

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

TESE

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

**ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E IMUNOMODULADORA DE 2-(3-HIDROXI-
1-METIL-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (CISACN) NA SÍNDROME DA
ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL**

JOÃO PESSOA – PB

2024

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E IMUNOMODULADORA DE 2-(3-HIDROXI-1-METIL-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (CISACN) NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora** em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: **Farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F383a Ferreira, Larissa Adilis Maria Paiva.

Atividades anti-inflamatória e imunomoduladora de 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila (cisacn) na síndrome da asma e rinite alérgica combinadas (caras) experimental / Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira. - João Pessoa, 2024.

104 f. : il.

Orientação: Márcia Regina Piuvezam.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Aduto. 2. Modelo Experimental de CARAS. 3. Sinais clínicos de Rinite alérgica. 4. Citocinas. 5. Eosinófilos. 6. Asma. I. Piuvezam, Márcia Regina. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.248+616.211-002(043)

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA

ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E IMUNOMODULADORA DE 2-(3-HIDROXI-1-METIL-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (CISACN) NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL

Tese 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 **DOUTORA EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Tese aprovada em 17/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



MARCIA REGINA PIUVEZAM

Data: 29/07/2024 10:58:32-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (Orientadora)
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)

Documento assinado digitalmente



MARIANNA VIEIRA SOBRAL

Data: 23/07/2024 20:56:55-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB. Avaliadora Interna)

Documento assinado digitalmente



MARGARETH DE FATIMA FORMIGA MELO DINIZ

Data: 23/07/2024 12:00:06-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Margareth de Fatima Formiga Melo Diniz
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB. Avaliadora Interna)

Documento assinado digitalmente



ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

Data: 20/07/2024 18:32:10-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz
(Universidade Federal de Alagoas. Avaliadora Externa)

Documento assinado digitalmente



NAIARA NAIANA DEJANI

Data: 21/07/2024 19:08:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Naiara Naiana Dejani
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB. Avaliadora Externa)

À minha maior incentivadora,
Ao meu maior exemplo,
Àquela que é a inspiração dos meus passos profissionais e pessoais,
A melhor irmã que Deus poderia colocar em minha vida,
Dra. Laércia Karla Diega Paiva Ferreira,
Dedico todo esse trabalho.

*“Antes que te formasse no ventre, te conheci, e antes que saíesses da
madre, te santifiquei, e às nações te dei por profeta.”*

Jr 1:5

*“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente
descansará.*

*Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e
nele confiarei.*

*Porque ele te livrará do laço do passarinho, e da peste perniciosa.
Ele te cobrirá com as suas penas, e debaixo das suas asas te confiarás;
a sua verdade será o teu escudo e broquel.*

*Não terás medo do terror de noite nem da seta que voa de dia,
Nem da peste que anda na escuridão, nem da mortandade que assola
ao meio-dia.*

*Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti.
Somente com os teus olhos contemplarás, e verás a recompensa dos
ímpios.*

*Porque tu, ó Senhor, és o meu refúgio. No Altíssimo fizeste a tua
habitação.*

*Nenhum mal te sucederá, nem praga alguma chegará à tua tenda.
Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem em
todos os teus caminhos.*

*Eles te sustentarão nas suas mãos, para que não tropeces com o teu pé
em pedra.*

*Pisarás o leão e a cobra; calcarás aos pés o filho do leão e a serpente.
Porquanto tão encarecidamente me amou, também eu o livrarei; pô-lo-ei
em retiro alto, porque conheceu o meu nome.*

*Ele me invocará, e eu lhe responderei; estarei com ele na angústia; dela
o retirarei, e o glorificarei.*

Fartá-lo-ei com longura de dias, e lhe mostrarei a minha salvação.”

SI 91

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a **Deus**, por toda graça imerecida, por suas misericórdias renovadas diariamente em minha vida, por todos os livramentos e pelas dádivas concedidas durante toda a execução desse trabalho. Ao único e suficiente Salvador da minha vida, autor e consumidor da minha fé, meu suporte e apoio, esconderijo e acalento sempre, pois sem Ele, nada seria possível.

À minha base, meu alicerce, sustento e consolo, meus maiores incentivadores e mantenedores constantes, **Luiz Carlos de Souza Ferreira e Clélia Paiva da Veiga**, painho e mainha. Sem vocês, nada disso estaria acontecendo. Vocês são meu suporte diário, a minha motivação de prosseguir, mesmo em meio as dificuldades. Meu pai, sempre trabalhador e que me ensinou desde cedo a importância do trabalho, de que sem sacrifícios nada conseguimos. Honestidade, trabalho e dedicação, esforço e empenho em tudo que faz, são ensinamentos que trago comigo por toda vida, obrigada por me ensinar princípios e caráter, por ser o provedor e acreditar em mim, te amo muito painho. Minha mainha, meu maior e primeiro amor, minha amiga, minha razão. Sei que dei muito trabalho na infância, pelas peripécias e curiosidades que, por muitas vezes, custavam cicatrizes que carrego até hoje com muito carinho. Agradeço por todas as orações, por todo cuidado, por toda atenção, por todo zelo, por nunca desistir de mim e sempre segurar em minhas mãos. Deus, na sua infinita sabedoria e misericórdia, me colocou sob seus cuidados e sabia o tanto que nossa relação seria especial e diferente. Ah, se todos os filhos tivessem o privilégio de tê-la como mãe. A senhora é o meu exemplo de fé, de intercessão, de graça, de coração. Obrigada por ser a senhora, por ser meu amor, por confiar em mim e acreditar mais que a mim mesma.

À ela, **Dra. Laércia Karla Diega Paiva Ferreira**, minha irmãzinha, a melhor professora do mundo, a imunologista mais apaixonada, a pesquisadora dedicada, a irmã amorosa, cuidadosa e sempre presente. Como eu te agradeço minha irmã, por ser exatamente você. Por toda ajuda, por todo conselho, por todo cuidado, por acreditar em mim, mesmo quando eu acho que não consigo. Lah, você é a minha maior inspiração, tenho em você meu norte. As palavras tornam-se tão pequenas e simples para conseguir expressar o tamanho da minha admiração e cuidado para com você. Deus não poderia ter me dado uma irmã melhor, parceiras, amigas, e hoje, dizemos com propriedade sobre o que é ser amigas. Quantos momentos já compartilhamos e só agradeço a Deus por esse privilégio. Deixo registrado nesse trabalho que sou hoje, Farmacêutica e Mestre, quase doutora, por muito apoio seu e tenho muito orgulho disso. Nossos experimentos, implantações, discussões científicas, construções de trabalhos e arguições tão enriquecedoras aprimoraram meu senso crítico científico e me fizeram repensar e argumentar em cada discussão. Regida no “chicote”, ensinada no modo mais “raiz” possível, buscando sempre a excelência em cada atitude, com compromisso, dedicação e responsabilidade: foi assim que fui iniciada na ciência e permaneci com esses propósitos até hoje. Conheci os “BALB/c” antes mesmo da UFPB, ainda no ensino médio, e desde ali, sabia que meu coração tinha uma polarização para pesquisa, e tudo graças a você, minha irmã. Dedico essa tese a você, pois sem ti, jamais teríamos obtido sucesso. Você é maravilhosa, te amo.

Agradeço a minha voinha, **Maria Alves de Souza Ferreira**, por todo suporte, força, apoio e por sempre está disponível, para qualquer situação. É minha

voinha que vale por quatro. Eu te amo tanto, minha vó, e agradeço a Deus por tê-la comigo em toda essa trajetória.

Aos meus familiares, **cunhado, tios, tias, primos e primas**, que direta ou indiretamente contribuíram para finalização dessa etapa tão importante em minha vida. Em especial, **Romero, Tia Mariinha, Tia Raquel, Tia Socorro, Tio André, Dudinha, Thiala, Fia Moça, Flor** e todos os outros.

Ao suporte espiritual, **Pastor Mano e Rinalda**, por me ajudar em oração e fortalecer minha fé, por sempre estarem dispostos a ajudar e ser palavra de conforto e apoio durante os momentos difíceis, e, sobretudo, nos alegres.

À **Dra Marcia Regina Piuvezam**, carinhosamente conhecida também como minha orientadora e professora amada. O que dizer de nossa trajetória de quase 12 anos juntas? A senhora é uma mãe científica, e no sentido mais real do adjetivo. Agradeço por tudo que construímos, por toda sua dedicação para comigo, seu empenho em me ensinar, por me mostrar que sempre existe uma saída. Obrigada por lapidar esse barro que chegou tão bruto em suas mãos. Que exemplo a senhora é, professora. Mulher íntegra, humilde, resiliente, dedicada, inteligente, extremamente profissional, ética, amorosa, cuidadosa, gentil. Quantas qualidades que tive o privilégio de conviver nos mais adversos momentos e comprová-las todas. Obrigada por segurar minha mão em um momento tão difícil e não soltar!! Obrigada por acreditar em mim, por me ensinar a confiar novamente em mim mesma, professora. Eu não tenho palavras para lhe agradecer por todo o bem que a senhora fez por mim. Saiba que terá sempre minha eterna gratidão. Que privilégio, que graça divina poder ter aprendido ciência com a melhor cientista que essa UFPB já viu. Que exemplo e que reponsabilidade em aplicar o que aprendi com a senhora nos meus próximos passos, agora, sem sua supervisão... Está sendo muito difícil me ver nesse cenário, mas sei que posso contar com a senhora sempre, pois somos muito mais que uma aluna-professora. A senhora é minha eterna mãe científica e por quem nutro uma admiração e carinho inigualáveis. Eu amo a senhora professora, e oro para que Deus continue te fazendo brilhar e iluminar a vida de tantos que tem o privilégio de lhe conhecer. Do fundo do meu coração, o meu mais puro obrigada, gratidão por ter me escolhido e não ter desistido de mim, mesmo com todos os motivos para tal, a senhora não desistiu. Obrigada, e estamos finalizando "do melhor jeito que podemos", obrigada professora.

Àqueles que são, sem dúvida nenhuma, a família que escolhi e que Deus colocou para me auxiliar nessa jornada tão árdua: **meus amigos**, que foram suporte nesse período, em especial agradeço à **Dra. Cinthia Rodrigues**, que foi essencial na etapa de estudos e aprovação para o doutorado e por todos os momentos angustiantes e alegres compartilhados. Você é muito especial minha amiga, e que benção ter sua amizade e desfrutar de todo carinho que temos e a nossa torcida de sucesso mútua. À **Fernanda e Ana Luiza**, presentes que o curso de Farmácia me deu e que seguimos até hoje, unidas e sempre sendo apoio e fortaleza. Vocês são muito importantes meninas e agradeço a Deus pelas vossas vidas.

Ainda, agradeço àqueles que compartilham as experiências e sempre disponibilizam um ombro amigo e uma mão ajudadora na caminhada, tornam o

caminho mais leve: **Mara, Paula, Eliane, Lulinha, Suenia, Eduardo, Dinart, Andréa e Jackeline**, obrigada de coração por toda ajuda, por tudo. Vocês estão em meu coração.

À minha grande amiga **Thâmyla Maria**, um presente que não tenho palavras para agradecer a Deus. Obrigada por todo suporte, ajuda, orientação, pela mão estendida, pelas “caronas de sempre”, pelos “lanches deliciosos”, por acompanhar, mesmo sem entender, meus estresses e a correria para escrever. Você é uma amiga muito especial e que eu só agradeço sua amizade, daquelas que a gente guarda para o resto da vida e sabe que tem abrigo. Essa tese tem sua participação efetiva por todo apoio, muito obrigada, de coração, por tudo. Amo você.

Aos **colegas do Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) da UFPB, Caércia, Larissa R., Talissa, Raquel, Allysson, Louise, Cosmo e João**, bem como às **Professoras Naiara, Giciane e Sandra**, por toda contribuição no desenvolvimento dos experimentos, por toda conversa na bancada, por toda troca de experiências e pelo apoio, que é tão importante para execução do trabalho.

À minha eterna aluna de IC, **Louise Manguiera**, que me ensinou a arte de ensinar, que contribuiu de forma significativa para a execução destes experimentos e que se doa por completo a cada oportunidade que lhe é concedida. Você chegará longe e que Deus possa te abençoar abundantemente, você é muito especial.

Ao professor **Dr. Cláudio Gabriel Junior**, por ter cedido o CISACN, utilizado neste trabalho, por toda disponibilidade, atenção e carinho para conosco.

A todos os **professores, mestres e doutores** que foram essenciais para o ápice desse trabalho, que durante toda minha trajetória acadêmica deixaram comigo um pouco de suas personalidades e me moldaram a ser quem me tornei. Desde o início, lá em Itabaiana-PB, passando pelo ensino fundamental e médio e culminando com os de graduação, que privilégio os ter como mestres. Em especial, destaco **Profa. Dra. Celidarque, Profa. Dra. Daniele, Profa. Dra. Marianna** e todos os que ainda me acompanharam no mestrado e, agora do doutorado. Vocês acenderam e mantiveram viva a chama do conhecimento e a crescente busca por descobertas dentro de mim.

À querida **Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral**, desde a graduação me cativou com seu jeito único e especial de ensinar e tocar a vida de seus alunos. Que privilégio ter a senhora em momentos tão especiais e importantes da minha vida, na defesa do mestrado, na qualificação e, agora, na defesa do doutorado. Eu agradeço a Deus pelo dom da sua vida e reitero que tenho muita admiração pela senhora, és exemplo e ajuda, obrigada por tudo.

À banca examinadora, **Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral; Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz; Prof. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz e Prof. Dra. Naiara Naiana Dejani** por ter aceitado o convite, pelo empenho e presteza em contribuir com esse trabalho e por serem tão solícitos, vocês são referências que tenho na caminhada científica e tenho

muito gratidão por disponibilizarem vosso tempo para esse momento tão importante e repleto de significado na minha vida. Vocês são exemplos e tê-las comigo neste momento é enriquecedor.

Aos professores ***Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira e Profa. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho*** por terem aceitado o convite de estar a postos sempre que necessário, vocês são muito importantes nesse momento tão especial de minha vida, e em especial, ***Profa Fabiana*** por ter contribuído de forma essencial na construção desse trabalho e toda dedicação para comigo.

Aos funcionários da UFPB, em especial, ***Mônica***, por todo apoio diário nas conversas no laboratório, por toda presteza e atenção quando solicitados.

À ***Universidade Federal da Paraíba, ao CNPQ e CAPES***, pela estrutura física, recursos humanos e estímulo a pesquisa que proporcionaram o desenvolvimento de minhas atividades.

FERREIRA, L.A.M.P. ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E IMUNOMODULADORA DE 2-(3-HIDROXI-1-METIL-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRILONITRILA (CISACN) NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL. 2024. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

RESUMO

A síndrome da asma e rinite alérgica combinadas (CARAS) é uma doença caracterizada por uma resposta imune do tipo 2 (T_H2) nas vias aéreas, acompanhada por um processo inflamatório intenso que afeta amplamente a população mundial. Devido ao comprometimento na qualidade de vida e à falta de farmacoterapia específica, a busca por novas moléculas torna-se relevante. Este estudo teve como objetivo avaliar o tratamento com o aduto de Morita Baylis-Hillman CISACN no modelo experimental de CARAS. Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) por um período de 43 dias e tratados com CISACN nas doses de 6,25; 12,5; ou 25 mg/kg por via oral. O tratamento com o aduto diminuiu o infiltrado de eosinófilos e neutrófilos, a hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes e o remodelamento tecidual da cavidade nasal nas doses de 12,5 e 25 mg/kg. A dose de 12,5 mg/kg foi escolhida para dar continuidade as análises por ser a menor dose capaz de promover o efeito anti-inflamatório investigado. Em adição, o CISACN reduziu o infiltrado de eosinófilos e neutrófilos no pulmão revertendo, a nível basal, o número de eosinófilos, a inflamação tecidual pulmonar, a hiperplasia/hipertrofia das células caliciformes, a hiperatividade da via aérea inferior, reduzindo a hiperplasia/hipertrofia do músculo liso e a espessura da matriz extracelular pulmonar. O CISACN reduziu os sinais clínicos de rinite alérgica, como fricção nasal e espirros, em ensaio de hiperreatividade nasal induzida por histamina. O efeito imunomodulador do CISACN foi observado via a redução dos níveis séricos de IgE total e IgE OVA-específica e o número de eosinófilos no sangue. O tratamento também diminuiu a produção de IL-33, TSLP, IL-17, TNF- α e TGF- β com efeito imuno regulador via diminuição de IL-5, IL-4, IL-13, citocinas do perfil T_H2 , dependente da produção de IFN- γ , citocina do perfil T_H1 , mas independente da produção de IL-10, citocina do perfil T regulador (Treg). Nas análises moleculares, observamos que o CISACN diminuiu, nos granulócitos pulmonares, a ativação da via de sinalização p-p38MAPK e p-NF- κ B, independente de p-ERK1/2MAPK. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram os efeitos anti-inflamatório e imunomodulador do CISACN pela diminuição da migração de células inflamatórias para os tecidos das vias aéreas de animais com CARAS, de citocinas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do perfil da CARAS e diminuição na via de sinalização celular responsável pela produção dessas moléculas sinalizadoras. O respaldo científico fornecido por esse trabalho possibilita a utilização do CISACN em formulações farmacêuticas a serem testadas no tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas.

Palavras chaves: Aduto; Modelo Experimental de CARAS; Sinais Clínicos de Rinite Alérgica; Citocinas; Eosinófilos; Balanço de resposta imune T_H1/T_H2

FERREIRA, L.A.M.P. **ANTI-INFLAMMATORY AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES OF 2-(3-HYDROXY-1-METHYL-2-OXOINDOLIN-3-IL) ACRYLONITRILE (CISACN) IN COMBINED ASTHMA AND ALLERGIC RHINITIS SYNDROME EXPERIMENTAL.** 2024. Thesis (Doctorate in Natural and Bioactive Synthetic Products) – UFPB/CCS, João Pessoa.

ABSTRACT

Combined asthma and allergic rhinitis syndrome (CARAS) are a type 2 (T_H2) airway immune response accompanied by an intense inflammatory process that widely affects the world population. Due to the compromise in the quality of life and the lack of specific pharmacotherapy, the search for new molecules becomes relevant. This study aimed to evaluate the treatment with the Morita Baylis-Hillman adduct CISACN in the CARAS experimental model. Therefore, female BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) for a period of 43 days and treated with CISACN at doses of 6.25, 12.5 or 25 mg/kg. Treatment with the adduct decreased the infiltrate of eosinophils and neutrophil, hyperplasia and hypertrophy of goblet cells and tissue remodeling of the nasal cavity at 12.5 and 25 mg/kg, without statistical differences between the groups. Therefore, the dose of 12.5 mg/kg was chosen to continue the analysis. In addition, CISACN reduced eosinophil and neutrophil infiltration, reverting to baseline the number of eosinophils in the lung, lung tissue inflammation, goblet cell hyperplasia/hypertrophy, airway hyperactivity, reducing smooth muscle hyperplasia/hypertrophy, and the thickness of the extracellular matrix. CISACN reduced clinical signs of allergic rhinitis, such as nasal rubbing and sneezing, in a histamine-induced nasal hyperreactivity trial. The immunomodulatory effect of CISACN was observed via the reduction of serum levels of total IgE, OVA-specific IgE and the number of eosinophils in the blood. The treatment also decreased the production of IL-33, TSLP, IL-17, TNF- α and TGF- β with an immunoregulatory effect via a decrease in IL-5, IL-4, IL-13, T_H2 cytokine profile, dependent on the increase of IFN- γ , a T_H1 cytokine profile, but independent of IL-10, a T regulator (Treg) cytokine profile. In the molecular analyzes we observed that CISACN decreased, in pulmonary granulocytes, the activation of the p-p38MAPK and p-NF- κ B signaling pathway, independent of p-ERK1/2 MAPK. Therefore, the results obtained in this work demonstrate the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of CISACN by reducing the migration of inflammatory cells to the airway tissues of animals with CARAS, the cytokines responsible for the development and maintenance of the CARAS profile and a decrease in the cellular signaling pathway responsible to produce these signaling molecules. The scientific support provided by this study makes it possible to use CISACN in pharmaceutical formulations to be tested in the treatment of inflammatory airway diseases.

Keywords: Adduct; CARAS Experimental Model; Clinical Signs of Allergic Rhinitis; Cytokines; Eosinophils; T_H1/T_H2 Immune Response Balance

LISTA DE QUADROS

Tabela 1. Grupos experimentais no modelo da CARAS	37
---------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da Patogênese da CARAS	27
Figura 2. Estrutura química do CISACN.....	31
Figura 3. Síntese química do CISACN	35
Figura 4. Esquema representativo do modelo experimental de CARAS	36
Figura 5. Efeito do tratamento com CISACN na migração celular para cavidade nasal no modelo experimental de CARAS.....	42
Figura 6. Efeito do tratamento com CISACN nos aspectos histopatológicos e morfométricos do tecido nasal no modelo experimental de CARAS	45
Figura 7. Efeito do tratamento com CISACN na quantificação dos sinais clínicos da Rinite Alérgica e da hiper-reatividade nasal à histamina no modelo experimental de CARAS.....	49
Figura 8. Efeito do tratamento com CISACN na migração celular para cavidade pulmonar no modelo experimental de CARAS	52
Figura 9. Efeito do tratamento com CISACN nos aspectos histopatológicos e morfométricos do tecido pulmonar no modelo experimental de CARAS.....	55
Figura 10. Efeito do tratamento com CISACN no perfil alérgico e quantificação sistêmica de eosinófilos no modelo experimental de CARAS	59
Figura 11. Efeito do tratamento com CISACN na imunomodulação do processo inflamatório no modelo experimental de CARAS	61
Figura 12. Efeito do tratamento com CISACN na imunorregulação da resposta imune no modelo experimental de CARAS.....	65
Figura 13. Efeito do tratamento com CISACN na sinalização celular de p38 MAPK, ERK 1/2 e NF-κB e em granulócitos no modelo experimental de CARAS	71
Figura 14. Mecanismo anti-inflamatório e imunomodulador do CISACN na CARAS	86

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
°C	Grau Celsius
AMBH	Aduto de Morita Baylis-Hillman
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
CARAS	Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
EMB	Espessamento da membrana basal
FcεRI	Fator de IgE de alta afinidade
g	gravidade
H&E	Hematoxilina e eosina
HBSS	Solução de sais balanceados de Hank
HRB	Hiper-reatividade brônquica
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILC	Célula Linfóide Inata
kg	Quilograma
MAPK	Proteína Cinase ativada por mitógeno
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NALF	Fluido do lavado nasal
NF-κB	Fator nuclear kappa b
nmol	Nanomol
OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido Periódico de Schiff

RMBH	Reação de Morita Baylis-Hillman
TCR	Receptor de célula T
TGF	Fator de crescimento transformador
TM	Tricrômio de Masson
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Perfil imunológico T regulatório
TSLP	Linfopoetina do estroma tímico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1. Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas - CARAS	20
2.2. Aspectos epidemiológicos e biomarcadores da CARAS	20
2.3. Fisiopatologia da CARAS.....	22
2.3.1. Resposta Imune Tipo 2.....	22
2.4. Imunorregulação da CARAS	25
2.5. Tratamento da CARAS.....	28
2.6. Síntese Orgânica	30
2.6.1. Adutos de Morita Baylis-Hillman (AMBH) - CISACN.....	30
3. OBJETIVOS	33
3.1. Geral	33
3.2. Específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Animais	34
4.2. Obtenção e preparo do CISACN - Aduto de Morita Baylis-Hillman 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila	34
4.3. Protocolo Experimental da CARAS.....	35
4.4. Tratamentos	36
4.5. Quantificação celular.....	37
4.6. Análises histológicas e imuno-histoquímica de tecidos das vias aéreas.....	38
4.7. Sinais Clínicos.....	38
4.8. Hiper-reatividade nasal induzida pela histamina	38
4.9. Quantificação de IgE e Citocinas	39
4.10. Análises de marcação de p38MAPK, NF-κB e ERK 1/2 MAPK em granulócitos por citometria de fluxo.....	39
4.11. Análise Estatística	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Efeito do CISACN na migração celular para a cavidade nasal de animais com CARAS41	
5.2. Efeito do tratamento com CISACN no tecido das vias aéreas superiores dos animais com CARAS.....	44
5.3. Efeito do tratamento com CISACN nos sinais clínicos, espirro e fricção nasal, nos animais com CARAS	48
5.4. Efeito do tratamento com CISACN na migração celular para cavidade pulmonar nos animais com CARAS	51

5.5. Efeito do tratamento com CISACN no tecido pulmonar dos animais com CARAS.....	54
5.6. Efeito do tratamento com CISACN no perfil alérgico e na quantificação de eosinófilos sistêmico nos animais com CARAS	58
5.7. Efeito do tratamento com CISACN no processo de imunomodulação nos animais com CARAS	60
5.8. Efeito do tratamento com CISACN no processo de imunorregulação nos animais com CARAS	63
5.9. Efeito do tratamento com CISACN na sinalização celular envolvendo a p38 MAPK, ERK 1/2 e NF-κB em granulócitos do BALF dos animais com CARAS.....	69
6. DISCUSSÃO	75
7. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIA	87
ANEXO 1.....	96
PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO (A PARTIR DE 2020).....	97

1. INTRODUÇÃO

A asma e a rinite alérgica (RA) são doenças inflamatórias crônicas do trato respiratório inferior e superior, respectivamente, com abrangência cosmopolita e alta incidência mundial, além de gerar custos de tratamento elevados (GINA, 2023; PAIVA FERREIRA et al., 2019). Estudos revelam que cerca de 90% dos indivíduos asmáticos apresenta quadro clínico de RA e cerca de 40% de indivíduos com RA apresenta sintomas clínicos de asma como tosse, sensação de aperto no peito e falta de ar, inferindo estreita relação entre essas duas afecções do trato respiratório (BOUSQUET et al., 2022).

No sentido de impulsionar as pesquisas em busca da melhor compreensão entre a ligação da asma e RA e terapias que tratem ambas as doenças, um novo termo diagnóstico foi proposto e está em vigência que é a síndrome da asma e rinite alérgica combinadas (CARAS – *Combined Asthma and Allergic Rhinitis Syndrome*). Essa terminologia diagnóstica foi introduzida pela Organização Mundial de Alergia no século XXI (XIA et al., 2018).

A CARAS está fundamentada no conceito de “*uma doença, uma via área*” ou “*doença da via aérea unida*” (PATEL; MIMS; CLINGER, 2023) e, para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da CARAS e potenciais novas terapias farmacológicas no tratamento da síndrome, o modelo murino de CARAS induzida por ovalbumina (OVA - alérgeno) vem sendo extensamente utilizado no Laboratório de Imunofarmacologia da UFPB (BEZERRA BARROS et al., 2020; CAVALCANTI et al., 2023; FERREIRA et al., 2024; GADELHA et al., 2021).

O perfil imune da CARAS está diretamente relacionado à circulação de células T_{H2} (resposta imune tipo 2) responsáveis pela indução e manutenção do quadro inflamatório tecidual característico da síndrome. As células T_{H2} são o elo fundamental entre as duas doenças das vias áreas superior e inferior, suportando, portanto, a hipótese de uma única doença e uma única via área (FERREIRA et al., 2024; KLEINJAN et al., 2010).

O microambiente na CARAS é caracterizado pela presença de células T_{H2}, eosinófilos e uma superprodução de IL-4, IL-5 e IL-13, além de IgE alérgeno específica (NUR HUSNA et al., 2022). A nível tecidual se observa uma hiperprodução de muco, espessamento da matriz extracelular e da musculatura lisa, destruição epitelial e fibrose tecidual das vias áreas (PAIVA FERREIRA et al., 2019).

Nesse contexto, o cenário da resposta imune tipo 2 está relacionado com o desequilíbrio entre as respostas imunes T_H2 e T_H1 (produtora de IFN- γ , IL-2), e Treg (IL-10). Alterações nas concentrações das citocinas IFN- γ e IL-4 (IFN- γ /IL-4, equilíbrio T_H1/T_H2) com aumento de IL-4 (T_H2) é marcante na patogênese da CARAS (EMAMI FARD; XIAO; SEHMI, 2023; JIN et al., 2023; LI et al., 2015).

O tratamento farmacológico da CARAS se baseia na utilização de diversas classes terapêuticas como os anti-histamínicos e corticosteroides, que são comumente utilizadas no tratamento individual da RA ou da asma sem que haja uma farmacoterapia específica estabelecida na CARAS. As classes farmacológicas utilizadas nas duas doenças alérgicas promovem reações adversas e afetam a qualidade de vida dos pacientes, pois podem induzir sonolência, tremores, taquicardia, glaucoma e/ou reabsorção óssea (BENGTSON et al., 2017).

Devido a crescente busca por alternativas terapêuticas no tratamento da CARAS destaca-se os candidatos a fármacos de origem sintética, como os produtos oriundos da reação de Morita Baylis Hillman que são denominados de adutos, alguns já descritos com atividades antimalárica, anticâncer, fungicida, antichagássica, leishmanicida, citotóxica e anti-inflamatória, além de ter alto rendimento em curto tempo de reação (PAIVA FERREIRA et al., 2023).

Os adutos pertencem à classe de moléculas polifuncionalizadas, com baixo peso molecular e relativa simplicidade estrutural. O composto 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila, codificado por CISACN (objeto do presente estudo), possui um rendimento de 95%, obtido em curto tempo de reação (90 minutos) e demonstrou atividade anticâncer em linhagem de células humanas leucêmicas (HL-60) e um potencial efeito contra malária, tendo em vista que reduziu a parasitemia *in vitro* do *P. falciparum* (LIMA-JUNIOR et al., 2016; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). Em adição, o CISACN apresentou baixa citotoxicidade, boa biodisponibilidade oral teórica, com baixa toxicidade teórica, apresentando uma DL_{50} de 5.000 mg/kg (MELO, 2020).

Portanto, a hipótese do presente trabalho é que o tratamento com CISACN apresente-se como uma alternativa farmacológica anti-inflamatória e/ou imunomoduladora no modelo experimental de CARAS induzida por ovalbumina, fornecendo dados científicos do aduto no sentido de se tornar uma ferramenta terapêutica no tratamento das doenças inflamatórias crônicas do trato respiratório.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas - CARAS

A CARAS se caracteriza por apresentar de forma concomitante a instalação da RA e a asma em um indivíduo, configurando uma íntima ligação dos mecanismos fisiopatológicos inerentes em ambas afecções, como exemplo, essas doenças compartilham os mesmos agentes etiológicos, que desencadeiam o processo patológico, apresentam o mesmo perfil celular, mediando os processos inflamatórios, e estão relacionadas ao sistema respiratório, além de compartilharem o mesmo princípio terapêutico (PAIVA FERREIRA et al., 2019; PATEL; MIMS; CLINGER, 2023).

Os fármacos comumente utilizados na CARAS, tais como anti-histamínicos e corticoides, ocasionam efeitos adversos importantes por serem utilizados cronicamente. Portanto, é de extrema importância pesquisas experimentais que, ao mimetizar em animais a CARAS, colaborem no entendimento da sua patogênese e possibilitem ao mercado farmacêutico o surgimento de novas moléculas candidatas a serem utilizadas como fármacos para o tratamento das duas doenças de maneira concomitante contribuindo, assim, para o arsenal farmacoterapêutico no tratamento dessa síndrome alérgica (BOUSQUET et al., 2008; DAI et al., 2022; LICARI et al., 2017).

2.2. Aspectos epidemiológicos e biomarcadores da CARAS

A RA é uma doença inflamatória da mucosa nasal não transmissível induzida após exposição de um indivíduo geneticamente predisponente a alérgenos e envolve uma variedade de células imune reativas e citocinas (BOUSQUET et al., 2020). Os principais sintomas da RA são espirros, congestão e prurido nasal e muco nasal aquoso (MENG; WANG; ZHANG, 2019), sendo uma das doenças mais comum em todo o mundo (ZUBERBIER et al., 2014). A RA é considerada um fator de risco para o desencadeamento da asma e está associada a outras doenças crônicas respiratórias, como a rinosinusite (HENS et al., 2007; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

A asma é uma doença inflamatória crônica brônquica complexa e heterogênea com múltiplos fenótipos e está associada à hiperresponsividade das vias aéreas, frequentemente, caracterizada por restrição generalizada e variável do fluxo expiratório reversível, levando a sintomas recorrentes de sibilos, falta de ar,

sensação de aperto no peito e tosse (CHIANG et al., 2017; PAPI et al., 2018; SUN et al., 2019). A prevalência da asma aumentou exponencialmente nas últimas décadas e estima-se que há 358 milhões de casos em todo o mundo (KOMLÓSI et al., 2022).

Atualmente, cerca de 10 a 30 % da população mundial apresenta um quadro de RA (TOHIDINIK; MALLAH; TAKKOUICHE, 2019). No Brasil, esta doença atinge cerca de 29,6% entre adolescentes e 25,7% entre crianças na fase escolar (ASBAI, 2018; SAKANO et al., 2018). A RA afeta a qualidade de vida dos indivíduos de forma negativa, interferindo na vida social, no desempenho escolar e intelectual, como também na produtividade laboral (BOUSQUET et al., 2020; SMALL; KEITH; KIM, 2018).

A asma acomete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo (TOHIDINIK; MALLAH; TAKKOUICHE, 2019). O Brasil é o 8º país em prevalência desta doença. Em 2015, foram notificadas 383.000 mortes por asma, sendo as crises asmáticas a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e a causa da morte de três pessoas por dia. Anualmente no mundo, são cerca de 250 mil óbitos em decorrência dessa doença (CARDOSO et al., 2017). A asma apresenta uma frequência maior em crianças (GINA, 2023) e, no Brasil, 19% dos adolescentes e 24% das crianças são asmáticos (ASBAI, 2018). Em termos mundiais, os custos financeiros com a asma superam os da tuberculose e HIV/AIDS somados (WHO, 2018).

A RA frequentemente coexiste com a asma (DE GROOT et al., 2012; KURUVILLA et al., 2019; LOHIA; SCHLOSSER; SOLER, 2013). Segundo dados, até 80% dos pacientes asmáticos são afetados pela RA e, até 40% dos pacientes com RA apresentam asma concomitante (XIA et al., 2018). A comorbidade entre a asma e RA é íntima e confere o padrão de uma única doença nas vias aéreas resultante de uma “marcha atópica” (BOUSQUET et al., 2008; BROŽEK et al., 2017). O manejo incorreto da RA eleva em até três vezes o risco de exacerbação asmática (BROŽEK et al., 2017). Além de ser observado que a provocação nasal com alérgenos induz uma inflamação brônquica asmática (BOUSQUET et al., 2019; BROŽEK et al., 2017).

A CARAS é, portanto, o resultado de uma resposta imune tipo 2 mediada por um fenótipo de células T_H2, infiltração de eosinófilos, hipertrofia/hiperplasia de células caliciformes na mucosa subepitelial e fibrose com remodelamento tecidual das vias aéreas, além de altos níveis séricos de IgE alérgeno-específica. As

citocinas produzidas, tais como a IL-4, IL-5 e IL-13, proveniente, majoritariamente, das células T_{H2}, promovem o desenvolvimento e manutenção do perfil CARAS no indivíduo atópico (PAIVA FERREIRA et al., 2019). Ambas as doenças representam sérios problemas de saúde com impactos econômicos e sociais negativos (GINA, 2023). Portanto, medidas de tratamento eficazes são particularmente importantes.

2.3. Fisiopatologia da CARAS

A CARAS apresenta uma resposta imunológica predominante T_{H2}, desenvolvida em indivíduos atópicos, os quais são geneticamente predisponentes a desencadear um processo de hipersensibilidade imediata ou tipo I. Os aeroalérgenos são elementos proteicos solúveis de baixo peso molecular presentes em ácaros da poeira; nas asas das baratas; em fungos; em pelos, saliva e urina de animais domésticos; restos de insetos e alimentos (RUBINI et al., 2017). Ao serem inalados por indivíduos atópicos, os aeroalérgenos penetram o epitélio respiratório e promovem um desequilíbrio entre as imunidades inata e adaptativa desencadeando a fisiopatologia da CARAS (EIFAN; DURHAM, 2016).

Essa síndrome tem uma fisiopatologia complexa e os processos intracelulares que envolvem a produção de mediadores inflamatórios são orquestrados pelas citocinas clássicas do perfil T_{H2}, tais como IL-4, IL-5 e IL-13. Esses eventos inflamatórios podem ocorrer concomitante nos epitélios respiratórios superior e inferior, e são esses mecanismos responsáveis por manter a doença ativa nas vias aéreas, além de que a circulação das células T_{H2} é o seu principal elo, o que sustenta a hipótese de uma via aérea única, e que RA e a asma são manifestações clínicas de uma única doença instalada em toda a via aérea (FERREIRA et al., 2024; KLEINJAN et al., 2010).

2.3.1. Resposta Imune Tipo 2

A resposta imune tipo 2 na CARAS é caracterizada pelas fases de sensibilização, de reação imediata ou crise alérgica e de reação tardia ou fase crônica do processo inflamatório. Vale salientar que as reações imediata e tardia podem ocorrer de forma concomitante, devido a intensidade e constância da reexposição do alérgeno (PAIVA FERREIRA et al., 2019).

A fase de sensibilização alérgica ocorre após o primeiro contato do alérgeno, o qual estimula as células epiteliais a secretarem as citocinas chamadas de alarminas, principalmente a linfopoetina do estroma tímico (TSLP) e a IL-33. As alarminas atuam em células do intra-epitélio ou do tecido conjuntivo subepitelial, como nas células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), induzindo a produção de IL-13 e IL-5 (EIFAN et al., 2012).

As alarminas atuam nas células apresentadoras de antígenos (APCs), em especial nas células dendríticas (CDs), induzindo o processo de apresentação alérgica e polarização do perfil T_H2 nos linfonodos de drenagem (HAMMAD et al., 2022). Na presença de IL-4, ocorre a ativação do fator de transcrição de ação trans específicos de células T do tipo 2 (GATA-3) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (STAT6) nas células T_H2 . A produção das citocinas clássicas: IL-4, IL-13 e IL-5 é então desencadeada pela ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) como a p38 e a ERK1/2 e pelos fatores transcripcionais como o NF- κ B, que estão diretamente associados ao GATA-3 (HOLGATE et al., 2015; KHORASANIZADEH et al., 2017; SCHULIGA; MICHAEL, 2015).

A IL-4 e IL-13, por compartilharem receptores celulares, ativam os linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos produtores de imunoglobulinas E (IgE) alérgeno específica. As IgE-alérgeno específicas se ligam aos receptores de alta afinidade (Fc ϵ RI) presentes na membrana de mastócitos teciduais, basófilos e eosinófilos circulantes. Esse processo é denominado de sensibilização alérgica (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015). Na figura 1a está representada a fase de sensibilização da CARAS.

Em contato(s) posterior(es) com o alérgeno, esse se ligará diretamente ao complexo IgE-Fc ϵ RI acoplados a membrana de mastócitos teciduais e basófilos/eosinófilos circulantes e, via ligação cruzada, ocasionará ativação celular com degranulação de grânulos contendo mediadores inflamatórios pré-estocados, como a histamina, e formação de outros mediadores como prostaglandinas e leucotrienos (BOULET, 2018). Os mastócitos residem próximo a superfície da mucosa respiratória e de vasos sanguíneos (GURISH; AUSTEN, 2012) e, uma vez ativados pelo alérgeno, liberam principalmente histamina, além de produzirem grandes quantidades de IL-4 (AMIN, 2012; LIEBERMAN; GARVEY, 2016).

A histamina desempenha um papel central na reação alérgica das vias aéreas por promover a vasodilatação local o aumento da permeabilidade vascular, proporcionando a formação do edema, a migração de células inflamatórias para o

tecido a broncoconstrição nas vias aéreas inferiores. Já, nas vias aéreas superiores, a histamina ativa as terminações nervosas sensoriais aferentes, estimula a via reflexa parassimpática das secreções glandulares, além de induzir a vasodilatação local, promovendo os sintomas da RA: prurido nasal, espirros e rinorreia (EIFAN; DURHAM, 2016; XU; ZHANG; WANG, 2014). Na figura 1b está representada a fase de reação imediata da CARAS.

A fase crônica na CARAS é mantida pelo processo inflamatório mediado por T_H2 resultando na perda da função tecidual das vias aéreas. Esse processo é mediado por redes de interações entre as células e moléculas da imunidade inata e adaptativa. A IL-4 apresenta um papel essencial na polarização e manutenção do perfil T_H2 , atuando como *feedback* positivo da resposta imune tipo 2 induzindo de maneira exacerbada a produção das citocinas T_H2 (BOULET, 2018; WYNN, 2015).

As IL-4 e IL-13 compartilham receptores celulares e atuam na amplificação do processo inflamatório tecidual na CARAS, ativando os macrófagos tipo 2 (M2). Os M2 produzem o fator de transformação do crescimento β (TGF- β) que induz os fibroblastos a produzirem fibras colágenas, as quais se depositam nas vias aéreas, levando a um quadro de fibrose e remodelamento tecidual, pois a deposição de colágeno acarreta o espessamento da matriz extracelular (BAGNASCO et al., 2016).

Em adição, a IL-4 e a IL-13 ativam diretamente os fibroblastos promovendo uma hiperprodução de colágeno nas vias aéreas. Nas células musculares lisas, essas citocinas participam da hipertrofia e/ou hiperplasia muscular, levando a um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas ou brônquica (HRB) (BOULET, 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015).

A IL-13 promove a hipersecreção de mucinas, e, conseqüentemente, muco pelas células caliciformes das vias aéreas. Também está envolvida no processo de hiperplasia e/ou hipertrofia das células caliciformes e da metaplasia de células ciliadas epiteliais (células Clara), se diferenciando em células produtoras de muco (BARLOW et al., 2012; GOUR; WILLS-KARP, 2015).

A IL-5 induz o processo de produção, maturação e migração de eosinófilos da medula óssea para as vias aéreas (HOLGATE et al., 2015). O acúmulo de eosinófilos ativados no tecido das cavidades nasal e pulmonar gera a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína básica principal (MBP), que provocam ruptura da integridade do epitélio causando diretamente a hiper-reatividade das vias aéreas com declínio da função pulmonar (BARNES, 2017; GEORGE; BRIGHTLING, 2016).

Os eosinófilos contribuem para o remodelamento das vias aéreas em consequência do aumento da deposição da matriz extracelular, do aumento das células mesenquimais subepiteliais e, principalmente, do aumento da massa muscular lisa da via aérea, que é o principal determinante da obstrução do fluxo aéreo (KAY, 2015). O TGF- β derivado de eosinófilos ativa a liberação de fibroblastos e proteínas da matriz, provocando o espessamento da membrana basal reticular (ELTBOLI et al., 2015). Os eosinófilos podem atuar como APCs e apresentar alérgenos aos linfócitos T (ROSENBERG; DYER; FOSTER, 2013) e os que se infiltram no tecido têm a capacidade de fixar IgEs nas suas membranas e respondem ao contato com o alérgeno liberando mediadores inflamatórios que atuam na manutenção da resposta imune tipo 2, característica da CARAS (BOULET, 2018; FAJT; WENZEL, 2015).

Em adição as células T_{H2}, outros perfis de células T *helper* estão associados à patogênese da CARAS, como as células T_{H17}. Esta população celular produz grande quantidade de IL-17 e fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), que contribuem para a hiper-reatividade das vias aéreas, acúmulo de neutrófilos e inflamação tecidual (HAMMAD et al., 2022). A IL-17 também é produzida por eosinófilos logo, quanto mais essa citocina é liberada nas vias aéreas, maior o estímulo para a migração de granulócitos/neutrófilos a intensificação da inflamação tecidual existente na CARAS (NOBS; KAYHAN; KOPF, 2019). Na figura 1c está representada a fase de reação tardia da CARAS.

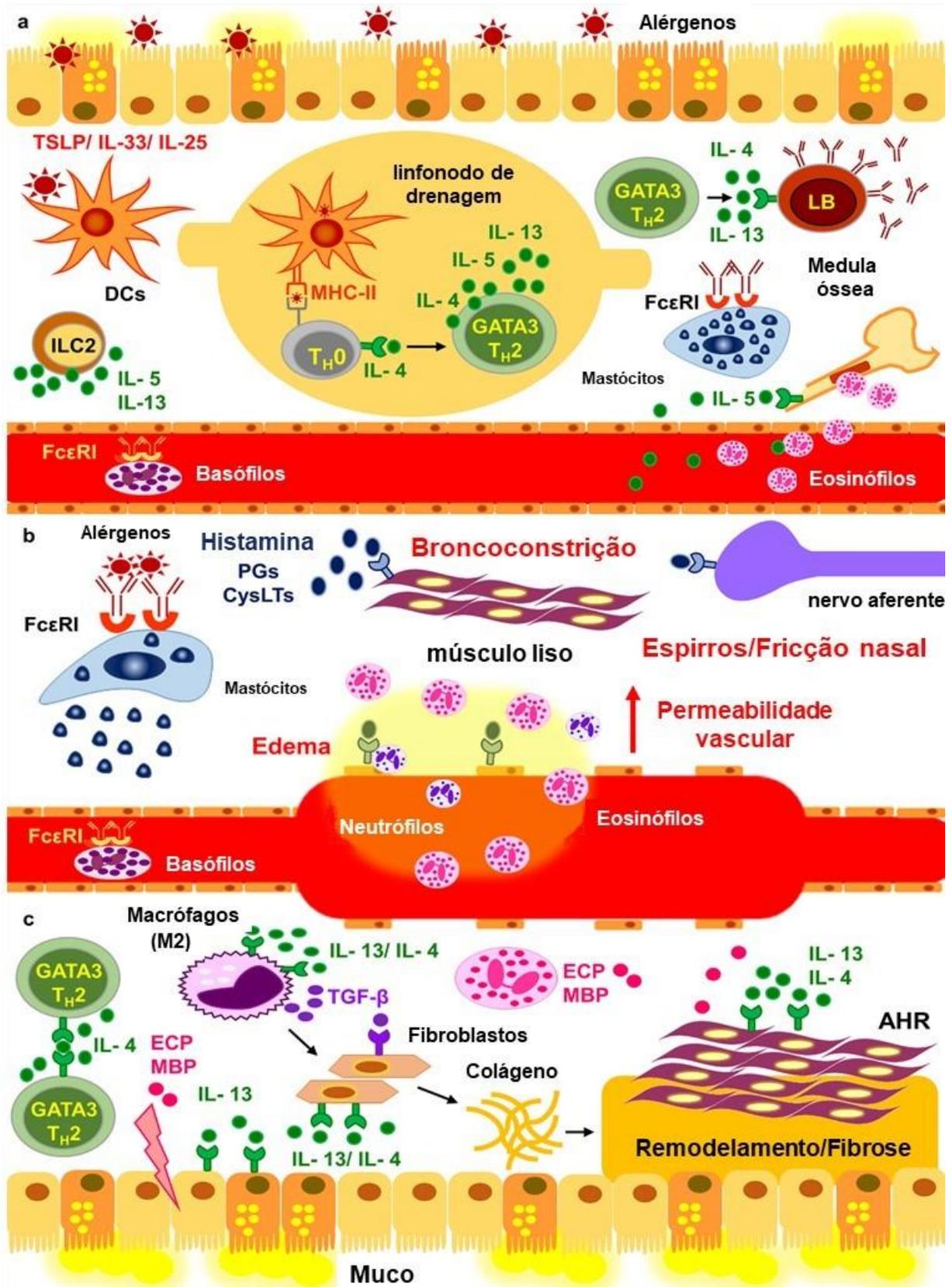
2.4. Imunorregulação da CARAS

Os mecanismos responsáveis por regular a resposta imune tipo 2 da CARAS envolvem as células T reguladoras – Treg (produtoras de IL-10) com efeito supressor sobre as demais subpopulações de TCD4⁺. As células Treg têm importante papel na regulação da função das células T_{H2} na asma e rinite alérgica (FAHY, 2015).

As células TCD8⁺ participam na inibição do processo de sensibilização alérgica, atenuando a resposta T_{H2} via inibição da produção de IgE, além de liberar o IFN- γ , indutor da polarização do fenótipo T_{H1} (TANG et al., 2012). A depleção dos linfócitos TCD8⁺ está envolvida com o aumento nos níveis séricos de IgE, remodelamento e hiper-reatividade das vias aéreas em alergias (BOULET, 2018).

O perfil T_H1 apresenta atividade imuno reguladora da resposta imune tipo 2 a partir da ação de suas citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF- β . O IFN- γ antagoniza a formação do fator de transcrição GATA 3, responsável pela indução transcricional das células T_H2. A IL-12, é responsável pela ativação do fator de transcrição box-T (T-bet), que induz a produção das citocinas T_H1 (FAHY, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015). Uma mudança na proporção de citocinas IFN- γ /IL-4 (equilíbrio T_H1/T_H2) com aumento de IL-4 (T_H2) é marcante na patogênese da CARAS (FERREIRA et al., 2024).

Figura 1. Fases da Patogênese da CARAS



Fases da fisiopatologia do CARAS. **a) Primeira fase da reação alérgica (fase de sensibilização).** Os alérgenos estimulam as células epiteliais a liberarem as alarminas como TSLP, IL-33 e IL-25, que estimulam as ILCs2 a produzirem IL-13 e IL-5. As alarminas estimulam as APCs (DCs) a migrarem para o linfonodo de drenagem e estas ativam TH0 via MHC-II para polarização do perfil TH2 com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-5 é um importante indutor de eosinofilia, atuando na medula óssea e provocando a produção, maturação e migração de eosinófilos para o local da inflamação. IL-

4 e IL-13 estimulam a produção de IgE pelas células B que se ligam aos receptores FcεRI na membrana dos mastócitos e basófilos e eosinófilos circulantes que conferem o primeiro estágio da sensibilização a alérgenos. **b) Segunda fase da reação alérgica (fase de desafio).** A reexposição de alérgenos resulta em ligação cruzada do alérgeno-IgE-célula em mastócitos que ativa o processo de degranulação com a liberação de mediadores pré-estocados como aminas vasoativas - histamina e mediadores neoformados como prostaglandinas (PGs) e cistenil leucotrienos (CysLTs). Esses mediadores serão responsáveis pela reação de fase imediata, atuando nos nervos aferentes, causando os sinais clínicos de espirros e fricção nasal (rinite), nas células endoteliais promovem o aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos para os tecidos e formação de edema e no músculo liso brônquico promovem a broncoconstrição (asma). **c) Terceira fase tardia da reação alérgica (Manutenção do perfil T_H2).** A polarização do perfil de T_H2 é mantida pela produção constante de IL-4 e IL-13. Essas citocinas atuam nas células caliciformes, promovendo a hiperprodução de muco; nas células musculares lisas hiperplasia e/ou hipertrofia e hiperresponsividade das vias aéreas (AHR). Além disso, eles ativam macrófagos (M2), que produzem o TGF-β associado à hiperprodução de fibras de colágeno pelos fibroblastos promovendo remodelamento tecidual e fibrose. Os eosinófilos são as células efetoras da inflamação crônica liberando mediadores como a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e a proteína básica principal (MBP), que atuam diretamente na destruição epitelial, remodelamento tecidual e AHR. TSLP (Linfopoetina do estroma tímico); IL (Interleucina); CD_s (células dendríticas); T_H (Linfócito T *helper*); ILC2 (célula linfóide inata de classe 2); MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade de classe 2); GATA-3 (fator de transcrição de ação "trans" específico de células T do tipo 3); LB (linfócito B); FcεRI (receptor de IgE de alta afinidade); TGF-β (fator de crescimento transformador β); HRB (hiperreatividade brônquica). Fonte: Adaptado de (PAIVA FERREIRA et al., 2019).

2.5. Tratamento da CARAS

O manejo farmacoterapêutico para a RA e asma baseia-se na adoção de duas medidas de controle: a medida não farmacológica e a farmacológica. A medida não farmacológica consiste no afastamento do contato com o alérgeno, como uma etapa da estratégia terapêutica (SOLÉ et al., 2012; BOUSQUET et al., 2015; PAPADOPOULOS et al., 2015; SOLÉ et al., 2012; RUBINI et al., 2017). As estratégias farmacológicas no tratamento de ambas as afecções respiratórias baseiam-se em dois momentos da fisiopatologia da CARAS: o controle dos processos subsequentes da fase imediata ou crise alérgica e o controle da inflamação crônica da fase tardia (PERA; PENN, 2016).

O tratamento das crises na RA se baseia no uso de anti-histamínicos (SOLÉ et al., 2012) e descongestionantes nasais, promovendo vasoconstrição e alívio do bloqueio nasal (LACCOURREYE et al., 2015). Para o controle da crise asmática são utilizados os broncodilatadores agonistas β-adrenérgicos; antagonistas dos receptores muscarínicos M3; e inibidores de fosfodiesterases (FRAGA RIGHETTI et al., 2014). Os antagonistas dos receptores de leucotrienos podem ser utilizados em ambas as doenças (GINA, 2023).

A corticoterapia é a primeira linha de escolha para o controle do processo inflamatório crônico estabelecido na CARAS, promovendo uma melhora do quadro inflamatório T_H2 presente nas vias aéreas (BROŽEK et al., 2017; PERA; PENN,

2016). Em associação aos corticosteroides os cromoglicatos, que agem estabilizando a membrana mastocitária, impedindo sua degranulação no contato cruzado com o alérgeno, podem ser prescritos (BOUSQUET et al., 2008).

Por mais que as opções farmacológicas clássicas apresentem relevante efeito benéfico no controle das manifestações da RA e asma, provocam efeitos colaterais e adversos importantes na avaliação do manejo e tratamento do paciente. Os anti-histamínicos causam sedação (XU; ZHANG; WANG, 2014); os descongestionantes geram tolerância (CHERVINSKY et al., 2005); os broncodilatadores induzem tremor muscular, taquicardia e glaucoma (FRAGA RIGHETTI et al., 2014); os corticosteroides promovem irritação local, sangramento, reabsorção óssea, catarata e glaucoma (DERENDORF et al., 2014; GINA, 2023).

A imunoterapia com os imunobiológicos pode ser prescrita como alternativa terapêutica e associada a farmacoterapia, sendo uma ferramenta de extrema seletividade no seu mecanismo de ação. No Brasil, se utiliza a terapia com os anticorpos omalizumab, anti-IgE, (HUMBERT et al., 2014) e mepolizumab, anti-IL-5 (ORTEGA et al., 2014) de forma extensiva. Além disso, estudos pré-clínicos e clínicos promissores com anticorpos anti-IL-13 e anti-IL-4 estão sendo desenvolvidos (FAHY, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019).

Alguns desses protocolos farmacológicos propostos para o tratamento de indivíduos alérgicos não conseguem aliviar os sintomas e induzem os efeitos colaterais citados, como sedação, aprendizagem/memória prejudicadas, arritmias cardíacas e tolerância (GINA, 2023). Cerca de 5-10% dos pacientes com asma são mal controlados ou insensíveis ao tratamento com corticosteroides (CABALLERO-SEGURA et al., 2022).

Na busca de uma melhora do cenário atual, terapias e moléculas inéditas têm sido exploradas para prevenir os sintomas alérgicos, de forma que os estudos farmacológicos de moléculas de fontes naturais ou sintéticas tornam-se promissores na investigação de novas terapias antialérgicas e/ou anti-inflamatórias. A triagem farmacológica de moléculas biologicamente ativas tem por objetivo selecionar as doses mais potentes e eficazes capazes de modular o processo patológico de uma determinada doença, possibilitando a busca de novos candidatos a fármacos.

2.6. Síntese Orgânica

Na química medicinal, a forma de sintetizar novas moléculas tem sido amplamente estudada e aperfeiçoada ao longo dos tempos. A síntese orgânica é a forma mais promissora para a obtenção de novos medicamentos. Produzir moléculas que tenham em sua estrutura grupos farmacofóricos, tornando-as biologicamente ativas, permitem o direcionamento efetivo ao alvo farmacológico e é um dos preceitos da síntese orgânica (BLAKEMORE et al., 2018).

A relação entre a síntese orgânica e a química medicinal tem ganhado força na busca do desenvolvimento de novos medicamentos, com propriedades terapêuticas mais favoráveis e sua conversão em derivados que mostrem atividade medicinal ideal e vem buscando novas moléculas com vias sintéticas menos demoradas, mais econômicas, seguras, e com melhor ação, como por exemplo, moléculas contra doenças graves como a malária, tuberculose e o câncer (BÉRUBÉ, 2016).

A síntese orgânica associada a metodologias como programas *in silico* possibilitam maior rapidez na elaboração de novos medicamentos, além de aumentar a eficiência e reduzir o custo de produção. Em adição, as metodologias sintéticas são inovadoras, o que estimula a indústria farmacêutica a criar e explorar estruturas que antes eram inacessíveis, além de buscar formas ecológicas de síntese (BLAKEMORE et al., 2018; SOMANI et al., 2021). Além disso, através de modificações estruturais, estereoquímica, remoção de grupos, oxigenação, hidrogenação, entre outros, são mudanças que podem alterar a atividade farmacológica de uma molécula, podendo levar ao seu aperfeiçoamento (PRAJAPAT et al., 2017).

2.6.1. Adutos de Morita Baylis-Hillman (AMBH) - CISACN

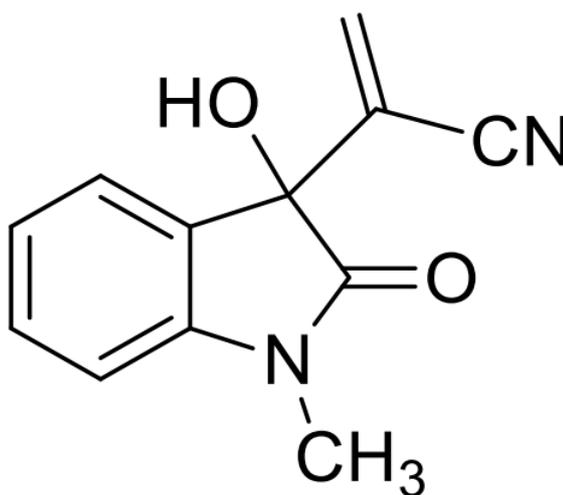
A reação de Morita Baylis-Hillman, um exemplo dos esforços em produzir moléculas de forma rápida e econômica ecologicamente aceitável, teve sua origem em 1968 com Morita, que descreveu a reação de aldeídos com acrilatos (MORITA; SUZUKI; HIROSE, 1968). Em 1972, Baylis e Hillmann complementaram a reação com acoplamentos catalisados entre vários alcenos ativados e aldeídos. A reação de Morita Baylis-Hillman (RMBH) constitui uma das mais úteis e populares reações de ligação carbono-carbono. Por meio desta, cria-se um centro quiral, no qual permite a síntese de moléculas multifuncionais (PELLISSIER, 2017).

A RMBH proporciona a formação de ligação química (C-C) entre átomos com mesma eletronegatividade, ocorre entre um carbono eletrofílico sp^2 (por exemplo, aldeídos, cetonas ou iminas) e a posição de um alceno (ou alcino) conectado a um grupo de atração de elétrons (EAG), sob amina terciária, como catálise nucleofílica, gerando compostos chamados Adutos de Morita Baylis-Hillman (AMBH) (BASAVAIAH; RAO; SATYANARAYANA, 2003).

Os AMBHs pertencem a uma classe de moléculas polifuncionalizadas, de baixo peso molecular e relativa simplicidade estrutural. Por se tratar de uma reação de adição, a RMBH gera economia de átomos, o uso de água como solvente quando na ausência de solventes e na condição de metal livre (organocatálise), além de viabilidade sintética, onde foram comprovadas uma vasta gama de atividades biológicas, tais como: antimalárica, anti-esquistossomose, anticâncer, fungicida, bactericida, herbicida, antichagássica, leishmanicida e anti-inflamatória (DA SILVA et al., 2023, 2016; DE SOUZA et al., 2008; JUNIOR et al., 2010; KUNDU et al., 1999; LIMA-JUNIOR et al., 2016; LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012; PAIVA FERREIRA et al., 2023; SANTOS et al., 2015; XAVIER et al., 2016).

O AMBH 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila codificado por CISACN, cuja estrutura química está representada na Figura 2, possui um rendimento de 95% e é obtido em um curto tempo de reação (20-45 minutos) e se mostra como sólido marrom (LIMA-JUNIOR et al., 2016).

Figura 2. Estrutura química do CISACN



Fonte: (MELO, 2020).

O CISACN apresenta potencial atividade antimalárica, pois reduziu o número de *P. falciparum* em experimentos *in vitro*. Ademais, causou baixa hemólise em eritrócitos humanos, indicando assim uma baixa citotoxicidade e boa viabilidade celular. Na avaliação *in silico*, este aduto apresentou uma boa biodisponibilidade oral teórica, já que atendeu aos requisitos preconizados pela “Regra dos cinco” de *Lipinski*. O CISACN apresentou uma boa taxa de permeabilidade pelas membranas celulares, sendo assim, se apresenta como uma molécula com uma boa biodisponibilidade oral, tendo também uma boa absorção intestinal quando administrada por via oral. O CISACN, a partir de estudos utilizando o programa AdmetSAR, possivelmente ao passar pelo teste de AMES, não terá potencial mutagênico, não tendo a capacidade de causar carcinogenicidade (MELO, 2020).

O aduto CISACN apresentou uma baixa toxicidade teórica, apresentando uma DL₅₀ de 5.000 mg/kg, sendo classificada na categoria 5, de acordo com o “*Globally Harmonized Classification System*” (GHS) (MELO, 2020; OECD, 2002). Na avaliação bioquímica, em experimentos *in vivo*, o CISACN não causou danos renais e hepáticos significativos, nem interferiu no sistema hematopoiético (MELO, 2020). Desta forma, o aduto CISACN, apresenta-se como uma molécula promissora para investigações em modelos inflamatórios.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi compreender o efeito e seus mecanismos de ação do tratamento oral com CISACN em animais com CARAS. O modelo murino de CARAS, cujo animal é sensibilizado com ovalbumina (OVA), tem sido utilizado para investigar potenciais terapias farmacológicas no tratamento desta síndrome (BEZERRA BARROS et al., 2020; CAVALCANTI et al., 2024; PAIVA FERREIRA et al., 2021). Portanto, a caracterização dos possíveis efeitos da molécula no modelo experimental de CARAS possibilitará a confecção de formulações farmacêuticas a serem testadas em futuros ensaios clínicos para, de acordo com os resultados obtidos, possibilitar a inserção de um fármaco adequado ao arsenal farmacoterapêutico no tratamento da CARAS.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar os efeitos anti-inflamatório e imunomodulador do aduto de Morita Baylis Hillman (CISACN) nos animais com CARAS induzida por ovalbumina.

3.2. Específicos

Avaliar o tratamento com CISACN nos animais com a CARAS quanto aos parâmetros inflamatórios:

- Migração de células inflamatórias para os fluidos dos lavados nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF);
- Perfil de granulócitos no NALF e BALF;
- Produção de muco, o espessamento da membrana basal e o remodelamento tecidual nas cavidades nasal e pulmonar;
- Sinais clínicos das vias aéreas superiores (espirros e fricção nasal);
- Hiper-reatividade nasal induzida por histamina;
- Hiper-reatividade muscular pulmonar.

Elucidar os mecanismos imunomoduladores e imunoreguladores do CISACN na resposta imune da CARAS, tais como:

- Níveis séricos de IgE;
- Perfil eosinofílico sistêmico;
- Produção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- γ , TGF- β , TNF- α e TSLP) no BALF;
- Avaliação sistêmica da produção das citocinas IL-4 e IFN- γ ;
- Verificação tecidual da presença de IFN- γ .

Identificar os mecanismos intracelulares do CISACN na resposta imunológica na CARAS:

- Mensurar a ativação/fosforilação de p-38MAPK, ERK1/2 MAPK e NF- κ B.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

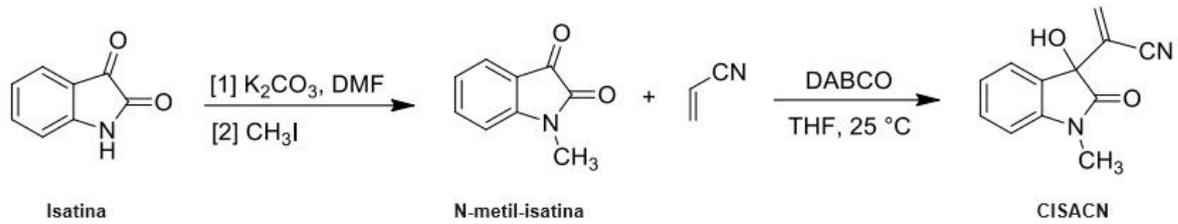
Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas (6 - 8 semanas) pesando entre 20 e 25g foram fornecidos pela Unidade de Produção Animal do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a temperatura de 22 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e 18h00 às 6h00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação.

Cada grupo experimental foi representado por 5 animais (n=5). Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)/Brasil, além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intramuscular de solução anestésica contendo 29 mg/mL de ketamina e 1,91 mg/mL de xilazina em solução salina (NaCl 0,9 %). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB) sob o protocolo de número 7316150420 (Anexo 1).

4.2. Obtenção e preparo do CISACN - Aduto de Morita Baylis-Hillman 2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila

A molécula foi sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB) e cedida, gentilmente, pelo Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Junior, coordenador do supracitado laboratório. Para a preparação de CISACN, duas etapas sintéticas foram realizadas (Figura 3). A primeira envolveu a metilação da isatina pela reação do tipo SN_2 usando K_2CO_3 como base e iodeto de metila como agente alquilante. Este produto foi obtido como sólido vermelho com rendimento de 98%. Posteriormente, o intermediário N-metil-isatina foi submetido a reação de Morita Baylis-Hillman usando acrilonitrila como aceptor de Michael e DABCO como catalisador, formando o aduto CISACN com rendimento de 95%, após 90 minutos de reação (LIMA-JUNIOR et al., 2016).

Figura 3. Síntese química do CISACN



Reação de Morita Baylis-Hillman em duas etapas, utilizando catalisadores para formação do produto codificado como CISACN. K_2CO_3 : carbonato de potássio. DMF: dimetilformamida. CH_3I : iodometano. DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano. THF: tetraidrofurano. Fonte: Melo, 2020.

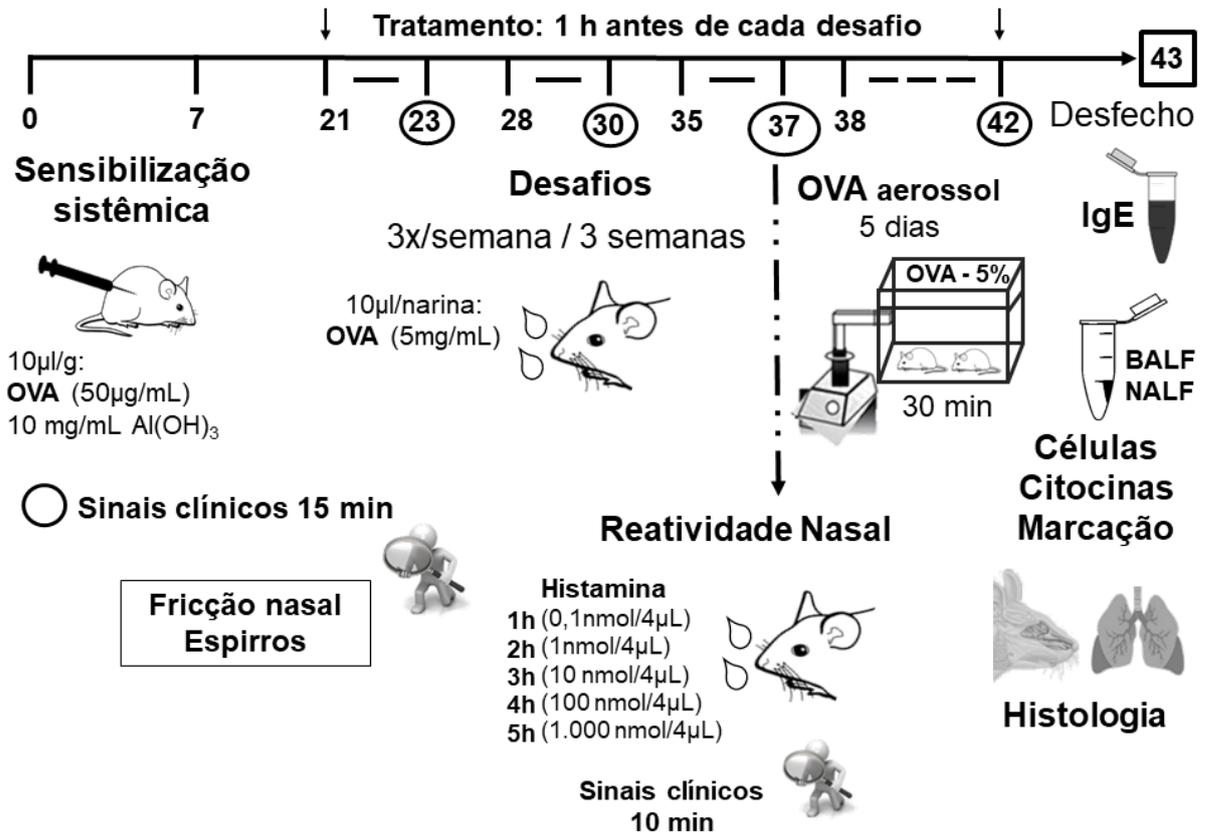
Para o preparo do CISACN nas doses de 25, 12,5 e 6,25 mg/kg foram preparadas suspensões com diluições na base 2. Para a administração do CISACN por via oral (gavagem) (10 μL / 10 g animal) utilizou-se a concentração de 2,5, 1,25 e 0,625 mg/mL, respectivamente de CISACN com solubilização em Tween 80 (até 0,5%), preparados com solução salina. O pH foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl).

4.3. Protocolo Experimental da CARAS

O modelo experimental de CARAS desenvolvido no presente trabalho teve como base o trabalho da Profa. Dra. Laércia P. Ferreira em 2021. Para tal, nos dias 0 e 7, os camundongos foram sensibilizados com injeção de 10 μL /g, intraperitoneal (i.p.), de uma suspensão contendo 50 μg /mL de OVA grade V (Ovalbumina, SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de $Al(OH)_3$ (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina. Dos dias 21 a 37 do protocolo, durante 3 dias consecutivos, em 3 semanas consecutivas, os animais foram desafiados por instilação nasal com uma solução de OVA-V (5 mg/mL, 20 μL / animal).

A partir do 38° dia, por cinco dias consecutivos, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5% em solução salina. Os desafios alérgicos foram realizados durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultrassônico. Os tratamentos dos animais ocorreram uma hora antes de cada desafio alérgico. No 43° dia do protocolo, ocorreu o desfecho do protocolo experimental e foi realizada a coleta do material biológico para análise dos parâmetros imunológicos. A figura 4 esquematiza os passos realizados durante a execução do protocolo experimental da CARAS.

Figura 4. Esquema representativo do modelo experimental de CARAS



Protocolo experimental da indução de CARAS em camundongos BALB/C fêmeas, compreendendo três fases: sensibilização sistêmica, desafios por via intranasal e aerossol e o desfecho do protocolo para obtenção das amostras para posterior dosagens alvo do estudo. µg: microgramas. µL: microlitro. Al(OH)₃: hidróxido de alumínio. BALF: lavado do fluido broncoalveolar. h: hora. IgE: imunoglobulina E. mg: miligrama. min: minutos. mL: mililitro. NALF: lavado do fluido nasal. nmol: nanomol. OVA: ovalbumina. x: vezes. Fonte: Ferreira, 2024.

4.4. Tratamentos

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais (n=5): grupo Basal, animais saudáveis não sensibilizados e desafiados com OVA; grupo CARAS, animais doentes, sensibilizados e desafiados com OVA; três grupos experimentais foram tratados com CISACN nas doses de 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg por via oral (v.o.) e expostos aos processos de sensibilização e desafios com OVA; grupo Dexametasona, tratados com dexametasona (2 mg/kg, DECADRON, Achê®) e expostos aos processos de sensibilização e desafios com OVA. Os tratamentos por via oral foram realizados pelo método de gavagem. Os tratamentos ocorreram uma hora antes de cada desafio com ovalbumina. O quadro 1 mostra os grupos animais, a sensibilização e desafios com ovalbumina e os tratamentos.

Quadro 1. Grupos experimentais no modelo da CARAS

	Grupo	Sensibilização	Desafio	Tratamento
Animais saudáveis	Basal	Salina	Salina	-
	CARAS	OVA	OVA	-
Animais doentes	CISACN 25	OVA	OVA	CISACN 25 mg/kg
	CISACN 12,5	OVA	OVA	CISACN 12,5 mg/kg
	CISACN 6,25	OVA	OVA	CISACN 6,25 mg/kg
	Dexa	OVA	OVA	Dexametasona 2 mg/kg

Fonte: Ferreira, 2024.

4.5. Quantificação celular

O número de células foi quantificado nos fluidos nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF) coletados no 43º dia do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio com ovalbumina. O BALF foi coletado com 1,5 mL de HBSS^{+/-} gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia e o NALF foi coletado com 1mL de HBSS^{+/-} gelado, injetado na nasofaringe do animal pela traqueia, sentido traqueia-nariz, os fluidos foram transferidos para tubos tipo *ependorf* e armazenados sob refrigeração. A contagem do número total de células no BALF e no NALF foi realizada em câmara hemocitométrica (Neubauer). O BALF foi diluído (1:4) e o NALF foi diluído (1:2) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ). Para tal, em 10µL do BALF foi adicionado 30 µL de Turk e em 20 µL do NALF foi adicionado 20 µL de Turk; a contagem das células totais foi realizada no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS).

Após a contagem das células totais, os tubos foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 300g, em uma temperatura de 4 °C, por seis minutos. Os sobrenadantes foram separados e congelados a uma temperatura de -20°C para posterior dosagem de citocinas. Para contagem diferencial dos granulócitos, o *pellet* foi ressuspenso em 300 µL de HBSS^{+/-} gelado, homogeneizado e retirados 200 µL de cada fluido (BALF e NALF) e centrifugados em lâminas de citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica e foi identificado os granulócitos: eosinófilos e

neutrófilos. Cada lâmina foi analisada e 100 células foram contadas, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X).

4.6. Análises histológicas e imuno-histoquímica de tecidos das vias aéreas

Após a eutanásia, cada espécime (cabeça e pulmão), foi fixada por 48 horas. Após o material ser submetido ao seccionamento e processamento foram realizadas etapas incluindo desidratação em banhos de solução com concentrações crescentes de álcool etílico, clarificação (em xileno), impregnação (em banhos de parafina com temperatura máxima de 60°C), inclusão (em parafina com inclusão moldes) e microtomia (feito cortes com espessura de 4 µm). As amostras foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricrômio de Masson (TM), e realizada imuno-histoquímica Anti-IFN-γ (FERREIRA et al., 2024).

As amostras submetidas à reação imuno-histoquímica foram reativadas com solução RECOVERY CITRATO pH 6,0 em câmara pressurizada Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca). A seguir, a peroxidase endógena foi bloqueada por um período de 30 minutos. Após essa etapa, foi realizado o bloqueio proteico específico e os cortes histológicos foram preenchidos com anticorpos primários: Anti-IFN-gama (Cloud-Clone Corp/ PAA049Ra01/Polyclonal Antibody; 1:100). Posteriormente, foi adicionado anticorpo secundário biotilado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1/100, DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase - K0675). A reação foi visualizada utilizando solução de diaminobenzidina (DAB) 0,024% e contrastada com hematoxilina de Harris.

4.7. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos nasais da rinite alérgica, fricção nasal e espirro, foram quantificados, por 10 minutos, em cada camundongo de cada grupo nos dias 23^o, 30^o e 37^o do protocolo, imediatamente após o desafio com OVA (FERREIRA et al., 2024).

4.8. Hiper-reatividade nasal induzida pela histamina

A hiper-reatividade nasal a histamina foi determinada pela quantificação dos sinais clínicos: espirro e fricção nasal, durante 10 minutos, após a administração de doses crescentes de histamina diluída em solução salina, na cavidade nasal. No dia

37º, uma hora após o desafio com o alérgeno, 4 µL/animal de doses crescentes de histamina (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol/camundongo) foram instilados na cavidade nasal de forma consecutiva em intervalos de 60 minutos (FERREIRA et al., 2024).

4.9. Quantificação de IgE e Citocinas

Para a quantificação da IgE Total e IgE OVA-específica, no 43º dia do protocolo, 24 horas após o último desafio, o sangue foi coletado pelo plexo braquial dos grupos experimentais para a obtenção do soro. Após os camundongos serem anestesiados, foi efetuado um corte no plexo braquial e o sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur, pela qual foi aspirado cerca de 500 a 1000 µL de sangue. O sangue foi armazenado em tubos do tipo *ependorf* inclinados a 45º e estocados em geladeira por cerca de quatro horas, para facilitar a formação dos coágulos e coleta dos soros que foi realizada após a centrifugação do sangue por 300 g, a 4ºC por 10 min. Em seguida, os soros foram aliquotados e congelados a – 20 °C para serem quantificados pelo Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA sanduíche para IgE, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN-γ, TGF-β, TNF-α e TSLP presentes no BALF dos camundongos foram quantificadas pelo método imunoenzimático ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.10. Análises de marcação de p38MAPK, NF-κB e ERK 1/2 MAPK em granulócitos por citometria de fluxo

A população celular heterogênea no BALF foi analisada por metodologia de citometria de fluxo. A luz espalhada frontalmente (FSC) e a luz espalhada lateralmente (SSC) permitem determinar as diferentes populações celulares por tamanho (difração de luz) e granularidade (difusão de luz), respectivamente. Analisando a ativação de p38, ERK1/2-MAPK e NF-κB pelo padrão de fosforilação, as células foram fixadas (BD Cytotfix™) e permeabilizadas (Perm Buffer BD Phosflow™) por 30 minutos cada. Após este período, as células foram marcadas com anticorpo anti-p-p38 (PerCPCy5), anti-p-NF-κB (PE) e anti-p-ERK1/2 (PE) de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 10.000 eventos foram analisados

em citômetro de fluxo FACS CANTO II (Becton & Dickinson) e os dados foram analisados por meio do software FlowJo (FERREIRA et al., 2024).

4.11. Análise Estatística

Para as análises estatísticas foram utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0 e valores com $P < 0,05$, considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média e analisados empregando-se o teste estatístico ANOVA *one-way* seguido do teste de Tukey.

5. RESULTADOS

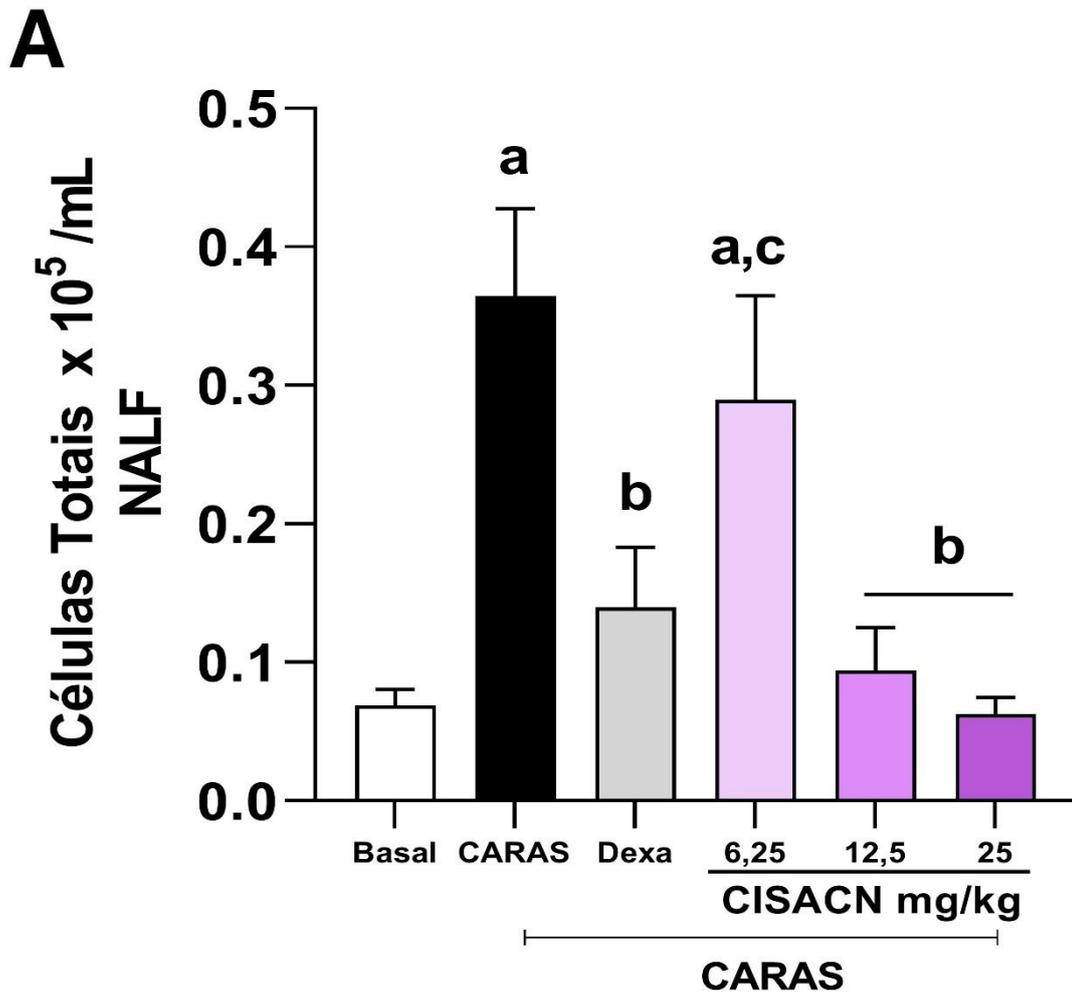
5.1. Efeito do CISACN na migração celular para a cavidade nasal de animais com CARAS

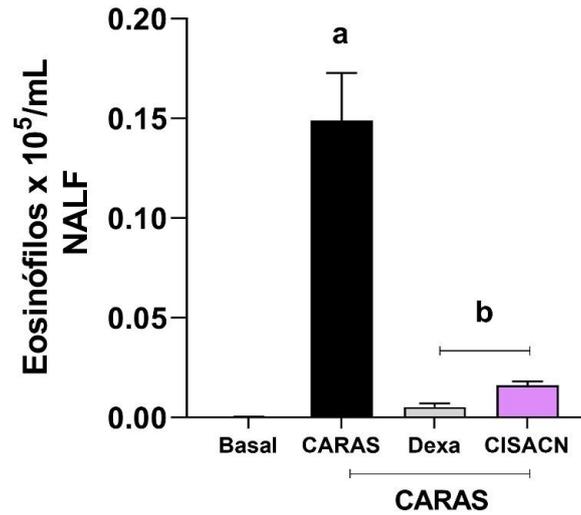
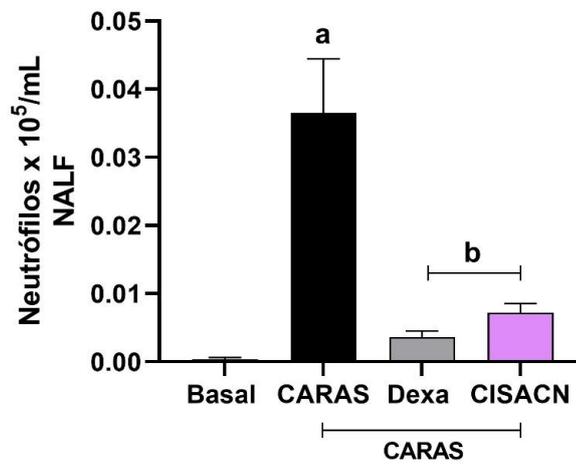
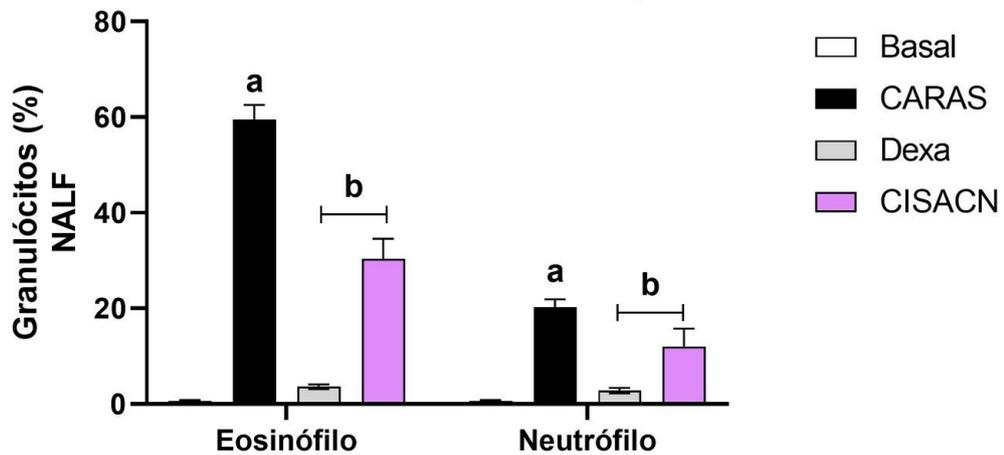
O número de células inflamatórias no NALF dos animais do grupo CARAS aumentou ($p < 0,001$) em comparação aos do grupo Basal. Os tratamentos com CISACN (12,5 mg/kg ou 25 mg/kg) ou Dexametasona (2 mg/kg) inibiram ($p < 0,05$) a migração dessas células para a cavidade nasal em comparação ao grupo CARAS, entretanto, não apresentaram diferenças, nos números dessas células, em comparação ao grupo Basal (Figura 5 A). Ademais, o grupo tratado com CISACN na dose de 6,25 mg/kg não apresentou redução na migração leucocitária no NALF em comparação com o grupo CARAS.

Em adição, não houve diferença significativa na redução do número de células inflamatórias no NALF dos animais dos grupos CISACN 12,5 mg/kg e 25 mg/kg (Figura 5 A), portanto, a dose de 12,5 mg/kg foi a escolhida para dar continuidade ao estudo. Os eosinófilos e os neutrófilos foram analisados e observamos que o número de eosinófilos no NALF dos animais do grupo CARAS aumentou ($p < 0,0001$) em comparação aos do grupo Basal. Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona, inibiram ($p < 0,0001$) a migração eosinofílica para o NALF, de forma a não apresentar diferença com o grupo Basal (Figura 5 B).

A migração de neutrófilos foi também aumentada ($p < 0,0001$) no NALF dos animais do grupo CARAS em comparação com os do grupo Basal e, os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,001$) os neutrófilos no NALF, de forma a não apresentar diferenças com o grupo Basal (Figura 5 C). Entretanto, o percentual de eosinófilos (acima de 50%) foi superior em detrimento aos neutrófilos (menor que 30%) no grupo CARAS quando comparado com o grupo Basal ($p < 0,0001$). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona diminuíram na mesma proporção ($p < 0,05$) a migração dos granulócitos para a cavidade nasal, assemelhando-se aos níveis basais (Figura 5 D).

Figura 5. Efeito do tratamento com CISACN na migração celular para cavidade nasal no modelo experimental de CARAS



B**C****D**

Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados por via oral (gavagem) com CISACN nas doses de 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, ou com Dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental foram coletados fluidos do lavado nasal (NALF) e uma alíquota foi diluída em solução de Turk para contagem de leucócitos. (A) Leucócitos totais, (B) Eosinófilos, (C) Neutrófilos e (D) porcentagem (%) de granulócitos. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo Basal, b ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo CARAS e c ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CISACN 12,5 mg/kg.

5.2. Efeito do tratamento com CISACN no tecido das vias aéreas superiores dos animais com CARAS

Os tecidos nasais dos animais do grupo CARAS apresentaram infiltração de células inflamatórias nas regiões perivascular e subepitelial (seta amarela), caracterizando o intenso processo inflamatório e destruição da camada epitelial na mucosa nasal, quando comparados aos tecidos nasais dos animais do grupo Basal ($p < 0,0001$) visualizado por hematoxilina e eosina (H&E) (Figura 6 A). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona diminuíram o infiltrado celular nas cavidades nasais ($p < 0,0001$), além de manter a integridade tecidual, semelhante aos do grupo Basal (Figura 6 A).

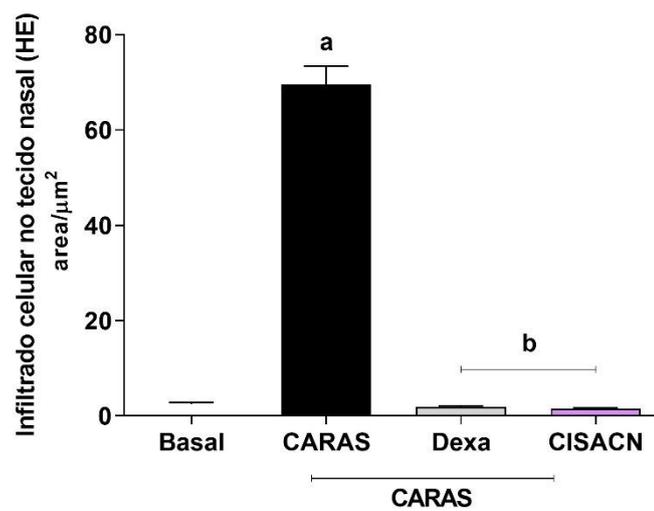
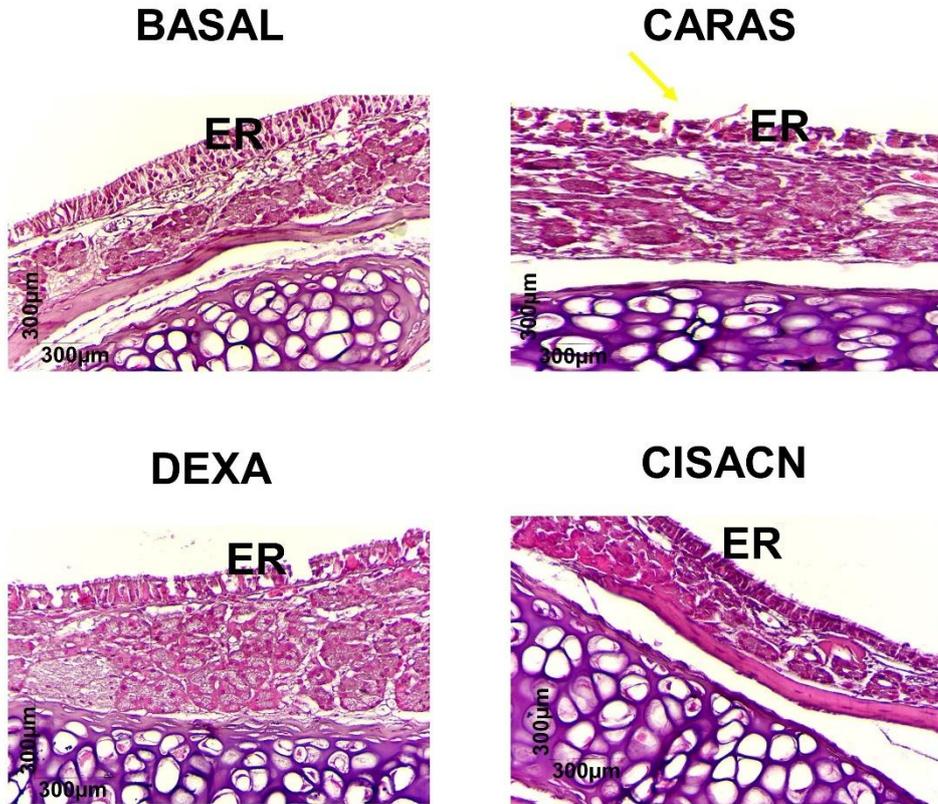
Pela coloração com o ácido periódico de Schiff (PAS), observamos que houve intenso processo de hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes na camada epitelial e no parênquima, com produção de muco na região epitelial (asterisco vermelho) nos tecidos nasais dos animais do grupo CARAS (Figura 6 B). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram o processo de hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes e a produção de muco na cavidade nasal quando comparado com o grupo CARAS ($p < 0,0001$). A redução dos parâmetros inflamatórios observada nos grupos CISACN e Dexametasona tornaram os tecidos nasais semelhantes aos dos animais do grupo Basal, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 6 B).

Os tecidos nasais corados com tricrômio de Masson (TM) demonstram que, nos animais do grupo CARAS, houve deposição de matriz extracelular (MEC) com espessamento da membrana basal (EMB) (ponta de seta preta) quando comparados aos do grupo Basal ($p < 0,0001$) (Figura 6 C). Os tecidos nasais dos animais dos grupos CISACN ou Dexametasona apresentaram redução ($p < 0,0001$) do espessamento da membrana nasal e do remodelamento tecidual quando comparados com os do grupo CARAS, redução essa que levou aos tecidos se assemelharem aos tecidos nasais dos animais do grupo Basal (Figura 6 C).

Figura 6. Efeito do tratamento com CISACN nos aspectos histopatológicos e morfométricos do tecido nasal no modelo experimental de CARAS

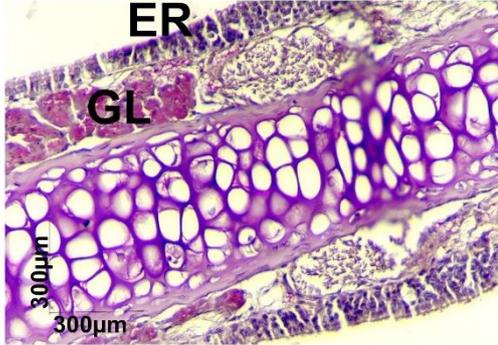
A

TECIDO NASAL

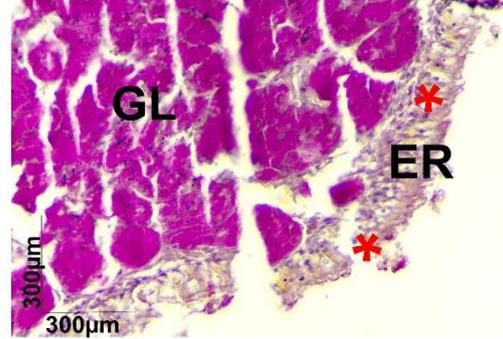


B TECIDO NASAL

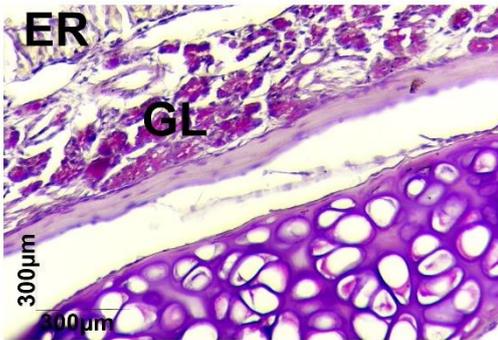
BASAL



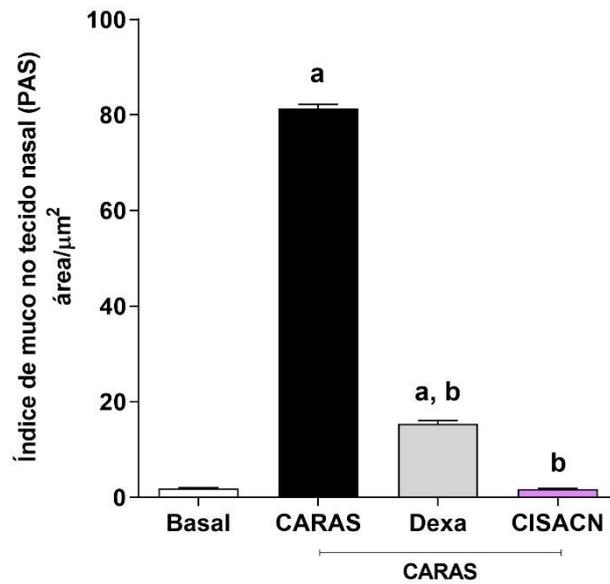
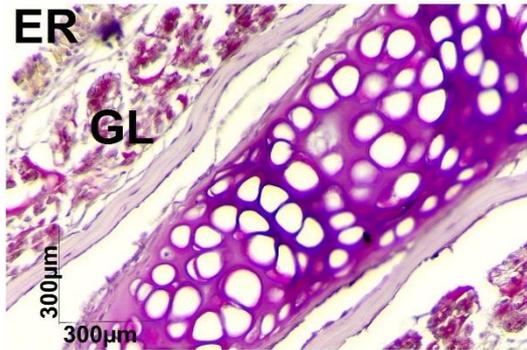
CARAS



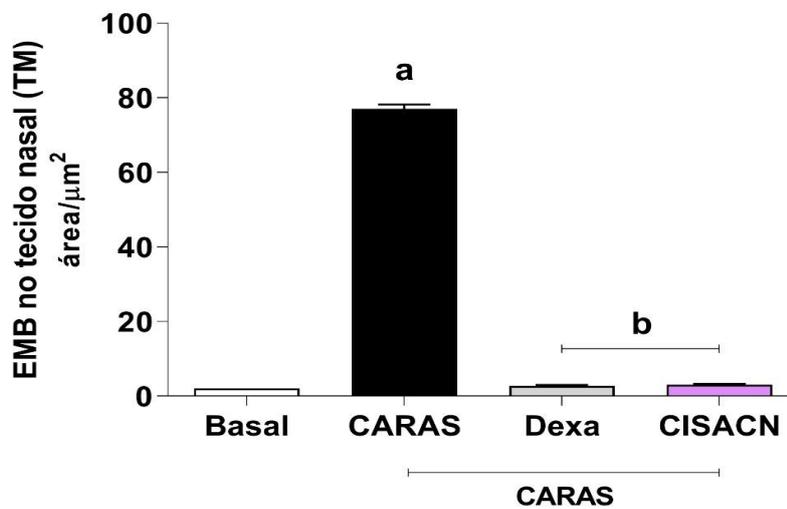
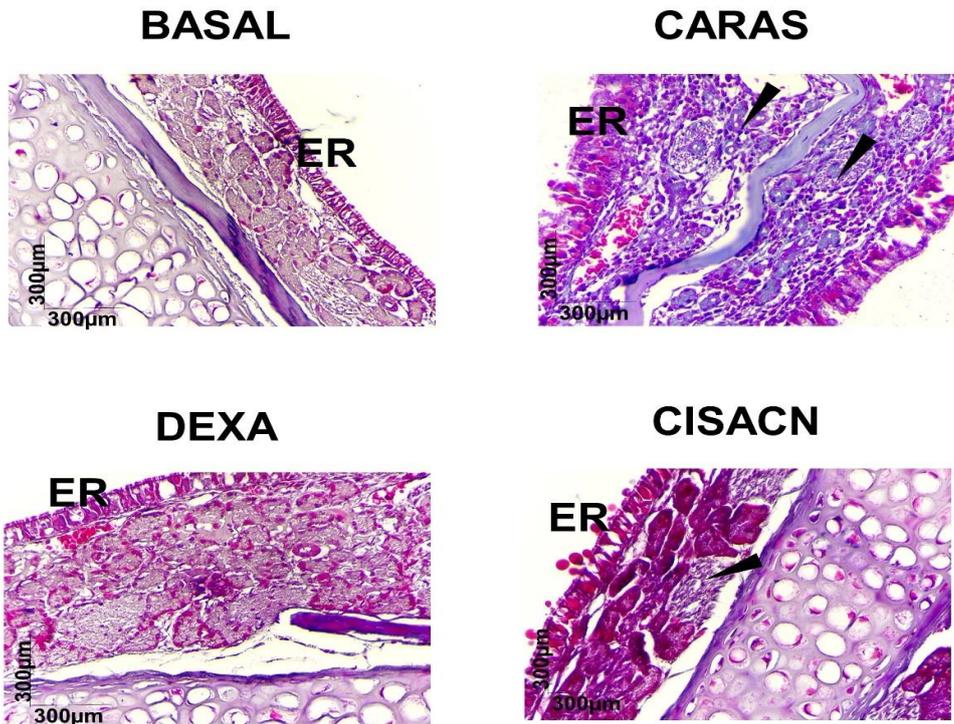
DEXA



CISACN



C TECIDO NASAL



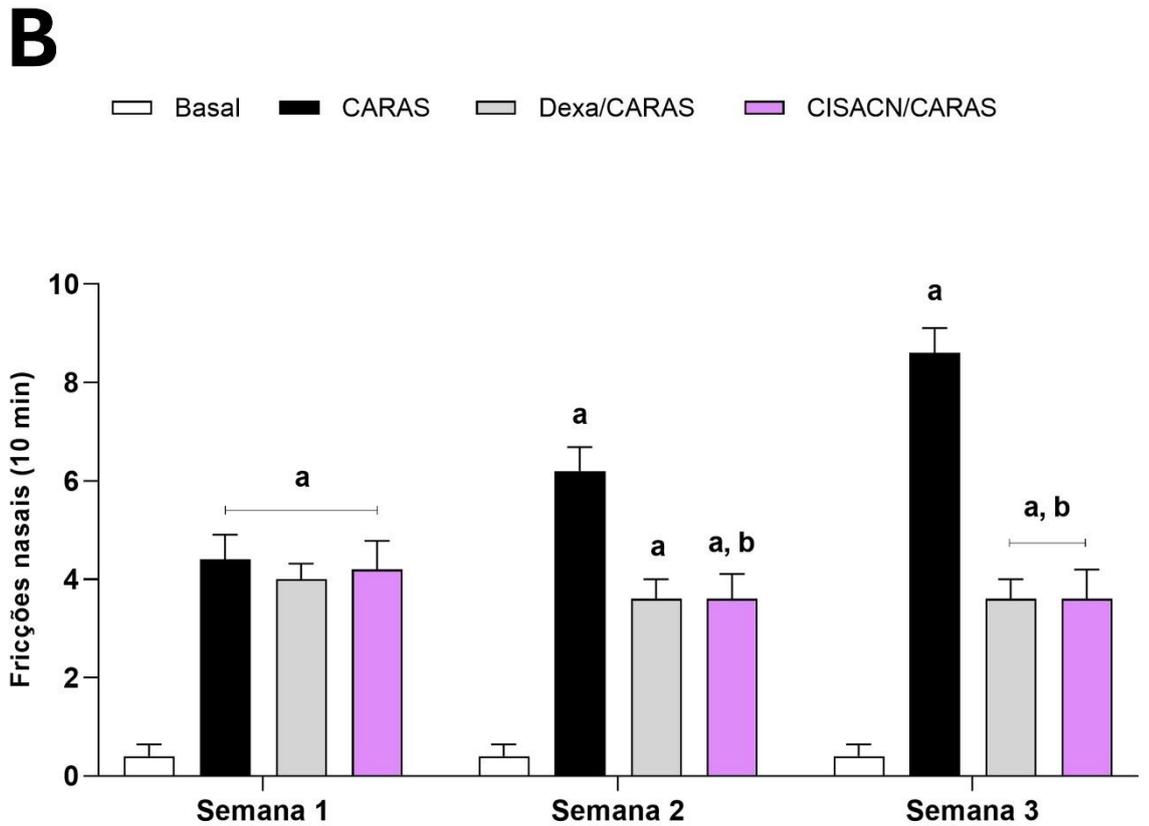
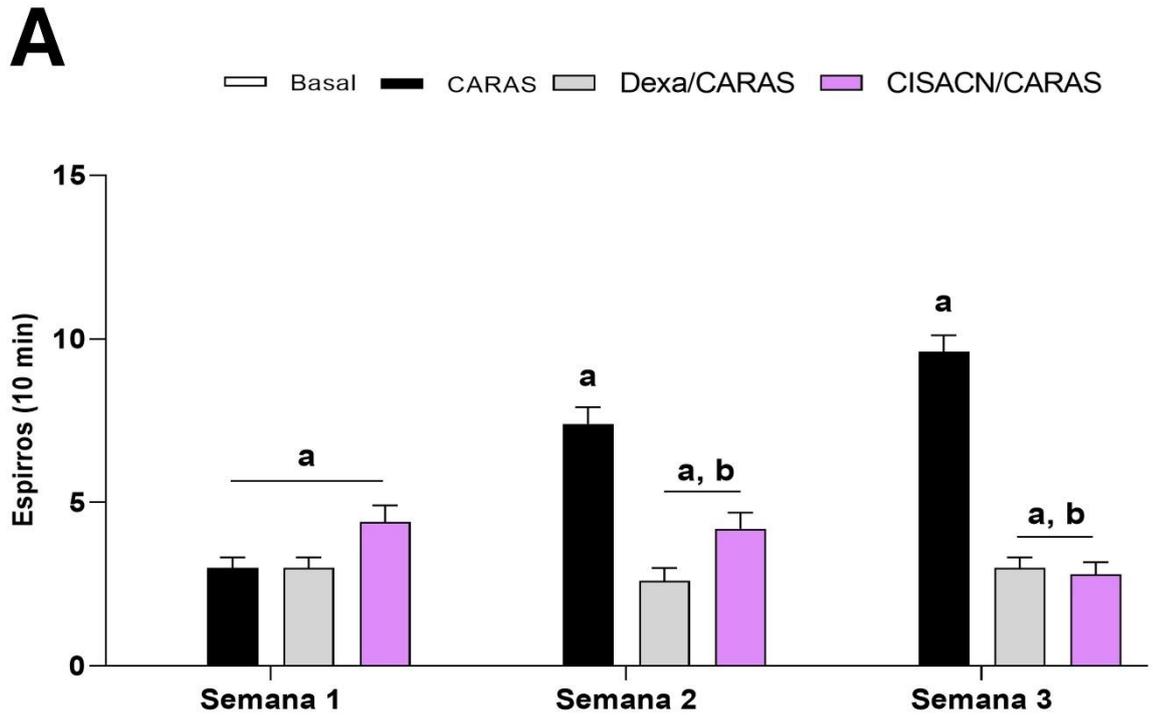
Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados por via oral (gavagem) com CISACN na dose de 12,5 mg/kg, ou com Dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental foram coletados o tecido nasal e submetidos a procedimentos de coloração histológicos. Fotomicrografias representativas de tecidos nasais dos grupos de animais. Os tecidos foram corados com (A) hematoxilina-eosina (H&E), (B) ácido periódico de Schiff (PAS) e (C) tricrômio de Masson (TM). Ampliação total 300x (150 µm). Os símbolos indicam os parâmetros avaliados: infiltrado celular (seta amarela), células calciformes (asterisco vermelho) e deposição de MEC (ponta de seta preta). RE (epitélio respiratório), GL (Glândula), Br (Bronquíolo), V (Vaso). Foram realizadas análises morfológicas de infiltração celular (A), produção de muco (B), espessamento da matriz extracelular (MEC) (C) do tecido nasal. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a (p < 0,0001), quando comparado ao grupo Basal e b (p < 0,0001) em comparação ao grupo CARAS.

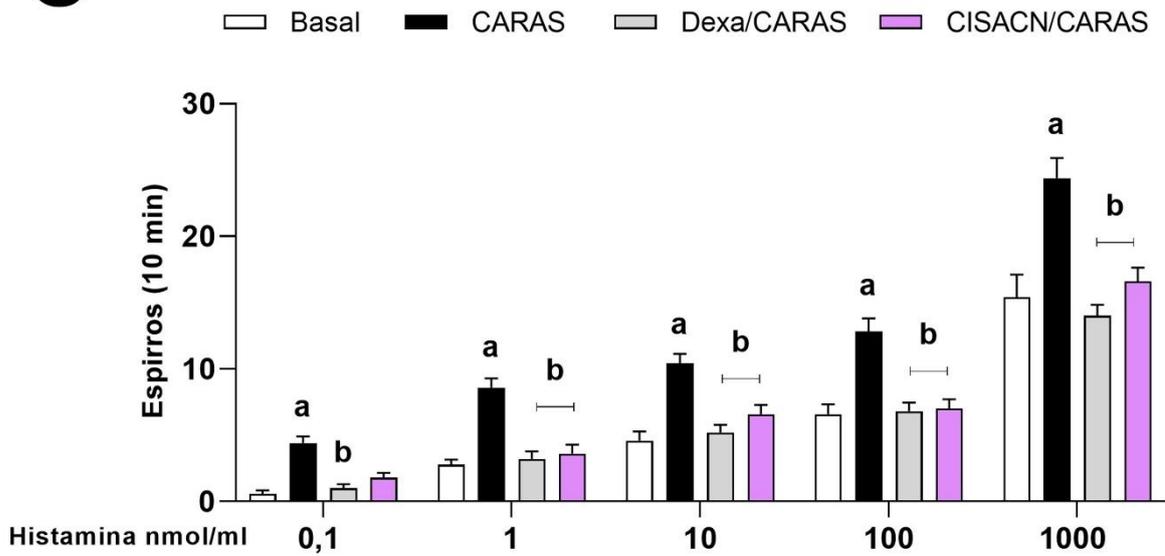
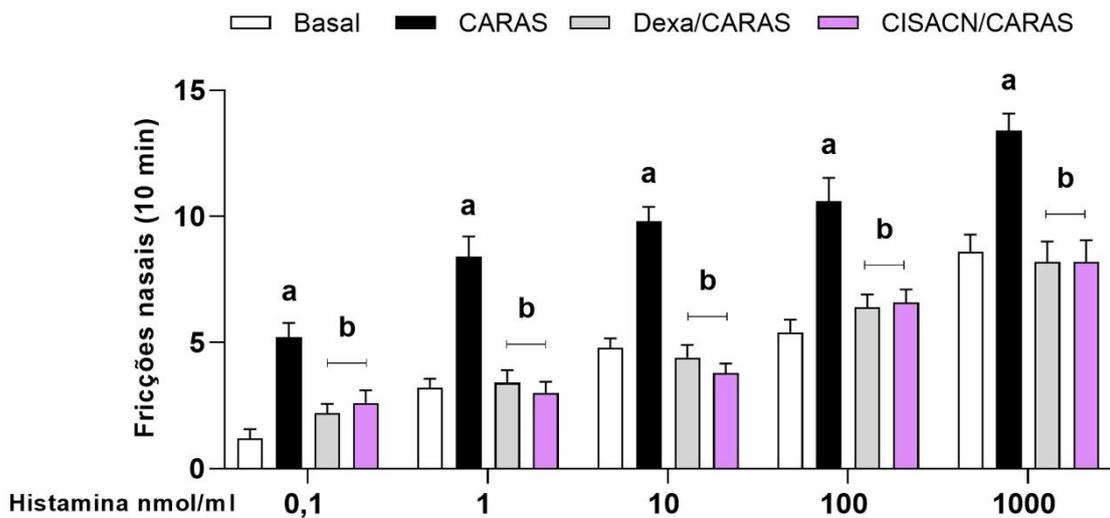
5.3. Efeito do tratamento com CISACN nos sinais clínicos, espirro e fricção nasal, nos animais com CARAS

O espirro e a fricção nasal foram quantificados durante 10 minutos após o desafio intranasal com OVA nos dias 23, 30 e 37 do protocolo CARAS. Os animais do grupo CARAS apresentaram aumento em ambos os sinais de rinite a partir da primeira semana de desafios com OVA (dia 23) em comparação ao grupo Basal ($p < 0,05$) (Figura 7 A e B). Entretanto, os tratamentos com CISACN ou com Dexa diminuíram ($p < 0,05$) os espirros e as fricções nasais, a partir da segunda semana (dias 30 e 37), quando comparado ao grupo CARAS (Figura 7 A e B).

A hiper-reatividade nasal pela histamina levou ao aumento ($p < 0,05$) de espirros e fricções nasais nos animais do grupo CARAS quando comparados aos do grupo Basal a partir da menor dose de histamina instilada (0,1nmol/mL) (Figura 7 C e D). O tratamento com CISACN reduziu os espirros a partir da dose de 1nmol/mL (Figura 7 C) e, os tratamentos com CISACN ou com Dexa reduziram ($p < 0,05$) as fricções nasais a partir da menor dose de histamina instilada (Figura 7 D).

Figura 7. Efeito do tratamento com CISACN na quantificação dos sinais clínicos da Rinite Alérgica e da hiper-reatividade nasal à histamina no modelo experimental de CARAS



C**D**

Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com CISACN (12,5 mg/kg) ou com Dexametasona (2 mg/kg) uma hora antes de cada desafio com OVA. Nos dias 23, 30 e 37, após o desafio, foram quantificados espirros e fricção nasal por 10 minutos. Para hiper-reatividade nasal à histamina, no dia 37, uma hora após o desafio com OVA, em intervalos de 1 hora, doses de histamina (0,1; 1; 10; 100 e 1000 nmol/mL) foram instiladas nos animais e os sinais clínicos foram contados. (A) espirros semanais, (B) fricção nasal semanal, (C) espirros após instilação de histamina e (D) fricção nasal após instilação de histamina. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo Basal e b ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS.

5.4. Efeito do tratamento com CISACN na migração celular para cavidade pulmonar nos animais com CARAS

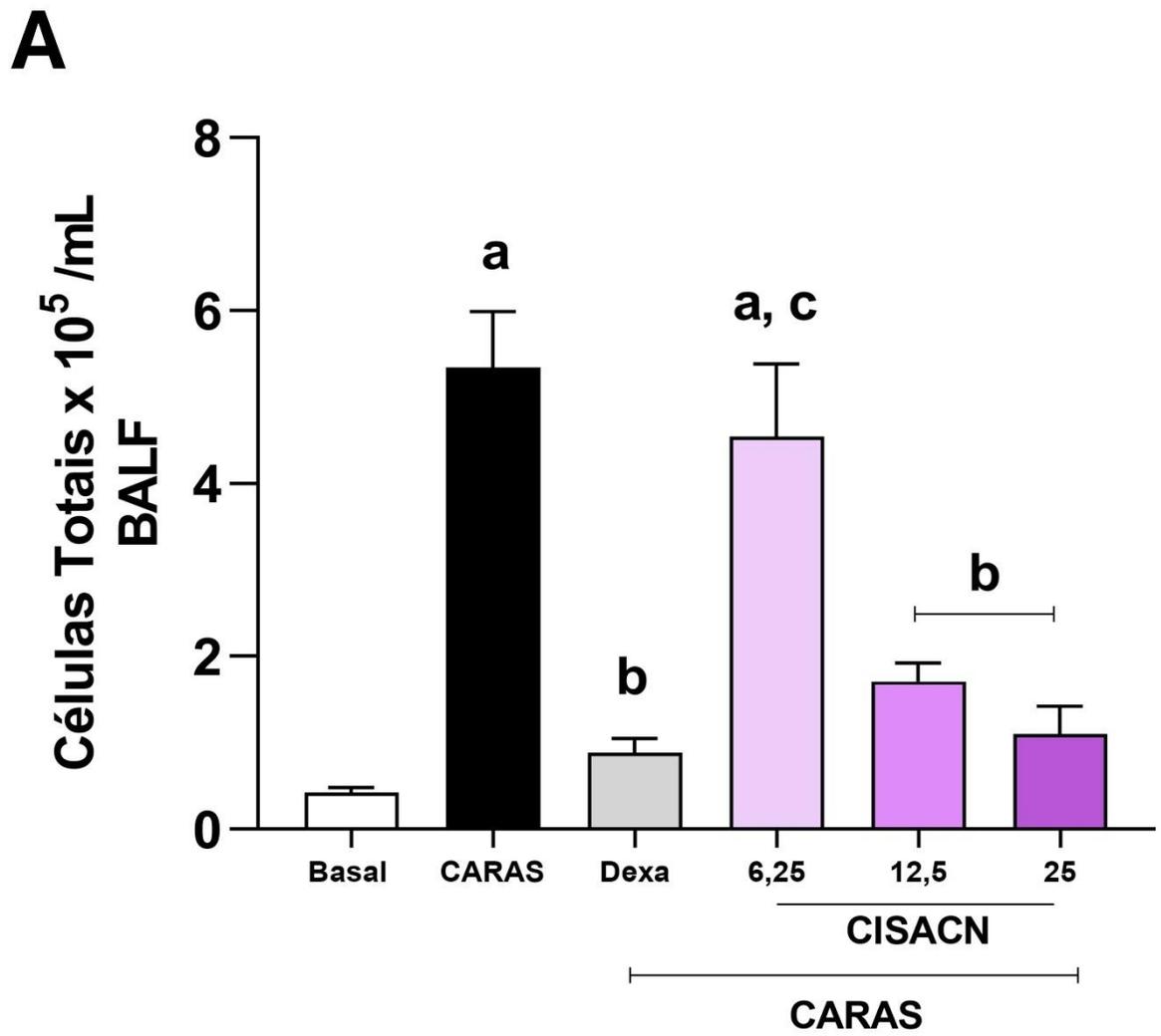
O número de células inflamatórias no BALF dos animais do grupo CARAS aumentou ($p < 0,0001$) quando em comparação aos do grupo Basal (Figura 8 A). Os tratamentos com CISACN (12,5 mg/kg ou 25 mg/kg) ou com Dexametasona (2 mg/kg) inibiram ($p < 0,0001$) a migração dessas células no BALF, embora sem diferenças significativas quando em comparação com os animais do grupo Basal (Figura 8 A). Entretanto, o tratamento com CISACN na dose de 6,25 mg/kg não diminuiu a migração celular no BALF em comparação com grupo CARAS (Figura 8 A).

Entre os grupos CISACN 12,5 mg/kg e 25 mg/kg não houve diferença significativa quanto a diminuição na migração celular no BALF (Figura 8 A), corroborando com os resultados observados nas vias aéreas superior, indicando que a dose de 12,5 mg/kg de CISACN também foi eficaz nas vias aéreas inferiores.

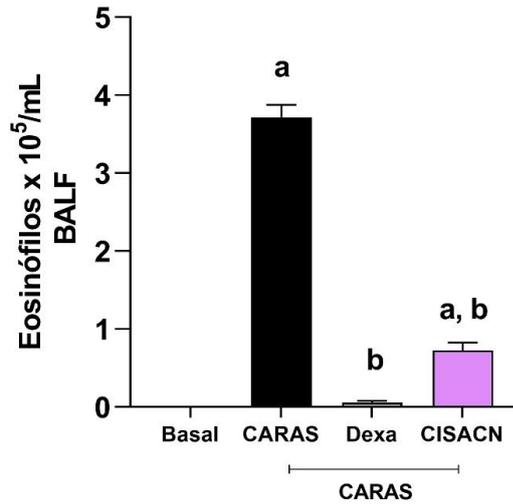
Dentre os granulócitos que migraram para o BALF dos animais do grupo CARAS, observamos aumento ($p < 0,0001$) de eosinófilos quando comparado com o grupo Basal e, os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,0001$) a migração dessas células no BALF (Figura 8 B). Houve também migração de neutrófilos ($p < 0,0001$) no BALF dos animais do grupo CARAS quando comparado ao grupo Basal e os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,001$) a migração dessas células (Figura 8 C).

Quanto ao percentual de eosinófilos e de neutrófilos no BALF houve preponderância de eosinófilos (superior a 50%) em detrimento aos neutrófilos (inferior a 30%) no grupo CARAS quando comparado com o grupo Basal ($p < 0,001$) (Figura 8 D). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona diminuíram ($p < 0,05$) a migração desses granulócitos para o BALF (Figura 8 D).

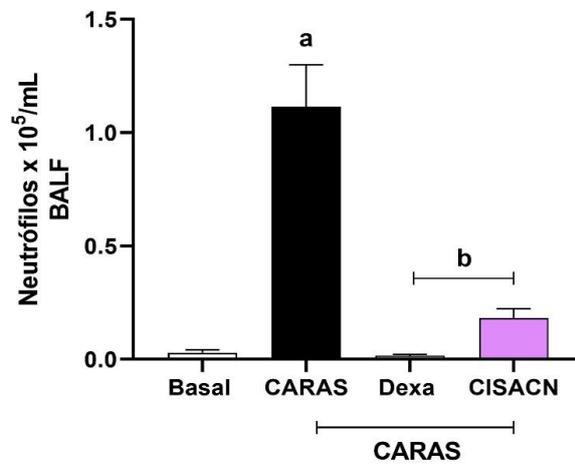
Figura 8. Efeito do tratamento com CISACN na migração celular para cavidade pulmonar no modelo experimental de CARAS



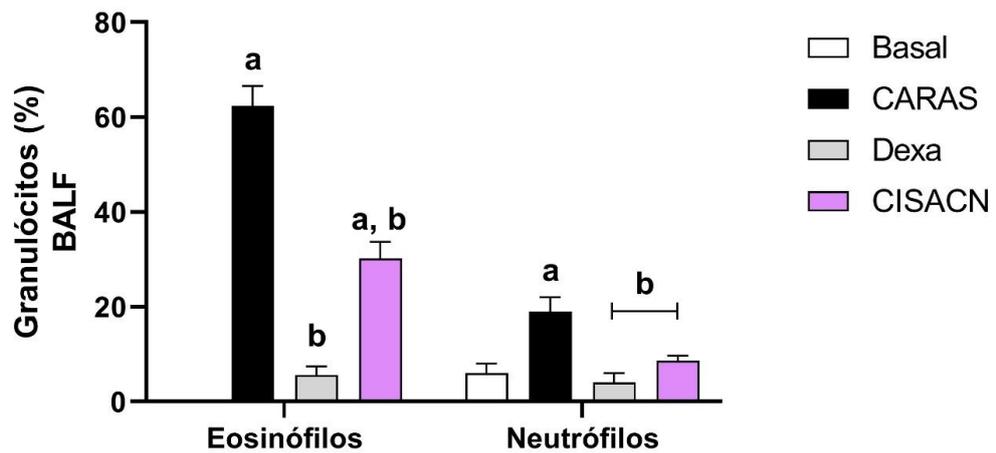
B



C



D



Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados por via oral (gavagem) com CISACN nas doses de 6,25, 12,5 ou 25 mg/kg, ou com Dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental foram coletados fluidos do lavado broncoalveolar (BALF) e uma alíquota foi diluída em solução de Turk para contagem de leucócitos. (A) Leucócitos totais, (B) Eosinófilos, (C) Neutrófilos e (D) percentagem (%) de granulócitos. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo Basal, b ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo CARAS e c ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CISACN 12,5mg/kg.

5.5. Efeito do tratamento com CISACN no tecido pulmonar dos animais com CARAS

Os tecidos pulmonares corados com H&E dos animais do grupo CARAS apresentaram intenso infiltrado de células inflamatórias nas regiões peribronquiolar e perivascular (seta amarela) e a perda da integridade tecidual do pulmão quando comparados com os tecidos pulmonares dos animais do grupo Basal ($p < 0,0001$) (Figura 9 A). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,0001$) o infiltrado celular no tecido pulmonar quando comparados com o grupo CARAS (Figura 9 A).

O número de eosinófilos nos tecidos pulmonares dos animais do grupo CARAS aumentou ($p < 0,0001$) em comparação com os do grupo Basal (Figura 9 B). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,0001$), à níveis basais, o número dessas células (Figura 9 B).

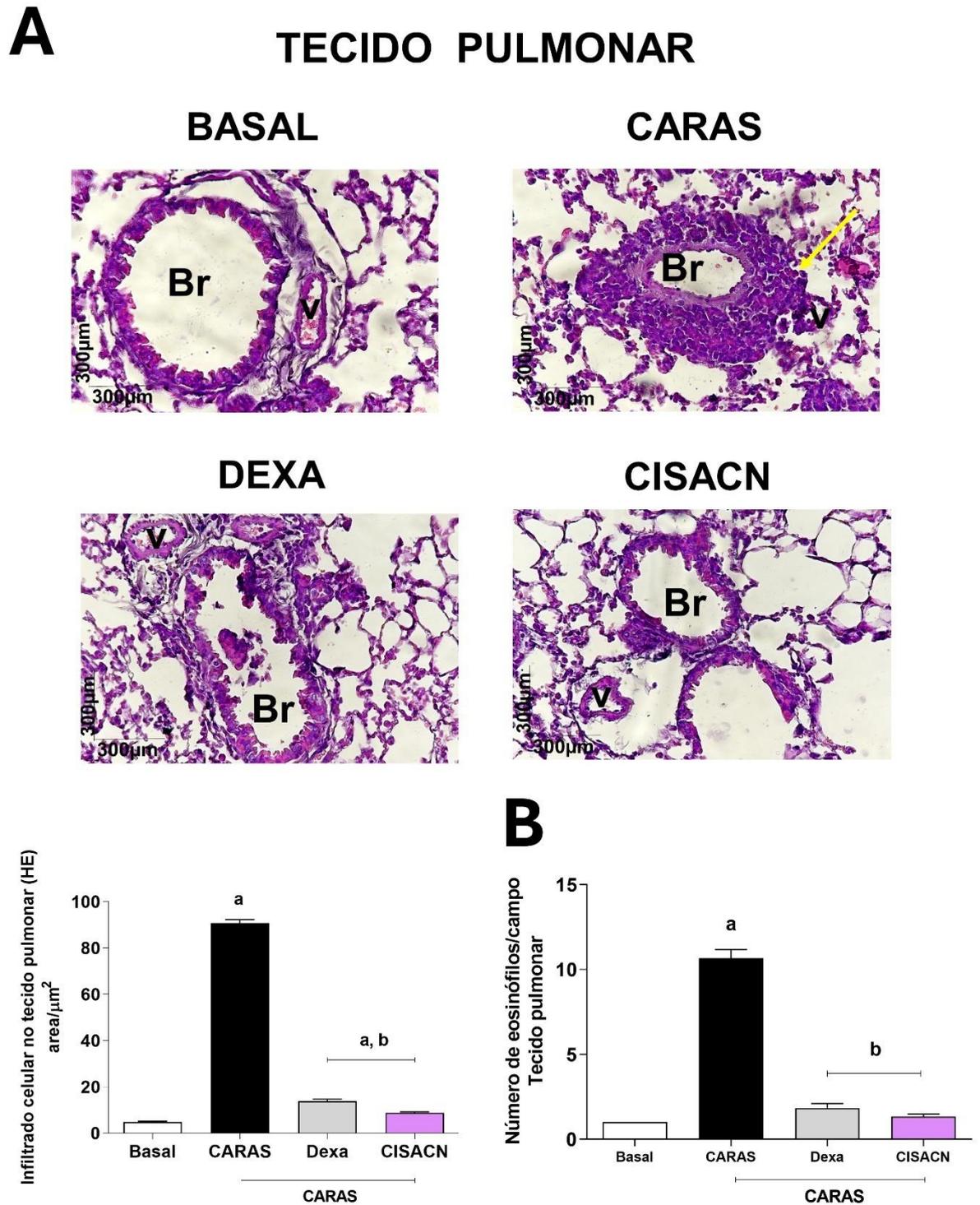
Análises dos tecidos pulmonares com o corante PAS mostraram intenso ($p < 0,0001$) processo de hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes na camada epitelial e no parênquima, nos bronquíolos, com consequente produção de muco na região epitelial (asterisco vermelho) no grupo CARAS quando em comparação com o grupo Basal (Figura 9 C). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,0001$) a produção de muco na cavidade pulmonar dos animais quando comparado com os animais do grupo CARAS (Figura 9 C).

O remodelamento tecidual e a hiper-reatividade das vias aéreas inferiores foram analisadas via o corante de TM. Os animais do grupo CARAS apresentaram deposição ($p < 0,05$) de matriz extracelular (MEC) com espessamento da membrana basal (EMB) (ponta de seta preta) nas regiões peribronquiolares e perivasculares quando comparados ao grupo Basal (Figura 9 D). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,0001$) o espessamento da membrana basal e o remodelamento quando comparados com os animais do grupo CARAS (Figura 9 D).

Ademais, foi possível identificar aumento ($p < 0,0001$) da área na camada muscular lisa bronquiolar, indicando processo de hiperplasia e/ou hipertrofia muscular com consequente hiperatividade das vias aéreas no grupo CARAS em comparação com o grupo Basal (Figura 9 E). Os tratamentos com CISACN ou com

Dexa diminuíram ($p < 0,0001$) a área da camada muscular com diminuição da hiper-reatividade brônquica (Figura 9 E).

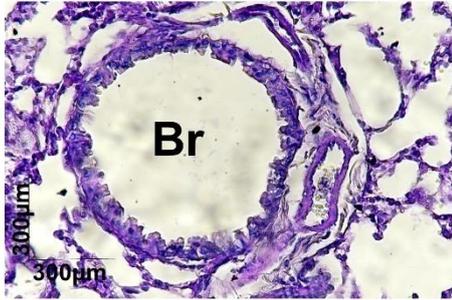
Figura 9. Efeito do tratamento com CISACN nos aspectos histopatológicos e morfométricos do tecido pulmonar no modelo experimental de CARAS



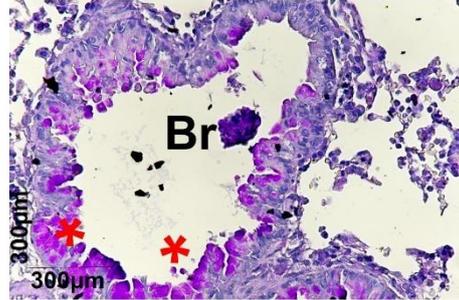
C

TECIDO PULMONAR

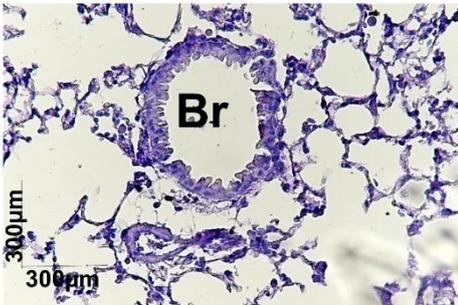
BASAL



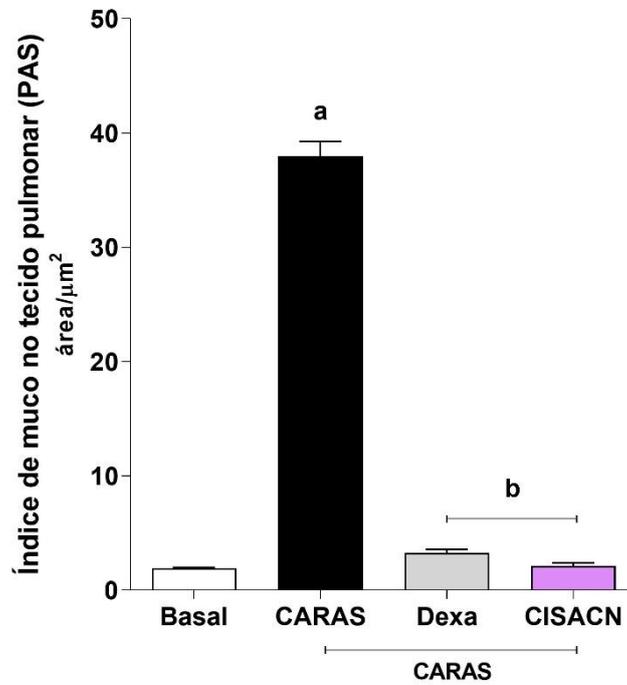
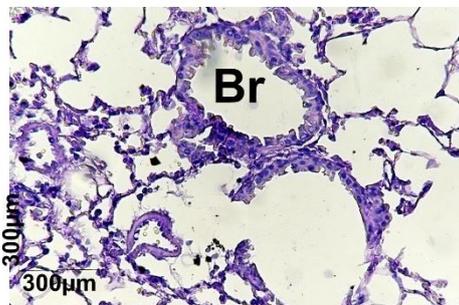
CARAS



DEXA



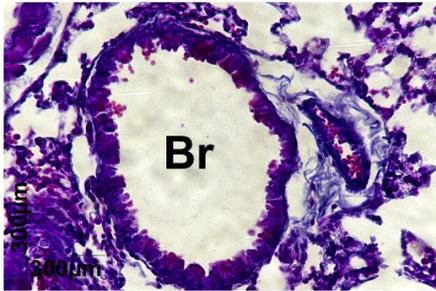
CISACN



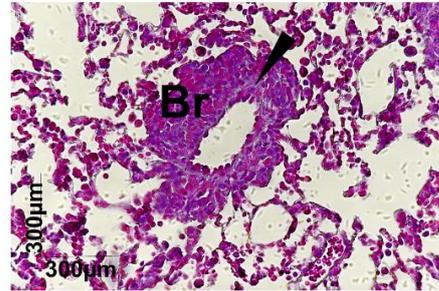
D

TECIDO PULMONAR

BASAL



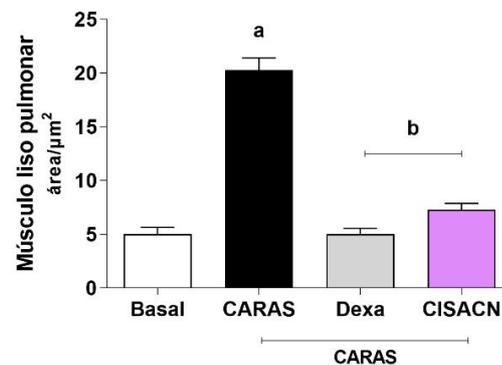
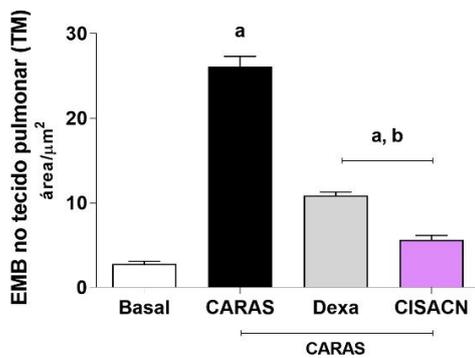
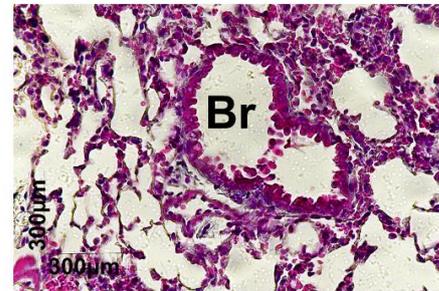
CARAS



DEXA



CISACN



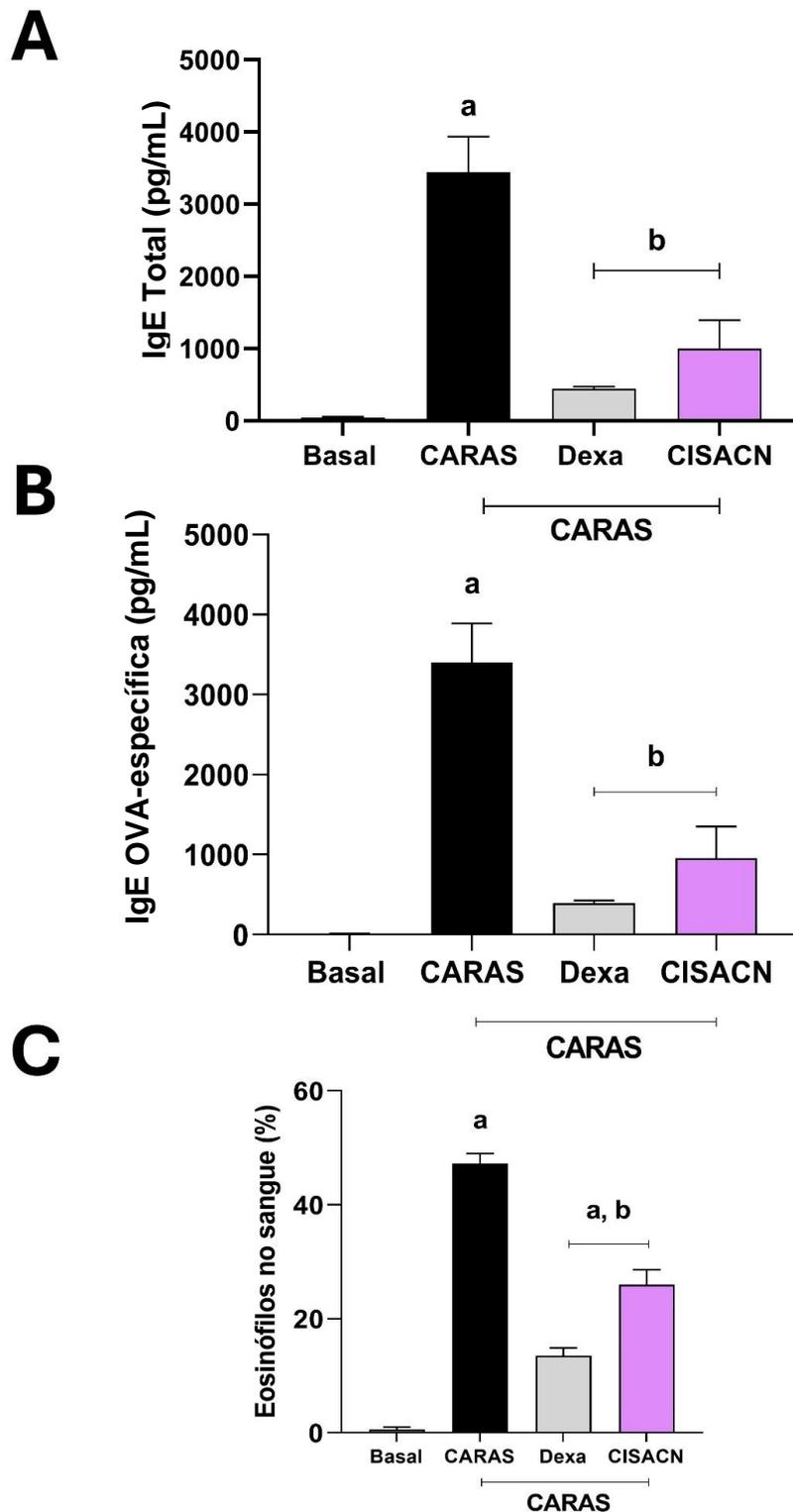
Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados por via oral (gavagem) com CISACN na dose de 12,5 mg/kg, ou com Dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental foram coletados o tecido pulmonar dos animais e submetidos a procedimentos de coloração histológicos. Fotomicrografias representativas de tecidos pulmonares dos grupos de animais. Os tecidos foram corados com (A) hematoxilina-eosina (H&E), (C) ácido periódico de Schiff (PAS) e (D) tricrômio de Masson (TM). Ampliação total 400x (150 μm). Os símbolos indicam os parâmetros avaliados: infiltrado celular (seta amarela), células caliciformes (asterisco vermelho) e deposição de MEC (ponta de seta preta). RE (epitélio respiratório), GL (Glândula), Br (Bronquíolo), V (Vaso). Foram realizadas análises morfométricas de infiltração celular (A), contagem de eosinófilos teciduais (B), produção de muco (C), espessamento da matriz extracelular (MEC) (D), espessamento da camada muscular lisa (E) do tecido pulmonar. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo Basal e b ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo CARAS.

5.6. Efeito do tratamento com CISACN no perfil alérgico e na quantificação de eosinófilos sistêmico nos animais com CARAS

As concentrações séricas IgE total e de IgE OVA-específica nos animais do grupo CARAS aumentou ($p < 0,0001$) em comparação com a dos animais do grupo Basal (Figuras 10 A e B). Os tratamentos com CISACN ou com Dexa reduziram ($p < 0,0001$) as concentrações desses dois tipos de IgE retornando aos níveis basais (Figura 10 A e B).

O percentual de eosinófilos no sangue aumentou ($p < 0,001$) nos animais do grupo CARAS em comparação com os do grupo Basal e os tratamentos com CISACN ou com Dexa diminuíram ($p < 0,0001$) o percentual dessa população celular a nível sistêmico quando comparados com o grupo CARAS (Figura 10 C).

Figura 10. Efeito do tratamento com CISACN no perfil alérgico e quantificação sistêmica de eosinófilos no modelo experimental de CARAS



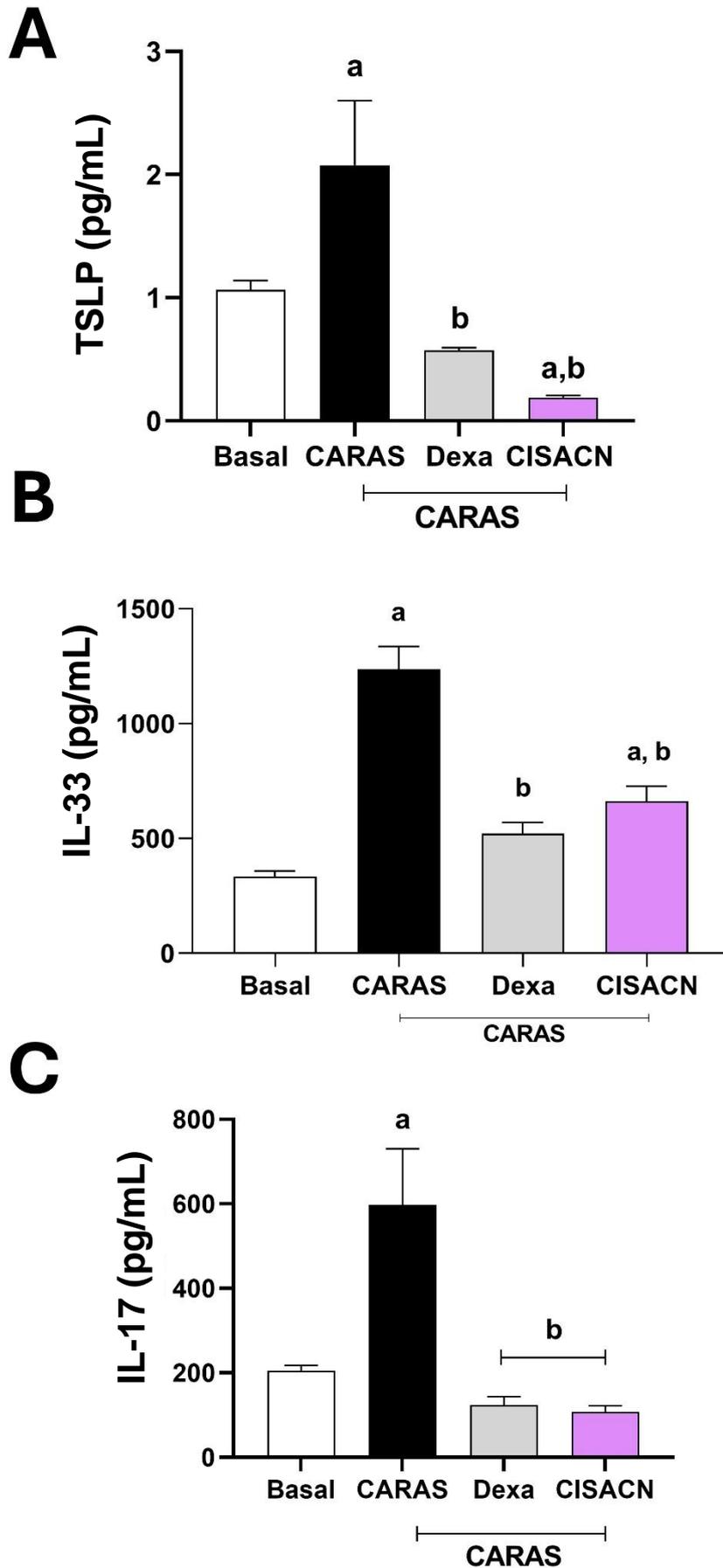
Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com CISACN (12,5 mg/kg) ou com Dexametasona (2 mg/kg) uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental de CARAS foi coletado o soro dos animais. O esfregaço sanguíneo foi realizado para contagem de eosinófilos. Pelo ensaio ELISA foi medido a concentração de IgE Total e OVA-específica no soro. (A) IgE Total, (B) IgE OVA-específica e (C) % eosinófilos no sangue. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo Basal e b ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo CARAS.

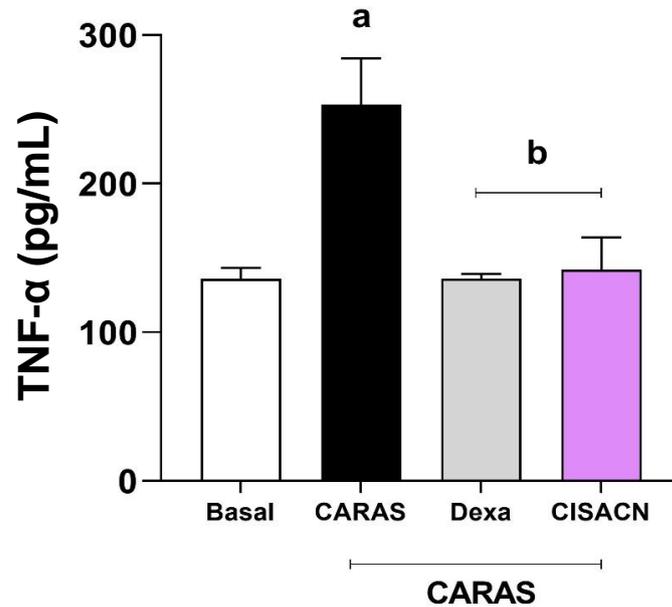
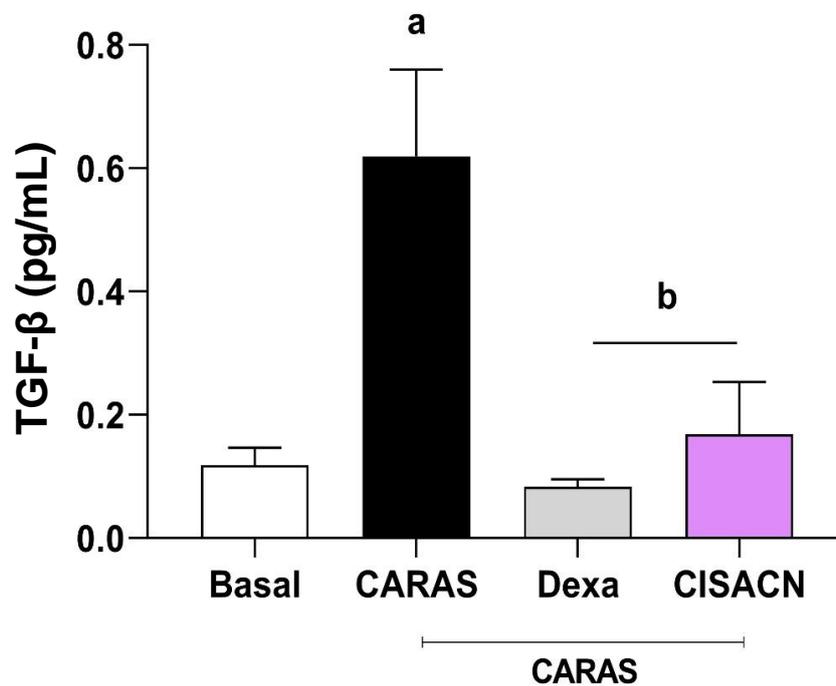
5.7. Efeito do tratamento com CISACN no processo de imunomodulação nos animais com CARAS

Os níveis das alarminas, TSLP e IL-33, aumentaram ($p < 0,05$) no BALF dos animais do grupo CARAS quando comparados com os animais do grupo Basal (Figura 11 A e B). Contudo, o tratamento com CISACN reduziu ($p < 0,001$) os níveis dessas alarminas quando comparado com o grupo CARAS (Figura 11 A e B). Ademais, em relação ao TLSP, o CISACN reduziu ($p < 0,001$), a níveis basais, quando comparado com o grupo Basal (Figura 11 A). Os animais do grupo CARAS apresentaram aumento ($p < 0,05$) de IL-17 em comparação com os do grupo Basal. Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,05$), a níveis basais, a concentração dessa citocina (Figura 11 C).

Os níveis de TNF- α aumentaram ($p < 0,0001$) no grupo CARAS quando comparado ao grupo Basal. Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,0001$), a níveis basais, a concentração dessa citocina quando comparados com o grupo Basal (Figura 11 D). Os níveis de TGF- β aumentaram ($p < 0,001$) nos animais do grupo CARAS quando comparados aos do grupo Basal e, os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona inibiram ($p < 0,05$), a níveis basais, sua produção (Figura 11 E).

Figura 11. Efeito do tratamento com CISACN na imunomodulação do processo inflamatório no modelo experimental de CARAS



D**E**

Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com CISACN (12,5 mg/kg) ou com Dexametasona (2 mg/kg) uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental de CARAS foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) de todos os animais. Pelo ensaio ELISA foi mensurada a concentração das citocinas (A) TSLP, (B) IL-33, (C) IL-17, (D) TNF- α e (D) TGF- β . Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a (p<0,05), quando comparado ao grupo Basal e b (p<0,05) em comparação ao grupo CARAS.

5.8. Efeito do tratamento com CISACN no processo de imunorregulação nos animais com CARAS

Os animais do grupo CARAS apresentaram aumento ($p < 0,0001$) das citocinas IL-5 e IL-13, no BALF, quando comparados com os do grupo Basal (Figuras 12 A e B, respectivamente). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona reduziram ($p < 0,05$), à níveis basais, a concentração das supracitadas citocinas em comparação com o grupo CARAS (Figuras 12 A e B).

Com relação a produção de IL-4, no BALF houve aumento ($p < 0,001$) na sua concentração no grupo CARAS em comparação com o grupo Basal (Figura 12 C). Os tratamentos com CISACN ou com Dexametasona inibiram ($p < 0,001$) a produção da IL-4 (Figura 12 C). Entretanto, não houve alteração na concentração dessa citocina no sangue dos animais dos grupos avaliados (Figura 12 F).

A produção de IFN- γ foi reduzida ($p < 0,05$) no BALF dos animais do grupo CARAS, quando comparada com o grupo Basal (Figura 12 D). O tratamento com CISACN aumentou ($p < 0,0001$) a produção dessa citocina (Figura 12 D). Entretanto, o tratamento com a Dexametasona não alterou a produção local (BALF) de IFN- γ (Figura 12 D).

A nível sistêmico, a concentração de IFN- γ permaneceu semelhante nos grupos Basal, CARAS e CISACN (Figura 12 G). Entretanto, o tratamento com Dexametasona aumentou ($p < 0,05$) a concentração sistêmica de IFN- γ quando comparada com os demais grupos experimentais avaliados (Figura 12 G).

Ademais, quando o IFN- γ foi mensurado no tecido pulmonar houve diminuição ($p < 0,0001$) dessa citocina nos animais do grupo CARAS quando comparados com os animais do grupo Basal (Figura 12 I). Entretanto, o tratamento com CISACN aumentou ($P < 0,05$) a concentração de IFN- γ tecidual quando comparado com o grupo CARAS (Figura 12 I). O tratamento com Dexametasona reduziu ($p < 0,05$) a quantidade de IFN- γ quando comparados com os grupos Basal, CARAS e CISACN (Figura 12 D, G e I).

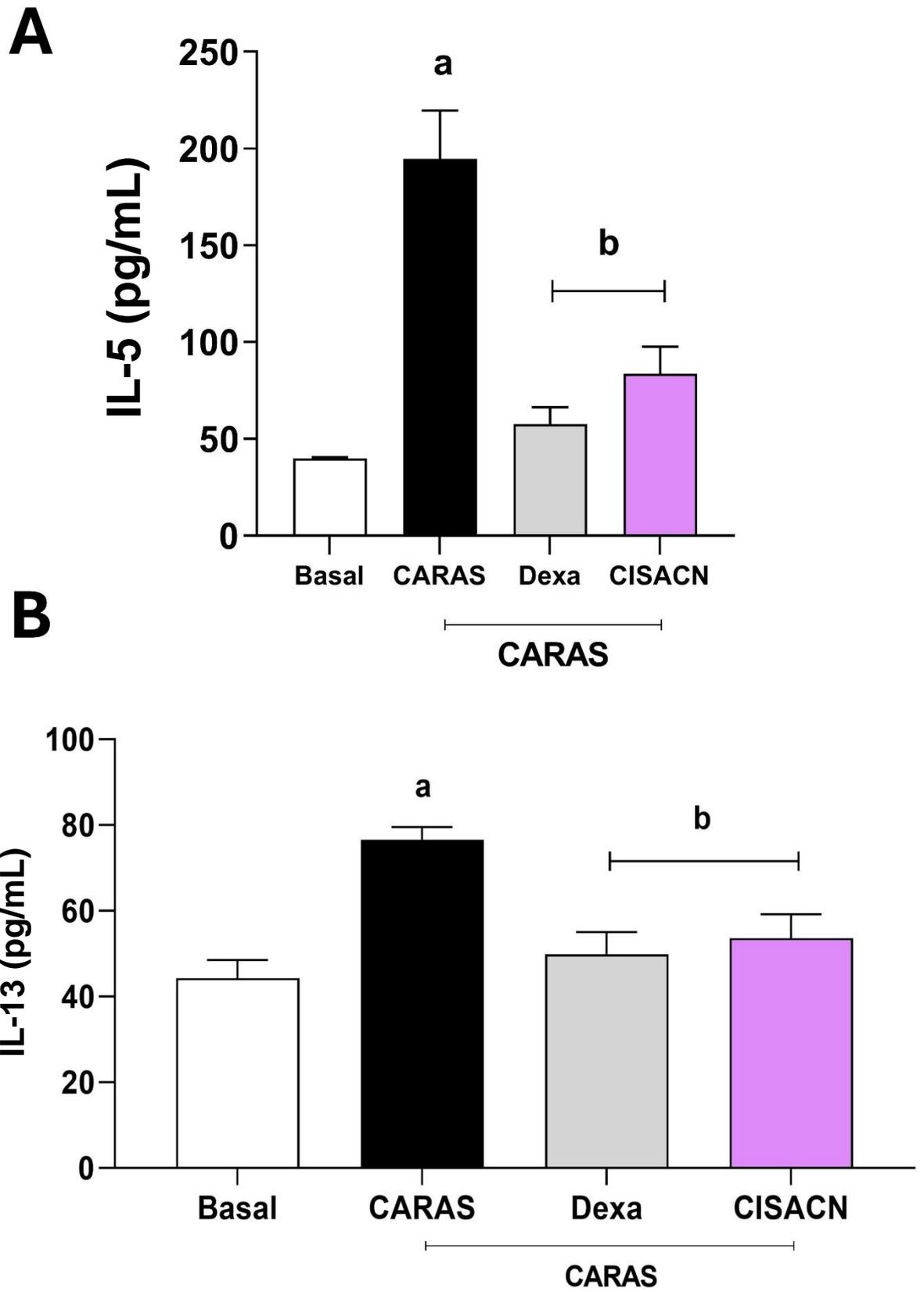
A razão IFN- γ /IL-4 é um indicador relevante na imuno regulação dos perfis de respostas imunes T_H1/T_H2 pois indica a polarização da resposta imune em um processo inflamatório. Os animais do grupo CARAS apresentaram diminuição ($p < 0,001$) na razão IFN- γ /IL-4 no BALF quando comparados com os do grupo Basal

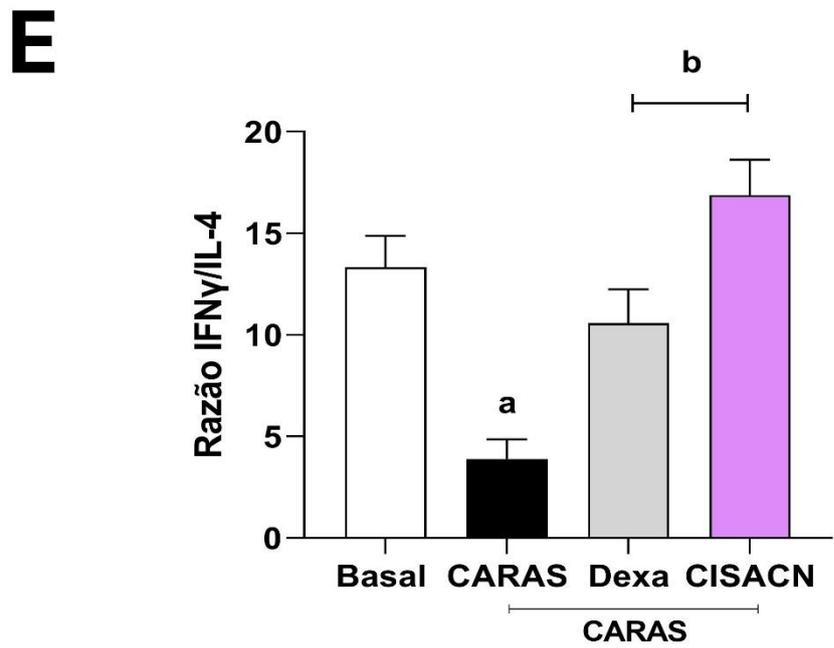
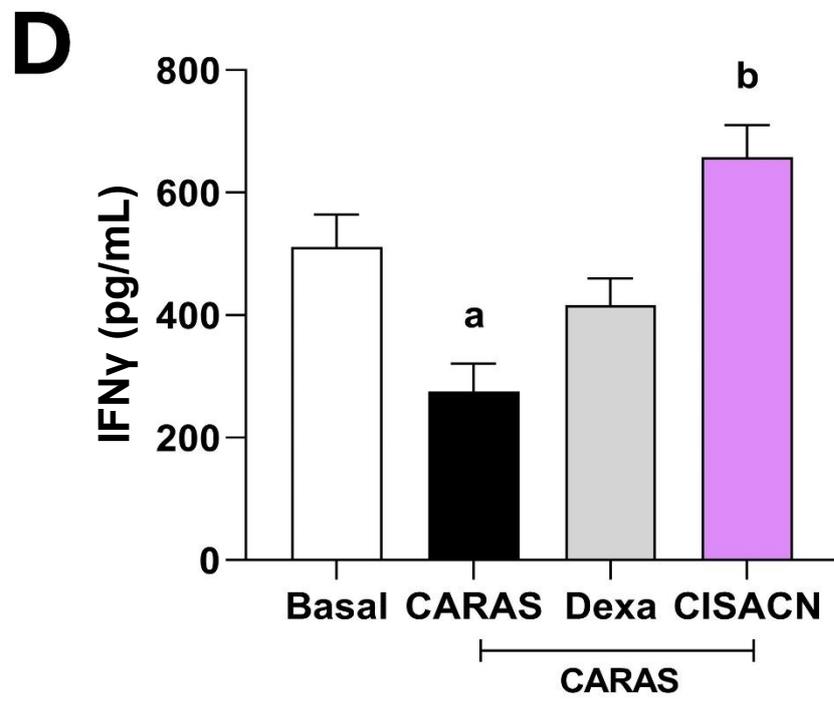
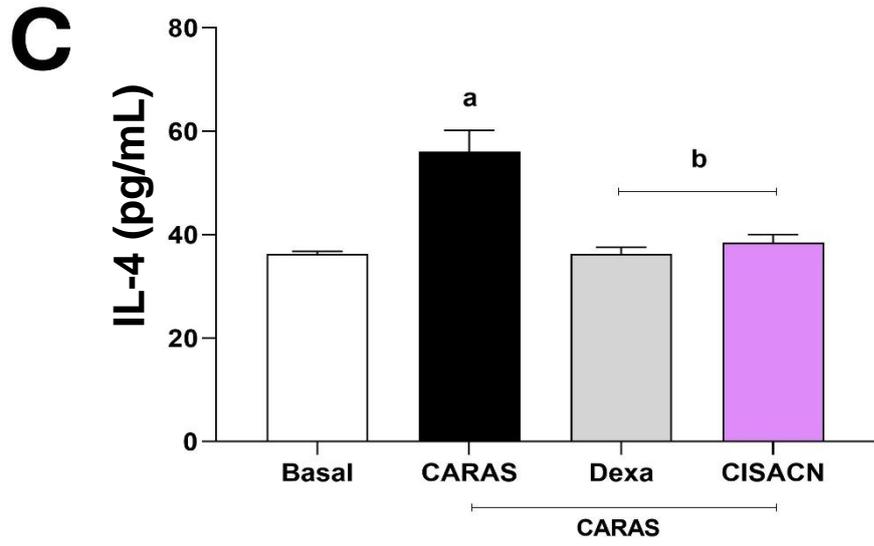
(Figura 12 E). Entretanto, os tratamentos com CISACN ou Dexametasona aumentaram ($p < 0,05$) a razão IFN- γ /IL-4 (Figura 12 E).

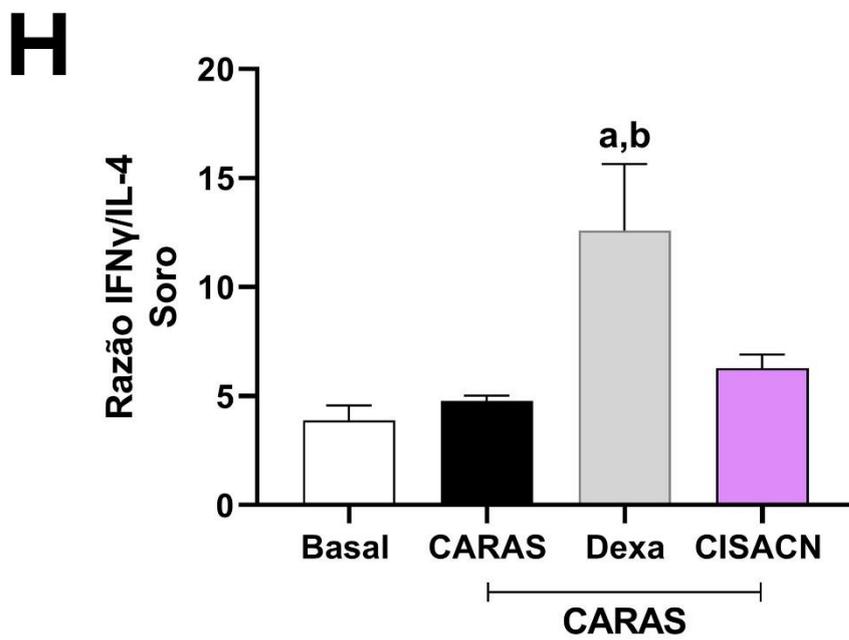
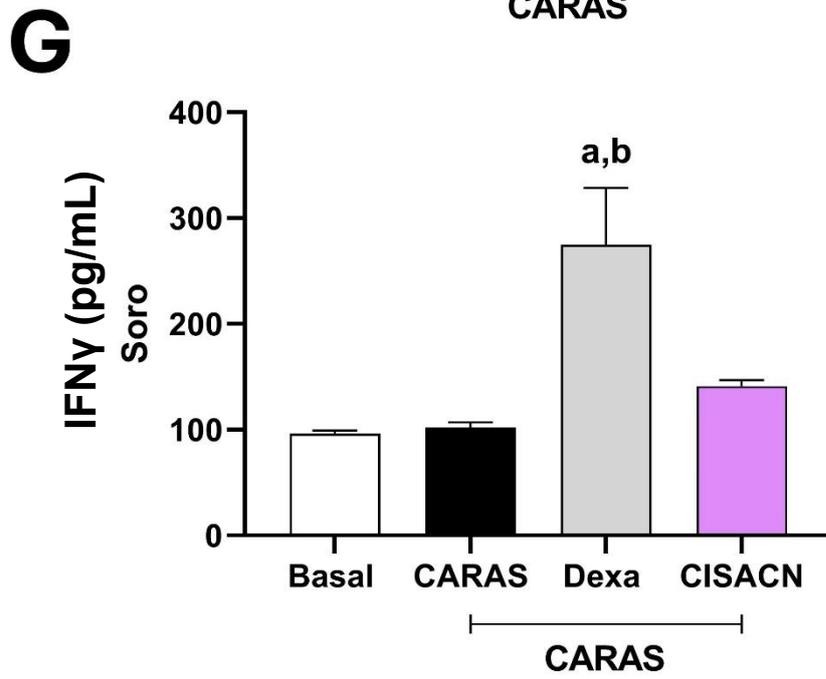
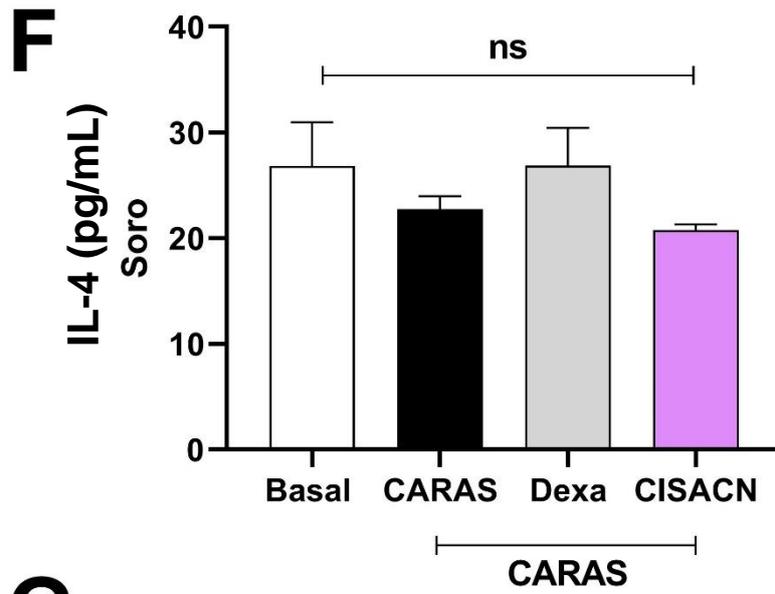
A razão IFN- γ /IL-4 no sangue dos animais dos diferentes grupos, Basal, CARAS e CISACN permaneceu semelhante sem diferenças entre eles. Contudo, o tratamento com Dexametasona aumentou ($p < 0,05$) a razão IFN- γ /IL-4 quando comparado aos grupos Basal e CARAS (Figura 12 F).

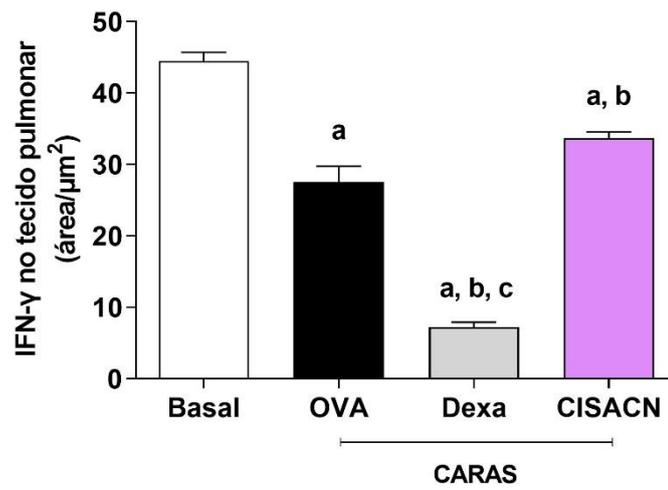
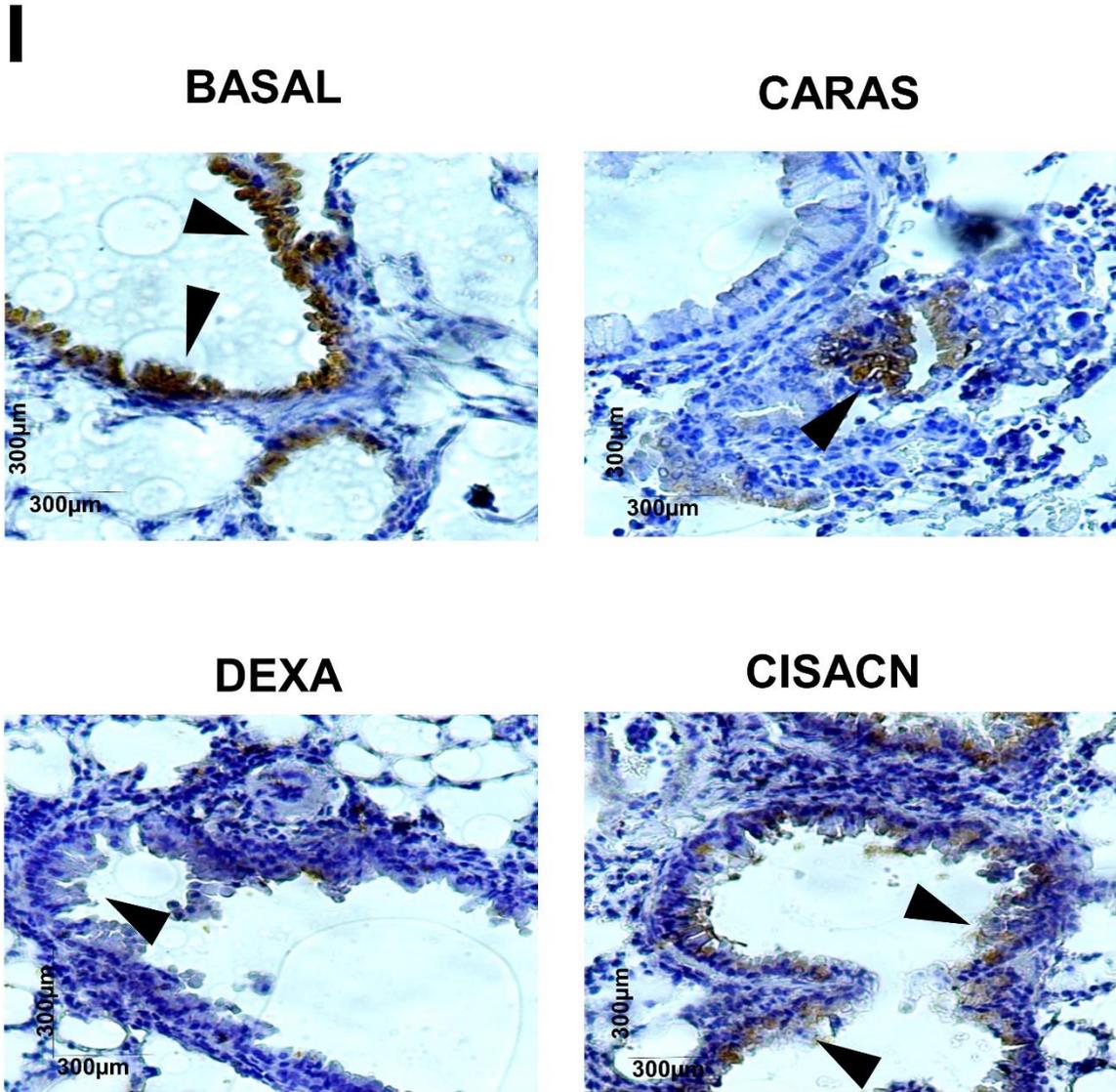
Por fim, a avaliação da concentração de IL-10 no BALF dos animais dos diferentes grupos, mostrou que não houve alteração na sua produção dessa citocina entre os grupos experimentais avaliados (Figura 12 J).

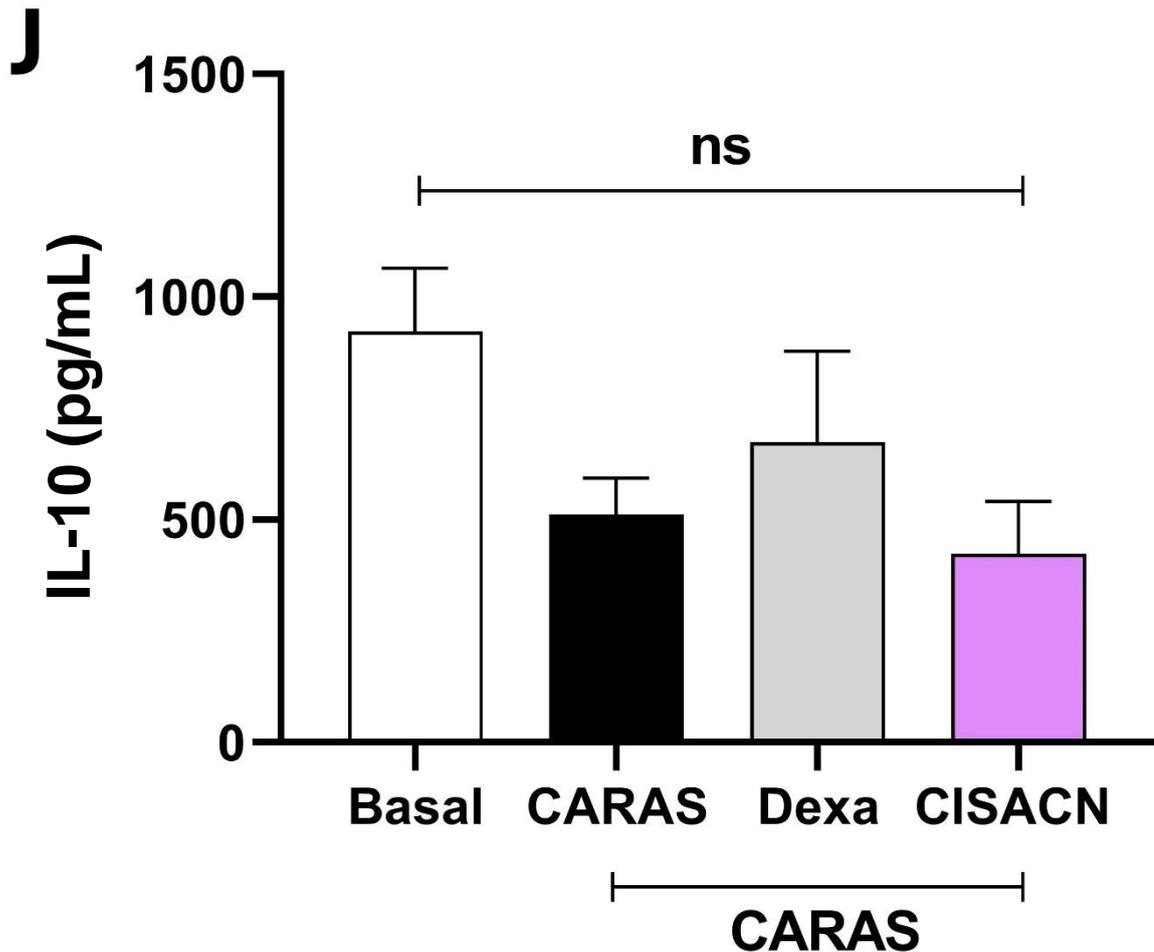
Figura 12. Efeito do tratamento com CISACN na imunorregulação da resposta imune no modelo experimental de CARAS











Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com CISACN (12,5 mg/kg) ou com Dexametasona (2 mg/kg) uma hora antes de cada desafio com OVA. No último dia do protocolo experimental de CARAS foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF), sangue pelo plexo braquial e o tecido pulmonar de todos os animais. Pelo ensaio ELISA foi mensurada a concentração das citocinas (A) IL-5, (B) IL-13, (C) IL-4 no BALF, (D) IFN- γ no BALF, (E) Razão IFN- γ /IL-4 no BALF, (F) IL-4 no soro, (G) IFN- γ no soro, (H) Razão IFN- γ /IL-4 no soro, (I) IFN- γ no tecido pulmonar e (J) IL-10 no BALF. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo Basal e b ($p < 0,05$) em comparação ao grupo CARAS.

5.9. Efeito do tratamento com CISACN na sinalização celular envolvendo a p38 MAPK, ERK 1/2 e NF- κ B em granulócitos do BALF dos animais com CARAS

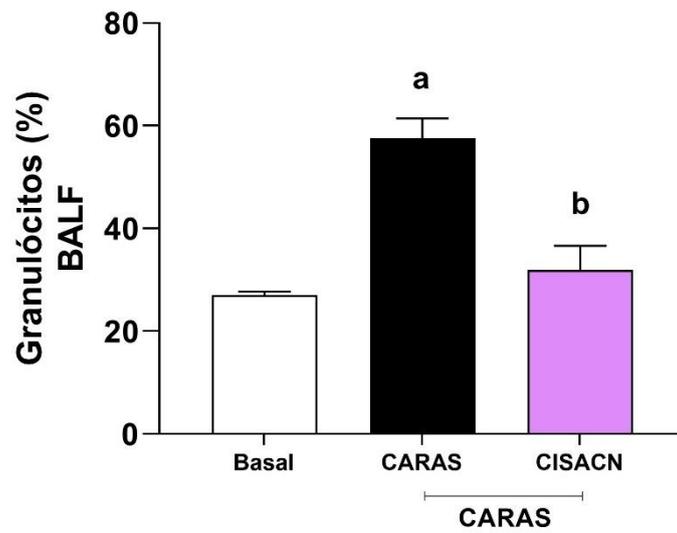
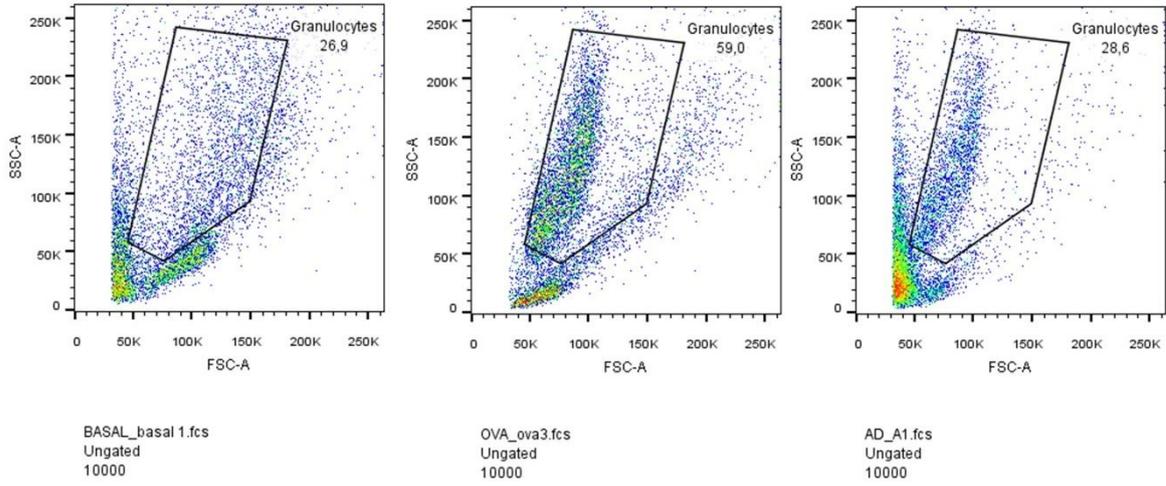
Na análise por citometria de fluxo as populações celulares dos materiais biológicos aqui avaliados são distinguidas por seu tamanho e granularidade citoplasmática. As porcentagens de granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) foram geradas e estão representadas na Figura 13 A.

Os animais do grupo CARAS apresentaram aumento ($p < 0,001$) na porcentagem de granulócitos quando comparados com os animais do grupo Basal. O tratamento com CISACN reduziu ($p < 0,001$) essa população celular, à níveis basais quando comparado com o grupo CARAS (Figura 13 A).

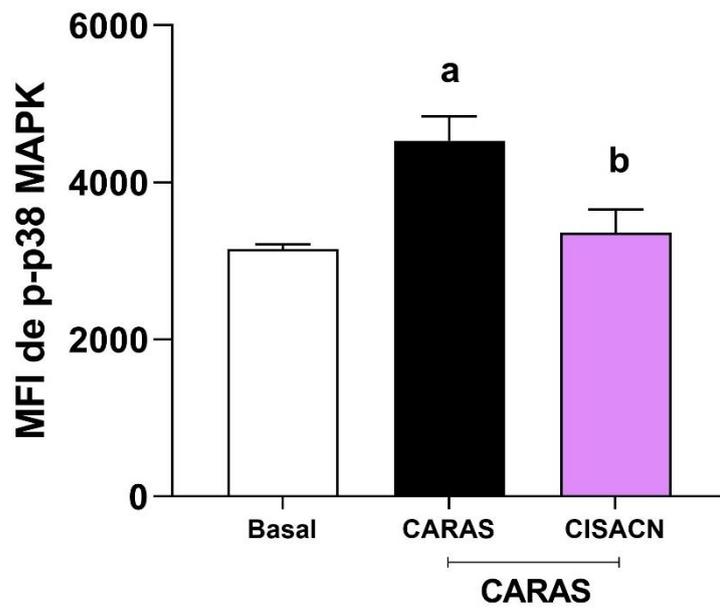
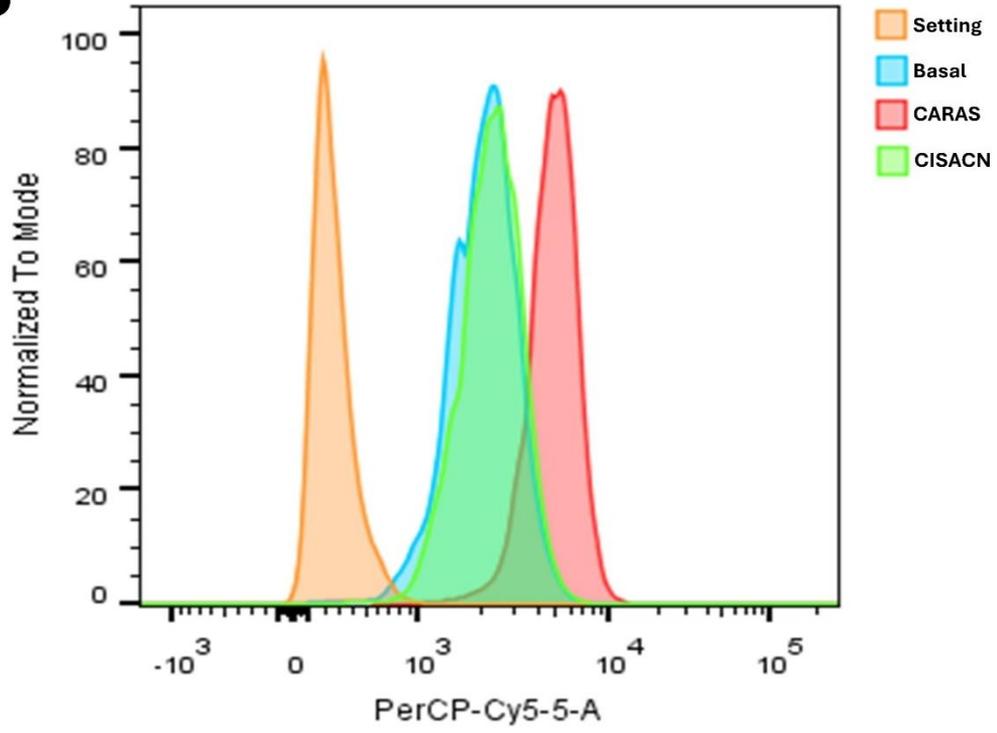
A intensidade de fluorescência celular (MFI) de p-p38, p-ERK1/2 e p-NF- κ B está relacionada à ativação/fosforilação dos granulócitos. Os animais do grupo CARAS apresentaram aumento ($p < 0,05$) de MFI da p-p-38, p-ERK1/2 e p-NF- κ B quando comparados com os do grupo Basal (Figura 13 B, C e D). Contudo, o tratamento com CISACN reduziu o MFI de p-p-38 e de p-NF- κ B sem alterar o MIF de p-ERK1/2 (Figura 13 B, C e D).

Figura 13. Efeito do tratamento com CISACN na sinalização celular de p38 MAPK, ERK 1/2 e NF- κ B e em granulócitos no modelo experimental de CARAS

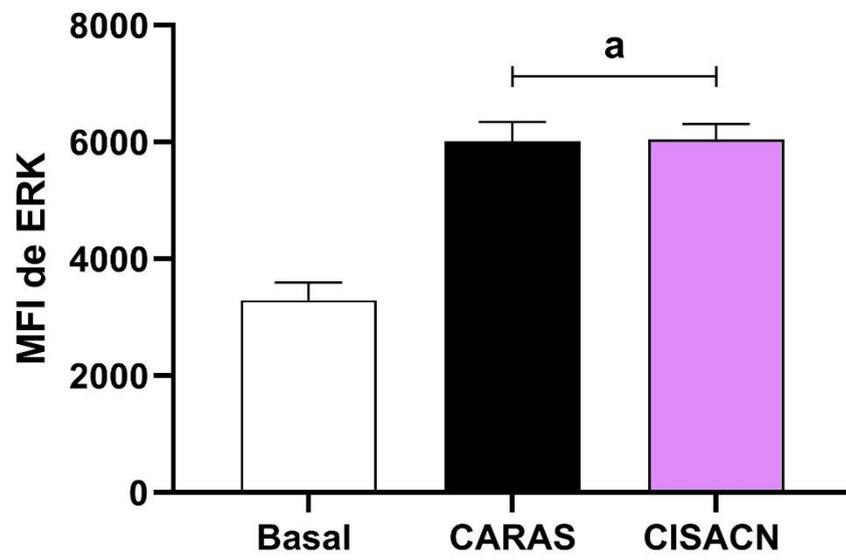
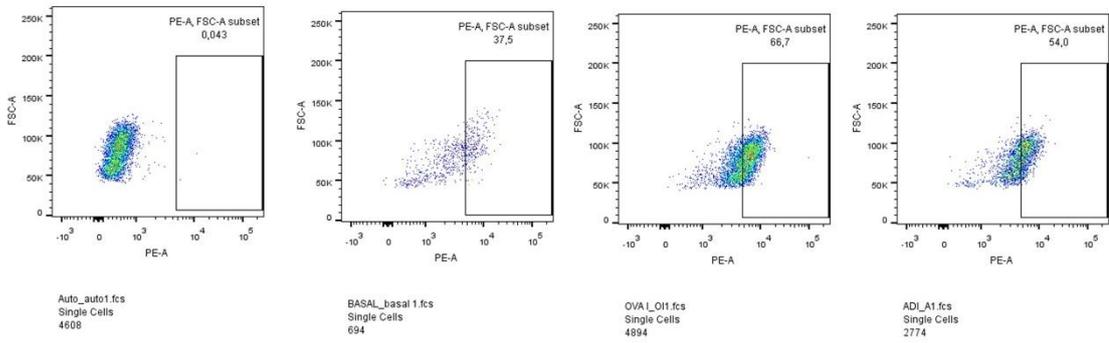
A



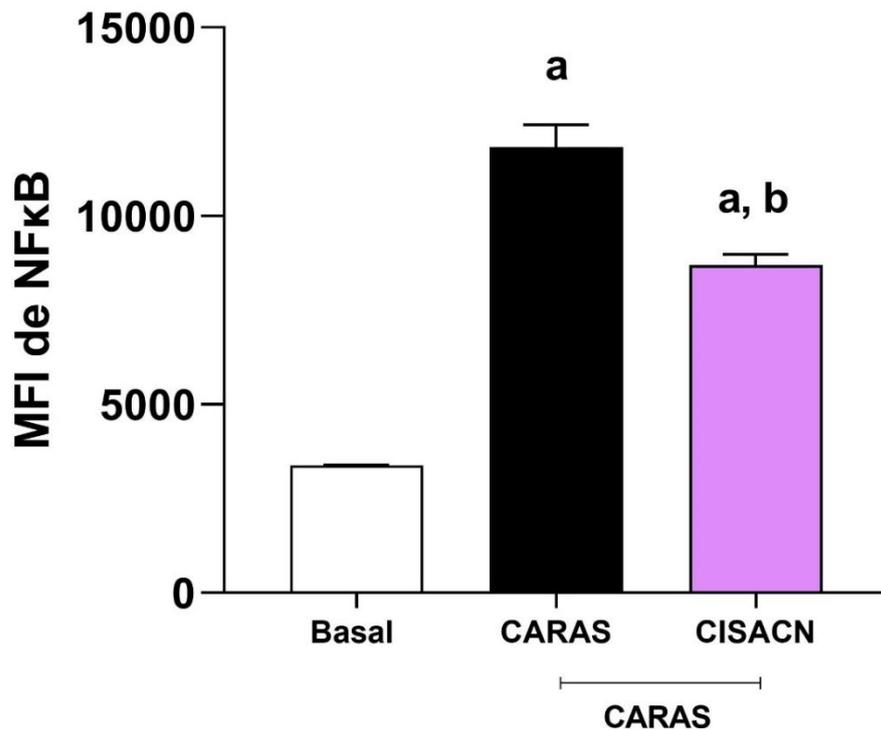
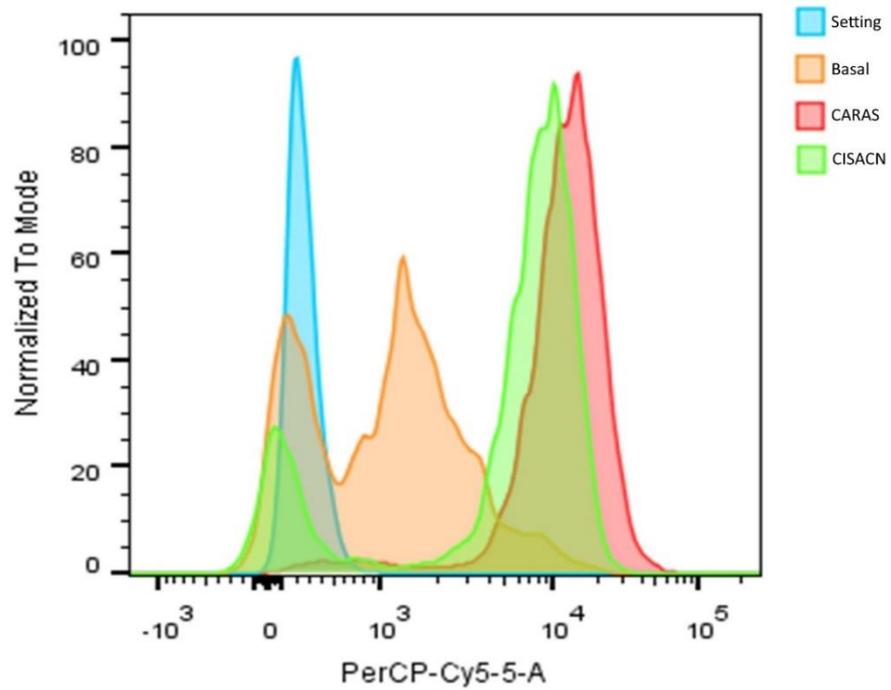
B



C



D



Camundongos BALB/c fêmeas (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados por via oral com CISACN (12,5 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental de CARAS, o lavado broncoalveolar (BALF) foi coletado e utilizado para mensuração de MFI p-38, ERK e NF-κB, além da expressão de granulócitos via citometria de fluxo. Em (A) Granulócitos no BALF; (B) MFI p38MAPK; (C) MFP ERK 1/2 e (D) MFI de NF-κB. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA one-way, seguida pelo teste de Tukey. a ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo Basal e b ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CARAS.

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram os efeitos anti-inflamatório e imunomodulador do tratamento com o aduto CISACN (2-(3-hidroxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il) acrilonitrila) no modelo experimental da síndrome da asma e rinite alérgica combinadas (CARAS), em camundongos da linhagem BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA).

O objeto desse estudo foi o composto CISACN, um aduto oriundo da reação de Morita Baylis Hillman, com rendimento de 95% e tempo de síntese de 90 min. Em estudos não clínicos o aduto apresentou atividades antitumoral e antiparasitária em modelos experimentais envolvendo o *P. falciparum* da malária (LIMA-JUNIOR et al., 2016). Em adição, O CISACN apresentou boa biodisponibilidade oral teórica com DL₅₀ de 5.000 mg/kg (MELO, 2020). Frente a esses resultados preliminares a hipótese deste trabalho foi que o CISACN apresentaria efeitos anti-inflamatório e imunomodulador frente a CARAS experimental. Esses prováveis efeitos seriam observados, após sua administração por via oral em camundongos BALB/c submetidos a um protocolo de sensibilização/desafios com OVA por um período de 42 dias induzindo a CARAS.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os animais com CARAS apresentaram inflamação nas vias aéreas superior e inferior, com a presença majoritária de eosinófilos acompanhados de neutrófilos, em menor número, nos tecidos e fluidos nasal e pulmonar, além de hiperprodução de muco, espessamento da matriz extracelular e da musculatura lisa de ambas as vias aéreas. Foi observado os sinais clínicos característicos da RA, como espirros e fricções nasais, e esses acentuados após concentrações progressivas de histamina por instilação nasal.

Além disso, foram quantificados elevados níveis séricos de IgE Total e IgE OVA-específica, aumento da concentração sistêmica de eosinófilos, bem como altos níveis de TSLP, IL-33, IL-17, TNF- α , TGF- β , IL-4, IL-5 e IL-13 no fluido do lavado broncoalveolar (BALF) diretamente relacionados com diminuição da produção de IFN- γ a nível tecidual pulmonar, além da ativação das vias de sinalização p-p38 MAPK e p-NF- κ B, independente de p-ERK1/2 MAPK. Esses dados demonstram, portanto, que os animais com CARAS desenvolveram resposta imune tipo 2 nas vias aéreas a partir da exposição do alérgeno OVA. O tratamento desses animais com

CISACN apresentaram melhoras significativas em todos os parâmetros inflamatórios acima mencionados.

Estudos envolvendo moléculas oriundas da reação de Morita Baylis Hillman no processo inflamatório da CARAS inexistem até o momento, como também, trabalhos utilizando adutos e modelos experimentais de asma e RA, separadamente, não são descritos. Portanto, o presente estudo é pioneiro no Brasil e no mundo na busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da CARAS, utilizando como tratamento o aduto sintético CISACN.

Inicialmente, levantou-se a hipótese da atividade anti-inflamatória do CISACN na inflamação crônica da RA e asma, presentes nas vias aéreas superior e inferior, de forma concomitante. A inflamação tecidual das vias aéreas característica na CARAS está intimamente relacionada à migração de células inflamatórias circulantes para os tecidos, portanto, quantificamos os leucócitos nos lavados nasal (NALF) e BALF dos animais com CARAS e os animais com CARAS tratados com CISACN nas doses de 6,25; 12,5 e 25 mg/kg.

Cabe salientar que as doses escolhidas nesse trabalho estão embasadas em um estudo que utilizou o aduto de Morita Baylis Hillman ISACN em modelo experimental de lesão pulmonar aguda (DA SILVA et al., 2023). Entretanto, somente as doses de 12,5 e 25 mg/kg reduziram a migração celular para as vias aéreas sem que observássemos diferenças significantes entre elas e, portanto, a dose de 12,5 mg/kg foi escolhida para dar prosseguimento ao presente estudo do potencial farmacológico do CISACN no modelo murino de CARAS.

Dentre os leucócitos que migram para os tecidos das vias aéreas em processos alérgicos, os eosinófilos são as células majoritárias. Essas células exercem um papel fundamental na manutenção do processo inflamatório tecidual, mediante a liberação de proteínas e mediadores eosinofílicos que participam da destruição epitelial e remodelamento tecidual. Os mediadores inflamatórios dos eosinófilos produzidos pela ativação das vias de sinalização intracelulares envolvendo as MAPK (p38 e ERK1/2) e enzimas tais como a cicloxigenase e lipooxigenase intensificam a hiperatividade brônquica (HRB) característica da asma (DAI et al., 2022)

Os mediadores eosinofílicos que atuam na intensificação da inflamação crônica das vias aéreas são as prostaglandinas, os leucotrienos, as enzimas catiônicas eosinofílicas (ECP), a proteína básica principal (MBP) e as citocinas pró-inflamatórias. Estes mediadores promovem a proliferação e ativação de células

teciduais como os mastócitos e intensificam o dano epitelial (WECHSLER et al., 2021). Os leucotrienos atuam no espessamento da camada de músculo liso brônquico e fibrose subepitelial. As proteínas granulares específicas de eosinófilos, principalmente a MBP e a ECP são tóxicas para o epitélio das vias aéreas e amplificam a produção de TGF- β pelas células epiteliais (LOMBARDI; BERTI; COTTINI, 2022).

O TGF- β , produzido tanto por células epiteliais quanto por eosinófilos desempenha um papel chave no remodelamento tecidual das vias aéreas, acarretando o espessamento da matriz extracelular (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). Os eosinófilos também produzem IL-13, essencial nos processos de hiperprodução de muco, fibrose subepitelial e HRB (GOUR; WILLS-KARP, 2015). Dentro desse contexto, moléculas que apresentam a capacidade de diminuir o processo de migração eosinofílica para os tecidos das vias aéreas são promissoras em regular o processo inflamatório mediado por elas.

No presente estudo observamos que o tratamento com CISACN reduziu o número de eosinófilos nas vias aéreas superior e inferior analisadas tanto no NALF como BALF e no tecido pulmonar. Esse resultado demonstrou o possível efeito anti-inflamatório local do CISACN nos animais com CARAS, o que nos impulsionou em dar continuidade aos estudos.

São parâmetros inflamatórios presentes na CARAS: a hiperplasia e a hipertrofia das células caliciformes produtoras de muco, a hiperprodução de muco, como também remodelamento tecidual, com espessamento da matriz extracelular e consequente deposição de colágeno tecidual (LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019). Nosso estudo demonstrou que os animais com CARAS apresentaram alto índice de muco nas vias aéreas, espessamento da matriz extracelular e da camada muscular lisa brônquica, contudo, o tratamento com o CISACN reduziu esses parâmetros histopatológicos, corroborando com o potencial efeito anti-inflamatório do CISACN descrito acima.

Na análise dos sinais clínicos da RA, ou seja, na quantificação de espirros e fricção nasal, desencadeados pela exposição ao alérgeno OVA e mensurados após o último desafio semanal (dias 23, 30 e 37 do protocolo de CARAS) nos foi possível identificar que, a partir da primeira semana de desafio com a OVA, os animais com CARAS apresentaram os sinais da RA. Resultado esse esperado, pois corroboram com dados observados em outros estudos de CARAS experimental (CAVALCANTI et al., 2020; GADELHA et al., 2021).

No presente trabalho foi observado que os animais tratados com CISACN, uma hora antes de cada desafio com OVA, apresentaram redução dos sinais clínicos a partir da segunda semana de tratamento. A redução no número de espirros e fricção nasal em resposta ao tratamento infere uma redução nas crises alérgicas e controle da RA. Nossos achados inferem que o CISACN provavelmente possa inibir mediadores inflamatórios que atuam a nível epitelial e fibras nervosas sensoriais periféricas responsáveis em parte pela produção dos sinais clínicos da RA.

A hiper-reatividade das vias aéreas superior e inferior é uma característica importante na patogênese da CARAS experimental pois leva a diminuição da captação de oxigênio pelas vias aéreas (PAIVA FERREIRA et al., 2021). No presente trabalho, os animais com CARAS apresentaram hiper-reatividade nasal frente ao desafio intranasal com histamina exógena, a partir da menor concentração instilada (10nmol).

O contato constante com o alérgeno induz um processo inflamatório alérgico tecidual com liberação de histamina oriunda da ativação de mastócitos que lesiona o epitélio respiratório e, conseqüentemente, exposição das fibras nervosas responsáveis pelos espirros e fricção nasal (NGUYEN et al., 2022). Dessa forma, em um epitélio não íntegro, a menor concentração de histamina provoca o desencadeamento dos sinais clínicos da RA. O tratamento com CISACN foi capaz de diminuir a hiper-reatividade nasal, provavelmente por manter o epitélio íntegro, e conseqüentemente controlar os sinais clínicos da RA, mesmo com a constante exposição ao alérgeno.

Em adição, estudos vem demonstrando que o TNF- α presente nas vias áreas é, em parte, responsável pelo processo de destruição do epitélio respiratório, pois promove e sustenta a inflamação tecidual (CAVALCANTI et al., 2024; JIANG et al., 2023). Nossos resultados inferem uma possível correlação entre o aumento dos níveis de TNF- α no BALF de animais com CARAS e o aumento da hiper-reatividade nasal à histamina, inflamação do tecido nasal com destruição epitelial e aumento dos sinais clínicos da RA. Portanto, o controle dos espirros e fricção nasal decorrentes do tratamento com o CISACN pode ter como mecanismo de ação, pelo menos em parte, a redução dos níveis de TNF- α com conseqüente manutenção da integridade epitelial das vias aéreas.

A hiper-reatividade da via aérea inferior, em modelos murinos de CARAS, pode ser mensurada pelo desafio com o broncoconstritor metacolina; ou a partir da

quantificação do espessamento das fibras musculares lisas bronquiolares e/ou do aumento dos níveis da alfa actina do músculo liso (α -SMA) (CAVALCANTI et al., 2024; LI et al., 2015, 2018). No modelo experimental de CARAS utilizado nesse trabalho foi possível demonstrar que os desafios sucessivos com a OVA promoveram um aumento da camada de músculo liso brônquico e que o tratamento com CISACN foi capaz de diminuir tal espessamento da camada muscular lisa, com provável diminuição da HRB.

No processo de remodelamento tecidual das vias aéreas, estudos demonstram que o TGF- β está intimamente relacionado nesse processo, pois induz o espessamento da matriz extracelular e consequente deposição de fibras colágenas e fibrose tecidual (BRANCHETT; LLOYD, 2019; MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). No presente estudo, observamos que os animais com CARAS apresentaram um aumento dos níveis de TGF- β no BALF, espessamento da matriz extracelular nos tecidos nasal e pulmonar com remodelamento tecidual, entretanto, os animais com CARAS e tratados com CISACN apresentaram redução de todos esses parâmetros.

Dando prosseguimento aos estudos, avaliamos a produção de um dos biomarcadores essenciais e importantes nas alergias, a IgE-alérgeno específica (CASALE, 2017). A concentração aumentada dessa imunoglobulina no sangue de indivíduos alérgicos é um parâmetro a ser considerado nos protocolos de tratamento. Essas moléculas, além de serem detectadas no sangue, estão ligadas, via receptores específicos, em mastócitos teciduais e basófilos séricos e são responsáveis pelo mecanismo de degranulação celular após ligação com o alérgeno. A degranulação promove a liberação de mediadores pré-formados, como a histamina e neoformados como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas que danificam o epitélio das vias aéreas (JIN et al., 2023; NAVINÉS-FERRER et al., 2016; PALOMARES et al., 2017).

Neste trabalho foi possível quantificar os níveis séricos de IgE Total e IgE OVA-específica nos animais com CARAS, estes foram sensibilizados e desafiados com o alérgeno OVA. Entretanto, não foi possível quantificar os níveis séricos de IgE OVA-específica nos animais do grupo Basal, estes não foram sensibilizados nem desafiados com OVA. Nossos achados inferem que o alérgeno (OVA) é essencial para o desenvolvimento da resposta imune tipo 2, característico da CARAS.

Entre nossos achados, observamos que o tratamento com o CISACN diminuiu os níveis desse biomarcador indicando uma atividade imunomoduladora. Esses

dados assinalam que o mecanismo antialérgico do CISACN na CARAS experimental ocorre, em parte, via a supressão da produção de IgE alérgeno específica, pois a ausência do complexo mastócito/basófilo-IgE alérgeno específica é suficiente para impedir o processo de degranulação celular e, portanto, a não liberação de mediadores responsáveis pela agressão tecidual, o que resulta na inibição de alguns sinais clínicos característicos, tanto da RA como da asma (WERNERSSON; PEJLER, 2014).

A resposta imune tipo 2 coordena todo o processo fisiopatológico da CARAS, desde sua instalação, exacerbações clínicas e manutenção do processo inflamatório crônico. A modulação desta resposta imune decorre da ação de seus biomarcadores, tais como as citocinas produzidas por células T_H2 : IL-4, IL-13 e IL-5; as citocinas produzidas por células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2), tais com IL-5 e IL-13; as citocinas produzidas por células epiteliais, tais como IL-33 e TSLP, bem como a produção de IgE alérgeno específica pelos plasmócitos e a presença de eosinófilos nos tecidos das vias aéreas (LI et al., 2015; PIAO et al., 2023).

O desencadeamento dessa resposta imune em indivíduos alérgicos se dá via contato com o alérgeno, pelas vias áreas que, por sua vez, estimulam as células epiteliais a liberarem algumas alarminas entre elas a IL-33 e o TSLP, as quais ativam as células dendríticas, que fagocitam o alérgeno, e migram para o linfonodo de drenagem onde realizam o processo de apresentação do alérgeno às células T *naive* (T_H0), que serão polarizadas para as T_H2 , produtoras das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Logo, essas alarminas são responsáveis por iniciar o processo de resposta imune tipo 2 (GOUR; WILLS-KARP, 2015; NUR HUSNA et al., 2022; WANG; SECOMBES, 2015).

Nesse contexto, tem sido descrito que o receptor de IL-33, presente principalmente nas ILC2 das vias aéreas, induz a produção das citocinas do perfil T_H2 (IL-5 e IL-13) via ativação da cascata de sinalização intracelular que culmina na ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 (KUBO, 2017). Em adição, estudos demonstraram que as proteases de alérgenos induzem o aumento de IL-33 a partir do receptor 2 ativado por protease (PAR-2) acoplado a proteína G nas células epiteliais, que promove ativação das vias das MAPK e do fator de transcrição NF- κ B e, por sua vez, a produção da alarmina IL-33 (GOON GOH et al., 2008).

No presente estudo, observamos que os animais com CARAS apresentaram altos níveis das alarminas TSLP e IL-33 no BALF. Entretanto, os animais com CARAS e tratados com CISACN demonstraram uma redução dos níveis de IL-33 e

de TSLP. Esses achados indicam que o CISACN pode interferir na fase inicial do processo de sensibilização com o alérgeno OVA no modelo experimental de CARAS e que, em parte, este aduto atua regulando a indução/manutenção da resposta imune tipo 2.

A IL-17 é uma citocina com papel chave no processo inflamatório tecidual das vias áreas acometidas com CARAS. Esta citocina é fundamental e clássica das células T_H17 bem como para a manutenção desse perfil de resposta imune, além de também ser produzida por eosinófilos presentes no tecido inflamado (GURTNER; CREPAZ; ARNOLD, 2023). A IL-17 é quimio-atraente de neutrófilos, granulócito de caráter inflamatório, que migram para as cavidades das vias aéreas e potencializam o processo inflamatório e destrutivo na CARAS conduzido pelos eosinófilos (GUERRA et al., 2017).

Em nosso trabalho os animais com CARAS apresentaram um aumento de neutrófilos em ambas as cavidades (nasal e pulmonar), evento correlacionado com o aumento nos níveis de IL-17 no BALF desses animais. Contudo, observamos que o tratamento com o CISACN diminuiu a produção de IL-17 com redução do número de neutrófilos para as cavidades das vias aéreas superior e inferior dos animais com CARAS. Portanto, podemos inferir que a redução na produção de IL-17 pelo CISACN estar diretamente relacionada à diminuição de migração de neutrófilos, atenuando a resposta inflamatória na CARAS. Ademais, a redução dos níveis de IL-17 pode estar relacionada, pelo menos em parte, a redução da eosinofilia para as vias aéreas, já que os eosinófilos são uma fonte importante dessa citocina na CARAS.

A hiperprodução de muco pelas vias áreas é uma característica essencial na CARAS, configurando-se como um dos principais sinais e sintomas nas doenças alérgicas do trato respiratório. A IL-13 é uma das citocinas intimamente envolvida na hiperprodução de muco, além de ser um biomarcador da resposta imune tipo 2 (T_H2). A IL-13 é produzida, na fase inicial da resposta imune tipo 2, por ILC2, logo, níveis elevados dessa citocina nos fluidos e tecidos nasal e pulmonar se correlacionam com aumento na produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas (NUR HUSNA et al., 2022).

A IL-13 induz a expressão gênica de algumas proteínas nas células epiteliais, tais como a Muc5ac e periostina, que resulta na metaplasia das células caliciformes, aumento da produção de muco e consequente obstrução das vias aéreas e HRB. A IL-13 aumenta a sensibilidade do músculo liso a vários agonistas contráteis, como a

acetilcolina, histamina e leucotrienos. Além de promover o aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina e a liberação de cálcio, que culmina na contração do músculo liso brônquico. Em adição, a IL-13 em associação com o TGF- β , induz a deposição de colágeno o que leva, por sua vez, ao aumento da matriz extracelular via a produção de arginase I, poliaminas e prolina em macrófagos do tipo 2 (DEVOS et al., 2017; JUNTILA, 2018; WANG; SECOMBES, 2015).

No presente estudo foi demonstrado que animais com CARAS apresentaram elevados níveis de IL-13 no BALF, associados ao aumento da produção de muco nos tecidos nasal e pulmonar. O tratamento com o CISACN, por sua vez, reduziu os níveis de IL-13 e a concentração de muco nas vias aéreas. Esses dados e os descritos acima inferem o papel imunomodulador do CISACN na resposta imune tipo 2 na CARAS experimental. Em adição, a IL-4, outra citocina do perfil T_{H2}, apresentou elevados níveis no BALF de animais com CARAS, já o tratamento com o CISACN promoveu redução de IL-4, sendo, portanto, indicativo de que, tanto as células T_{H2} produtora de ambas as citocinas, IL-4 e IL-13, bem como as ILC2 estão sendo moduladas negativamente pelo aduto.

Ambas as citocinas T_{H2} (IL-4 e IL13) exercem papel fundamental em linfócitos B via a ligação com seu receptor tipo I (IL-4R α / γ c), induzindo a produção de IgE/IgG1 alérgenos específicos e sua diferenciação em plasmócitos. Enquanto em células endoteliais induzem a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1), fenômeno que permite a migração e instalação de eosinófilos/neutrófilos nas vias aéreas inflamadas (LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019).

A IL-4 possui ainda um papel essencial na polarização de células T_{H0} para células T_{H2}, a nível de linfonodo de drenagem, durante o processo de apresentação alérgica por células dendríticas. O processo intracelular que determina a polarização da célula se deve à ativação de vias de sinalização do STAT-6 e do fator de transcrição GATA-3, responsáveis pela indução gênica das citocinas clássicas do perfil imune T_{H2} (IL-4, IL-13 e IL-5) (GOUR; WILLS-KARP, 2015). Dessa forma, a modulação negativa nos níveis de IL-4 e IL-13 de animais com CARAS tratados com o CISACN, provoca a diminuição na produção de IgE OVA-específica, o que confere ao CISACN o efeito antialérgico e imunomodulador.

Outra hipótese levantada no presente estudo foi que o CISACN reverteria o quadro inflamatório crônico asmático e os sinais clínicos da RA no modelo de CARAS induzido por OVA via o desvio de resposta imune do tipo 2 (perfil T_{H2}) para

o de resposta imune do tipo 1 (perfil T_H1) com a produção de IFN- γ , citocina que antagoniza a produção de IL-4 pelas células T_H2 (KAK; RAZA; TIWARI, 2018).

A resposta alérgica presente na CARAS se baseia no desvio da resposta imune tipo 1 para o tipo 2 (T_H1/T_H2), cujo biomarcadores de T_H2 estão elevados e os biomarcadores T_H1 estão diminuídos (LI et al., 2016). A balança T_H1/T_H2 está relacionada à razão entre as duas citocinas IFN- γ /IL-4. O IFN- γ , produzido por T_H1 , induz a manutenção da polarização desse perfil e inibe a produção de IL-4. Já a IL-4 tem o efeito oposto ao do IFN- γ (LI et al., 2015). Estudos demonstraram que animais com CARAS apresentaram uma preponderância T_H2/T_H1 a partir de níveis elevados de IL-4 tanto localmente (fluidos dos lavados nasal e pulmonar), como a nível sistêmico no soro (FENG et al., 2023; LI et al., 2016, 2018).

No presente estudo o tratamento oral com o CISACN dos animais com CARAS induziu a produção do IFN- γ com a redução da IL-4. A redução dos níveis de IL-4 se correlaciona com a redução das demais citocinas associadas ao perfil de resposta imune tipo 2, tais como: IL-33, TSLP, IL-13, IL-5 e TGF- β . Em adição, foi possível demonstrar que, nos animais com CARAS tratados com o CISACN, a razão IFN- γ /IL-4 estava aumentada de forma significativa indicando que o balanço da resposta imune nesses animais estava direcionado para o perfil T_H1 ao invés do perfil T_H2 . Assim, nossos resultados demonstram de forma concisa que a administração do CISACN, em animais submetidos ao protocolo experimental de CARAS, apresenta uma resposta imune T_H1 protetiva, ao invés de uma resposta imune T_H2 inflamatória.

Moléculas que apresentam um potencial efeito imunomodulador do perfil de resposta imune tipo 2 (T_H2) conduzindo um desvio para a resposta imune tipo 1 (T_H1) nas doenças alérgicas como a CARAS são de grande interesse nos estudos farmacológicos pré-clínicos. Uma vez que estimulando a produção de IFN- γ e consequentemente a inibição de IL-4, poderá contribuir para um processo que atenuará as exacerbações clínicas relacionadas às alergias. Nesse sentido, o CISACN demonstrou ser uma possível ferramenta farmacológica para o tratamento futuro das afecções alérgicas do trato respiratório.

Dando prosseguimento as análises do presente trabalho, observamos que os animais com CARAS e tratados com o CISACN apresentaram diminuição na produção de IL-5, citocina que estimula a eosinopoiese a nível de medula óssea (TAKATSU; NAKAJIMA, 2008). Essa citocina, uma vez produzida em excesso por ILC2 presente no tecido das vias aéreas, exerce seu papel no processo de

quimiotaxia e viabilidade de eosinófilos nos indivíduos alérgicos. Tem sido demonstrado níveis elevados de RNAm de IL-5 nos fluidos e tecidos nasal e pulmonar de animais com CARAS (DAI et al., 2022; TANG et al., 2019).

Em modelos experimentais de CARAS têm sido demonstrados a correlação entre a diminuição de eosinófilos nas vias áreas inferiores e o decréscimo nos níveis de IL-5 (CAVALCANTI et al., 2020; GADELHA et al., 2021; LI et al., 2015). Em adição, a IL-5 promove a proliferação e degranulação de eosinófilos uma vez que se liga ao receptor IL-5R α e promove a ativação das MAPKs, p38 e ERK1/2 (TAKATSU; NAKAJIMA, 2008). Portanto, ambas as MAPKs são importantes para ativação de eosinófilos com liberação de mediadores inflamatórios tais como as citocinas inflamatórias que atuam na inflamação crônica das vias áreas na CARAS (CAVALCANTI et al., 2023; KHORASANIZADEH et al., 2017).

De acordo com os nossos achados, podemos inferir, nesse contexto, que o CISACN é uma molécula capaz de proteger os tecidos das vias aéreas por inibir a produção de citocinas inflamatórias bem como a migração de eosinófilos para as cavidades nasal e pulmonar. Essas ações estão intrinsicamente relacionadas ao papel imunomodulador do CISACN sobre IL-5, uma vez que essa citocina exerce um papel central na eosinofilia tecidual das vias aéreas acometidas com CARAS.

As principais vias de transdução de sinal intracelulares que culminam na transcrição de citocinas do perfil T_H2 e mediadores inflamatórios nas células do sistema imune, como nos eosinófilos, são as vias da MAPK, em particular a p-38 MAPK e do fator nuclear NF- κ B (WANG et al., 2016). Estudos demonstraram que os tecidos e fluidos nasais e pulmonar de animais com CARAS apresentaram aumento da fosforilação da p-38MAPK e do p65-NF- κ B. Esses achados indicam uma ativação de ambas as vias de sinalização intracelulares no processo inflamatório das vias áreas acometidas com CARAS (BEZERRA BARROS et al., 2020; CONG; FENG; TANG, 2023; FENG et al., 2023).

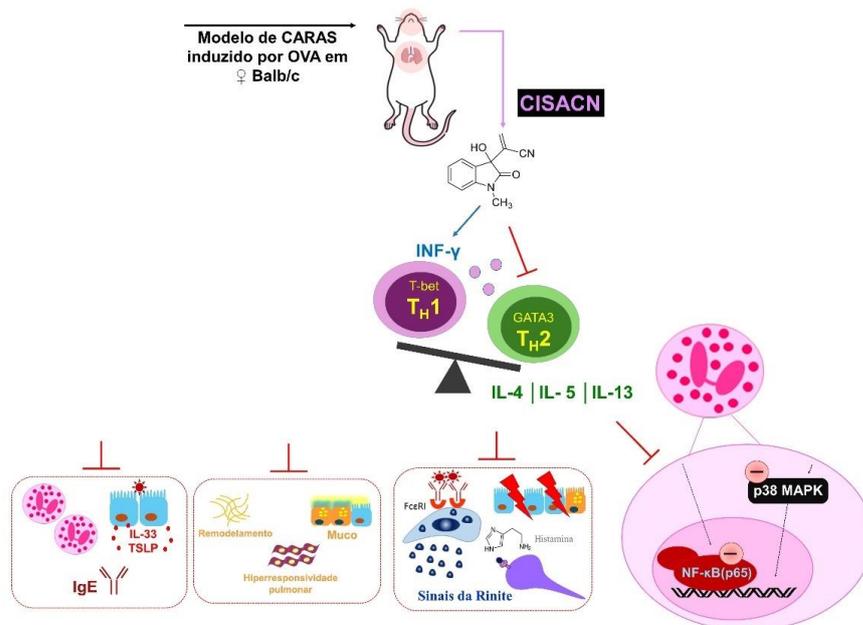
Neste trabalho, demonstramos que a população de granulócitos, majoritariamente eosinófilos, do BALF de animais com CARAS, apresentou aumento da fosforilação da p-38MAPK e do p65-NF- κ B. Todavia, o tratamento com o CISACN reduziu a fosforilação desses fatores intracelulares. Desse modo, de acordo com esses dados sugerimos que o CISACN tem efeito anti-inflamatório nas vias áreas, sustentada, em parte, pelos eosinófilos, devido à redução na ativação das vias de transdução de sinal inflamatórias p-38MAPK e p-NF- κ B eosinofílicas.

Portanto, o conjunto de resultados obtidos nesse estudo suporta a hipótese de que o CISACN apresenta atividades anti-inflamatória e imunomoduladora no modelo experimental de CARAS, e que pode ser um candidato a futuros ensaios clínicos na busca por alternativas terapêuticas no tratamento de quadros alérgicos respiratórios. No entanto, futuros estudos deverão esclarecer e compreender os mecanismos de ação do CISACN, bem como estudos farmacotécnicos deverão ser realizados a fim de se obter formulações farmacêuticas seguras para futuros ensaios clínicos.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou os efeitos anti-inflamatório e imunomodulador do aduto CISACN no modelo experimental de CARAS. O tratamento com o CISACN em animais com CARAS inibiu a produção das citocinas do perfil de resposta imune tipo 2 (T_H2) dependente da produção de IFN- γ do perfil de resposta imune do tipo 1 (T_H1) no ambiente das vias aéreas. O CISACN inibiu o processo de sensibilização por ovalbumina nos camundongos da linhagem BALB/c por inibir a produção das citocinas IL-33, TLSP, TNF- α , TGF- β , IL-13, IL-4 e IL-5, que estão diretamente relacionadas com a polarização da resposta imune tipo 2 alérgica. Em adição, inibiu a produção da IL-4 que, em associação com a IL-13, são responsáveis pela produção da IgE-OVA específica. Esses dados demonstram claramente o efeito imunomodulador do aduto na CARAS experimental, o qual corrobora com o efeito anti-inflamatório pois o CISACN diminuiu a migração de eosinófilos e neutrófilos para as vias aéreas, manteve a integridade epitelial e da musculatura lisa com atenuação dos sinais clínicos da rinite alérgica. Um dos possíveis mecanismos de ação do aduto está relacionado a diminuição da ativação das vias de sinalização p-38MAPK e NF- κ B em eosinófilos.

Figura 14. Mecanismo anti-inflamatório e imunomodulador do CISACN na CARAS



Mecanismo anti-inflamatório e imunomodulador do CISACN no modelo experimental de CARAS. Modulando a resposta T_H2 em detrimento da polarização para T_H1 , orquestrados pela diminuição do processo inflamatório por diminuição da ativação intracelular das vias de sinalização p38 MAPK e NF- κ B. Fonte: Ferreira, 2024.

REFERÊNCIAS

- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9–14, 2012.
- ASBAI. **ASBAI - Associação Brasileira de Alergia e Imunologia**. Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/secao.asp?s=81&id=940>>. Acesso em: 9 fev. 2018.
- BAGNASCO, D. et al. A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 170, n. 2, p. 122–131, 2016.
- BARLOW, J. L. et al. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 1, p. 191- 198.e4, jan. 2012.
- BARNES, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 13, p. 1541–1558, 1 jul. 2017.
- BASAVAIHAH, D.; RAO, A. J.; SATYANARAYANA, T. Recent advances in the Baylis - Hillman reaction and applications. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 811–891, mar. 2003.
- BENGTSON, L. G. S. et al. Inhaled Corticosteroid-Containing Treatment Escalation and Outcomes for Patients with Asthma in a U.S. Health Care Organization. **Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy**, v. 23, n. 11, p. 1149–1159, nov. 2017.
- BÉRUBÉ, G. **An overview of molecular hybrids in drug discovery**. **Expert Opinion on Drug Discovery** Taylor and Francis Ltd, , mar. 2016.
- BEZERRA BARROS, G. C. et al. 4-Carvomenthenol ameliorates the murine combined allergic rhinitis and asthma syndrome by inhibiting IL-13 and mucus production via p38MAPK/NF-κB signaling pathway axis. **International Immunopharmacology**, v. 88, n. August, p. 106938, 2020.
- BLAKEMORE, D. C. et al. **Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery**. **Nature Chemistry** Nature Publishing Group, , abr. 2018.
- BOULET, L.-P. Airway remodeling in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 56–62, jan. 2018.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008*. **Allergy**, v. 63, p. 8–160, abr. 2008.
- BOUSQUET, J. et al. MACVIA-ARIA Sentinel Network for allergic rhinitis (MASK-rhinitis): the new generation guideline implementation. **Allergy**, v. 70, n. 11, p. 1372–1392, nov. 2015.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Phase 4 (2018): Change management in allergic rhinitis and asthma multimorbidity using mobile technology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 3, p. 864–879, 1 mar. 2019.

- BOUSQUET, J. et al. Allergic rhinitis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2020.
- BOUSQUET, J. et al. The Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) Approach of Value-Added Medicines: As-Needed Treatment in Allergic Rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 10, n. 11, p. 2878–2888, nov. 2022.
- BRANCHETT, W. J.; LLOYD, C. M. **Regulatory cytokine function in the respiratory tract. Mucosal Immunology** Nature Publishing Group, , 1 maio 2019. . Acesso em: 20 nov. 2019
- BROŽEK, J. L. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 4, p. 950–958, out. 2017.
- CABALLERO-SEGURA, F. J. et al. Trends in asthma hospitalizations among adults in Spain: Analysis of hospital discharge data from 2011 to 2020. **Respiratory Medicine**, v. 204, p. 107009, nov. 2022.
- CARDOSO, T. DE A. et al. Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dados extraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **Jornal Brasileiro de pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163–168, 2017.
- CASALE, T. B. Biologics and biomarkers for asthma, urticaria, and nasal polyposis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 5, p. 1411–1421, 2017.
- CAVALCANTI, R. F. P. et al. Warifteine and methylwarifteine inhibited the type 2 immune response on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) experimental model through NF-κB pathway. **International Immunopharmacology**, v. 85, n. March, p. 106616, 2020.
- CAVALCANTI, R. F. P. et al. *Limosilactobacillus fermentum* modulates the gut-airway axis by improving the immune response through FOXP3 activation on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **Immunobiology**, v. 228, n. 5, p. 152721, set. 2023.
- CAVALCANTI, R. F. P. et al. Oral administration of *Lacticaseibacillus paracasei* attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in mice model: Relevance of short-chain fatty acids on gut-airway axis. **Journal of Functional Foods**, v. 115, p. 106109, abr. 2024.
- CHERVINSKY, P. et al. Efficacy and safety of desloratadine/pseudoephedrine tablet, 2.5/120 mg two times a day, versus individual components in the treatment of patients with seasonal allergic rhinitis. **Allergy and asthma proceedings**, v. 26, n. 5, p. 391–6, 2005.
- CHIANG, C. Y. et al. Osthole treatment ameliorates Th2-mediated allergic asthma and exerts immunomodulatory effects on dendritic cell maturation and function. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 14, n. 11, p. 935, 1 nov. 2017.
- CONG, S.; FENG, Y.; TANG, H. Network pharmacology and molecular docking to explore the potential mechanism of urolithin A in combined allergic rhinitis and

- asthma syndrome. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 396, n. 9, p. 2165–2177, 24 set. 2023.
- DA SILVA, J. S. DE F. et al. Morita-Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-2-oxoindolin-3-yl)acrylonitrile (ISACN) modulates the inflammatory process during LPS-induced acute lung injury. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 45, n. 4, p. 485–496, 4 jul. 2023.
- DA SILVA, W. A. V. et al. Synthesis and activity of novel homodimers of Morita–Baylis–Hillman adducts against *Leishmania donovani*: A twin drug approach. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 18, p. 4523–4526, 2016.
- DAI, M. et al. CCR3 gene knockout in bone marrow cells ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by reducing airway inflammatory cell infiltration and Th2 cytokines expression in mice model. **International Immunopharmacology**, v. 104, p. 108509, mar. 2022.
- DE GROOT, E. P. et al. Allergic rhinitis is associated with poor asthma control in children with asthma. **Thorax**, v. 67, n. 7, p. 582–587, jul. 2012.
- DE SOUZA, R. O. M. A. et al. The Morita-Baylis-Hillman reaction in aqueous-organic solvent system. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 41, p. 5902–5905, out. 2008.
- DERENDORF, H. et al. Clinical development of an advanced intranasal delivery system of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate. **Drugs of Today**, v. 50, n. 1, p. 15, jan. 2014.
- DEVOS, F. C. et al. IL-13 is a central mediator of chemical-induced airway hyperreactivity in mice. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–12, 2017.
- EIFAN, A. O. et al. Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 6, p. 891–900, jun. 2012.
- EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, n. 9, p. 1139–1151, set. 2016.
- ELTBOLI, O. et al. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 20, n. 4, p. 667–70, maio 2015.
- EMAMI FARD, N.; XIAO, M.; SEHMI, R. Regulatory ILC2—Role of IL-10 Producing ILC2 in Asthma. **Cells**, v. 12, n. 21, p. 2556, 31 out. 2023.
- FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57, 2015.
- FAJT, M. L.; WENZEL, S. E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 299–310, fev. 2015.
- FENG, Y. et al. Exploration of the mechanism of aloin ameliorates of combined allergic rhinitis and asthma syndrome based on network pharmacology and experimental validation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 14 set. 2023.

- FERREIRA, L. A. M. P. et al. Morita-Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (CISACN) ameliorates the pulmonary allergic inflammation in CARAS model by increasing IFN- γ /IL-4 ratio towards the Th1 immune response. **International Immunopharmacology**, v. 130, p. 111737, mar. 2024.
- FRAGA RIGHETTI, R. et al. New Pharmacological Targets for Asthma Drug Development. **Journal of Allergy & Therapy**, v. 05, n. 02, p. 1–13, 25 mar. 2014.
- GADELHA, F. A. A. F. et al. Immunomodulatory properties of *Musa paradisiaca* L. inflorescence in Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome (CARAS) model towards NF κ B pathway inhibition. **Journal of Functional Foods**, v. 83, p. 104540, 1 ago. 2021.
- GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 7, n. 1, p. 34–51, jan. 2016.
- GINA. A Pocket Guide for Health Professionals (for Adults and Children Older than 5 Years). **GINA**, p. 1–36, 2019.
- GINA, G. I. FOR A. **Global Strategy for Asthma Management and Prevention**. 2023
- GOON GOH, F. et al. G-protein-dependent and -independent pathways regulate proteinase-activated receptor-2 mediated p65 NF κ B serine 536 phosphorylation in human keratinocytes. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 7, p. 1267–1274, jul. 2008.
- GOUR, N.; WILLS-KARP, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 68–78, set. 2015.
- GREEN, R. H. et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 875–9, out. 2002.
- GUERRA, E. S. et al. Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2017.
- GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 27 jul. 2012.
- GURTNER, A.; CREPAZ, D.; ARNOLD, I. C. Emerging functions of tissue-resident eosinophils. **Journal of Experimental Medicine**, v. 220, n. 7, 3 jul. 2023.
- HAMMAD, H. et al. Emerging Paradigms in Type 2 Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 40, n. 1, p. 443–467, 26 abr. 2022.
- HENS, G. et al. Original article: Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: 'united airway disease' beyond the scope of allergy. **Allergy**, v. 63, n. 3, p. 261–267, 5 dez. 2007.
- HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15025, 10 set. 2015.

- HUMBERT, M. et al. Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 5, p. 525-536.e1, set. 2014.
- JATAKANON A, LIM S, B. PJ. Changes in Sputum Eosinophils Predict Loss of Asthma Control. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 64–72, jan. 2000.
- JIANG, Y. et al. Bergapten ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome after PM2.5 exposure by balancing Treg/Th17 expression and suppressing STAT3 and MAPK activation in a mouse model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 164, p. 114959, ago. 2023.
- JIN, J. et al. Fallopia japonica Root Extract Ameliorates Ovalbumin-Induced Airway Inflammation in a CARAS Mouse Model by Modulating the IL-33/TSLP/NF- κ B Signaling Pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12514, 7 ago. 2023.
- JUNIOR, C. G. L. et al. Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. **Bioorganic Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 279–284, dez. 2010.
- JUNTILA, I. S. **Tuning the cytokine responses: An update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 7 jun. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 27 set. 2020
- KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. **Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases**. **Biomolecular Concepts** Walter de Gruyter GmbH, , 2018.
- KAY, A. B. The early history of the eosinophil. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 3, p. 575–582, 1 mar. 2015.
- KHORASANIZADEH, M. H. et al. **Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma**. **Pharmacology and Therapeutics** Elsevier Inc., , 1 jun. 2017. . Acesso em: 2 dez. 2019
- KLEINJAN, A. et al. United airways: Circulating Th2 effector cells in an allergic rhinitis model are responsible for promoting lower airways inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 40, n. 3, p. 494–504, 2010.
- KOMLÓSI, Z. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 85, p. 100995, jun. 2022.
- KUBO, M. **Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation**. **Immunological Reviews** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jul. 2017. . Acesso em: 20 nov. 2019
- KUNDU, M. K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene- propionic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 5, p. 731–736, mar. 1999.

- LACCOURREYE, O. et al. Benefits, limits and danger of ephedrine and pseudoephedrine as nasal decongestants. **European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases**, v. 132, n. 1, p. 31–4, fev. 2015.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. **The Cytokines of Asthma**. ImmunityCell Press, , 16 abr. 2019. . Acesso em: 20 nov. 2019
- LI, H. et al. Intranasal administration of CpG oligodeoxynucleotides reduces lower airway inflammation in a murine model of combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 390–398, 2015.
- LI, H. et al. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a mechanism that possibly involves in TSLP airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma sy. **Experimental Lung Research**, v. 2148, n. August, 2016.
- LI, H. TAO et al. CpG-ODNs and Budesonide Act Synergistically to Improve Allergic Responses in Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome Induced by Chronic Exposure to Ovalbumin by Modulating the TSLP-DC-OX40L Axis. **Inflammation**, p. 1–17, 2018.
- LICARI, A. et al. The Nose and the Lung: United Airway Disease? **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, p. 44, mar. 2017.
- LIEBERMAN, P.; GARVEY, L. H. Mast Cells and Anaphylaxis. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 16, n. 3, p. 1–7, 2016.
- LIMA-JUNIOR, C. G. et al. Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 602–612, jun. 2016.
- LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. Bioorganic and Medicinal Chemistry**Bioorg Med Chem, , 1 jul. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22632793/>>. Acesso em: 7 abr. 2021
- LOHIA, S.; SCHLOSSER, R. J.; SOLER, Z. M. Impact of intranasal corticosteroids on asthma outcomes in allergic rhinitis: a meta-analysis. **Allergy**, v. 68, n. 5, p. 569–579, maio 2013.
- LOMBARDI, C.; BERTI, A.; COTTINI, M. The emerging roles of eosinophils: Implications for the targeted treatment of eosinophilic-associated inflammatory conditions. **Current Research in Immunology**, v. 3, p. 42–53, 2022.
- MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. **The biology of eosinophils and their role in asthma**. **Frontiers in Medicine**Frontiers Media S.A., , 2017. . Acesso em: 3 dez. 2019
- MELO, C. R. **Atividade antiplasmodial in vitro de um derivado da N-metil-isatina (CH3ISACN), e sua toxicidade in silico e in vivo**. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 2020.

- MENG, Y.; WANG, C.; ZHANG, L. Recent developments and highlights in allergic rhinitis. **Allergy**, v. 74, n. 12, p. 2320–2328, 1 dez. 2019.
- MORITA, K.-I.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. **A Tertiary Phosphine-catalyzed Reaction of Acrylic Compounds with Aldehydes**. [s.l.: s.n.].
- NAVINÉS-FERRER, A. et al. IgE-Related Chronic Diseases and Anti-IgE-Based Treatments. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–12, 21 dez. 2016.
- NGUYEN, T. VAN et al. Artemisia gmelinii Extract Alleviates Allergic Airway Inflammation via Balancing TH1/TH2 Homeostasis and Inhibiting Mast Cell Degranulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 15377, 6 dez. 2022.
- NOBS, S. P.; KAYHAN, M.; KOPF, M. GM-CSF intrinsically controls eosinophil accumulation in the setting of allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1513- 1524.e2, abr. 2019.
- NUR HUSNA, S. M. et al. IL-4/IL-13 axis as therapeutic targets in allergic rhinitis and asthma. **PeerJ**, v. 10, p. e13444, 30 maio 2022.
- OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. **Oecd Guideline for Testing of Chemicals**, n. December, p. 1–14, 2002.
- ORTEGA, H. G. et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 13, p. 1198–1207, set. 2014.
- PAIVA FERREIRA, L. A. M. et al. Biological Activities of Morita-Baylis-Hillman Adducts (MBHA). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 17, p. 1691–1710, set. 2023.
- PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105718, 1 set. 2019.
- 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, n. December 2020, p. 107590, 2021.
- PALOMARES, Ó. et al. divergent: How IgE axis contributes to the continuum of allergic asthma and anti-IgE therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–14, 2017.
- PAPADOPOULOS, N. G. et al. Phenotypes and endotypes of rhinitis and their impact on management: a PRACTALL report. **Allergy**, v. 70, n. 5, p. 474–494, maio 2015.
- PAPI, A. et al. **Asthma**. **The Lancet**Lancet Publishing Group, , fev. 2018.
- PATEL, K. B.; MIMS, J. W.; CLINGER, J. D. The Burden of Asthma and Allergic Rhinitis. **Otolaryngologic Clinics of North America**, out. 2023.
- PELLISSIER, H. **Recent developments in the asymmetric organocatalytic Morita–Baylis–Hillman reaction**. **Tetrahedron**Elsevier Ltd, , maio 2017.

- PERA, T.; PENN, R. B. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 164, p. 82–96, ago. 2016.
- PIAO, C. H. et al. PM2.5 exposure regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production through NF- κ B signaling in combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **International Immunopharmacology**, v. 119, p. 110254, jun. 2023.
- PRAJAPAT, P. et al. Synthetic and Medicinal Chemistry in Drug Discovery: Needs for Today. **Ann Med Chem Res**, v. 3, n. 1, p. 1021, 2017.
- ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; FOSTER, P. S. Eosinophils: Changing perspectives in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 9–22, 2013.
- RUBINI, N. D. P. M. et al. Guia prático sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 1, p. 7–22, 2017.
- SAKANO, E. et al. IV Consenso Brasileiro sobre Rinites 2017. **Documento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia, Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial e Sociedade Brasileira de Pediatria.**, p. 1–43, 2017.
- SAKANO, E. et al. IV Brazilian Consensus on Rhinitis-an update on allergic rhinitis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, n. 1, p. 3–14, 2018.
- SANTOS, M. et al. The Morita-Baylis-Hillman Reaction: Advances and Contributions from Brazilian Chemistry. **Current Organic Synthesis**, v. 12, n. 6, p. 830–852, ago. 2015.
- SCHULIGA, M.; MICHAEL. NF- κ B Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 1266–1283, 26 jun. 2015.
- SIVA, R. et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 5, p. 906–913, 1 maio 2007.
- SMALL, P.; KEITH, P. K.; KIM, H. Allergic rhinitis. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. S2, p. 51, 12 set. 2018.
- SOLÉ, D. et al. III Consenso Brasileiro sobre Rinites. **Otorhinolaryngology Otorhinolaryngology Otorhinolaryngology Brazilian Journal of Brazilian Journal of Brazilian Journal**, v. 75, n. 6, p. 1–52, 2012.
- SOMANI, R. R. et al. Optimization and study of variables in microwave assisted organic synthesis of some biologically active chalcones. **Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 3, p. 153–160, 15 jan. 2021.
- SUN, X. et al. Anti-inflammatory mechanisms of the novel cytokine interleukin-38 in allergic asthma. **Cellular & Molecular Immunology** 2019 17:6, v. 17, n. 6, p. 631–646, 23 out. 2019.
- TAKATSU, K.; NAKAJIMA, H. **IL-5 and eosinophilia**. **Current Opinion in Immunology**, jun. 2008. . Acesso em: 1 dez. 2019

- TANG, H. et al. TLR4 antagonist ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by reducing inflammatory monocytes infiltration in mice model. **International Immunopharmacology**, v. 73, p. 254–260, 1 ago. 2019.
- TANG, Y. et al. Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 6, p. 1611- 1620.e4, jun. 2012.
- TOHIDINIK, H. R.; MALLAH, N.; TAKKOUICHE, B. History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis. **World Allergy Organization Journal**, v. 12, n. 10, 1 out. 2019.
- WANG, T.; SECOMBES, C. J. **The evolution of IL-4 and IL-13 and their receptor subunits**. Cytokine Academic Press, , 1 set. 2015. . Acesso em: 27 set. 2020
- WANG, X. et al. Potent ameliorating effect of Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) antagonist YC-1 on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 343–350, 2016.
- WECHSLER, M. E. et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 96, n. 10, p. 2694–2707, out. 2021.
- WENSLEY, A. M.; MCDUGAL, N. T.; SCHAUS, S. E. Morita–Baylis–Hillman, Vinylogous Morita–Baylis–Hillman, and Rauhut–Currier Reactions. **Lewis Base Catalysis in Organic Synthesis**, v. 2, p. 655–714, 17 ago. 2016.
- WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478–494, 2014.
- WHEATLEY, L. M.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 456–463, 29 jan. 2015.
- WHO. **WHO | Asthma (World Health Organization)**. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 9 fev. 2018.
- WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 5, p. 271–282, 17 maio 2015.
- XAVIER, F. J. S. et al. Synthesis and In Vitro Anti Leishmania amazonensis Biological Screening of Morita-Baylis-Hillman Adducts Prepared from Eugenol, Thymol and Carvacrol. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 11, nov. 2016.
- XIA, S. et al. Correlation between upper and lower airway inflammations in patients with combined allergic rhinitis and asthma syndrome: A comparison of patients initially presenting with allergic rhinitis and those initially presenting with asthma. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 2, p. 1761–1767, 1 fev. 2018.
- XU, Y.; ZHANG, J.; WANG, J. The efficacy and safety of selective H1-antihistamine versus leukotriene receptor antagonist for seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112815, 2014.
- ZOABI, Y.; LEVI-SCHAFFER, F.; ELIASHAR, R. Allergic Rhinitis: Pathophysiology and Treatment Focusing on Mast Cells. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2486, 5 out. 2022.

ZUBERBIER, T. et al. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA² LEN review. **Allergy**, v. 69, n. 10, p. 1275–1279, out. 2014.

ANEXO 1

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos e mecanismos de ação de produtos naturais e sintéticos bioativos em modelos experimentais de edema inflamatório, lesão pulmonar aguda (LPA) e síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS).", protocolada sob o CEUA nº 7316150420 (00 001064), sob a responsabilidade de **Marcia Regina Piuvezam** e equipe: **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; Larissa Rodrigues Bernardo; Grasiela Costa Bezerra; Raquel Fragoso Pereira; Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha; **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 15/05/2020.

We certify that the proposal "Study of effects and mechanisms of action of natural and synthetic bioactive products in experimental models of inflammatory edema, acute lung injury (ALI) and combined allergic asthma and rhinitis syndrome (CARAS).", utilizing 676 isogenics mice (325 males and 351 females), 312 Heterogenics mice (312 females), protocol number CEUA 7316150420 (00 001064), under the responsibility of **Marcia Regina Piuvezam** and team; **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; Larissa Rodrigues Bernardo; Grasiela Costa Bezerra; Raquel Fragoso Pereira; Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha; **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/15/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

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

Área: Ciências Farmacêuticas

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

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

João Pessoa, 25 de janeiro de 2022



Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Ivia Carmem Talleri
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS

“Morita Baylis-Hillman adduct 2-(3-hydroxy-1-methyl-2-oxoindolin-3-yl) acrylonitrile (CISACN) ameliorates the pulmonary allergic inflammation in CARAS model by increasing IFN- γ /IL-4 ratio towards the Th1 immune response.” **ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA, LARISSA;** KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, LAÉRCIA; FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI, RAQUEL; ALLYSSON DE ASSIS FERREIRA GADELHA, FRANCISCO; MANGUEIRA DE LIMA, LOUISE; FRANCISCO ALVES, ADRIANO; GABRIEL LIMA JÚNIOR, CLÁUDIO; REGINA PIUVEZAM, MARCIA. *International Immunopharmacology*, v. 130, p. 111737, **2024**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111737>. F.I: 5,6.

“Oral administration of *Lacticaseibacillus paracasei* attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in mice model: Relevance of short-chain fatty acids on gut-airway axis.” CAVALCANTI, RAQUEL F.P.; GADELHA, FRANCISCO A.A.F.; PAIVA FERREIRA, LAERCIA K.D.; **PAIVA FERREIRA, LARISSA A.M.;** JÚNIOR, JOSÉ VENÂNCIO C.; DE ARAÚJO BATISTA, RAYANNE S.; LINS, TAYNARA B.; DE SOUZA, FÁBIO S.; ALVES, ADRIANO F.; BATISTA, LEÔNIA MARIA; DEJANI, NAIARA N.; PIUVEZAM, MARCIA R. *Journal of Functional Foods*, v. 115, p. 106109, **2024**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106109>. F.I: 5,6.

“*Limosilactobacillus fermentum* modulates the gut-airway axis by improving the immune response through FOXP3 activation on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS).” CAVALCANTI, RAQUEL F.P.; GADELHA, FRANCISCO A.A.F.; PAIVA FERREIRA, LAÉRCIA K.D.; **PAIVA FERREIRA, LARISSA A.M.;** CHAVES JÚNIOR, JOSÉ V.; DE ARAÚJO BATISTA, RAYANNE S.; MELO, TAYNARA B.L.; DE SOUZA, FÁBIO S.; ALVES, ADRIANO F.; MARIA BATISTA, LEÔNIA; PIUVEZAM, MARCIA R. *Immunobiology*, v. 01, p. 152721, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152721>. FI: 2,8.

“Biological Activities of Morita Baylis-Hillman Adducts (MBHA).” **PAIVA FERREIRA, LARISSA ADILIS MARIA;** DE LIMA, LOUISE MANGUEIRA; PAIVA FERREIRA, LAERCIA KARLA DIEGA; BERNARDO, LARISSA RODRIGUES; CASTRO, ALEFF; LIMA JUNIOR, CLAUDIO GABRIEL; DE ALMEIDA VASCONCELLOS, MÁRIO LUIZ ARAÚJO; PIUVEZAM, MARCIA REGINA. *Mini-Reviews In Medicinal Chemistry*, v.

23, p. 1691-1710, **2023**. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389557523666230202103719>. FI: 3,8.

“Curine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Downregulating the TLR4/MD-2/NF- κ B(p65) Signaling Pathway.” **PAIVA FERREIRA, LARISSA A. M.**; PAIVA FERREIRA, LAÉRCIA K. D.; MONTEIRO, TALISSA M.; GADELHA, FRANCISCO A. A. F.; DE LIMA, LOUISE M.; DOS SANTOS MAIA, MAYARA; SCOTTI, MARCUS TULLIUS; RIBEIRO-FILHO, JAIME; DA S. DIAS, CELIDARQUE; PIUVEZAM, MARCIA REGINA. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 1, p. 1, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43450-022-00230-4>. F.I.: 1,6.

“4-carvomenthenol, a monoterpene of essential oils, and its underlying effects on anti-inflammatory activity and immediate hypersensitivity reaction.” BERNARDO, L. R.; PAIVA FERREIRA, L. K. D.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; DURVIGENS, C. I.; ALVES, A. F.; FIGUEIREDO, PEDRO T.R.; PIUVEZAM, M. R. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Online), v. 58, p. 1-14, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20780>. F.I. 1,3.

“Milonine attenuates the lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by modulating the Akt/NF- κ B signaling pathways.” BERNARDO, LARISSA R.; FERREIRA, LAÉRCIA KARLA D.P.; **FERREIRA, LARISSA A.M.P.**; VIEIRA, COSMO ISAÍAS D.; OLIVEIRA, JOÃO BATISTA DE; LIMA, LOUISE M. DE; ALVES, ADRIANO FRANCISCO; ARAÚJO, RUBENS S.; MAIA, MAYARA S.; SCOTTI, MARCUS T.; BARBOSA FILHO, JOSÉ MARIA; PIUVEZAM, MARCIA REGINA. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 94, p. 1-13, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202220211327>. F.I. 1,3.

“Fisiopatologia e modelos murinos de Rinossinusite Crônica com Pólipos Nasais (RSCcPN), uma revisão.” FERREIRA, LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA; **FERREIRA, LARISSA ADILIS MARIA PAIVA**; LIMA, LOUISE MANGUEIRA DE; OLIVEIRA, JOÃO BATISTA DE; VIEIRA, COSMO ISAIAS DUVIRGENS; BERNARDO, LARISSA RODRIGUES; PIUVEZAM, MARCIA REGINA. Brazilian Journal of Development, v. 8, p. 63781-63794, **2022**. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n9-224>.

“MHTP, a synthetic alkaloid, attenuates combined allergic rhinitis and asthma syndrome through downregulation of the p38/ERK1/2 MAPK signaling pathway in mice”. LAÉRCIA K.D. PAIVA FERREIRA, **LARISSA A.M. PAIVA FERREIRA**, GRASIELA C. BEZERRA BARROS, TALISSA MOZZINI MONTEIRO, LUIZ A. DE ARAÚJO SILVA, RAMON DE A. PEREIRA, PEDRO T. R. FIGUEIREDO, ADRIANO FRANCISCO ALVES, LUÍS CEZAR RODRIGUES, MARCIA REGINA PIUVEZAM. International Immunopharmacology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107590>. **2021**. F.I: 5,6.

“4-Carvomenthenol ameliorates the murine combined allergic rhinitis and asthma syndrome by inhibiting IL-13 and mucus production via p38MAPK/ NFκB signaling pathway axis”. GRASIELA COSTA BEZERRA BARROS, LAÉRCIA K.D. PAIVA FERREIRA, **LARISSA A.M.P. FERREIRA**, TALISSA MOZZINI MONTEIRO, ADRIANO FRANCISCO ALVES, RAMON DE ALENCAR PEREIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM. International Immunopharmacology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106938>. **2020**. F.I. 5,6.

“Warifteine and methylwarifteine inhibited the type 2 immune response on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) experimental model through NF-κB pathway”. RAQUEL F.P. CAVALCANTI, FRANCISCO A.A.F. GADELHA, TAMIRES G. DE JESUS, LUIZ H.A. CAVALCANTE-SILVA, LAERCIA K.D. PAIVA FERREIRA, **LARISSA A.M. PAIVA FERREIRA**, GICIANE C. VIEIRA, MARCIA R. PIUVEZAM. International Immunopharmacology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106616>. **2020**. F.I. 5,6.

CAPÍTULO DE LIVRO COM ISBN

“Avaliação das vias de sinalização intracelular da dexametasona em modelo experimental da síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS) no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba.” LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; MARCIA REGINA PIUVEZAM. Publicado em Farmácia: os desafios do novo cenário. 1ed. v. 1, (13): p. 23-44. ISBN: 978-65-89069-21-8 (on-line), **2022**.

“Rinossinusite crônica com pólipos nasais (RSCCPN) uma revisão sobre endotipo e protocolos experimentais in vivo e in vitro.” LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; LARISSA RODRIGUES BERNARDO; MARCIA REGINA PIUVEZAM. Publicado em Farmácia: os desafios do novo cenário. 1ed. v. 1, (16): p. 87-106. ISBN: 978-65-89069-21-8 (on-line), **2022**.

“Lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo - perfil migratório das células inflamatórias no tecido pulmonar.” OLIVEIRA, J. B.; VIEIRA, C. I. D.; DE LIMA, L. M.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. Publicado em FARMÁCIA: TECNOLOGIA A SERVIÇO DA SAÚDE, 1. 1ed.: v. 1, (33):p. 710-729. ISBN: 978-65-89069-13-3 (on-line), **2021**.

“Síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas – avaliação das vias de sinalização NFKB e as MAPK-P38 / -ERK 1/2 em eosinófilos e linfócitos do processo alérgico.” DE LIMA, L. M.; VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. Publicado em FARMÁCIA: TECNOLOGIA A SERVIÇO DA SAÚDE, 1. 1ed.: v. 1, (34):p. 730-750. ISBN: 978-65-89069-13-3 (on-line), **2021**.

“Investigação do efeito inflamatório do lipopolissacarídeo em um modelo experimental de lesão pulmonar aguda.” DE LIMA, L. M.; VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. Publicado em FARMÁCIA: TECNOLOGIA A SERVIÇO DA SAÚDE, 1. 1ed.: v. 1, (27):p. 523-541. ISBN: 978-85-53005-25-3, **2020**.

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

PATENTES

LARISSA RODRIGUES BERNARDO, LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**, COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA, ADRIANO FRANCISCO ALVES, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM. ALCALOIDE PARA O TRATAMENTO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO NA LESÃO PULMONAR AGUDA. Registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 22/12/2021. Nº BR 10 2021 026081 5. Universidade Federal da Paraíba, **2021**.

MARCIA REGINA PIUVEZAM, LARISSA RODRIGUES BERNARDO, GRASIELA COSTA BEZERRA, LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA** FERREIRA, COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA, TALISSA MOZZINI MONTEIRO, ADRIANO FRANCISCO ALVES, PEDRO THIAGO RAMALHO DE FIGUEIREDO. MONOTERPENO PARA TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA. Registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 18/08/2020. Nº BR102020016462-7. Universidade Federal da Paraíba, **2020**.

COMUNICAÇÕES ORAIS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

INTERNACIONAIS

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA, FERREIRA**, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, LARISSA RODRIGUES BERNARDO, MARCIA REGINA PIUVEZAM. RINOSSINUSITE CRÔNICA COM PÓLIPOS NASAIS (RSCcPN) UMA REVISÃO SOBRE ENDOTIPO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS IN VIVO E IN VITRO. In: CINASAMA, Edição on-line, 2021.

LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA, **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**, LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM. 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. In: CINASAMA, Edição on-line, 2021.

LARISSA RODRIGUES BERNADO, **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, COSMO ISAIAS DUVIRGENS VIEIRA, MARCIA REGINA PIUVEZAM. EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA. In: CINASAMA, Edição on-line, 2021.

OLIVEIRA, J. B.; VIEIRA, C. I. D.; DE LIMA, L. M.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO - PERFIL MIGRATÓRIO DAS CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO PULMONAR. In: CINASAMA, Edição on-line, 2020.

DE LIMA, L. M.; VIEIRA, C. I. D.; OLIVEIRA, J. B.; **FERREIRA, L. A. M. P.**; PIUVEZAM, M. R. SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS – AVALIAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO NFκBE AS MAPK -p38 / -ERK 1/2 EM EOSINÓFILOS E LINFÓCITOS DO PROCESSO ALÉRGICO. In: CINASAMA, Edição on-line, 2020.

COMUNICAÇÕES EM PÔSTER EM EVENTOS CIENTÍFICOS

NACIONAIS

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; GRASIELA COSTA BEZERRA BARROS; TALISSA MOZZINI MONTEIRO; LUIZ A. DE ARAÚJO SILVA; LARISSA RODRIGUES BERNARDO; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; ADRIANO FRANCISCO ALVES; LUIS CEZAR RODRIGUES; MARCIA REGINA PIUVEZAM. MHTP, A SYNTHETIC ALKALOID, MODULATES THE EXPERIMENTAL COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS) BY DOWNREGULATING P38/ERK1/2 MAPK AND NFKBPATHWAYS IN LYMPHOCYTES. In XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, On-line, from September 26th to 28th, 2021.

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; TALISSA MOZZINI MONTEIRO; **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; LARISSA RODRIGUES BERNARDO; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; COSMO ISAÍAS

DUVIRGENS VIEIRA; MARCIA REGINA PIUVEZAM. GAMMA-TERPINENE, AN ESSENTIAL OIL, INHIBITS P38 / NFKB SIGNALING PATHWAY BY SUPPRESSING TLR4 IN A MURINE MODEL OF ACUTE LUNG INJURY. In XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, On-line, from September 26th to 28th, 2021.

LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; TALISSA MOZZINI MONTEIRO; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; LARISSA RODRIGUES BERNARDO; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA; MAYARA DOS SANTOS MAIA; MARCUS TULLIUS SCOTTI; CELIDARQUE DA S. DIAS; MARCIA REGINA PIUVEZAM. "CURINE, A BISBENZYLISOQUINOLINE ALKALOID, AMELIORATES THE LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED ACUTE LUNG INJURY BY DOWNREGULATING THE TLR4/MD-2/NFKB(P65) SIGNALING PATHWAY. In XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, On-line, from September 26th to 28th, 2021.

LARISSA RODRIGUES BERNARDO; LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA; **LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA**; COSMO ISAÍAS DUVIRGENS VIEIRA; JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA; LOUISE MANGUEIRA DE LIMA; ADRIANO FRANCISCO ALVES; RUBENS DA SILVA ARAÚJO; MAYARA DOS SANTOS MAIA; MARCUS TULLIUS SCOTTI; JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO; MARCIA REGINA PIUVEZAM. MILONINE PROTECTS AGAINST ACUTE LUNG INJURY BY MODULATING THE AKT AND NFKBSIGNALING PATHWAY. In XLV Annual Meeting of the Brazilian Society of Immunology, On-line, from September 26th to 28th, 2021.

TRABALHOS PREMIADOS

Louise Mangueira de Lima, João Batista de Oliveira, **Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira**, Laércia Karla Diega Paiva Ferreira, Marcia Regina Piuvezam. 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. In CINASAMA, on-line, **2021**.

Larissa Rodrigues Bernado, **Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira**, Louise Manguiera de Lima, Cosmo Isaias Duvirgens Vieira, Marcia Regina Piuvezam. EDEMA PULMONAR E SINALIZAÇÕES INTRACELULARES NO MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO PULMONAR AGUDA. In: CINASAMA, on-line, **2021**.