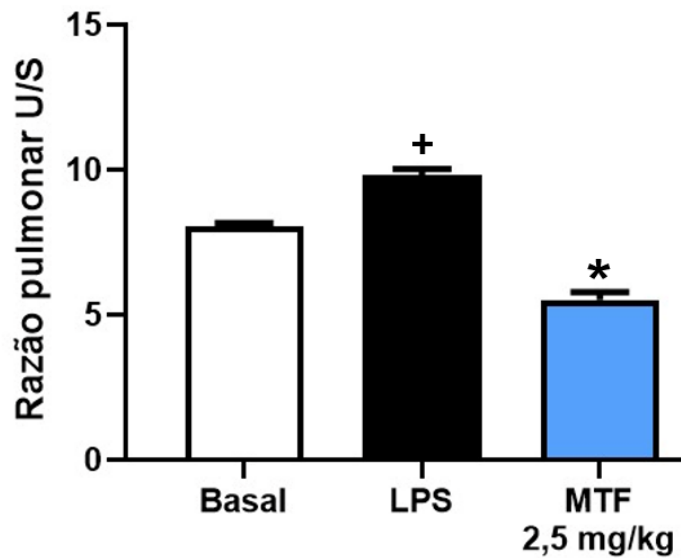
Gráficos 3: Quantificação de proteínas totais no BALF



Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Já em relação à razão do peso úmido/peso seco dos pulmões, observou-se que houve aumento dessa razão no grupo LPS quando comparado ao grupo basal ($p < 0,05$). E, ainda, que o tratamento com MTF reduziu a razão entre os pesos quando comparado aos animais do grupo LPS ($p < 0,05$) (Gráfico 4).

Gráficos 4: Razão dos pesos pulmonares



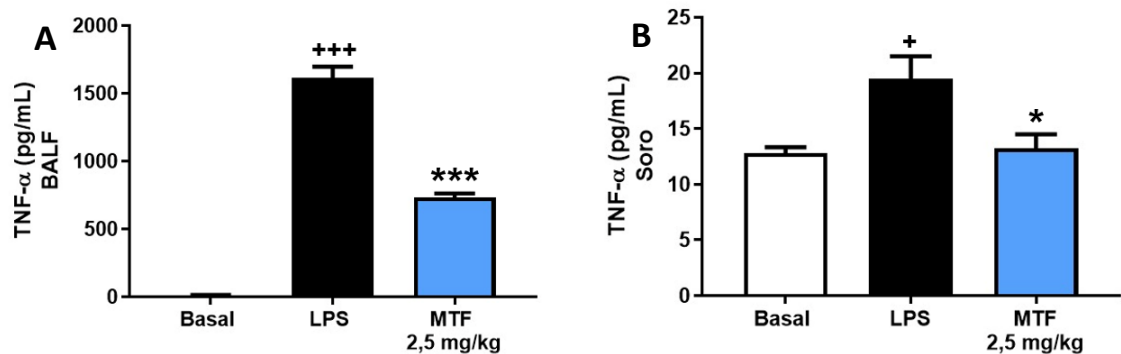
Valores de + ($p < 0,05$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de * ($p < 0,05$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Em conjunto, esses resultados mostram que o MTF está atuando na diminuição do edema pulmonar. Em continuidade, buscando avaliar também a ação imunomoduladora do MTF, avaliamos o efeito na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, as quais apresentam atividades que podem predizer morbidade e mortalidade de pacientes com LPA/SDRA.

5.5. Efeito do tratamento com MTF na imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias no BALF e no soro do sangue dos animais com LPS induzida por LPS

No BALF dos animais do grupo LPS, observou-se aumento de TNF- α ($p < 0,001$) quando comparado aos dos animais do grupo Basal. Esse aumento também foi verificado no soro dos animais do grupo LPS ($p < 0,05$). Por sua vez, o tratamento com MTF foi capaz de diminuir a liberação dessa citocina no BALF ($p < 0,001$) e no soro ($p < 0,05$) dos animais, quando comparados com os animais do grupo LPS (Gráfico 5A e 5B).

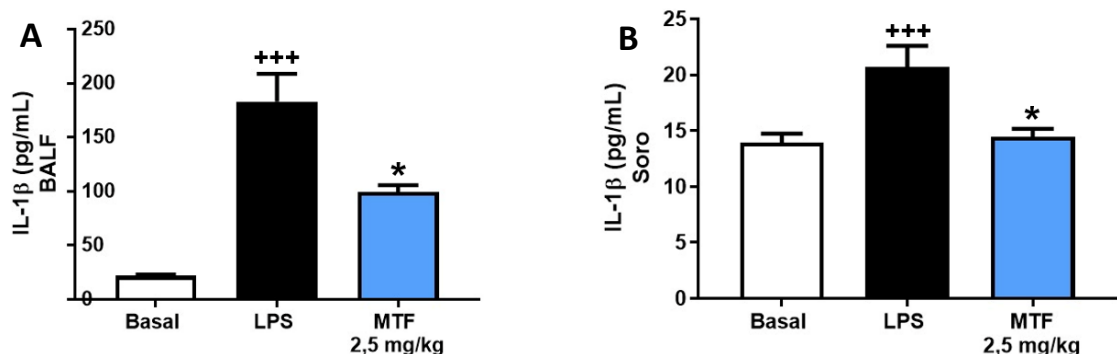
Gráficos 5: Concentração de TNF- α no (A) BALF e (B) soro do sangue



Valores de +($p < 0,05$) e +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de *($p < 0,05$) e ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Em adição, nos animais do grupo LPS, houve aumento de IL-1 β tanto no BALF ($p < 0,001$) como no soro ($p < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo basal. O tratamento com MTF, por sua vez, diminuiu a liberação dessa citocina em ambas amostras biológicas ($p < 0,05$) dos animais tratados quando comparados com os animais do grupo LPS (Gráfico 6A e 6B).

Gráficos 6: Concentração de IL-1 β no (A) BALF e (B) soro do sangue

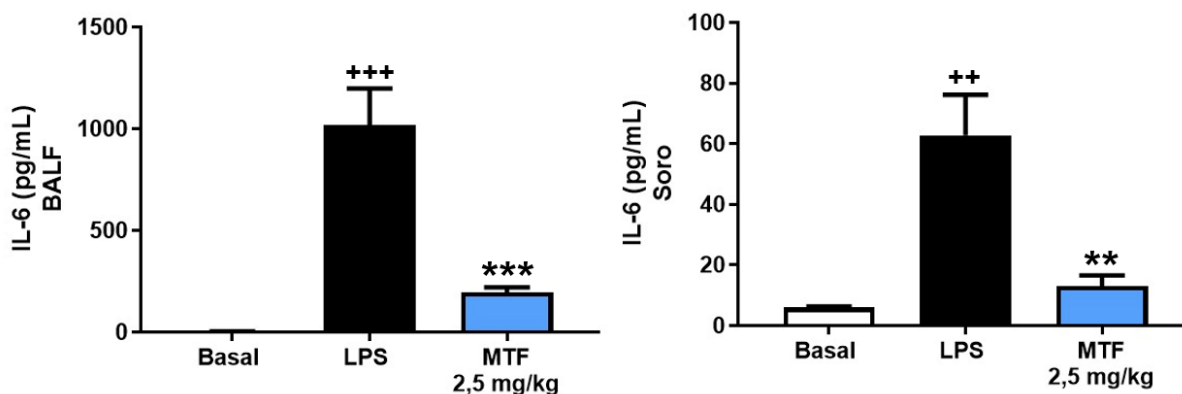


Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de *($p < 0,05$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Quanto à liberação de IL-6, observamos que os animais do grupo LPS apresentaram aumento da liberação dessa citocina, tanto no BALF ($p < 0,001$), como no soro ($p < 0,01$), quando comparados aos animais do grupo basal, e o tratamento com MTF modulou negativamente a liberação dessa citocina nos dois compartimentos

avaliados (BALF ($p < 0,001$) e no soro ($p < 0,01$)) quando comparados aos animais do grupo LPS (Gráfico 7A e 7B).

Gráficos 7: Concentração de IL-6 no (A) BALF e (B) soro do sangue

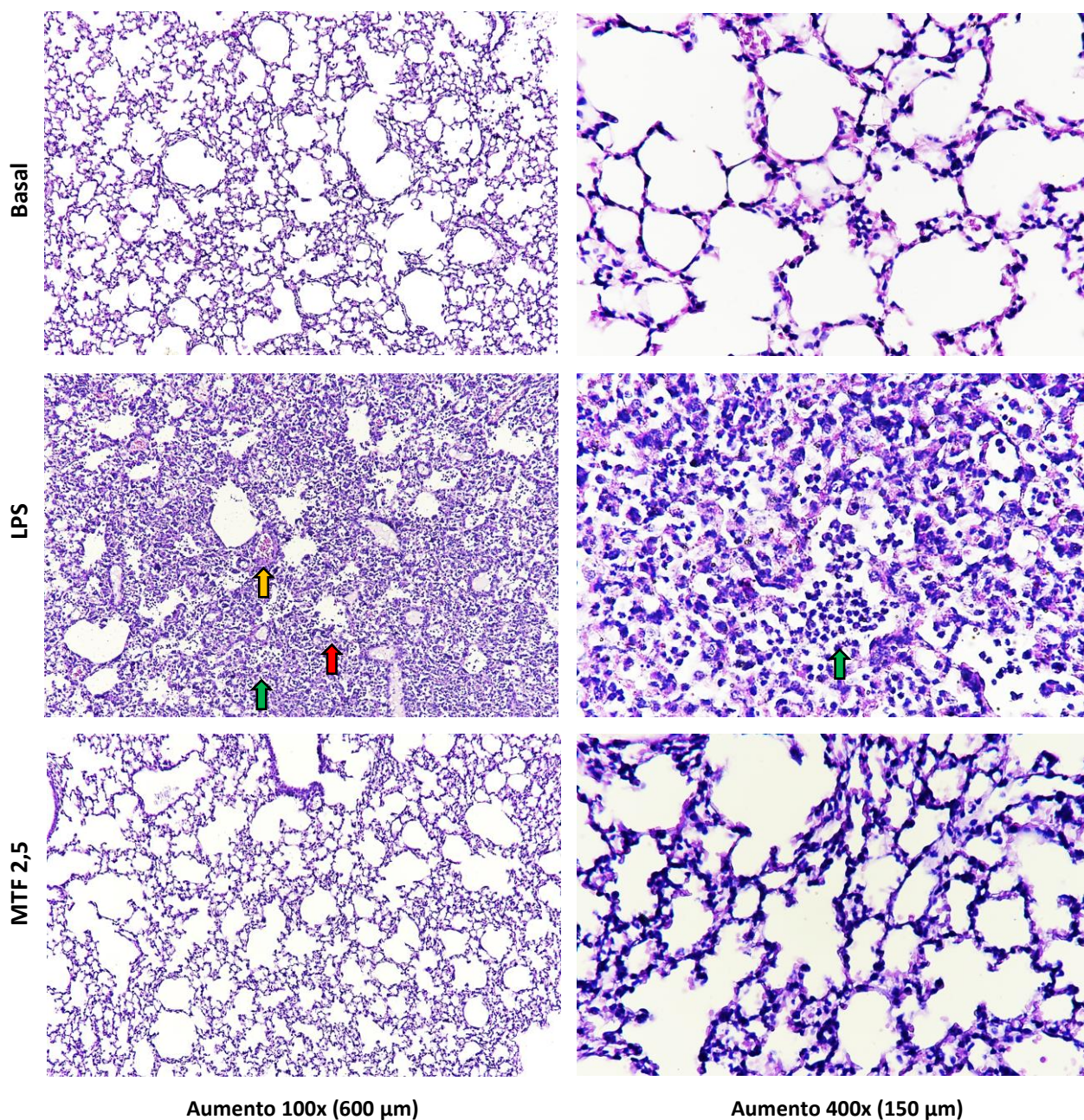


Valores de ++($p < 0,01$) e +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.6. Efeito do tratamento com MTF na lesão tecidual pulmonar nos animais com LPS induzida por LPS

Um dos parâmetros que mensura a diminuição do quadro lesivo agudo no pulmão é a análise tecidual realizada histologicamente em tecidos pulmonares de camundongos com LPA. Os cortes de tecido pulmonar dos camundongos BALB/c com LPA demonstraram infiltração celular, edema e hemorragia, nos animais do grupo Basal, LPS e MTF (Figura 7).

Figura 7: Análise histológica dos pulmões de camundongos com LPA

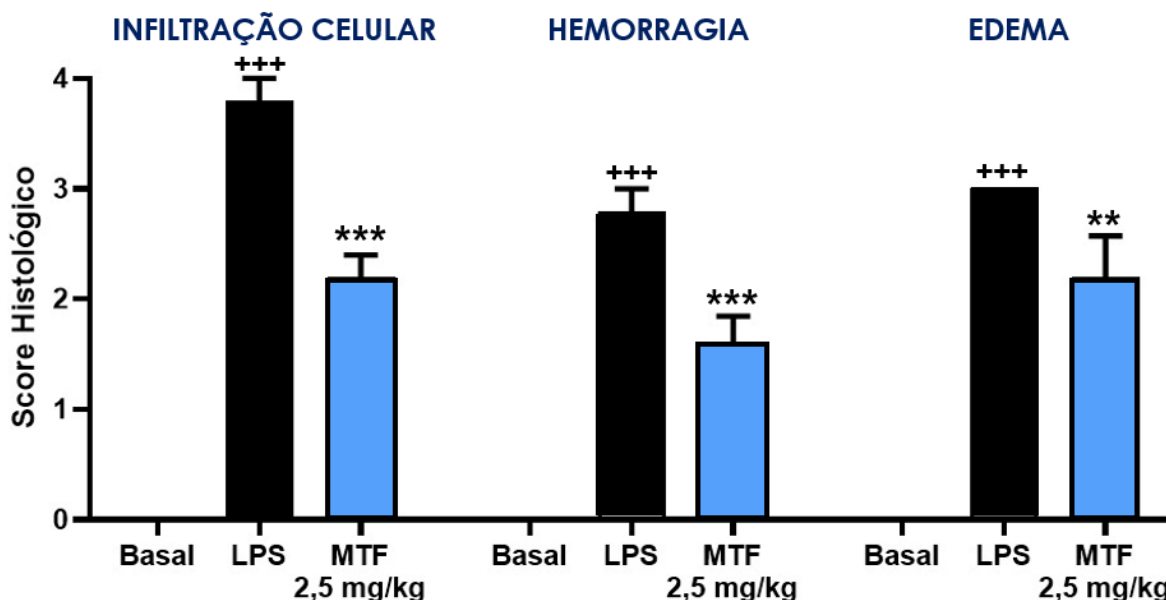


Seta vermelha indica edema pulmonar; seta verde indica infiltração celular; seta amarela indica hemorragia.

Utilizando as pontuações elencadas no score histológico (ver material e métodos item 4.6.6), foi possível quantificar a lesão tecidual (Gráfico 8). O grupo Basal apresentou a histoarquitetura pulmonar preservada, sem alterações alveolares presentes. Já o grupo LPS apresentou aumento da infiltração celular ($p < 0,001$), hemorragia alveolar ($p < 0,001$) e edema ($p < 0,001$). Em contrapartida, os animais

tratados com MTF tiveram a lesão tecidual diminuída, havendo redução da infiltração celular ($p < 0,001$), hemorragia alveolar ($p < 0,001$) e edema ($p < 0,01$).

Gráficos 8: Score histológico das lesões pulmonares



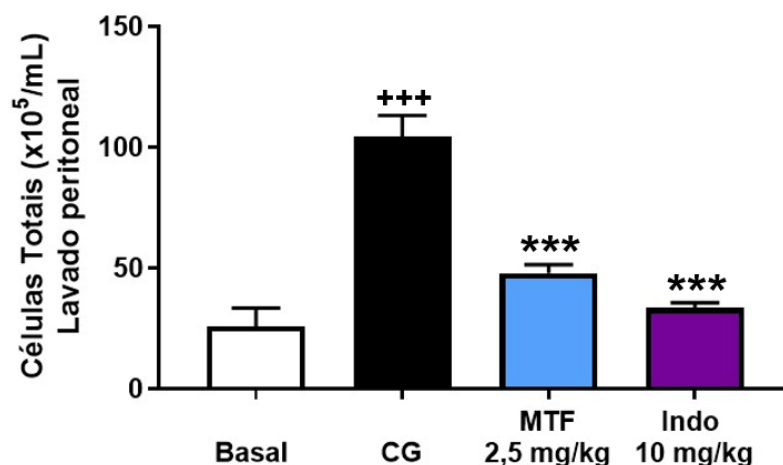
Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo LPS. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

O MTF, preliminarmente, apresenta efeito imunomodulador e anti-inflamatório em modelo experimental de LPA induzida por LPS como observado nos resultados acima. Entretanto, outros agentes flogísticos, além do LPS, podem desencadear respostas imunes de característica inflamatória. Portanto, investigamos o tratamento com MTF na resposta inflamatória no protocolo experimental de peritonite induzida por carragenina.

5.7. Efeito do tratamento com MTF na migração de células totais para o peritônio de animais com peritonite induzida por carragenina

Os animais do grupo carragenina (CG) apresentaram aumento ($p < 0,001$) no número de células totais no fluido do lavado peritoneal quando comparados aos animais do grupo Basal. O tratamento com MTF, por sua vez, foi capaz de reduzir a migração leucocitária ($p < 0,001$), resultado observado também nos animais tratados com indometacina (Indo) ($p < 0,001$), droga padrão (Gráfico 9).

Gráfico 9: Quantificação da migração de células totais para lavado peritoneal



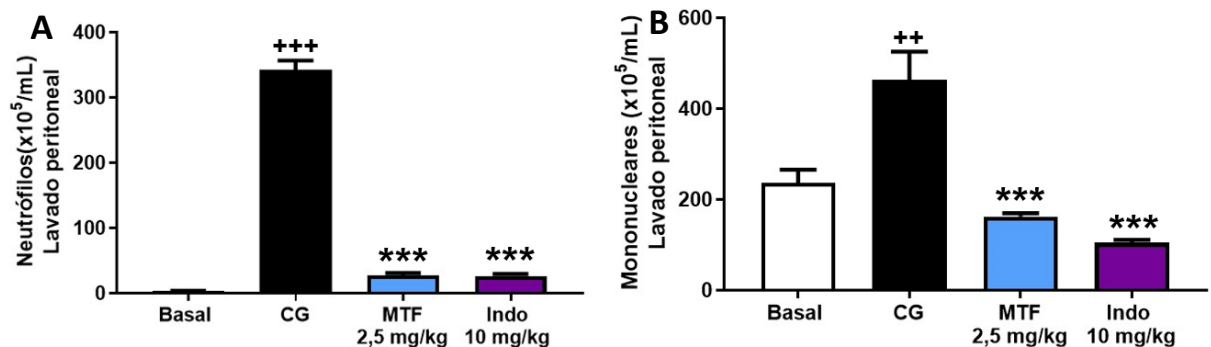
Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo CG. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

As populações celulares foram identificadas em duas populações celulares, os polimorfonucleares, com predominância de células neutrofílicas, e mononucleares, que representam macrófagos em sua maioria.

5.8. Efeito do tratamento com MTF na migração de células diferenciais para o peritônio de animais com peritonite induzida por carragenina

Quando as populações de leucócitos foram quantificadas, verificou-se que houve um aumento tanto de polimorfonucleares ($p < 0,001$), como de mononucleares ($p < 0,01$). Entretanto, o tratamento com MTF reduziu a migração de ambos os perfis celulares ($p < 0,001$). Os animais do grupo Indo, por sua vez, apresentaram redução de polimorfonucleares ($p < 0,001$) e mononucleares ($p < 0,01$) (Gráfico 10A e 10B).

Gráficos 10: Quantificação da migração de (A) neutrófilos e (B) mononucleares para o lavado peritoneal

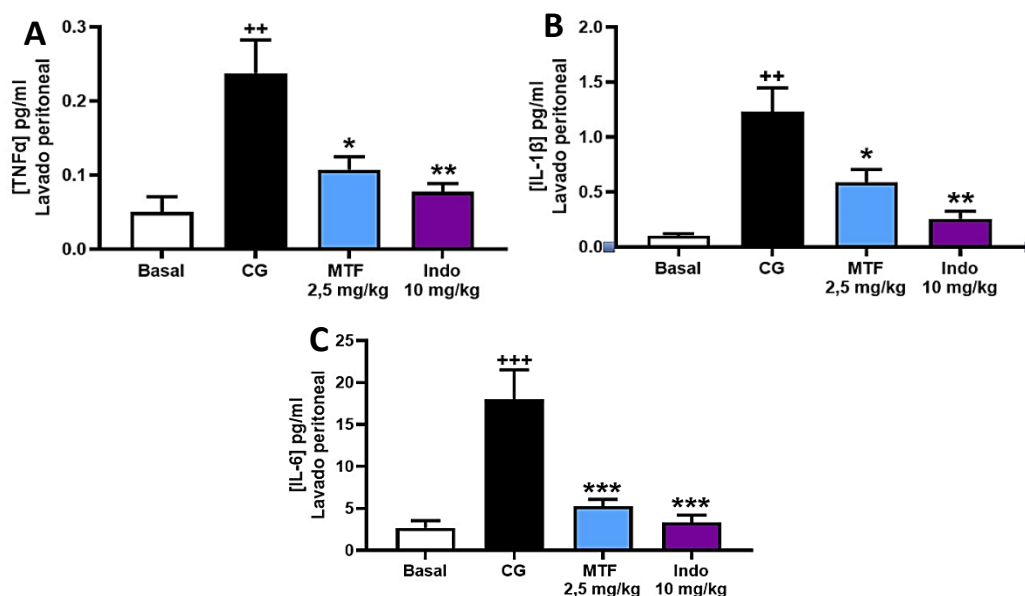


Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo CG. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.9. Efeito do tratamento com MTF na imunomodulação de citocinas pró-inflamatórias no lavado peritoneal dos animais com peritonite induzida por carragenina

Verificamos que os animais do grupo CG, apresentaram aumento na liberação de $\text{TNF-}\alpha$ ($p < 0,001$), $\text{IL-1}\beta$ ($p < 0,01$) e IL-6 ($p < 0,01$). Por sua vez, o tratamento com MTF reduziu a concentração de ambas as citocinas no lavado ($\text{TNF-}\alpha = p < 0,05$; $\text{IL-1}\beta = p < 0,05$; $\text{IL-6} = p < 0,01$) (Gráfico 11A, 11B e 11C).

Gráficos 11: Concentração de (A) TNF- α , (B) IL-1 β e (C) IL-6 presentes no lavado peritoneal



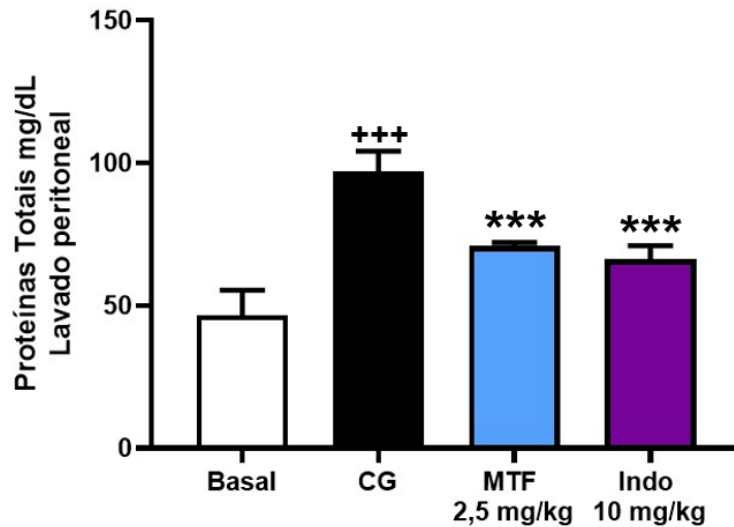
Valores de ++($p < 0,01$) e +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo CG. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Essas citocinas liberadas, somadas a outras proteínas encontradas no lavado do peritônio, promovem o edema intersticial, caracterizando o extravasamento vascular. Nesse sentido, avaliamos a concentração de proteínas totais presente neste lavado.

5.10. Efeito do tratamento com MTF na quantificação de proteínas totais no lavado peritoneal dos animais com peritonite induzida por carragenina

Os animais do grupo CG apresentaram aumento da concentração de proteínas no lavado peritoneal dos animais ($p < 0,001$) quando comparados aos animais do grupo Basal. O tratamento com MTF reduziu a concentração de proteínas ($p < 0,05$) no lavado quando comparado aos animais do grupo CG. A indometacina também foi capaz de diminuir essa concentração ($p < 0,05$) (Gráfico 12).

Gráfico 12: Concentração de proteínas totais no lavado peritoneal



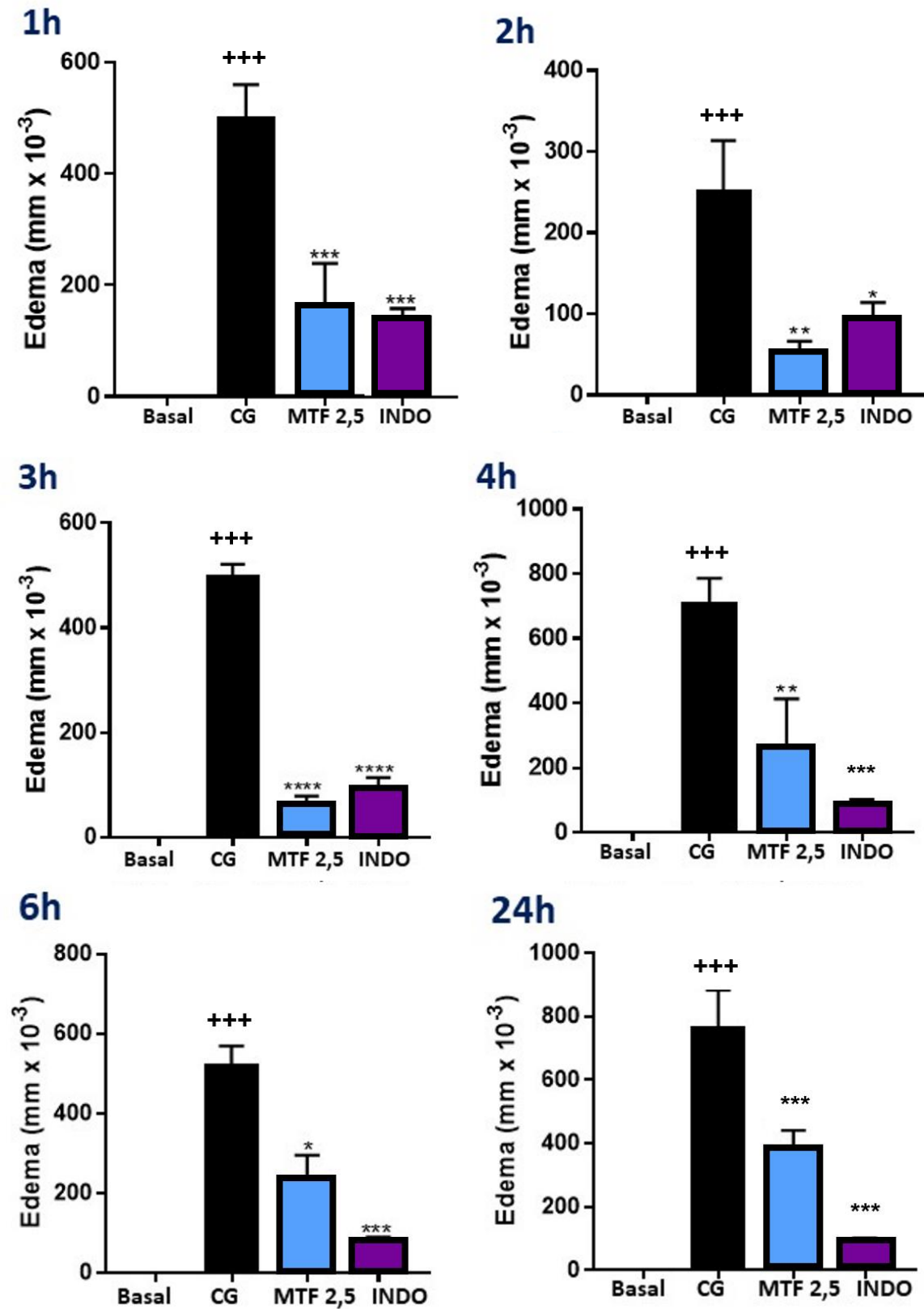
Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo CG. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Analizamos como o MTF atua na diminuição do edema intersticial via protocolos de indução de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos.

5.11 Efeito do tratamento com MTF no edema de pata induzido por carragenina

Neste protocolo experimental, após o desafio intraplantar com uma solução de carragenina, os animais foram avaliados nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, e 24 horas (item 4.10.2 em materiais e métodos). Os animais do grupo CG apresentaram aumento na formação de edema de pata quando comparados aos animais do grupo basal em todos os momentos analisados: 1h, 2h, 3h, 4h, 6h e 24h ($p < 0,001$). Entretanto, o tratamento com MTF foi capaz de diminuir a formação do edema nos momentos analisados (1h, 3h e 24h = $p < 0,001$; 2h e 4h = $p < 0,01$; 6h = $p < 0,05$ (Gráfico 13).

Gráfico 13: Edema de pata induzido por carragenina avaliados de 1-24h

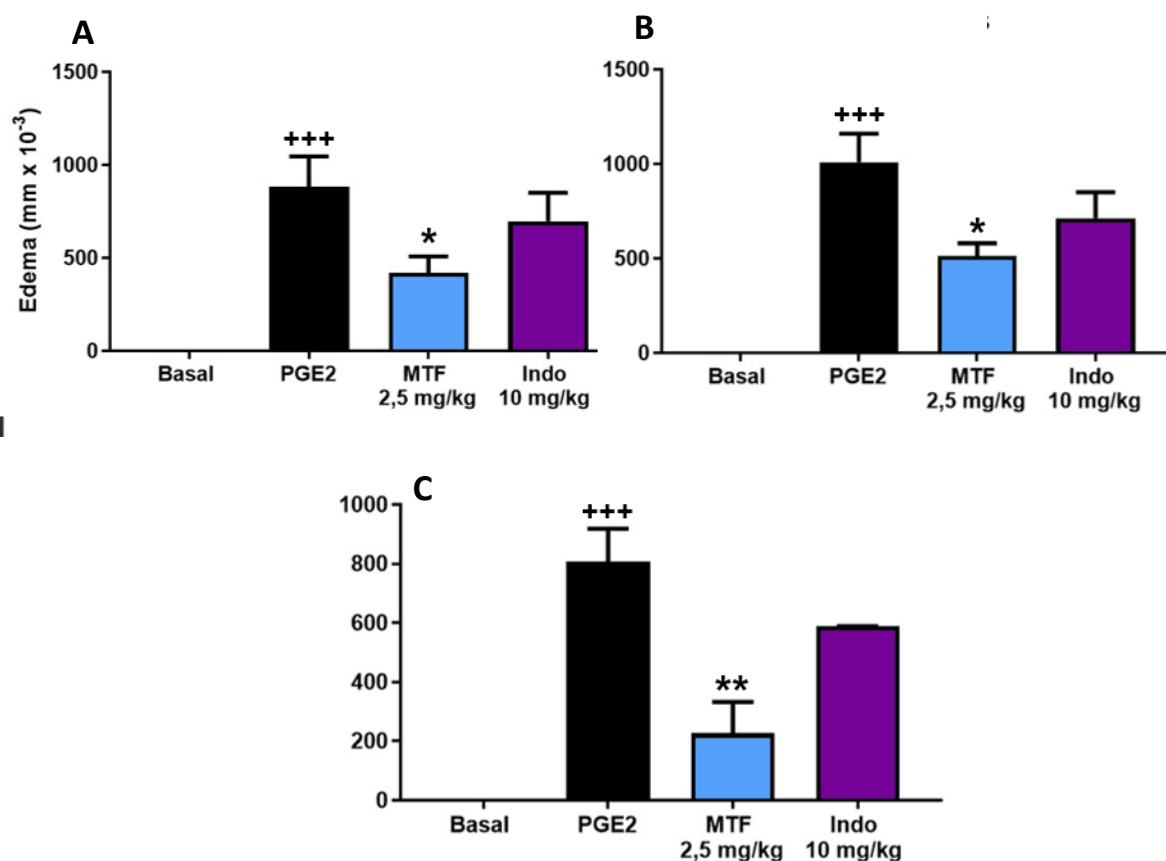


Valores de +++(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***(p<0.001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo CG. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.12. Efeito do tratamento com MTF no edema de pata induzido por prostaglandina E2 (PGE2).

Após o desafio intraplantar com PGE2, os animais do grupo PGE2 apresentaram aumento do edema de pata nos tempos analisados quando comparados aos animais do grupo Basal (15, 30 e 60 minutos = $p < 0,001$). Por sua vez, o tratamento com MTF reduziu a formação desse edema nos tempos analisados (15 e 30 minutos = $p < 0,05$; 60 minutos = $p < 0,001$) (Gráfico 14 A; B e C).

Gráfico 14: Edema de pata induzido por PGE2 em (A) 15, (B) 30 e (C) 60 minutos



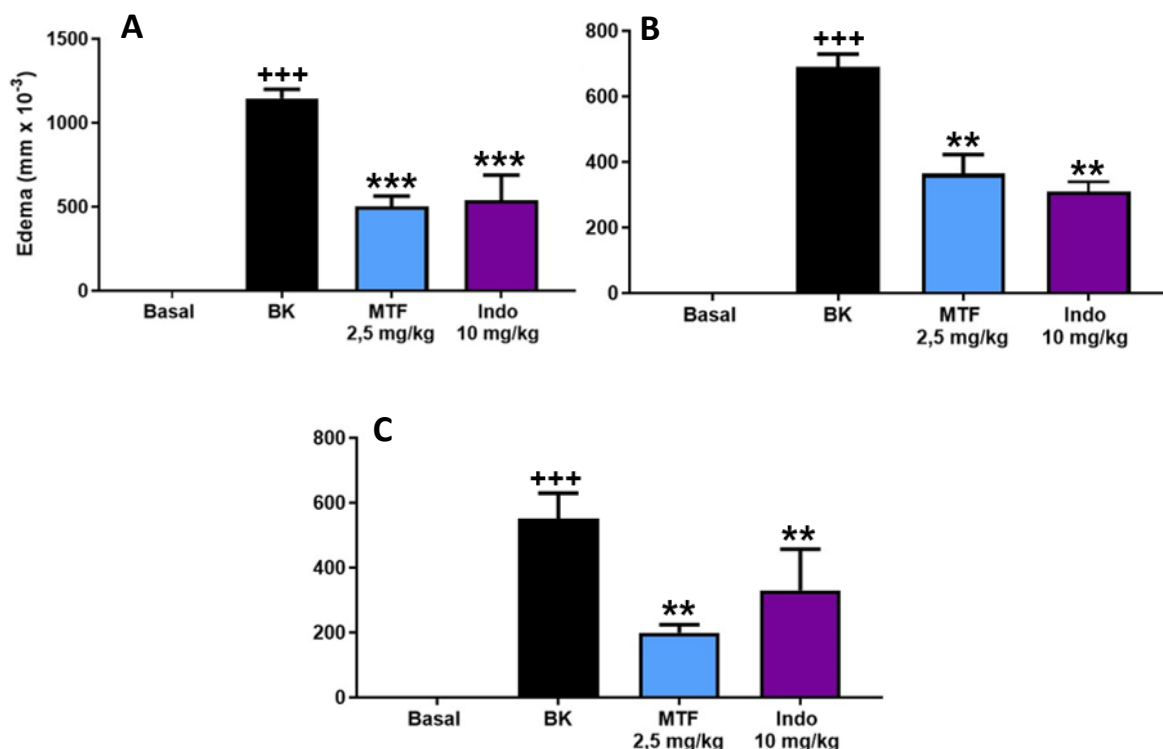
Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo PGE2. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.13. Efeito do tratamento com MTF sobre o edema de pata induzido por bradicinina (BK).

Os animais do grupo BK apresentaram aumento na formação de edema de pata nos tempos analisados se comparados aos animais do grupo Basal (15, 30 e 60

minutos = $p < 0,001$). Por sua vez, o tratamento com MTF reduziu a formação desse edema em todos os tempos analisados (15 minutos = $p < 0,001$; 30 e 60 minutos = $p < 0,01$) (Gráfico 15 A, B e C).

Gráfico 15: Edema de pata induzido por BK em (A) 15, (B) 30 e (C) 60 minutos

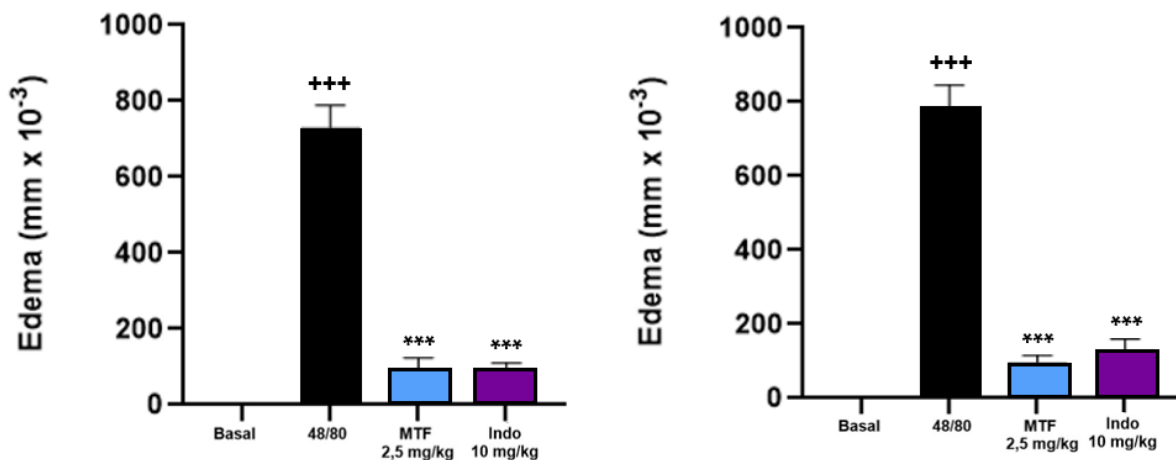


Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo BK. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.14. Efeito do tratamento com MTF no edema de pata induzido por serotonina (5-HT).

Os animais do grupo 5-HT apresentaram aumento do edema pata nos tempos analisados comparando-os com os do grupo Basal (15 e 30 minutos = $p < 0,001$). O tratamento com MTF reduziu a formação desse edema nos tempos analisados (15 e 30 minutos = $p < 0,001$) (Gráfico 16 A e B).

Gráfico 17: Edema de pata induzido por 5-HT (A) 15 e (B) 60 minutos

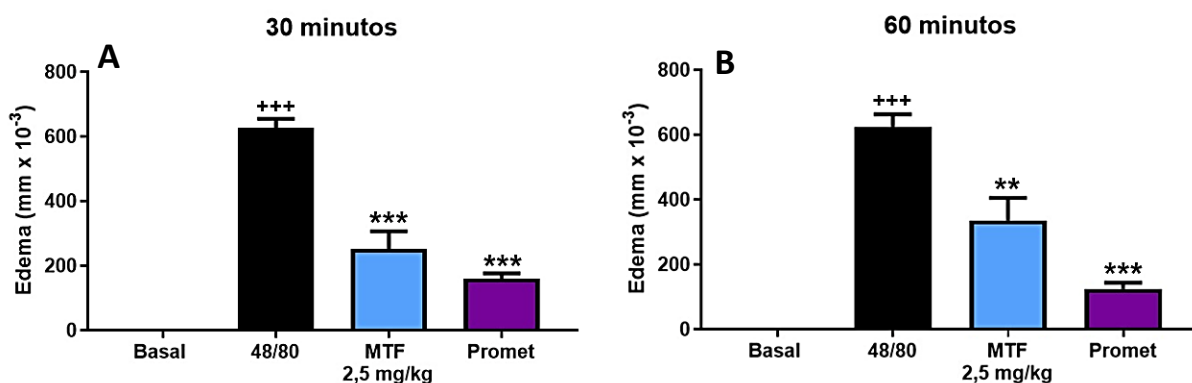


Valores de +++(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de ***(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Hist. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.15. Efeito do tratamento com MTF sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80.

Os animais do grupo 48/80 apresentaram aumento na formação do edema de pata nos tempos avaliados quando comparados aos animais do grupo Basal (p < 0,001). O tratamento com MTF diminuiu a formação desse edema (30 minutos = p < 0,001; 60 minutos = p < 0,01) (Gráfico 17 A e B).

Gráfico 17: Edema de pata induzido por 48/80 em (A) 30 e (B) 60 minutos

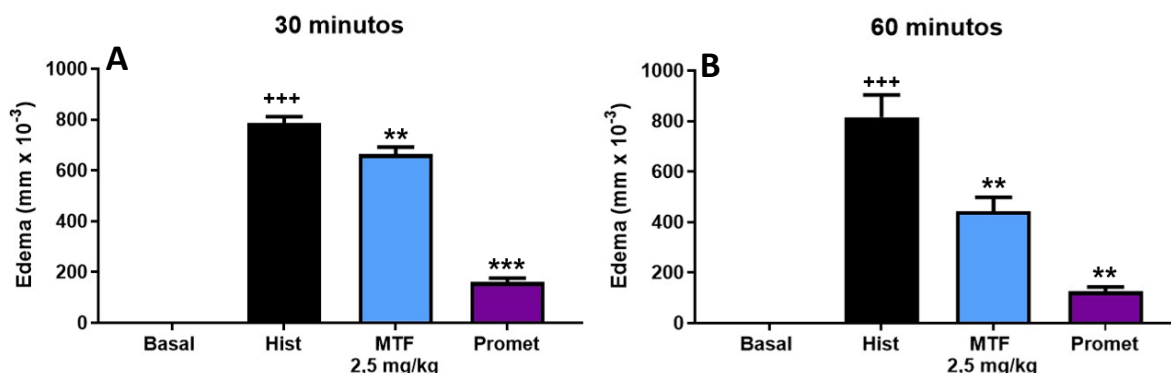


Valores de +++(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de *(p<0,05) e ***(p<0,001) foram considerados significativos quando comparados ao grupo 48/80. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

5.16. Efeito do tratamento com MTF sobre o edema de pata induzido por histamina (Hist).

Os animais do grupo Hist apresentaram aumento na formação do edema de pata em ambos os tempos analisados (30 e 60 minutos = $p < 0,001$) quando comparados aos animais do grupo Basal. O tratamento com MTF diminuiu a formação do edema quando comparados aos animais do grupo não tratado (30 e 60 minutos = $p < 0,01$) (Gráfico 18).

Gráfico 18: Edema de pata induzido por histamina em (A) 30 e (B) 60 minutos



Valores de +++($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Basal. Os valores de **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) foram considerados significativos quando comparados ao grupo Hist. Os dados foram analisados pelo Graph pad Prism 9.0.

Os resultados imunofarmacológicos reunidos até o presente nos impulsionou a estudar de forma preditiva, via estudos *in silico*, possíveis alvos moleculares que o MTF estaria atuando para desempenhar sua atividade anti-inflamatória e antiedematogênica.

5.17. Alvos farmacológicos do MTF avaliados através de *Docking* molecular

O *docking* molecular foi realizado para analisar a afinidade da proteína-ligante por meio da energia de ligação e as interações da molécula com os alvos, apontando possivelmente um mecanismo de ação.

A energia de ligação foi expressa pelo consenso entre os scores do *MolDock* e *Rerank*, a energia de ligação do MTF com o alvo MAPK p38 foi de -71,492 kcal/mol (Tabela 2), enquanto a energia da dexametasona (fármaco controle) foi de -53,035 kcal/mol.

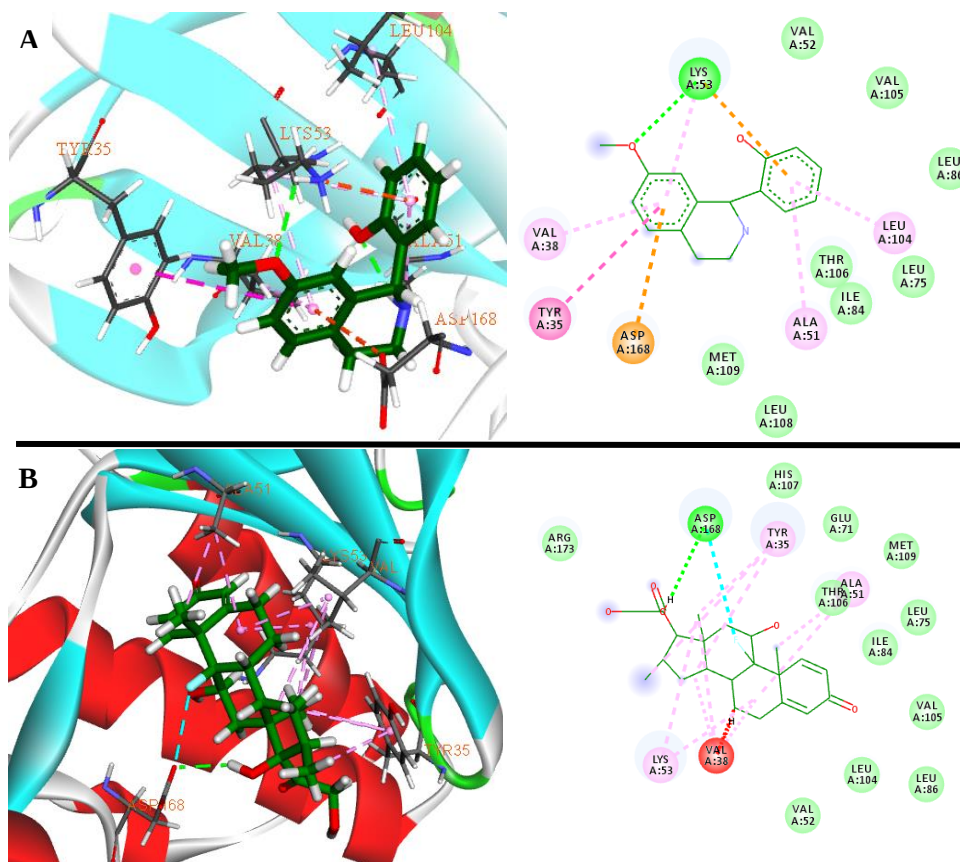
Tabela 2. Resultados da energia de ligação por *docking* molecular

Alvos	MTF			Dexametasona		
	<i>MolDock</i> Score (kcal/mol)	<i>Rerank</i> Score (kcal/mol)	<i>Consenso</i> Score (kcal/mol)	<i>MolDock</i> Score (kcal/mol)	<i>Rerank</i> Score (kcal/mol)	<i>Consenso</i> Score (kcal/mol)
MAPK p38	-78,519	-64,465	-71,492	-79,803	-26,266	-53,035
TOLL 4	-22,152	-18,847	-20,500	-39,498	20,5419	-9,47805
ERK 2	-66,986	-57,751	-62,368	-97,239	-66,288	-81,763
NFkB	-86,337	-70,554	-78,445	-95,042	-75,251	-85,147

Foram observadas também as interações do MTF com a MK p38. O MTF (Figura 8A) interagiu com a LYS53 através de ligação de hidrogênio, pi-alquil e pi-cation. O MTF também fez interações: pi-alquil com os resíduos de aminoácido LEU105, ALA51 e VAL38; interações pi-ânion com ASP168 e emparelhamento pi-pi com o anel do aminoácido TYR35; e interações de *van der Waals* com os resíduos VAL52, VAL105, LEU86, LEU75, THR106, ILE84, LEU108 e MET109.

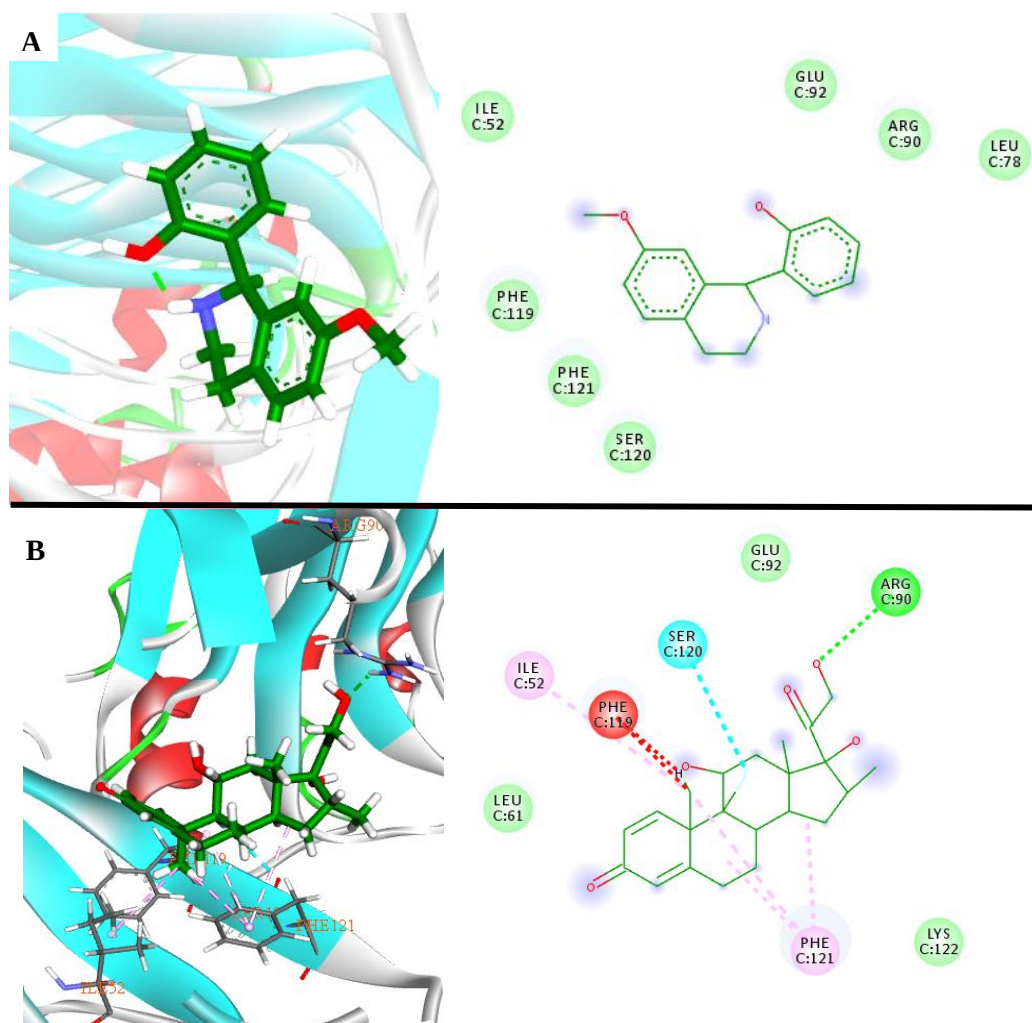
A dexametasona (Figura 8B) mostrou ligações de hidrogênio e interações de halogênio com o resíduo ASP168. E interações de *van der Waals* com os resíduos de aminoácidos ARG173, HIS107, GLU71, THR106, MET109, ILE84, LEU75, LEU86, LEU104, VAL105, VAL52; interações alquil com LYS53 e ALA51; e interações pi-alquil no resíduo TYR35. A dexametasona interagiu por meio de interações de alquil com o resíduo do aminoácido VAL38, porém apresentou uma interação desfavorável com esse aminoácido, o que acontece devido ao choque estérico intermolecular, que contribuiu para diminuir o energia de ligação entre os alvos e o ligante.

Figura 8: Interações em 3D e 2D do (A) MTF e (B) dexametasona com a MAP quinase p38



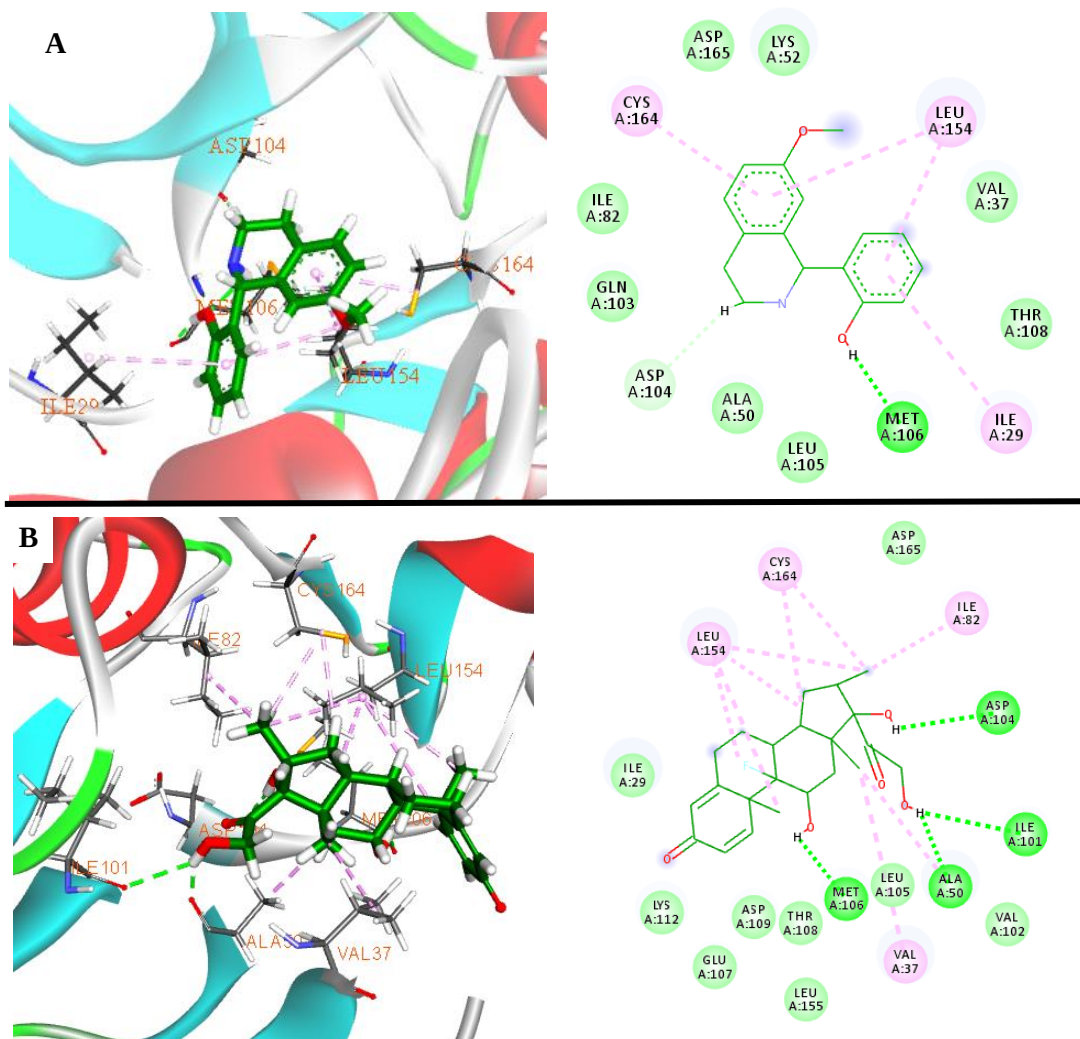
Ao ancorar o MTF com receptor *Toll like 4* (TLR4), o escore de energia de ligação obtido foi de -20,500 kcal/mol e o da dexametasona com um score positivo no *Rerank* de valor 20,542 kcal/mol (Tabela 2). O MTF (Figura 9A) fez apenas interações de *van der Waals* com o alvo, interagindo com os resíduos ARG90, ILE52, GLU92, LEU78, PHE119, PHE121 e SER120. A dexametasona (Figura 9B) realizou uma ligação de hidrogênio com a ARG90; interações pi-alquil com PHE121; interações alquil com ILE52; interações halogênio via SER120; e interações de *van der Waals* com os resíduos LYS122, LEU61 e GLU92. A dexametasona também realizou 2 interações desfavoráveis com o resíduo PHE119.

Figura 9: Interações em 3D e 2D do A) MTF e B) dexametasona com o receptor Toll like 4



A energia de ligação do MTF à MAPK ERK 2 (Tabela 2) foi de -62,368 kcal/mol, sendo um valor menor que a energia de ligação da dexametasona, que foi de -81,764 kcal/mol. O MTF (Figura 10A) realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo MET106 e uma ligação carbono-hidrogênio com ASP104. Fez interações de pi-alquil com os resíduos de aminoácidos LEU154, CYS164 e ILE29, e interações de *van der Waals* com THR108, VAL37, LYS52, ASP165, LEU105, ILE82, ALA50, e GLN103. Enquanto a dexametasona (Figura 10B) interagiu com os resíduos MET106, ASP104, ALA50 e ILE101 por meio de pontes de hidrogênio; o fármaco controle interagiu através de interações alquil com LEU154, CYS164, VAL37, ALA50 e ILE82, e *van der Waals* com ILE29, ASP109, LYS112, VAL102, GLU107, THR108, LEU155 e LEU105.

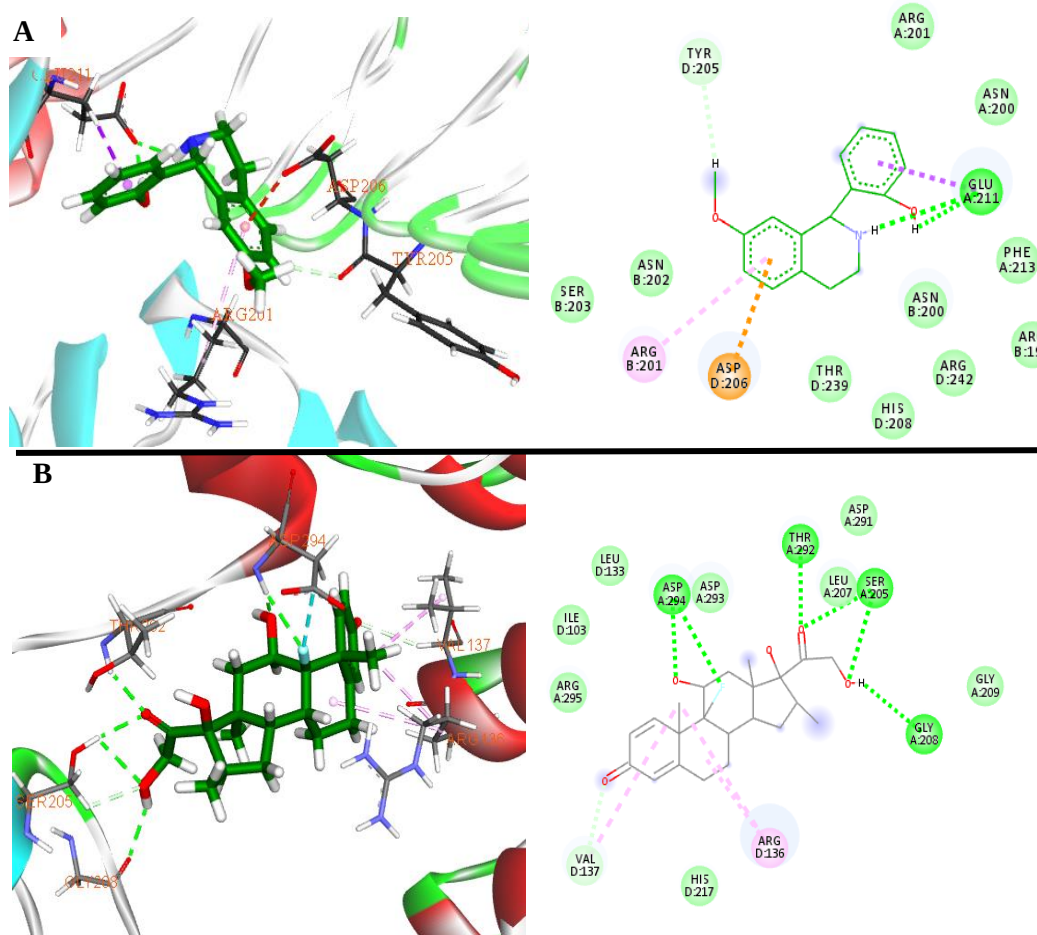
Figura 10: Interações em 3D e 2D do A) MTF e B) dexametasona com MAP quinase ERK2



O *docking* molecular da molécula com NFκB na porção 65 também apresentou energia de ligação menor que o valor da dexametasona (Tabela 2). Desta forma, o *escore* do MTF e da dexametasona foram de -78,445 e -85,147 kcal/mol, respectivamente (Tabela 2). O MTF (Figura 11A) apresentou menos interações com alvo. Realizou duas ligações de hidrogênio e uma pi-sigma com o resíduo de aminoácido GLU211, uma ligação de carbono-hidrogênio com o THR205, uma interação alquim com o resíduo ARG201(B) e uma interação pi-ânion com ASP206. Além disso, apresentou interações de *van der Waals* com ARG201(A), ASN200(A), ASN200(B), PHE213, ASN202, ARG198, ARG242, HIS208, THR239 e SER203. Em contrapartida, a dexametasona (Figura 11B) realizou 2 ligações de hidrogênio com ASP294 e SER205, e 1 com THR292 e GLY208. Além disso, fez uma ligação carbono-

hidrogênio com VAL137, interações alquil com VAL137 e ARG136 e interações de *van der Waals* com LEU207, ASP291, LEU133, ILE103, ARG295, ASP293, GLY209 e HIS217.

Figura 11: Interações em 3D e 2D do A) MTF e B) dexametasona com o NFκB



6. DISCUSSÃO

O 2-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-1-il) fenol é um novo alcaloide sintetizado na Universidade Federal da Paraíba, com estrutura molecular que se assemelha a outras moléculas com atividades biológicas importantes, dentre elas, atividade anti-inflamatória. Por tratar-se de uma molécula inédita, diferentes protocolos experimentais de inflamação aguda foram conduzidos nesse estudo, a fim de avaliar o efeito que o MTF desempenha sobre processos de migração celular, formação de edema intersticial, liberação de citocinas pró-inflamatórias e alterações teciduais decorrentes do agravamento inflamatório. Discutiremos aqui como a molécula em estudo foi capaz de interferir nesses parâmetros.

O MTF é um alcaloide sintético inédito que possui o núcleo tetrahydroisoquinolínico semelhante aos alcaloides naturais extraídos de diversas espécies marinhas, onde as atividades antitumorais e antibióticas são bem descritas (TANG et al., 2015). Em adição, os efeitos de alcaloides com esse núcleo na inibição de alvos inflamatórios importantes vêm sendo relatados (KO et al., 2017a).

O esqueleto molecular do MTF é derivado de outro alcaloide sintético, o MHTP, que possui atividade anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015) (PAIVA FERREIRA et al., 2018, 2021). O MHTP também foi capaz de atenuar a LPA induzida por LPS, via sinalização p38MAPK/p65-NFκB-TLR4 dependente (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019), direcionando a investigação da atividade farmacológica do alcaloide nesse estudo.

Nessa perspectiva, a estimativa de propriedades farmacocinéticas nas fases iniciais da descoberta de medicamentos tem sido fundamental para orientar os esforços de otimização de P&D (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019). Dada a notável complexidade do atual modelo de P&D, os participantes da descoberta de medicamentos têm buscado intensamente estratégias de modelagem molecular para identificar padrões nos dados ADMET e convertê-las em direcionamentos para o desenvolvimento de novos fármacos com os mais diversos interesses terapêuticos (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019). Portanto, buscamos avaliar, *in silico*, os parâmetros ADMET que podem estar relacionados com a atividade biológica que o MTF desempenha em um organismo vivo.

As regras de Lipinski consideram que um candidato a fármaco possui resultados farmacocinéticos satisfatórios administrado por via oral se: 1) o peso molecular for inferior a 500 g/mol; 2) o coeficiente de partição octanol/água calculado (Log P) for menor que 5; 3) houver menos de 5 doadores de ligação de hidrogênio (grupos OH e NH, por exemplo); 4) existir menos de dez aceptores de ligação de hidrogênio (notavelmente N e O). Embora preditivos, os resultados com o MTF são encorajadores, por não violar as regras de Lipinski e, ainda, apresentar possível absorção oral de 100% (LIPINSKI et al., 2001), via de administração mais comum para grande parte dos medicamentos disponíveis, principalmente os com ação anti-inflamatória.

Alcaloides isoquinolínicos, a exemplo da berberina, apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados pela via oral, e inúmeras são as estratégias para favorecer sua absorção por essa via (MURAKAMI; BODOR; BODOR, 2023a, 2023b). Neste sentido, o MTF apresenta-se como um forte candidato ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica oral.

Considerando o processo inflamatório como um todo, embora seja fisiológico no sentido de restaurar a homeostase, sua estimulação prolongada pode levar a danos aos tecidos e órgãos, como na LPA, que ao afetar os pulmões, órgãos vitais, compromete a oxigenação e pode rapidamente levar a óbito (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016).

A LPA entrou em maior evidência em 2020, dada a sua manifestação na COVID-19, doença causada pelo corona vírus tipo 2, que entrou em situação pandêmica, caracterizada principalmente por danos no sistema respiratório e cardiovascular (GALLELLI et al., 2020), mas que já vem sendo há anos, observada em todo mundo como potente fator de risco de morte hospitalar (GAJIC et al., 2011).

Diante disso, os modelos experimentais se fazem necessários para a compreensão da doença e investigação de estratégias terapêuticas eficazes para seu manejo. O modelo experimental de indução de LPA por lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano é um dos mais usados e é eficaz em apresentar aspectos cruciais do desenvolvimento da doença, como indução do processo inflamatório, dano alveolar difuso e alterações histopatológicas (CHEN; BAI; WANG, 2010; DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; YANG et al., 2019).

Na LPA experimental realizado neste trabalho, os animais do grupo LPS (animais doentes) apresentaram aumento da migração de células inflamatórias para a cavidade alveolar, pelo aumento do número de linfócitos e principalmente de neutrófilos. A diminuição do processo inflamatório local diretamente associada à diminuição da migração de neutrófilos, se apresenta como um resultado inicial importante para o manejo da LPA, considerando que essas células são cruciais no agravamento das manifestações observadas em doenças pulmonares (POLVERINO et al., 2017).

Essa análise inicial de migração celular permitiu indicar a dose de continuidade para as demais análises experimentais no desenvolvimento deste trabalho, sendo a de 2,5 mg/kg a menor dose que apresentou atividade anti-inflamatória significativa dentro do protocolo avaliado.

De fato, as análises realizadas mostram que não houve alterações na população de macrófagos dentre os grupos experimentais, todavia é importante entender o papel dessas células frente a LPA (XIAOFANG et al., 2018). Os macrófagos M1, quando ativados, liberam citocinas pró-inflamatórias que favorecem o recrutamento de células, o aumento da permeabilidade capilar e a expressão de moléculas de adesão do endotélio (LU et al., 2018). Porém, os macrófagos desempenham duplo papel dentro do processo fisiopatológico dessa doença, pois os de perfil M2 foram relatados por eliminar células apoptóticas e participar da fibrose. Além disso, são capazes de suprimir a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, e aumentar a produção de IL-10, favorecendo o reparo tecidual (SHEN et al., 2019).

As supressões das respostas de macrófagos M1 devem ser manejadas, quando exarcebadas, para prevenir danos teciduais ao hospedeiro e evitar imunopatologias graves (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). Essas ocorrem através da produção de mediadores anti-inflamatórias por macrófagos polarizados M2, além de citocinas e quimiocinas que irão regular macrófagos M1, atenuar reações inflamatórias, promover e acelerar o processo de cicatrização de feridas e reparação tecidual (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018).

Tal polarização de macrófagos M1 para M2 pode ocorrer a qualquer momento durante o processo inflamatório. Os macrófagos M1 e M2 têm diferentes funções, sendo elas: destruir patógenos ou reparar a inflamação e manter a homeostase, respectivamente. (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). Portanto, a manutenção de

macrófagos frente ao desenvolvimento da inflamação é de crucial importância a depender da fase dos processos inflamatórios, do grau de severidade e da resposta ao tratamento.

Em adição, o tratamento com MTF não foi capaz de interferir no número de linfócitos totais quando comparados com os animais do grupo LPS nos animais com LPA. O papel dos linfócitos no desenvolvimento da LPA ainda não é bem esclarecido, mas sabe-se que alguns perfis celulares desempenham atividades importantes (LIN et al., 2018).

Os linfócitos T auxiliares do perfil T_H17 apresentam-se como potentes auxiliares no recrutamento de macrófagos e polimorfonucleares (neutrófilos), e estudos científicos mostraram que a modulação negativa desse perfil celular é importante para melhora da LPA. Em adição, o perfil regulatório regido pelos linfócitos T regulatórios (Treg) foi considerado peça fundamental no balanceamento da resposta induzida pelos linfócitos T_H17 (WANG et al., 2018).

Os resultados desse estudo não distinguem as subpopulações de linfócitos encontrados, logo se faz de grande relevância entender se o alcaloide atua de forma discriminada entre as diferentes subpopulações de linfócitos T sendo, portanto, alvos de investigação para entender não só o mecanismo de ação da molécula em estudo, mas também de esclarecer os caminhos adjacentes do papel desse perfil celular no desenvolvimento da LPA.

Em protocolos experimentais de LPA, a exacerbação da resposta neutrofílica está bem definida e tornou-se alvo terapêutico importante (KINOSHITA; ONO; MOCHIZUKI, 2000). O excesso de atividade da elastase e de proteases de neutrófilos causam danos aos tecidos e altera o processo de remodelamento em muitas outras condições clínicas (KINOSHITA; ONO; MOCHIZUKI, 2000); (POLVERINO et al., 2017).

Os neutrófilos são fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando liberadas no local da inflamação causam disfunção endotelial e lesão tecidual. Sob as condições inflamatórias, o estresse oxidativo produzido pelos neutrófilos leva à abertura de junções endoteliais e favorece a migração de células inflamatórias através da barreira endotelial (MITTAL et al., 2014)(KELLNER et al., 2017).

Os neutrófilos representam as células imunológicas mais abundantes no sangue humano. Eles representam aproximadamente 50-70% de todos os

leucócitos. Além de serem as primeiras células a responder a muitas infecções, os neutrófilos têm funções homeostáticas críticas (SOEHNLEIN et al., 2017), sendo um alvo importante de análise quando se deseja avaliar o potencial terapêutico de novas moléculas candidatas a fármacos anti-inflamatórios.

Na COVID-19, por exemplo, os neutrófilos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da SDRA (CESTA et al., 2023; MCKENNA et al., 2022). Em adição, um desequilíbrio da elastase e outras proteinases produzidas e liberadas por neutrófilos induz danos na barreira alvéolo-capilar, resultando em lesão tecidual e formação de edema (PU et al., 2017).

O MTF foi capaz de atenuar essas lesões teciduais verificadas na análise histopatológica nos pulmões dos camundongos desafiados com MTF. Parâmetros como hemorragia, infiltrado celular e edema foram diminuídos nos animais tratados com a molécula em estudo, quando comparados aos animais sem tratamento. Possivelmente, a diminuição dessas alterações teciduais se deu, principalmente, pela diminuição da migração de neutrófilos para a cavidade pulmonar, perfil celular importante no agravamento dos processos inflamatórios agudos e que o MTF apresentou potencial farmacoterapêutico ao diminuir sua migração para o tecido pulmonar.

Para avaliar o efeito do MTF sobre os neutrófilos, utilizamos o agente flogístico carragenina, que induz, na cavidade peritoneal, uma reação inflamatória semelhante à que ocorre por infecção, inflamação ou neoplasias. A predominância de células migratórias é de polimorfonucleares, com neutrófilos sendo amplamente observados em diversos estudos, classificando-se como uma boa alternativa para avaliação da migração inicial de células inflamatórias (DE FRANÇA et al., 2021; DE SOUZA COSTA et al., 2018).

Sabe-se que a migração neutrofílica é um dos passos iniciais do processo inflamatório frente à defesa a agentes agressores. Isso ocorre porque essas células são finamente sensíveis a estímulos e atingem, em grande número e em minutos, áreas de inflamação e lesão tecidual (PETRI; SANZ, 2018). Para essa resposta efetiva, eles podem detectar gradientes químicos extracelulares e avançar para concentrações mais altas, o chamado processo de quimiotaxia ou migração celular guiada (PETRI; SANZ, 2018).

Em adição, os neutrófilos usam de diferentes mecanismos com o objetivo de debelar possíveis agressores, onde as funções antimicrobianas dessas células se adaptam para combater infecções e lesões de diferentes origens e magnitudes (HIDALGO et al., 2022). A liberação de estruturas de DNA semelhantes a teias, denominadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), constitui um importante mecanismo pelo qual os neutrófilos impedem a disseminação de patógenos ou lidam com microrganismos de maior tamanho (HIDALGO et al., 2022).

No entanto, essas propriedades tóxicas podem produzir efeitos indesejados no hospedeiro, quando os neutrófilos liberam NETs de forma incontrolável após inflamação persistente, o que pode gerar a oclusão de vasos, dano tecidual, e inflamação prolongada associada à progressão e exacerbação de múltiplas condições patológicas (DE BUHR; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, 2020; HIDALGO et al., 2022; MUTUA; GERSHWIN, 2021).

O MHTP, alcaloide com estrutura semelhante ao MTF, também apresenta efeito anti-inflamatório na LPA, principalmente pela redução de neutrófilos (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019). Outros alcaloides de diferentes classificações também apresentam efeito inibitório na migração de neutrófilos na LPA, dentre eles os alcaloides isoquinolínicos berberina (LIANG et al., 2019) e corinolina (LIU et al., 2017), o alcaloide indólico tabersonia (ZHANG et al., 2018), e o alcaloide prostotemonina (WU et al., 2019).

O MTF também foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos no protocolo de peritonite induzida por carragenina. Este, então, é caracterizado por ampla formação de edema intersticial e migração exacerbada de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal dos camundongos. Dentre os parâmetros avaliados, verificamos, então, a migração de células inflamatórias, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a mensuração de edema intersticial pela quantificação de proteínas totais.

Com esse resultado, podemos inferir que o MTF atua logo na fase inicial do processo inflamatório, diminuindo o estímulo necessário para desencadear a migração neutrofílica. E, considerando que essas células podem migrar por estímulos imunomoduladores, como pela liberação de citocinas e quimiocinas (CASALE; CAROLAN, 1999), a análise da liberação dessas indica direcionamentos importantes para a investigação do mecanismo farmacológico que o MTF pode ter.

No processo fisiopatológico da LPA, as citocinas pró-inflamatórias são proteínas essenciais no desenvolvimento da doença (MOKRA; KOSUTOVA, 2015). Liberadas após o reconhecimento de algum agente lesivo ou infeccioso, a exacerbação das respostas induzidas por essas necessita de manejo adequado para que não piorem o prognóstico dos indivíduos então acometidos com a doença (CASER et al., 2014a)(SIEGEL M, PARSONS P, 2018); (I et al., 2019).

Vários biomarcadores potenciais existem em amostras de plasma ou no BALF, muitos dos quais estão sendo ativamente pesquisados em estudos com animais (BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016). Entre as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6, dentre outras citocinas, são os potenciais biomarcadores moleculares mais promissores para prever morbidade e mortalidade de paciente com LPA/SDRA (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

Estudos mostraram que os níveis iniciais e persistentemente elevados de IL-6, IL-8 e TNF- α são preditivos de mortalidade. Esses dados mostraram que as citocinas inflamatórias plasmáticas refletem as concentrações encontradas nas amostras do lavado broncoalveolar (MEDURI et al., 1995); (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

A IL-1 β , por sua vez, é capaz de ativar as células endoteliais, de síntese de proteínas de fase aguda, bem como pode favorecer a diferenciação de células T em células T_H17, que é um perfil celular envolvido no recrutamento de neutrófilos e piora o quadro clínico da LPA (LIN et al., 2018)(MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

A IL-6, embora em apenas pequenas quantidades, na faixa de picogramas, possa ser detectada em humanos saudáveis, em quase todos estados fisiopatológicos, sua expressão é altamente regulada. Essa citocina ativa vias de sinalização intracelular após se ligar ao seu receptor ligado à membrana (IL-6R), que é expresso apenas nos hepatócitos, favorecendo a síntese de proteínas de fase aguda, e em certas subpopulações de leucócitos, induzindo a diferenciação de células T_H17 (WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014); (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020).

O TNF- α é descrito como um dos primeiros mediadores endógenos pró-inflamatórios produzidos na LPA. Quando se liga ao seu receptor no tecido pulmonar leva à liberação de enzimas que causam danos ao parênquima pulmonar, bem como induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais vasculares,

resultando no recrutamento de neutrófilos para o local inflamatório (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019).

Embora a produção e liberação dessas citocinas sejam pontos importantes no agravamento da doença, LPA/SDRA (MOWERY; TERZIAN; NELSON, 2020), os seus estímulos podem ser iniciados por outros fatores que não estão envolvidos com os desencadeadores diretos dessa doença. Isso é reforçado no protocolo experimental de peritonite induzido por carragenina, onde os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α são altamente elevados no lavado peritoneal dos animais desafiados.

Compreendendo as atividades farmacológicas do MTF nestes modelos experimentais, outra perspectiva de análise foi verificar os possíveis alvos farmacológicos do MTF em vias de sinalização inflamatórias. Para tal, foram utilizados modelos *in silico* de *docking* molecular que, embora não sejam estudos conclusivos, são direcionadores, excluindo alvos não promissores e apontando possíveis sítios de ação com melhor eficácia, redução de efeitos toxicológicos e aumentando a seletividade em mecanismos de ação (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2019; KAR; LESZCZYNSKI, 2020).

Quatro alvos moleculares foram elencados para avaliar a afinidade do MTF, sendo eles o receptor de reconhecimento padrão *Toll like 4*, o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), e as MAPKs p38 e ERK2, todos envolvidos em vias de transdução pró-inflamatórias (GERMOLEC et al., 2018). A molécula dexametasona, um corticoide usado na prática clínica, foi escolhido como molécula padrão para os parâmetros comparativos.

Dentre os alvos avaliados, a energia de ligação do MTF para os alvos TLR4 e MAPK p38 foram de -22,500 e -71,492, respectivamente, demonstrando alta afinidade do MTF a esses alvos moleculares quando comparado aos valores da dexametasona. Indicando uma possível via de sinalização intracelular, a qual a molécula em estudo está atuando para desenvolver as suas atividades anti-inflamatórias.

De forma geral, os alcaloides com núcleo tetrahydroisoquinolínicos ou isoquinolínicos, apresentam potencial anti-inflamatório pela inibição de pontos de sinalização do NFkB (KO et al., 2017b). Exemplos podem ser bem observados pelo MHTP em protocolos de inflamação aguda e crônica (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015; PAIVA FERREIRA et al., 2018, 2021), bem como na atividade farmacológica da higenamina, que também diminuiu citocinas

pró-inflamatórias, pela inibição desta mesma via de sinalização (BAI et al., 2019). Ainda, a dauricina atenua a resposta inflamatória induzida por LPS pela regulação negativa da via de sinalização mediada pelo NFkB (QIAO et al., 2019).

O núcleo tetrahydroisoquinolínico pode estar atuando como grupo farmacofórico para o NFkB, inibindo sua ação na via de sinalização pró-inflamatória, reduzindo, então, a formação e a liberação de citocinas e quimiocinas importantes para o desenvolvimento inflamatório (KO et al., 2017b).

Considerando então o efeito imunomodulador do MTF, reduzindo significativamente a liberação de citocinas pró inflamatórias, atenuando no processo inflamatório local pela redução da migração de células inflamatórias, bem como pela redução da concentração de proteínas totais presentes no lavado peritoneal. Esse resultado corrobora os do protocolo de LPA, no qual, o tratamento com MTF também reduziu a concentração de proteínas totais presentes no BALF.

Em conjunto, esses resultados indicam que o MTF apresenta efeito antiedematogênico. Logo, a investigação de como essa molécula interfere na formação deste edema é ponto importante para compreensão do seu possível efeito farmacológico. Investigamos, via o protocolo de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos, como o MTF atuaria na redução do edema intersticial (pata).

A triagem inicial feita com os animais desafiados via intra plantar com carragenina indicou que os efeitos edematogênicos do MTF perduram de 1 até 24 horas após o desafio com este agente flogístico. O MHTP, alcaloide sintético com estrutura molecular semelhante ao MTF, também se mostrou eficaz ao inibir em até 24 horas a formação de edema de pata (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015).

O protocolo de edema de pata induzido por carragenina é importante, pois, após sua administração local, inúmeros mediadores inflamatórios, tais como bradicinina e histamina, são liberados no tecido e desempenham inúmeras funções que podem contribuir na formação de edema local (MCCARSON; FEHRENBACHER, 2021; MORRIS, 2003).

Dentre os estímulos liberados para formação de edema intersticial está a formação de PGE2 (LEBENDER et al., 2018), um dos mediadores lipídicos produzidos a partir do ácido araquidônico (AA) pela ciclooxigenase (COX). Esse mediador está envolvido em diversas reações e sinais clínicos como pirexia, sensação de dor e inflamação (KAWAHARA et al., 2015).

O MTF atuou diminuindo o efeito edematogênico da PGE2 exógena em patas dos camundongos desafiados. Possivelmente, sua ação possa estar relacionada com uma interação sobre os receptores ou componentes da via de sinalização induzida pela PGE2, as quais são mediadas pela ativação do receptor EP3, envolvendo também a estimulação das vias PLC, PKC e MAPKs (CLAUDINO et al., 2006; KAWAHARA et al., 2015).

Outros mediadores inflamatórios, como bradicinina e serotonina, estão envolvidos na sinalização edematogênica (COLE et al., 1995; DOBRIVOJEVIĆ; ŠPIRANEC; SINĐIĆ, 2015; OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016). A bradicinina é um mediador inflamatório que está envolvido no sistema das cininas plasmáticas, possuindo ação pró-inflamatória por estabelecer vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, alterações celulares e, ainda, atuar em vias de sinalização que ativam a fosfolipase A2, o que culmina na produção de substratos para as COX e na geração de mais mediadores pró-inflamatórios (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016). Já a serotonina, mediador do sistema nervoso central, possui efeitos pró-inflamatórios muito bem descritos, atuando como forte agente edematogênico (FLANAGAN; NICHOLS, 2018; OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

O alcaloide derivado de *Cissampelos sympodialis*, a milonina, apresentou eficácia em diminuir o edema de pata induzido por bradicinina, mas não foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela serotonina (SILVA et al., 2017). Já os derivados do alcaloide N-benzoiltriptamina foram capazes de inibir a formação de edema de pata induzidos por ambos os agentes flogísticos (SOUSA-NETO et al., 2018). O MTF, por sua vez, inibiu a formação de edema de pata induzido tanto por bradicinina como por serotonina. Apontando-nos, portanto, caminhos investigativos que podem ser traçados para o MTF, como por exemplo o manejo da dor.

Ainda, a formação de edema de pata pode ser mediada pelas aminas vasoativas, como a histamina, estocada em células imunes teciduais, os mastócitos, que degranulam em contato com padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) ou ao dano (DAMPs), provocando respostas vasculares, tais como aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação (MAINTZ; NOVAK, 2007). Ferramentas farmacológicas são usadas no sentido de compreender a atividade da histamina sobre

respostas biológicas, bem como a ação de moléculas sobre o mecanismo de ação dessa amina entre elas o composto 48/80.

O composto 48/80 induz a liberação de histamina estocada em mastócitos teciduais. Esse processo ocorre quando esse agente indutor é inserido no tecido conjuntivo, atravessa a membrana dos mastócitos e ativa vias de transdução de sinal que culmina na liberação seletiva da histamina para o tecido (IRMAN-FLORJANC; ERJAVEC, 1983). O composto 48/80 atua como uma boa ferramenta para verificar a ação de moléculas testes na inibição da degranulação de mastócitos. Somado a essa ferramenta, utilizar a histamina exógena na indução de edema de pata, também acrescenta na elucidação da atividade farmacológica de moléculas potenciais com essa atividade em foco (MAINTZ; NOVAK, 2007).

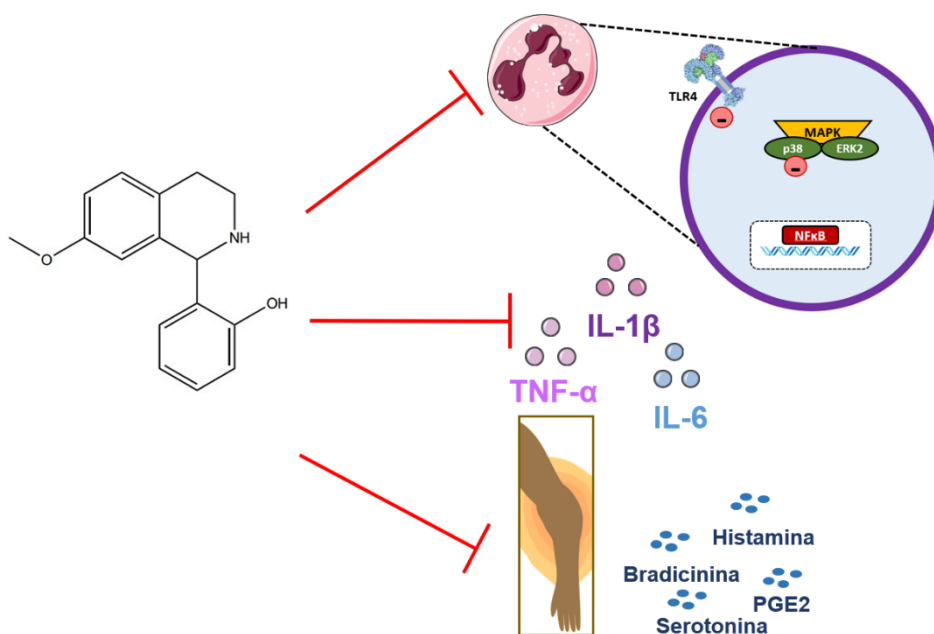
O MTF atuou inibindo a formação de edema de pata tanto no protocolo experimental induzido pelo composto 48/80, bem como pelo protocolo experimental induzido pela histamina exógena. Caso tivesse atuado apenas diminuindo o edema formado pelo composto 48/80, e não no edema formado pela histamina, poderíamos sugerir que o MTF atuaria sobre a inibição da degranulação de mastócitos, o que não foi o caso. Em conjunto, esses dados apontam que essa molécula pode atuar inibindo alvos que estão envolvidos na via de sinalização da histamina.

Embora os estudos realizados neste trabalho sejam iniciais, as análises realizadas até então demonstram que o MTF apresenta um potencial promissor para manejar sinais importantes do processo inflamatório, como migração celular e formação de edema intersticial. Efeitos correlacionados pela diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, onde o MTF pode estar atuando por interagir, de forma inibitória, na via de sinalização do TLR4/MAPKp38.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o alcaloide inédito sintético, codificado MTF, atua regulando processos inflamatórios mediados pela via de sinalização do TLR4/p38, diminuindo a liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , a migração de neutrófilos para o sítio inflamado, além de diminuir a formação de edema intersticial induzido por diferentes agentes flogísticos (Figura 12). Em adição, os estudos *in silico* indicaram que a molécula possui excelente absorção oral, classificando-a como um forte candidato para continuidade de suas análises farmacológicas, podendo vir a tornar-se um novo fármaco com atividade terapêutica em processos inflamatórios, como na Lesão Pulmonar Aguda.

Figura 12: Efeito do MTF sobre a manifestação de sinais inflamatórios



Fonte: Elaborado pelo autor

8. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

- ARTIGAS, A. et al. Inhalation therapies in acute respiratory distress syndrome. **Annals of Translational Medicine**, v. 5, n. 14, p. 293–293, jul. 2017.
- ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, n. 7511, p. 319–323, 12 ago. 1967.
- 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, 19 jun. 2018.
- BAI, X. et al. Higenamine inhibits IL-1 β -induced inflammation in human nucleus pulposus cells. **Bioscience reports**, v. 39, n. 6, 2019.
- BERNARD, G. R. et al. Report of the American-European consensus conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. Consensus Committee. **Intensive Care Medicine**, v. 9, n. 1, p. 72–81, 1994.
- BHATTACHARYA, S. et al. Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. **PloS one**, v. 9, n. 2, 21 fev. 2014.
- BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute lung injury: A clinical and molecular review. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 140, n. 4, p. 345–350, 2016.
- CASALE, T. B.; CAROLAN, E. J. Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 48, n. 1, p. 22–27, 1999.
- CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: Prospective evaluation of 7,133 Patients. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 3, p. 574–582, 2014a.
- CASER, E. B. et al. Impact of distinct definitions of acute lung injury on its incidence and outcomes in Brazilian ICUs: Prospective evaluation of 7,133 Patients. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 3, p. 574–582, 2014b.
- CESTA, M. C. et al. Neutrophil activation and neutrophil extracellular traps (NETs) in COVID-19 ARDS and immunothrombosis. **European Journal of Immunology**, v. 53, n. 1, 1 jan. 2023.
- CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, dez. 2010.
- CHENG, P.; LI, S.; CHEN, H. Macrophages in Lung Injury, Repair, and Fibrosis. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 1 fev. 2021.
- CLAUDINO, R. F. et al. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 318, n. 2, p. 611–618, 2006.
- COLE, H. W. et al. Serotonin-induced paw edema in the rat: Pharmacological profile. **General Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 431–436, 1995.
- DE BUHR, N.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M. Detection, Visualization, and Quantification of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and NET Markers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2087, p. 425–442, 2020.
- DE FRANÇA, J. S. et al. Morita-Baylis-Hillman Adduct 2-(3-Hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) Modulates Inflammatory Process In vitro and In vivo. **Inflammation**, v. 44, n. 3, p. 899–907, 1 jun. 2021.

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

DEQUIN, P.-F. et al. Hydrocortisone in Severe Community-Acquired Pneumonia. **The New England journal of medicine**, v. 388, n. 21, 21 mar. 2023.

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

DOBRIVOJEVIĆ, M.; ŠPIRANEC, K.; SINĐIĆ, A. Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 467, n. 2, p. 201–212, 1 fev. 2015.

FANELLI, V.; RANIERI, V. M. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, p. pp S3–S8, 2015.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. ADMET modeling approaches in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 24, n. 5, p. 1157–1165, 1 maio 2019.

FLANAGAN, T. W.; NICHOLS, C. D. Psychedelics as anti-inflammatory agents. **International review of psychiatry (Abingdon, England)**, v. 30, n. 4, p. 363–375, 4 jul. 2018.

FREITAS, P. R. et al. THERAPEUTIC APPROACHES IN INFLAMMATORY DISEASES: A REVIEW. **Interfaces**, v. 7, n. 2, p. 318–324, 2019.

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

GAJIC, O. et al. Early identification of patients at risk of acute lung injury: Evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 4, p. 462–470, 15 fev. 2011.

GALLELLI, L. et al. **Severe Acute Lung Injury Related to COVID-19 Infection: A Review and the Possible Role for Escin**. **Journal of Clinical Pharmacology** Blackwell Publishing Inc., , 2020.

GBD 2015 CHRONIC RESPIRATORY DISEASE COLLABORATORS, J. B. et al. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet. Respiratory medicine**, v. 5, n. 9, p. 691–706, set. 2017.

HARRINGTON, J. S. et al. Acute respiratory distress syndrome without identifiable risk factors: A secondary analysis of the ARDS network trials. **Journal of Critical Care**, v. 47, p. 49–54, 2018.

HIDALGO, A. et al. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. **Cardiovascular research**, v. 118, n. 13, p. 2737–2753, 21 out. 2022.

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

IRMAN-FLORJANC, T.; ERJAVEC, F. Compound 48/80 and substance P induced release of histamine and serotonin from rat peritoneal mast cells. **Agents and actions**, v. 13, n. 2–3, p. 138–141, 1983.

JIN, S. et al. Mechanical Ventilation Exacerbates Poly (I:C) Induced Acute Lung Injury: Central Role for Caspase-11 and Gut-Lung Axis. **Frontiers in immunology**, v. 12, 19 jul. 2021.

KAR, S.; LESZCZYNSKI, J. Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates. **Expert opinion on drug discovery**, v. 15, n. 12, p. 1473–1487, 1 dez. 2020.

- KAUKONEN, K.-M. et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria in Defining Severe Sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, p. 1629–1638, 2015.
- KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1851, n. 4, p. 414–421, 2015.
- KELLNER, M. et al. ROS signaling in the pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 967p. 105–137.
- KINOSHITA, M.; ONO, S.; MOCHIZUKI, H. Neutrophils mediate acute lung injury in rabbits: Role of neutrophil elastase. **European Surgical Research**, v. 32, n. 6, p. 337–346, 2000.
- KO, Y. S. et al. A limited series of synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloids reduce inflammatory gene iNOS via inhibition of p-STAT-1 and suppress HMGB1 secretion in LPS-treated mice lung tissue. **International Immunopharmacology**, v. 52, p. 297–304, 1 nov. 2017a.
- KO, Y. S. et al. A limited series of synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloids reduce inflammatory gene iNOS via inhibition of p-STAT-1 and suppress HMGB1 secretion in LPS-treated mice lung tissue. **International immunopharmacology**, v. 52, p. 297–304, 1 nov. 2017b.
- LEBENDER, L. F. et al. Selectively targeting prostanoid E (EP) receptor-mediated cell signalling pathways: Implications for lung health and disease. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 49, p. 75–87, 1 abr. 2018.
- LIANG, Y. et al. Berberine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the PERK-mediated Nrf2/HO-1 signaling axis. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 1, p. 130–148, 1 jan. 2019.
- LIN, S. et al. **Regulatory T cells and acute lung injury: Cytokines, uncontrolled inflammation, and therapeutic implications**. **Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 9 jul. 2018.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, 1 mar. 2001.
- LIU, Y. et al. Corynoline attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by activating Nrf2. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 96–101, 1 jul. 2017.
- LONG, M. E.; MALLAMPALLI, R. K.; HOROWITZ, J. C. Pathogenesis of pneumonia and acute lung injury. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 136, n. 10, p. 747–769, 1 maio 2022.
- LU, H. L. et al. Activation of M1 macrophages plays a critical role in the initiation of acute lung injury. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, 27 abr. 2018.
- MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **The American journal of clinical nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1185–1196, 1 maio 2007.
- MCCARSON, K. E.; FEHRENBACHER, J. C. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. **Current protocols**, v. 1, n. 7, 1 jul. 2021.
- MCKENNA, E. et al. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. **Frontiers in immunology**, v. 13, 1 jun. 2022.
- MEDURI, G. U. et al. Inflammatory Cytokines in the BAL of Patients With ARDS: Persistent Elevation Over Time Predicts Poor Outcome. **Chest**, v. 108, n. 5, p. 1303–1314, 1 nov. 1995.
- MITTAL, M. et al. **Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury**. **Antioxidants and Redox Signaling**Antioxid Redox Signal, , 1 mar. 2014.

- MOKRA, D. et al. **Corticosteroids in acute lung injury: The dilemma continues**. *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 out. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31557974>>. Acesso em: 13 abr. 2020
- MOKRA, D.; KOSUTOVA, P. Biomarkers in acute lung injury. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, v. 209, p. 52–58, 2015.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 225, p. 115–121, 2003.
- MOWERY, N. T.; TERZIAN, W. T. H.; NELSON, A. C. Acute lung injury. *Current Problems in Surgery*, v. 57, n. 5, 1 maio 2020.
- MURAKAMI, T.; BODOR, E.; BODOR, N. Approaching strategy to increase the oral bioavailability of berberine, a quaternary ammonium isoquinoline alkaloid: Part 1. Physicochemical and pharmacokinetic properties. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 19, n. 3, 2023a.
- MURAKAMI, T.; BODOR, E.; BODOR, N. Approaching strategy to increase the oral bioavailability of berberine, a quaternary ammonium isoquinoline alkaloid: part 2. development of oral dosage formulations. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, v. 19, n. 3, p. 139–148, 4 mar. 2023b.
- MUTUA, V.; GERSHWIN, L. J. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinical reviews in allergy & immunology*, v. 61, n. 2, p. 194–211, 1 out. 2021.
- OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. DE; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Revista Dor*, v. 17, p. 35–42, 2016.
- PACHECO DE OLIVEIRA, M. T. et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 37, n. 4, p. 400–412, 2015.
- PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid, Induces IFN- γ Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation. *Inflammation*, v. 41, n. 6, p. 2116–2128, 2018.
- PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. MHTP, a synthetic alkaloid, attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome through downregulation of the p38/ERK1/2 MAPK signaling pathway in mice. *International immunopharmacology*, v. 96, 1 jul. 2021.
- PANNU, A.; O'GARA, B. Inhaled anesthetics in acute lung injury. *International Anesthesiology Clinics*, v. 56, n. 1, p. 118–130, 2018.
- PARK, I. et al. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *The European respiratory journal*, v. 53, n. 3, 1 mar. 2019.
- PATIL, K. R. et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 18, 1 set. 2019.
- PETRI, B.; SANZ, M. J. Neutrophil chemotaxis. *Cell and tissue research*, v. 371, n. 3, p. 425–436, 1 mar. 2018.
- POLVERINO, E. et al. The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. *Chest*, v. 152, n. 2, p. 249–262, 1 ago. 2017.
- PU, S. et al. Effect of sivelestat sodium in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC pulmonary medicine*, v. 17, n. 1, 21 nov. 2017.

- QIAO, B. et al. Dauricine negatively regulates lipopolysaccharide- or cecal ligation and puncture-induced inflammatory response via NF- κ B inactivation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 666, p. 99–106, 15 maio 2019.
- RANIERI, V. M. et al. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 23, p. 2526–2533, 13 jun. 2012.
- SHEN, Y. et al. M2 macrophages promote pulmonary endothelial cells regeneration in sepsis-induced acute lung injury. **Annals of Translational Medicine**, v. 7, n. 7, p. 142–142, abr. 2019.
- SIEGEL M, PARSONS P, F. G. Acute respiratory distress syndrome: Clinical features, diagnosis, and complications in adults. **UpToDate**, 2018.
- SILVA, L. R. et al. Milonine, a Morphinandienone Alkaloid, Has Anti-Inflammatory and Analgesic Effects by Inhibiting TNF- α and IL-1 β Production. **Inflammation**, v. 40, n. 6, p. 2074–2085, 11 dez. 2017.
- SINGH, B. et al. β 2 agonist for the treatment of acute lung injury: A systematic review and meta-analysis. **Respiratory Care**, v. 59, n. 2, p. 288–296, 1 fev. 2014.
- SOEHNLEIN, O. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 17, n. 4, p. 248–261, 1 abr. 2017.
- SOUSA-NETO, B. P. et al. Antiedematogenic activity of the indole derivative N-salicyloyltryptamine in animal models. **An Acad Bras Cienc**, v. 90, n. 1, p. 185–194, 2018.
- TANG, G.-L. et al. Biosynthesis of Tetrahydroisoquinoline Antibiotics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 15, p. 1717–1726, 15 out. 2015.
- WANG, L. et al. Recovery from acute lung injury can be regulated via modulation of regulatory T cells and Th17 cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 88, n. 5, 1 nov. 2018.
- WANG, L. et al. The role of immunometabolism in macrophage polarization and its impact on acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1117548, 2023.
- WOLF, J.; ROSE-JOHN, S.; GARBERS, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. **Cytokine**, v. 70, n. 1, p. 11–20, 1 nov. 2014.
- WU, R.; LIN, S.; ZHAO, H. Albuterol in the treatment of acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis of randomized controlled trials. **World journal of emergency medicine**, v. 6, n. 3, p. 165, 2015.
- WU, Y. et al. Protostemonine alleviates heat-killed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced acute lung injury through MAPK and NF- κ B signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 77, 1 dez. 2019.
- XIAOFANG, H. et al. The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS. **Mediators of inflammation**, n. 1264913, 2018.
- YANG, H. et al. Oridonin protects LPS-induced acute lung injury by modulating Nrf2-mediated oxidative stress and Nrf2-independent NLRP3 and NF- κ B pathways. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, 11 jun. 2019.
- YQ, H. et al. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms. **Pharmacological research**, v. 163, 1 jan. 2021.
- YUAN, Z.; BEDI, B.; SADIKOT, R. T. Bronchoalveolar Lavage Exosomes in Lipopolysaccharide-induced Septic Lung Injury. **Journal of Visualized Experiments**, n. 135, p. e57737, 2018.
- ZHANG, D. et al. Tabersonine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via suppressing TRAF6 ubiquitination. **Biochemical Pharmacology**, v. 154, p. 183–192, 1 ago. 2018.

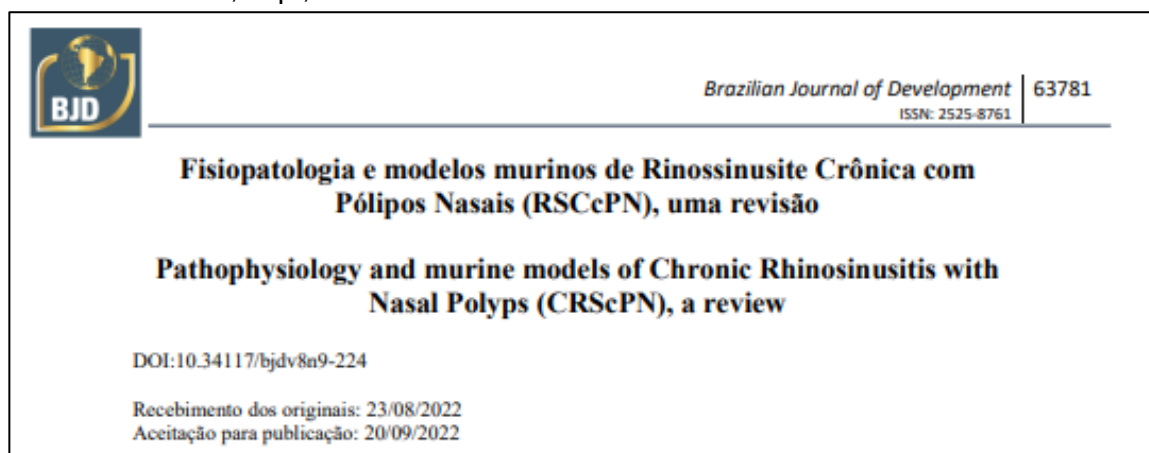
ANEXOS – PRODUÇÃO CIENTÍFICA REALIZADA DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO ACADÊMICO

• Artigos científicos publicados

- ❖ Larissa R. Bernardo, Laércia Karla D.P. Ferreira, Larissa A.M.P. Ferreira, Cosmo Isaías D. Vieira, João Batista De Oliveira, Louise M. De Lima, Adriano Francisco Alves, Rubens S. Araújo, Mayara S. Maia, Marcus T. Scotti, José Maria Barbosa Filho & Marcia Regina Piuvezam. Milonine attenuates the lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by modulating the Akt/NF- κ B signaling pathways. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2022, 94(Suppl. 4): e20211327 DOI 10.1590/0001-376520220211327.



- ❖ Laércia Karla D.P. Ferreira, Larissa A.M.P. Ferreira, Louise M. De Lima, João Batista De Oliveira, Cosmo Isaías D. Vieira, Larissa R. Bernardo, Marcia Regina Piuvezam. Fisiopatologia e modelos murinos de Rinossinusite Crônica com Pólipos Nasais (RSCcPN), uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.8, n.9, p. 63781- 63794, sep., 2022.



- ❖ SILVA, E. R. da; VIEIRA, G. N.; CRUZ, P. J. S. C.; OLIVEIRA, J. B. de. Potencialidades e desafios das práticas educativas em Promoção da Saúde e Segurança Alimentar Nutricional na Atenção Básica. **Revista de Educação Popular**, Uberlândia, MG, p. 135–155, 2022. DOI: 10.14393/REP-2022-67140.

Potencialidades e desafios das práticas educativas em Promoção da Saúde e Segurança Alimentar Nutricional na Atenção Básica

Edileuza Ricardo da Silva¹, Gabriel Nóbrega Vieira², Pedro José Santos Carneiro Cruz³, João Batista de Oliveira⁴

- **Trabalhos apresentados em congressos internacionais**

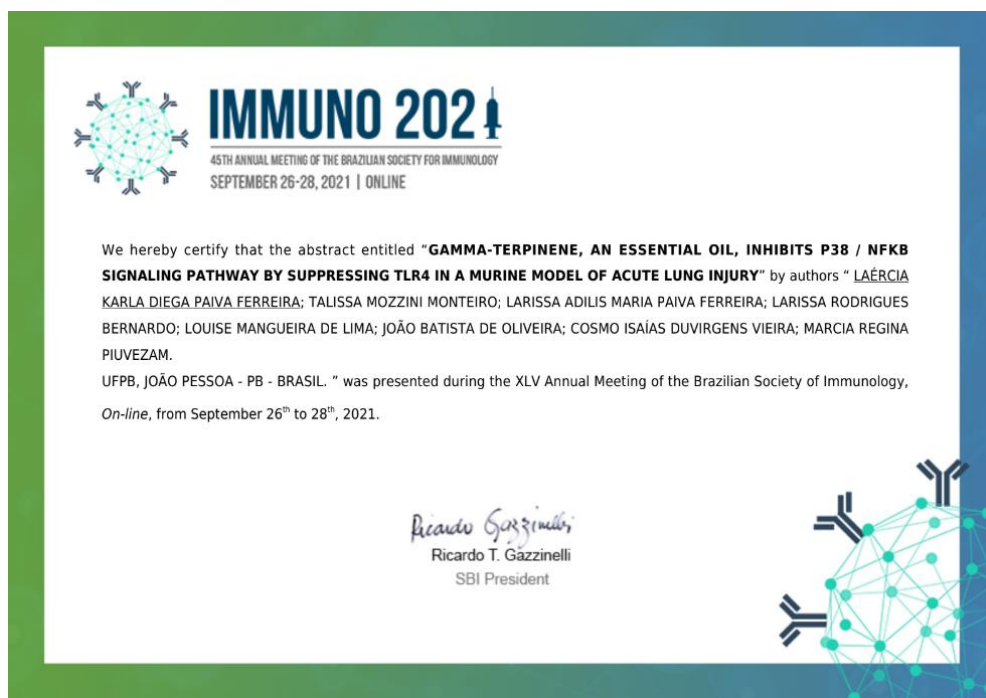
- ❖ Avaliação das vias de sinalização intracelular da dexametasona em modelo experimental da síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS) no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba. CINASAMA - **Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente, 2021.**
- ❖ Lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo – avaliação local e sistêmica das citocinas próinflamatórias em modelo murino experimental. CINASAMA - **Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente, 2021.**
- ❖ Uso da indometacina como droga padrão antiinflamatória em modelos murino de desordens inflamatórias agudas no laboratório de imunofarmacologia da UFPB. CINASAMA - **Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente, 2021.**

- **Trabalhos apresentados em congressos nacionais**

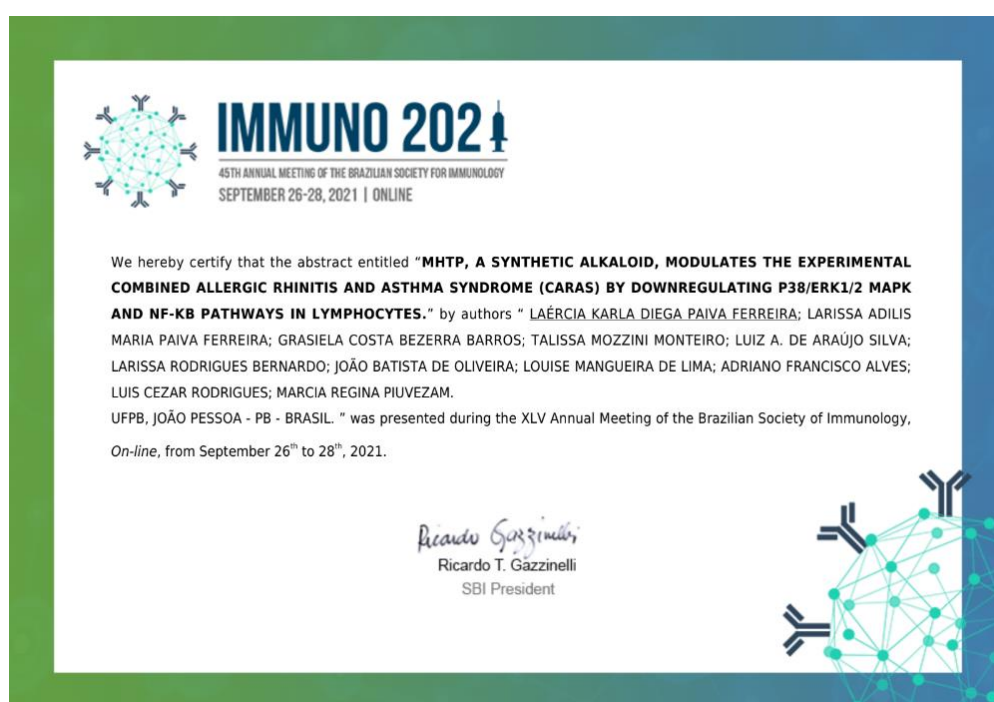
- ❖ Curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, ameliorates the lipopolysaccharide-induced acute lung injury by downregulating the TLR4/md-2/NF-κB(p65) signaling pathway. **XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2021.**



- ❖ Gamma-terpinene, an essential oil, inhibits p38 / NFkB signaling pathway by suppressing TLR4 in a murine model of acute lung injury. **XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2021.**



- ❖ MHTP, a synthetic alkaloid, modulates the experimental combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by downregulating p38/erk1/2 mapk and NFkB pathways in lymphocytes. **XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2021.**

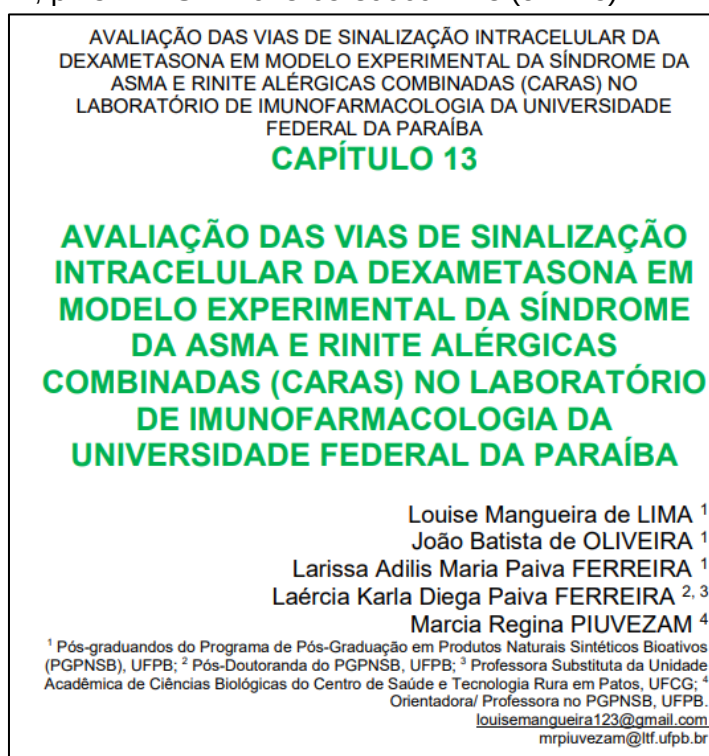


- ❖ Milonine protects against acute lung injury by modulating the akt and NFkB signaling pathway. **XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2021.**

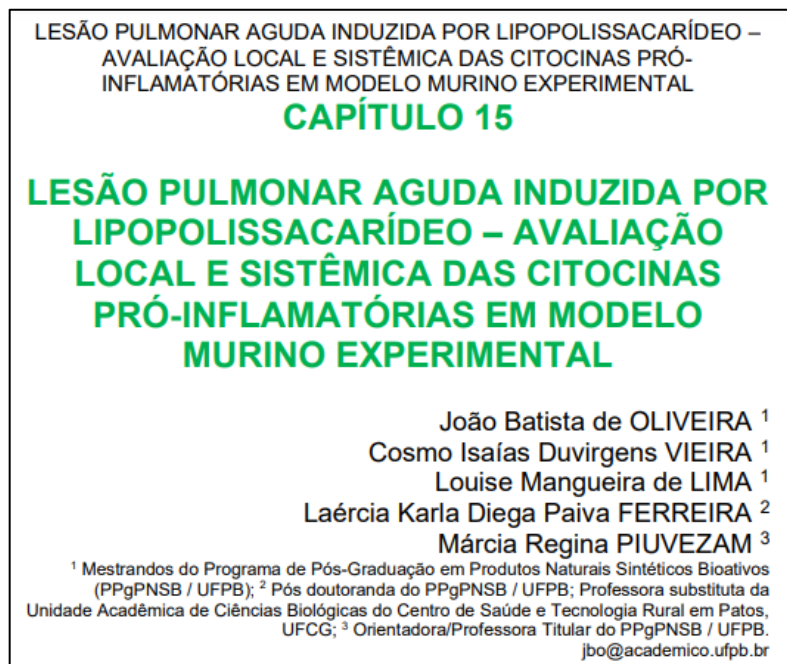


- **Capítulos de livros publicados**

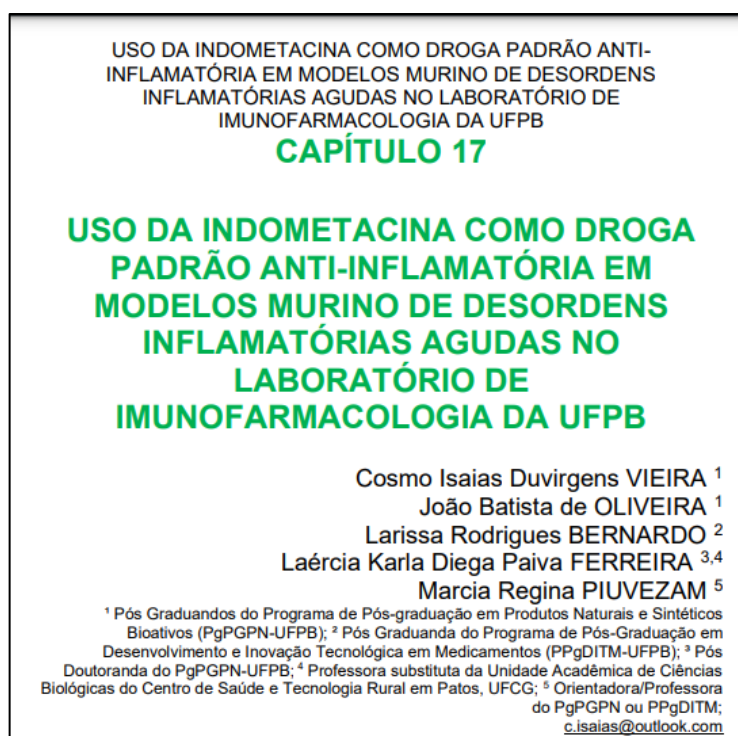
- ❖ Avaliação das vias de sinalização intracelular da dexametasona em modelo experimental da síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (caras) no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba. **Farmacia: os desafios do novo cenário.** 1ed. João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2022, p.23-44. ISBN: 978-65-89069-21-8 (on-line)



- ❖ Lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo – avaliação local e sistêmica das citocinas próinflamatórias em modelo murino experimental. **Farmacia: os desafios do novo cenário**. 1ed. João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2022, p.67-86. ISBN: 978-65-89069-21-8 (on-line)



- ❖ Uso da indometacina como droga padrão antiinflamatória em modelos murino de desordens inflamatórias agudas no laboratório de imunofarmacologia da UFPB. **Farmacia: os desafios do novo cenário**. 1ed. João Pessoa: Instituto Medeiros de Educação Avançada, 2022, p.107-131. ISBN: 978-65-89069-21-8 (on-line)



- **Premiação acadêmica**

- ❖ Honra ao mérito pelo melhor trabalho apresentado na área - CINASAMA - Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente 2019, João Pessoa – PB, 2021.



- **Depósito de patente**

- ❖ Patente de Invenção. ALCALOIDE PARA O TRATAMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA LESÃO PULMONAR AGUDA. Número do Processo: BR 10 2021 026081 5.