

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

O ácido láurico previne as alterações morfofuncionais das vias aéreas de ratos
Wistar com asma alérgica

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

João Pessoa-PB

2025

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

**O ácido láurico previne as alterações morfofuncionais das vias aéreas de ratos
Wistar com asma alérgica**

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**. Área de Concentração: **FARMACOLOGIA**.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos

João Pessoa-PB

2025

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F475á Figueiredo, Indyra Alencar Duarte.

O ácido láurico previne as alterações
morfofuncionais das vias aéreas de ratos Wistar com
asma alérgica / Indyra Alencar Duarte Figueiredo. -
João Pessoa, 2025.
256 f. : il.

Orientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Coorientação: Luiz Henrique César Vasconcelos.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Asma. 2. Ácido láurico. 3. Reatividade traqueal.
4. Ventilação pulmonar. 5. Estresse oxidativo. I.
Cavalcante, Fabiana de Andrade. II. Vasconcelos, Luiz
Henrique César. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.248(043)

Indyra Alencar Duarte Figueiredo

**O ácido láurico previne as alterações morfofuncionais das vias aéreas de ratos
Wistar com asma alérgica**

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 **DOCTORA EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de Concentração: **FARMACOLOGIA**.

Aprovado em 28/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



FABIANA DE ANDRADE CAVALCANTE OLIVEIRA

Data: 16/04/2025 13:08:57-0300

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

**Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**

Documento assinado digitalmente



TATJANA KEESSEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE

Data: 15/04/2025 06:27:33-0300

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

**Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna**

Documento assinado digitalmente



DAVI FELIPE FARIAS

Data: 16/04/2025 11:36:32-0300

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

**Prof. Dr. Davi Felipe Farias
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**

Documento assinado digitalmente



JOSIANE DE CAMPOS CRUZ

Data: 15/04/2025 07:38:12-0300

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

**Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora externa**

Documento assinado digitalmente



JOELMIR LUCENA VEIGA DA SILVA

Data: 14/04/2025 17:22:20-0300

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

**Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva
(Faculdade de Medicina de Olinda)
Examinador externo**

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria do Socorro Alencar da Silva Figueiredo (*in memoriam*), que tanto sonhou e rezou por essa conquista. Sinto sua falta diariamente e queria tanto tê-la aqui comigo nesse momento. Mas do céu, sei que cuida de mim e me ampara, como sempre fez. Tudo é e sempre será por você, Mainha.

Ao meu pai, Franciland Duarte Figueiredo, por sempre incentivar minhas escolhas e não medir esforços para me ajudar e contribuir com o meu crescimento.

Agradecimentos

A Deus, fonte de toda sabedoria, por me conceder força, discernimento e perseverança ao longo desta caminhada. Agradeço pelo dom da vida, pelas oportunidades e por ter iluminado meus passos nos momentos de incerteza. Sou grata pelas bênçãos recebidas, pelo amparo nas dificuldades e por todas as oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus irmãos, Hugo Alencar Duarte Figueiredo e Hortência Alencar Duarte Figueiredo, por toda cumplicidade, por estarem sempre presentes torcendo por mim e por terem me presenteado com as coisas mais valiosas da minha vida, minhas sobrinhas, Helena Alencar Figueiredo de Oliveira, Bettina Alencar Ishibashi e Celina Alencar Ishibashi, que trouxeram mais alegria e amor para as nossas vidas.

Aos meus avós, Francisco Fernandes Figueiredo, Maria do Socorro Duarte Figueiredo (*in memoriam*), Antônio Nino da Silva (*in memoriam*) e Maria Alencar da Silva, por todo amor que me deram.

Aos meus tios, em especial Antônio Nino da Silva Filho, por incentivar e contribuir com a minha formação e Eva Cristina Alencar, por representar a minha mãe, se preocupar e cuidar de mim. Também agradeço as tias Bernadete Alencar, Maria de Lourdes Alencar e Mércia Alencar, por todo cuidado e zelo comigo.

Às minhas primas-irmãs, Olívia Alencar Ferreira, Maria Isabel Alencar Ferreira e Ludmilla Alencar Fortunato, por estarem ao meu lado, vibrando e celebrando a cada conquista. Agradeço por serem verdadeiras amigas, por me oferecerem suporte nos momentos de dificuldade e por me incentivarem diariamente a seguir em frente. O carinho, o apoio e a força de vocês foram essenciais.

Ao meu amor, Fábio Marcel da Silva Santos, enviado do céu pra dividir a vida comigo, me fazendo feliz e me incentivando diariamente. Obrigada por estar sempre presente, por me entender, por ser um porto-seguro e por fazer tudo o que está ao seu alcance para me ver bem. Sua gentileza e generosidade são minhas inspirações. Tenho muito orgulho do profissional e da pessoa que você é. Me espelho e aprendo diariamente com você. Também estendo os agradecimentos à sua família, que sempre me recebeu com tanto carinho e torcem por mim.

À minha cunhada, Renatha Figueiredo de Oliveira, por ser como uma irmã e por ter cuidado da minha mãe com tanto carinho quando mais precisamos. Obrigada pelo apoio e gentileza que sempre tem comigo. Sua presença é um verdadeiro presente, e sou imensamente grata por tudo o que você faz pela nossa família.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, pela dedicação, paciência e apoio incondicional ao longo dos nossos 11 anos de convivência. Sou imensamente grata por seus ensinamentos, que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional, e por acreditar no meu potencial mesmo nos momentos mais desafiadores. Obrigada por ser incansável em ajudar e defender seus alunos, sempre buscando o nosso melhor. Há quem diga que nos parecemos e eu fico extremamente lisonjeada com essa comparação, pois a tenho como inspiração.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos, meu coorientador, expresso minha gratidão pelos valiosos ensinamentos, pelas sugestões sempre precisas e pelo incentivo constante, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Além de sua orientação acadêmica, agradeço pela parceria e amizade ao longo dos anos, que tornaram essa jornada mais leve e enriquecedora.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, um exemplo de profissional ética e dedicada, agradeço por nunca hesitar em me ajudar e por contribuir com minha formação desde a graduação. Levo comigo não apenas os valiosos ensinamentos acadêmicos, mas também os valores que transmitiu, que continuarão guiando minha caminhada profissional.

Aos membros da banca examinadora do Exame de Qualificação do Doutorado, Prof. Dr. Adriano Francisco Alves, Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhaes e Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima, pela gentileza de aceitarem o convite e pelas suas valiosas contribuições que aprimoraram esse trabalho.

Aos membros titulares da banca examinadora de defesa da tese, Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima, Prof. Dr. Davi Felipe Farias, Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz e Prof. Dr. Joelmir Lucena Veiga da Silva, e aos suplentes, Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam e Profa. Dra. Ana Carolina Carvalho Correia por aceitarem participar e pelas valiosas contribuições para o trabalho final.

Aos colaboradores Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, Profa. Daniele Idalino Janebro Ximenes, Profa. Dra. Luciana Scotti, Prof. Dr. Adriano Francisco Alves e Profa. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio, expresso minha sincera gratidão pela colaboração fundamental na realização dos experimentos desta pesquisa. Agradeço pela disponibilidade, pelo compartilhamento de conhecimento e pelas valiosas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Aos orientandos dos professores colaboradores, expresso minha sincera gratidão pelo empenho, dedicação e auxílio na realização dos experimentos desta pesquisa, como os alunos do Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) do IPeFarM/UFPB, em especial, o doutorando Igor Gabriel da Silva Ramalho, pelo auxílio na realização dos experimentos de toxicidade de doses repetidas. Também agradeço a doutoranda Natália Ferreira de Sousa, do Laboratório de Quimioinformática do IPeFarM/UFPB, pela execução dos protocolos de *docking* molecular.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, Profa. Dra. Luciana Scotti, Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros e Profa. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz sou grata pela visão de ciência que me transmitiram e pela forma única de ensinar.

Aos professores supervisores do meu Estágio de Docência na disciplina de Farmacologia para turma de Farmácia (2020.2 e 2021.2), Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros e Profa. Dra. Karla Veruska Marques Cavalcante da Costa, pela confiança em me permitir ministrar aulas para suas turmas, assim como pelas valiosas orientações e sugestões, que foram fundamentais para o meu crescimento como docente.

À Dra. Sarah Rebeca Dantas Ferreira, uma pessoa cheia de luz, de amor e de boas energias, que me ensinou os primeiros protocolos experimentais desenvolvidos no laboratório enquanto alunas de Iniciação Científica. Sou muito grata por todos os anos em que trabalhamos juntas e pela amizade que construímos. Os anos se passam, mas o amor e a amizade sempre permanecem.

À doutoranda Bárbara Cavalcanti Barros, por toda contribuição nos experimentos que realizamos juntas e durante as discussões científicas no laboratório, mas principalmente, pela amizade que mantemos depois de tantos anos. Obrigada por estar sempre presente pra me ouvir, aconselhar e incentivar.

À mestrande Alissa Maria de Oliveira Martins, que foi uma parceira incansável em todos esses anos. Sua dedicação, inteligência e comprometimento foram fundamentais para o andamento desse trabalho. Nunca irei esquecer que na época em que mais precisei, você assumiu o controle de todos os meus experimentos sem jamais reclamar. Definitivamente, não teria conseguido sem o seu auxílio. Agradeço também pela amizade sincera, confiança e apoio constante. Estarei aqui sempre torcendo pelo seu sucesso e te desejando um mundo de coisas boas.

À doutoranda Isabela Motta Felício, agradeço por toda a ajuda durante os experimentos, mas especialmente, pela amizade que construímos. Você é uma aluna, profissional, mãe e pessoa exemplar. Me inspiro muito na sua dedicação e sou muito feliz por tê-la sempre presente, mesmo à km de distância.

Ao doutorando Lucas Nóbrega de Oliveira, pelo auxílio nos experimentos e pelos bons momentos que compartilhamos durante esses anos. Obrigada pela confiança e torcida que sempre tem comigo.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Agra, que com tanta paciência e disponibilidade me ajudou na compreensão dos complexos conteúdos de Imunologia e compartilhou seus valiosos conhecimentos comigo. Também sou grata pelos anos de amizade e conselhos dados.

Às alunas de Iniciação Científica (IC), Alexya Mikelle Teixeira Cavalcanti, Jayne Muniz Fernandes e Ludmila Emilly da Silva Gomes, as primeiras ICs que acompanharam de perto o desenvolvimento deste projeto, expresse minha gratidão pelo comprometimento e dedicação em me auxiliar ao longo de toda a trajetória. Agradeço também pela confiança em me permitir coorientar os seus trabalhos de conclusão de curso, uma oportunidade que contribuiu imensamente para o meu crescimento profissional.

Aos mais novos alunos de IC, Bruno Fernandes Lemos Alves, Karen de Melo Cordeiro, Maria Luísa Baracho de Souza e Samyra Oliveira da Silva, agradeço pelo compromisso em contribuir para o desenvolvimento desse trabalho e pelas boas companhias e risadas durante os experimentos que realizamos juntos.

Aos atuais membros do Laboratório de Farmacologia Funcional “Prof. George Thomas” (LFF), Alissa Maria de Oliveira Martins, Anderson Fellype Diniz, Bárbara Cavalcanti Barros, Bruno Fernandes Lemos Alves, Gabriel Nunes Machado de Oliveira, Isabela Motta Felício, João Marcos Araújo, José Edvaldo Cavalcanti de Sousa Filho, Lucas Nóbrega de Oliveira, Karen de Melo Cordeiro, Maria Luísa Baracho de Souza, Maxsyara Felismino da Silva Soares, Michel Benício de Melo, Ray Ravilly Arruda, Samyra Oliveira da Silva e Thaís Rosa de Sousa, pela ajuda nos protocolos experimentais, pelas discussões científicas e pela boa convivência.

Aos que fizeram parte LFF nesses anos em que estive presente, Alana Cristina Costa, Alexya Mikelle Teixeira Cavalcanti, Antônio Raphael Cavalcanti, Brena Freire de Oliveira Claudino, Cleyton Oliveira, Daiany Francelino, Elba dos Santos Ferreira, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Francisco Fernandes Lacerda Júnior,

Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iana Vitória de Souza Oliveira, Iara Luna Leão de Souza, Ítalo Rossi Martins, Jayne Muniz Fernandes, João Pedro Moura Lima, Joedna Cavalcante Pereira, Laiz Aline Silva Brasileiro, Ludmila Emily da Silva Gomes, Luiz Henrique César Vasconcelos, Manoel Duvirgens, Maria da Conceição Correia Silva, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Matheus Melchiades, Matheus Mendes Vieira, Paula Benvindo Ferreira, Petruska Pessoa, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayane Fernandes Pessoa, Renata de Souza Sampaio, Sarah Rebeca Dantas Ferreira e Thayna Maria Fernandes de Moura pela boa convivência e por toda ajuda nos experimentos e nas correções dos trabalhos.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição que proporcionou um ambiente de aprendizado enriquecedor e me ofereceu todas as condições necessárias para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal desde a graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo amparo financeiro à pesquisa.

Ao Centro de Ciências da Saúde (CCS), ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), pelo apoio físico e institucional.

À coordenadora do PPgPNSB, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante e ao vice-coordenador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, por representarem e contribuírem com o desenvolvimento do programa.

À Caroline Manguiera e Nilmar Níncia Neves de Medeiros, secretárias do PPgPNSB, por toda dedicação e paciência em nos atender.

Ao Conselho Federal de Farmácia, em nome do Prof. João Samuel Meira, pelo apoio financeiro concedido para participação em eventos científicos.

À Dra. Roberta Parentoni e José Crispim Duarte (*in memoriam*), pelo trabalho em conduzir a Unidade de Produção Animal (UPA), e por serem sempre solícitos para nos ajudar na disponibilização e cuidado com os animais, e também por terem contribuído com os experimentos.

Aos demais funcionários terceirizados da UPA, como Sr. Luís Silva e Adriano Cordeiro, pelo trabalho exemplar e eficiente executado na UPA.

À Mônica Rodrigues da Silva, que além de prestar serviços essenciais ao laboratório, é uma pessoa iluminada, cujos gestos de carinho e positividade contagiam

a todos ao seu redor. Sua torcida, suas orações e sua alegria com minhas conquistas têm sido uma fonte constante de motivação e apoio.

Aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta tese de Doutorado, meus sinceros agradecimentos.

Indyra Alencar Duarte Figueiredo.

Resumo

O ácido láurico (AL) é um ácido graxo saturado de cadeia média e componente majoritário do óleo de coco virgem que, por sua vez, já apresentou efeito preventivo nas alterações induzidas pela asma em animais. Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos morfofuncionais do AL em um modelo de asma induzido por ovalbumina (OVA) em ratos Wistar. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (nº 9310040522). Os ratos foram divididos randomicamente para as análises toxicológicas em grupo controle (GC) e grupo tratado com 100 mg/kg/dia do AL (GAL100), cada qual contendo 5 machos e 5 fêmeas. Para os demais protocolos experimentais (n = 5-6), os ratos foram divididos em GC, grupo asmático (GA), grupo asmático tratado com AL de 25 (GAAL25), 50 (GAAL50) e 100 mg/kg (GAAL100) ou com 5 mg/kg de dexametasona (GADEXA). Na avaliação da toxicidade de doses repetidas, o AL na dose de 100 mg/kg/dia não promoveu nenhum sinal de toxicidade. Nas análises das alterações promovidas pela asma, quantificou-se o volume minuto através da técnica de pletismografia e evidenciou-se que o AL (25 mg/kg) preveniu a redução desse parâmetro observada no GA. Na avaliação da responsividade traqueal, os animais do GA, previamente sensibilizados com OVA, apresentaram aumento da reatividade contrátil a este alérgeno *in vitro*, sendo esse efeito parcialmente prevenido pelo AL (25, 50 e 100 mg/kg) e pela dexametasona. As vias eletromecânicas de contração e de relaxamento parecem não estar envolvidas na hiper-responsividade das vias aéreas neste modelo de asma. Diferentemente, na avaliação do acoplamento farmacomecânico de contração, todos os grupos tratados com AL e dexametasona preveniram o aumento da eficácia contrátil ao carbacol observada no GA. Na avaliação da participação do acoplamento farmacomecânico de relaxamento, os grupos tratados com o AL também preveniram a redução da capacidade relaxante da aminofilina no GA. Os estudos *in silico* de *docking* molecular também revelaram que o AL apresenta uma boa afinidade de ligação para diversos alvos envolvidos na inflamação e na hiper-responsividade das vias aéreas, como o receptor adrenérgico- β_2 , Ca_v , BK_{Ca} , K_{ATP} , ciclase de adenilil, PKG, eNOS, iNOS e COX-2. Além disso, seguiu-se com a caracterização do mecanismo de ação do AL na dose de 25 mg/kg, a menor dose eficaz em reduzir a hiper-responsividade traqueal. Observou-se, portanto, que o AL promove uma provável redução tanto na produção de prostanoídes contráteis pela via das cicloxigenases (COXs), como na produção exacerbada de óxido nítrico (NO) por um possível aumento na atividade e/ou expressão da sintase de óxido nítrico (NOS), além de uma possível diminuição na produção de ânion superóxido. Também foi evidenciado uma provável modulação negativa na via da RhoA-ROCK e do TGF- β . Na análise do desbalanço do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes no homogenato pulmonar, o AL previne o aumento da peroxidação lipídica, dos níveis de nitrito e a redução da atividade da superóxido dismutase (SOD) observados no GA. Entretanto, não previne a redução dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). O AL em diferentes doses também preveniu o infiltrado inflamatório e aumento do depósito da matriz extracelular no parênquima pulmonar, assim como o aumento da expressão de α -actina do músculo liso e da ROCK1. Portanto, esses dados sugerem que o ácido láurico exerce efeito preventivo nas alterações morfofuncionais promovidas pela asma nas vias aéreas de ratos Wistar por modular negativamente a sinalização mediada pelas COXs, NOS, RhoA-ROCK, TGF- β e as espécies reativas de oxigênio, podendo, portanto, atuar como um adjuvante no tratamento da asma.

Palavras-chave: ácido láurico, asma, reatividade traqueal, ventilação pulmonar, estresse oxidativo.

Abstract

Lauric acid (LA) is a medium-chain saturated fatty acid and the major component of virgin coconut oil, which, in turn, has already shown a preventive effect on changes induced by asthma in animals. This study aimed to evaluate morphofunctional effects of LA in an ovalbumin (OVA)-induced asthma model in Wistar rats. Experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee of UFPB (No. 9310040522). Rats were randomly divided for toxicological analyses into the control group (CG) and the group treated with 100 mg/kg/day of LA (LA100G), each consisting of 5 males and 5 females. For the other experimental protocols ($n = 5-6$), the rats were divided into CG, asthmatic group (AG), asthmatic groups treated with LA at 25 mg/kg (ALA25G), 50 mg/kg (ALA50G), and 100 mg/kg (ALA100G), or dexamethasone at 5 mg/kg (ADEXAG). In the evaluation of repeated dose toxicity, LA at 100 mg/kg/day did not promote any signs of toxicity. In the analysis of asthma-induced changes, minute volume was quantified using plethysmography, revealing that LA (25 mg/kg) prevented the reduction of this parameter observed in AG. In the assessment of tracheal responsiveness, AG animals previously sensitized with OVA exhibited increased contractile reactivity to this allergen *in vitro*, an effect partially prevented by LA (25, 50 and 100 mg/kg) and dexamethasone. Electromechanical pathways of contraction and relaxation do not seem to be involved in airway hyperresponsiveness in this asthma model. Conversely, in the evaluation of pharmacomechanical coupling of contraction, all groups treated with LA and dexamethasone prevented the increase in contractile efficacy to carbachol observed in the AG. In the evaluation of the involvement of pharmacomechanical coupling in relaxation, the groups treated with LA also prevented the reduction in the relaxing capacity of aminophylline in the AG. *In silico* molecular docking studies also revealed that LA has a good binding affinity for various targets involved in inflammation and airway hyperresponsiveness, as β_2 -adrenergic receptor, Ca_v , BK_{Ca} , K_{ATP} , adenylyl cyclase, PKG, eNOS, iNOS, and COX-2. Furthermore, the characterization of LA's mechanism of action at 25 mg/kg, the lowest effective dose in reducing tracheal hyperresponsiveness, was pursued. It was observed that LA promotes a probable reduction in the production of contractile prostanoids by cyclooxygenase (COX) pathways, as well as a decrease in excessive nitric oxide (NO) production due to a possible increase in nitric oxide synthase (NOS) activity/expression, was observed, along with a potential decrease in superoxide anion production. Additionally, a probable negative modulation of the RhoA-ROCK and TGF- β pathways was evidenced. In the analysis of oxidative stress imbalance and antioxidant defenses in lung homogenate, LA prevented the increase in lipid peroxidation and nitrite levels, as well as the reduction in superoxide dismutase (SOD) activity observed in AG. However, it did not prevent the reduction in reduced glutathione (GSH) levels. LA at different doses also prevented inflammatory infiltration and excessive extracellular matrix deposition in the lung parenchyma, as well as the increase in smooth muscle α -actin and ROCK1 expression. Therefore, these data suggest that lauric acid exerts a preventive effect on the morphofunctional changes caused by asthma in the airways of Wistar rats by negatively modulating the signaling mediated by COXs, NOS, RhoA-ROCK, TGF- β and reactive oxygen species, and may therefore act as an adjuvant in the treatment of asthma.

Keywords: lauric acid, asthma, tracheal reactivity, pulmonary ventilation, oxidative stress.

Lista de figuras

Figura 1 – Estimativa global de casos de asma, por 100 pessoas, em 2021.	36
Figura 2 – Prevalência da asma no Brasil no período de 1990-2021.	38
Figura 3 – Mecanismo imunológico da asma alérgica.	41
Figura 4 – Representação da morfologia do parênquima pulmonar normal (A e C) e com asma (B e D).	44
Figura 5 – Esquema anatômico do sistema respiratório.	47
Figura 6 – Estrutura anatômica da traqueia.	48
Figura 7 – Inervação das vias aéreas.	50
Figura 8 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa das vias aéreas pelo aumento da concentração extracelular de K^+	53
Figura 9 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa das vias aéreas pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC- β_1	54
Figura 10 – Mecanismo de manutenção da contração muscular lisa das vias aéreas pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.	56
Figura 11 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso das vias aéreas induzido pelo aumento de cAMP e cGMP.	59
Figura 12 – Biossíntese dos eicosanoides a partir do ácido araquidônico (AA).	60
Figura 13 – Mecanismo da formação de ERO/ERNs e sistemas antioxidantes na asma alérgica.	67
Figura 14 – Linhas de tratamento da asma de acordo com as características clínicas do paciente e a gravidade da doença. Primeira (A) e segunda abordagem (B).	77
Figura 15 – Estrutura química do ácido láurico.	79
Figura 16 – Câmara pletismográfica de corpo inteiro (A), transdutor diferencial de pressão e o amplificador de sinais (B) e sistema de aquisição digital de dados conectados ao amplificador (C).	87
Figura 17 – Cuba de banho contendo anel de traqueia suspenso (A), sistema de cubas de banho conectados a transdutores de força isométricos e (B) e sistema de aquisição digital de dados conectados ao amplificador (C).	87
Figura 18 – Aparato utilizado para nebulização dos ratos, contendo caixa poliacrílica fechada acoplada a um nebulizador ultrassônico.	91
Figura 19 – Protocolo de indução da asma em ratos.	92

Figura 20 – Mapa conceitual dos principais mecanismos de ação do ácido láurico.	
.....	219

Lista de abreviaturas

[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de cálcio
[K⁺]_e	concentração extracelular do potássio
4Ca²⁺-CaM	complexo 4 íons cálcio-calmodulina
5-HPETE	ácido 5-hidroperoxi-eicotetraenoico
5-LOX	5-lipoxigenase
AA	ácido araquidônico
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
AL	ácido láurico
ALT	alanina aminotransferase
AMP	monofosfato de adenosina
ANOVA	análise de variância
APCs	células apresentadoras de antígeno
AST	aspartato aminotransferase
ATP	trifosfato de adenosina
CaM	calmodulina
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Cav	canais de cálcio dependentes de voltagem
CCh	carbacol
CDs	células dendríticas
CE₅₀	concentração do fármaco que produz 50% do seu E _{max}
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CGRP	peptídio relacionado ao gene da calcitonina
CHCM	concentração da hemoglobina corpuscular média

cNOS	NOS constitutiva
COX	cicloxygenase
CPI-17	peptídio de 17 kDa inibidor de fosfatase ativada por PKC
CRTH2	<i>chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells</i>
CVF	capacidade vital forçada
CXCL-2	ligante 2 da quimiocina
CXCL-3	ligante 3 da quimiocina
CXCL-8	interleucina-8
CysLT	cisteinil leucotrieno
DAG	diacilglicerol
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DP₂	receptor de PGD ₂
e.p.m.	erro padrão da média
ECP	proteína catiônica eosinofílica
EGF	fator de crescimento epidérmico
E_{max}	efeito máximo
eNANC	vias excitatórias da inervação não colinérgica não adrenérgica
eNOS	sintase de óxido nítrico endotelial
EPO	peroxidase eosinofílica
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
FcεRI	receptor de IgE de alta afinidade
FeNO	fração exalada de óxido nítrico
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FR	frequência respiratória

GATA-3	fator de transcrição de ação trans específico de células T tipo 3
GDI	proteína inibidora da dissociação do GDP
GDP	difosfato de guanosina
GEF	fator de troca de nucleotídeo de guanina
G_{i/o}	proteína G _i ou proteína G _o
Gina	<i>Global Initiative of Asthma</i>
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GPR35	receptor acoplado à proteína G35
GPX	glutathione peroxidase
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
GR	glutathione reductase
G_s	proteína G _s
GSH	glutathione reductase
GSSG	dissulfeto de glutathione
GST	glutathione S-transferase
GTP	trifosfato de guanosina
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HCIO	ácido hipocloroso
HCM	hemoglobina corpuscular média
HETE	ácido hidroxi-eicosatetraenoico
HO•	radical hidroxila
HO₂•	radical hidroperóxido
i.p.	via intraperitoneal
IFN-γ	interferon-gama
IgE	imunoglobulina do tipo E
IL	interleucina

ILC	células linfoides inatas
ILC2	células linfoides inatas do grupo 2
iNANC	vias inibitórias da inervação não colinérgica não adrenérgica
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
IP	receptor de PGI ₂
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
LABA	agonista adrenérgico- β de ação longa
LAMA	antimuscarínicos de ação longa
LOX	lipoxigenases
LT	leucotrieno
LTA₄	leucotrieno A ₄
LTB₄	leucotrieno B ₄
LTC₄	leucotrieno C ₄
LTD₄	leucotrieno D ₄
LTE₄	leucotrieno E ₄
LXs	lipoxinas
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno
MBP	proteína básica principal
MDA	malondialdeído
MHC II	complexo principal de histocompatibilidade do tipo II
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
MMP	metaloproteinase de matriz extracelular

MUC	glicoproteína mucina
MYPT1	subunidade regulatória de ligação à miosina da MLCP
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NANC	nervos não-adrenérgico não-colinérgicos
NCX	trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NKA	neurocinina A
NLR	receptor do tipo domínio de oligomerização de nucleotídeos
nNOS	NOS neuronal
NO	óxido nítrico
NO_2^-	nitrito
$\text{NO}_2^\bullet$	dióxido de nitrogênio
NOS	sintase de óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
O_2	oxigênio molecular
$\text{O}_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
O_3	ozônio
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
$\text{ONOO}^\bullet$	peroxinitrito
OVA	ovalbumina
PA	ácido fosfatídico
PA	pressão de vapor d'água à temperatura da câmara;
PB	pressão barométrica
PC	fosfatidilcolina
PDE	fosfodiesterase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas

PG	prostaglandina
PGD₂	prostaglandina D ₂
PGE₂	prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGI₂	prostaciclina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PK	deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase G
PLA₂	fosfolipase A ₂
PLC-β1	fosfolipase C-β1
PLD	fosfolipase D
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
PP1c	subunidade catalítica da MLCP
PT	deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente
rMLC	cadeia leve regulatória da miosina
ROCK	proteína cinase associada à Rho
ROO[•]	radical peroxil
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SABA	agonista adrenérgico-β de ação curta
sCG	ciclase de guanilil solúvel
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
SOD	superóxido dismutase

SP	substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
TA	temperatura do ar dentro da câmara
TC	temperatura corporal
TGF-α	fator de crescimento transformador alfa
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
Th0	linfócito T auxiliar virgem
Th17	linfócito T auxiliar tipo 17
Th2	linfócito T auxiliar tipo 2
TNF	fator de necrose tumoral
TP	receptor de PGF _{2α}
TPα	receptor α de TxA ₂
TPβ	receptor β de TxA ₂
TSLP	linfopoetina do estroma tímico
TxA₂	tromboxano A ₂
UPA	Unidade de Produção Animal
v.o.	via oral
VC	volume corrente
VCM	volume corpuscular médio
VEF1	volume expiratório forçado no primeiro segundo
VK	volume de ar injetado na câmara do animal para calibração
VM	volume minuto
ZIPK	proteína cinase de interação zíper

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

Sumário

1 Introdução	30
2 Fundamentação teórica	33
2.1 Características gerais e classificações da asma	34
2.2 Epidemiologia da asma	36
2.3 Fisiopatologia da asma alérgica	38
2.4 Vias aéreas: anatomia e inervação	47
2.5 Bioquímica da contração e relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas	51
2.6 Estresse oxidativo na asma alérgica	64
2.7 Diagnóstico e tratamento da asma alérgica	70
2.8 Ácido láurico	77
3 Objetivos	81
3.1 Objetivo geral	82
3.2 Objetivos específicos	82
4 Material e métodos	83
4.1 Material	84
4.1.1 Animais	84
4.1.2 Substâncias e reagentes	85
4.1.3 Solução Nutritiva	86
4.1.4 Equipamentos	86
4.2 Métodos	88
4.2.1 Preparação do ácido láurico	88
4.2.2 Grupos experimentais	88
4.2.3 Tratamento dos animais	89
4.2.4 Avaliação da toxicidade de doses repetidas e triagem farmacológica comportamental do ácido láurico em ratos Wistar	89
4.2.4.1 Avaliação ponderal, ingestão alimentar e hídrica e peso de órgãos	90
4.2.4.2 Análise hematológica e bioquímica	90
4.2.5 Avaliação do efeito do ácido láurico na hiper-responsividade das vias aéreas em ratos Wistar	91
4.2.5.1 Indução da asma (sensibilização e desafios com ovalbumina)	91
4.2.5.2 Avaliação da ventilação pulmonar	91
4.2.5.3 Obtenção dos anéis de traqueia	93

4.2.5.4 Avaliação da reatividade contrátil à ovalbumina em traqueia de ratos: reação de Schultz-Dale	94
4.2.5.5 Avaliação da reatividade contrátil ao KCl e ao CCh em traqueia de ratos	94
4.2.5.6 Avaliação da reatividade relaxante ao nifedipino ou à aminofilina em traqueia de rato pré-contráida com CCh	94
4.2.6 Possíveis alvos farmacológicos do ácido láurico <i>in silico</i>	95
4.2.6.1 <i>Docking</i> molecular	95
4.2.7 Investigação do mecanismo de ação envolvido nas alterações induzidas pela asma e pelo tratamento com o ácido láurico sobre a reatividade contrátil da traqueia de ratos	96
4.2.7.1 Avaliação da participação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico pelas enzimas cicloxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX).....	96
4.2.7.2 Avaliação do envolvimento da via do NO	96
4.2.7.3 Avaliação do envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ROS)	96
4.2.7.4 Avaliação do envolvimento da via da Rho cinase (ROCK)	97
4.2.7.5 Avaliação da participação do fator de crescimento transformador β (TGF- β)	97
4.2.8 Avaliação dos efeitos da asma alérgica e do tratamento com o ácido láurico sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes	97
4.2.8.1 Obtenção do homogenato pulmonar	97
4.2.8.2 Determinação do nível de peroxidação lipídica	98
4.2.8.3 Determinação de nitrito	98
4.2.8.4 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida	98
4.2.8.5 Determinação da atividade da superóxido dismutase	99
4.2.9 Avaliação dos efeitos da asma alérgica e do tratamento com o ácido láurico sobre a anatomopatologia do parênquima pulmonar	99
4.2.10 Análise estatística	100
5 Resultados e discussão	101
5.1 Artigo 1	102
5.1.1 Material suplementar	136
5.2 Artigo 2	159
5.3 Artigo 3	194
6 Conclusões	218
Referências	220

Apêndices	252
Apêndice A – Artigo publicado na <i>Scientific Reports</i> (FI: 3.8 e Qualis A1 para Farmácia).	253
Apêndice B – Artigo publicado na <i>Frontiers in Pharmacology</i> (FI: 4.4 e Qualis A2 para Farmácia).	254
Apêndice C – Artigo publicado na <i>Pharmaceuticals</i> (FI: 4.3 e Qualis A1 para Farmácia).	255
Anexos	256
Anexo 1 – Certificado de aprovação do projeto junto à CEUA.	257

1 Introdução

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada pela ação conjunta de células do sistema imune inato, adaptativo e células epiteliais, resultando em hiper-responsividade, aumento da produção de muco, remodelamento tecidual e estreitamento do lúmen das vias aéreas (Hammad; Lambrecht, 2021). É responsável por afetar mais de 300 milhões de indivíduos mundialmente, com taxas de prevalência variando de 1 a 29% da população em diferentes países (Gina, 2024).

Caracterizada como uma doença heterogênea, a asma é classificada em fenótipos com base em características clínicas, gravidade, resposta ao tratamento e comorbidades, visando uma abordagem mais precisa e maior compreensão da sua diversidade. Segundo a *Global Initiative for Asthma* (2024), os fenótipos incluem asma alérgica, não alérgica, de tosse predominante, tardia, persistente com limitação do fluxo aéreo e associada à obesidade (Gina, 2024).

Contudo, devido à sobreposição de sintomas, os endótipos, definidos por mecanismos fisiopatológicos e biomarcadores, complementam essa classificação. Os endótipos dividem-se em *Th2-low* e *Th2-high*, com base na presença ou ausência da resposta inflamatória de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2). Todavia, apenas o último é um endótipo bem definido proposto para a asma alérgica, uma vez que o perfil *Th2-low* engloba diferentes mecanismos imunológicos (Fahy, 2015).

A asma alérgica tende a começar na infância e está associada à respostas imunológicas dos linfócitos Th2, sendo caracterizada por inflamação eosinofílica mediada por citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, que são ativadas após contato com alérgenos. Essas citocinas estimulam a produção de IgE, promovendo a degranulação de mastócitos, basófilos e eosinófilos, o que leva à broncoconstrição, edema e hipersecreção de muco. Além disso, a hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas e a infiltração de células inflamatórias exacerbam a hiper-responsividade das vias aéreas, resultando em obstrução persistente e inflamação crônica (Lambrecht; Hammad; Fahy, 2019; Syabbalo, 2020; Rupani *et al.*, 2021).

Uma alternativa promissora para o tratamento da asma é o ácido láurico (AL), um ácido graxo de cadeia média presente em diversos óleos vegetais, como o óleo de coco virgem (*Cocos nucifera* L.), que apresenta o AL como um composto majoritário em sua composição, representando 45,1-53,2% do total de ácidos graxos contidos no óleo de coco virgem (Codex Alimentarius Commission, 2005).

Isto posto, uma vez que há relatos de que o óleo de coco virgem reverte as alterações de hiper-reatividade do músculo liso traqueal, a inflamação pulmonar e o

remodelamento tecidual ocasionados pela indução da asma em animais (Kamalaldin *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2020), e este produto apresenta como componente majoritário o AL, que apresentou efeito relaxante em modelos de músculo liso (Alves *et al.*, 2017; Olubiyi *et al.*, 2022) e atividade anti-inflamatória (Dubó *et al.*, 2019) e antioxidante (Augustine *et al.*, 2022), levantou-se a hipótese de que este ácido graxo poderia ser o responsável pelos efeitos promovidos pelo óleo de coco virgem.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do ácido láurico sobre a reatividade do músculo liso traqueal, o desbalanço do estresse oxidativo, a inflamação e o remodelamento pulmonar em modelo de asma alérgica em ratos Wistar, caracterizando possíveis mecanismos de ação *in silico* e *in vitro*, contribuindo para a descoberta de potenciais adjuvantes para o tratamento da asma.

2 Fundamentação teórica

2.1 Características gerais e classificações da asma

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela hiper-responsividade das vias aéreas, graus variáveis de obstrução ao fluxo aéreo e inflamação pulmonar, com indivíduos apresentando sintomas respiratórios variáveis, como sibilos, dispneia, opressão torácica, tosse e limitação do fluxo aéreo expiratório (Gina, 2024).

O desenvolvimento da asma está associado a várias comorbidades e fatores de risco, como a exposição a alérgenos, irritantes ou à poluição atmosférica, fungos do gênero *Aspergillus*, mudanças no clima, infecções respiratórias, rinossinusite, tabagismo, exercícios físicos, obesidade, estresse e o uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (Kuruvilla *et al.*, 2019; Bellou; Gogali; Kostikas, 2022; Chatkin; Correa; Santos, 2022).

Historicamente, apenas duas formas principais de asma foram identificadas: asma alérgica e não alérgica. Ao se observar o curso da doença e as características clínicas da asma, revelou-se que esta é uma doença heterogênea, caracterizada por diferenças específicas do paciente na idade de início, fatores de risco associados e graus de gravidade, comorbidade e resposta ao tratamento (Wu *et al.*, 2019).

Nesse contexto, reconhecendo a heterogeneidade da doença, a asma é classificada em fenótipos, em que se padroniza um conjunto de respostas clínicas, padrão temporal, gravidade, duração, controle sintomático, resposta ao tratamento e presença de comorbidades (Popović-Grle *et al.*, 2021). A fenotipagem da asma é necessária para uma abordagem mais precisa do paciente e uma melhor compreensão de sua diversidade (Fajt; Wenzel, 2015). Ainda não se tem um consenso sobre a classificação fenotípica e diferentes tipos de asma são observados. De acordo com a *Global Initiative for Asthma* (Gina, 2024), os fenótipos da asma são descritos em seis tipos distintos:

1. Asma alérgica: comumente se manifesta na infância e é caracterizada por inflamação eosinofílica das vias aéreas com aumento de imunoglobulina E (IgE).
2. Não alérgica: apresenta perfil inflamatório neutrofílico ou eosinofílico.
3. Asma de tosse predominante e variante: a tosse é o único sintoma da asma. Alguns pacientes podem desenvolver sibilância e responsividade ao broncodilatador.

4. Asma tardia: é mais comum em mulheres e a doença se manifesta apenas na idade adulta, com um perfil que tende a ser não alérgico.
5. Asma persistente e com limitação do fluxo aéreo: pode ser desenvolvida por pacientes que já possuem asma há anos, e é caracterizada por exacerbações asmáticas e dificuldades respiratórias persistentes que não são facilmente reversíveis.
6. Asma com obesidade: alguns pacientes obesos e asmáticos possuem piora dos sintomas das doenças e apresentam um perfil inflamatório neutrofílico e pouco eosinofílico.

Apenas características observáveis não são suficientes, devido a muitos sintomas sobrepostos da doença, então o mecanismo fisiopatológico subjacente na asma é importante. Devido a esses fatos, uma outra classificação também foi desenvolvida com base nos endótipos de asma, que são definidos por mecanismos fisiopatológicos específicos. Enquanto os fenótipos são principalmente explicados e divididos por meio de características observáveis, os endótipos são divididos usando biomarcadores (Popović-Grle *et al.*, 2021).

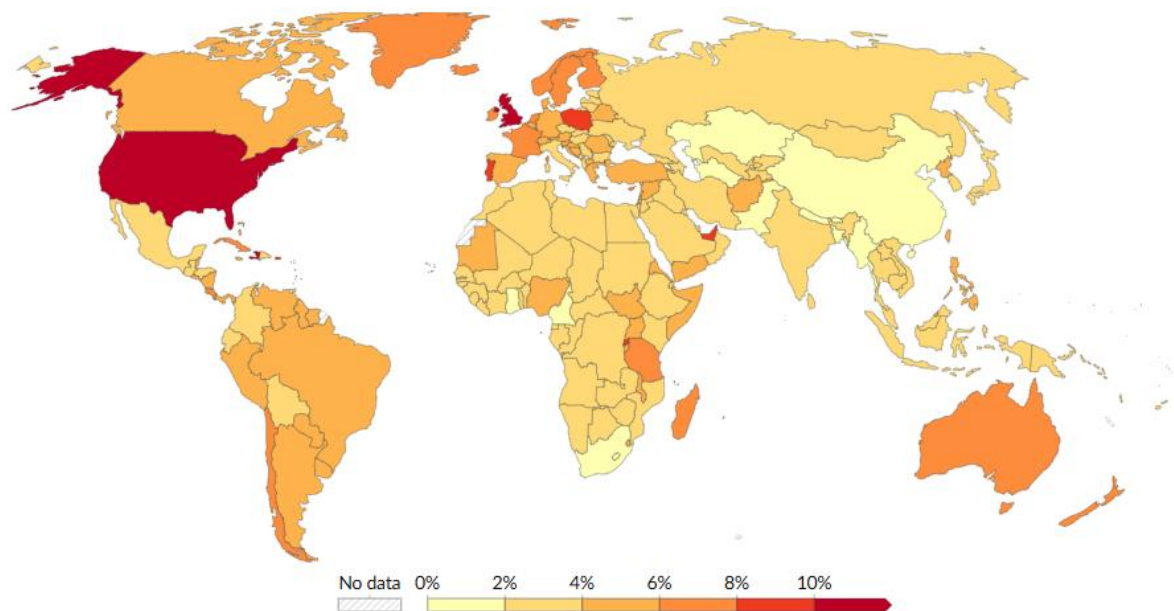
Sendo assim, os endótipos da asma podem ser divididos em dois grupos, com base na presença ou ausência da resposta inflamatória de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2): tipo T2 alto (Th2-*high*) e não T2 alto (Th2-*low*). Asma tipo T2 alto é característica dos endótipos de início precoce, como a asma alérgica, a induzida por exercício e por ácido acetilsalicílico (AAS) e a relacionada à menopausa. Já na asma não T2 alto destacam-se os endótipos: asma associada à obesidade, a neutrofílica associada ao tabagismo e a paucigranulocítica, com inflamação resultante da ativação de células Th1 e/ou Th17 e liberação de suas citocinas específicas, como interferon- γ (IFN- γ), IL-17, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12 (Holgate *et al.*, 2019; Syabbalo, 2020; Huang; Pansare, 2021).

Já o endotipo tipo T2 alto é essencialmente eosinofílico e orquestrado por citocinas associadas ao perfil Th2, produzidas após o contato do alérgeno. Destas, as alarminas IL-25, IL-33 e a linfopoietina estromal do timo (TSLP) são liberadas pelas células epiteliais das vias aéreas e atuam em células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), ativando-as e produzindo as citocinas clássicas IL-4, IL-13 e IL-5 (Rupani *et al.*, 2021; Bourdin *et al.*, 2024).

2.2 Epidemiologia da asma

A asma é responsável por afetar mais de 300 milhões de indivíduos mundialmente, com taxas de prevalência variando de 1 a 29% da população em diferentes países (Gina, 2024). Segundo estimativas levantadas para o *Global Burden of Disease* (GBD), em 2019, houve um predomínio de aproximadamente 262 milhões de casos e 461 mil mortes em decorrência da asma (WHO, 2024). A Figura 1 destaca a prevalência global da asma, por 100 pessoas, em 2021.

Figura 1 – Estimativa global de casos de asma, por 100 pessoas, em 2021.



Fonte: IHME, *Global Burden of Disease* (2024).

A asma é considerada a doença respiratória crônica não transmissível mais comum, com grandes consequências para a saúde pública em nível global. Os impactos negativos causados por esta desordem respiratória são relatados mais comumente entre crianças e adultos jovens, destacando-se como a doença crônica mais comum nessa faixa etária. Além disso, a maioria das mortes relacionadas à asma ocorre em países de renda baixa e média-baixa, onde o subdiagnóstico e o subtratamento são um desafio (WHO, 2024).

Um estudo recente revelou que a prevalência de asma no Brasil é de 4,7% em adultos e 12,1% em crianças. Embora a maioria dos casos seja controlável com tratamento farmacológico convencional, cerca de 10% dos pacientes apresentam

asma grave e requerem tratamento adicional. A asma grave está associada a um aumento significativo da morbidade e da mortalidade, além de variações na saúde psicológica e no *status* socioeconômico dos pacientes (Forno *et al.*, 2022).

No Brasil, a asma grave e não controlada corresponde a aproximadamente 60% dos custos totais com a doença, podendo ser até 10 vezes superiores aos gastos com pacientes que apresentam a forma leve da doença. Ademais, 71,5% da população utiliza o sistema público de saúde, que oferece serviços em todos os níveis de atendimento. Considerando o número de pessoas com asma no país, essa doença gera altos custos para o governo, sendo estimado cerca de 200 milhões de reais de despesas entre os anos de 2019-2024 (Pizzichini *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2024; Teixeira *et al.*, 2024).

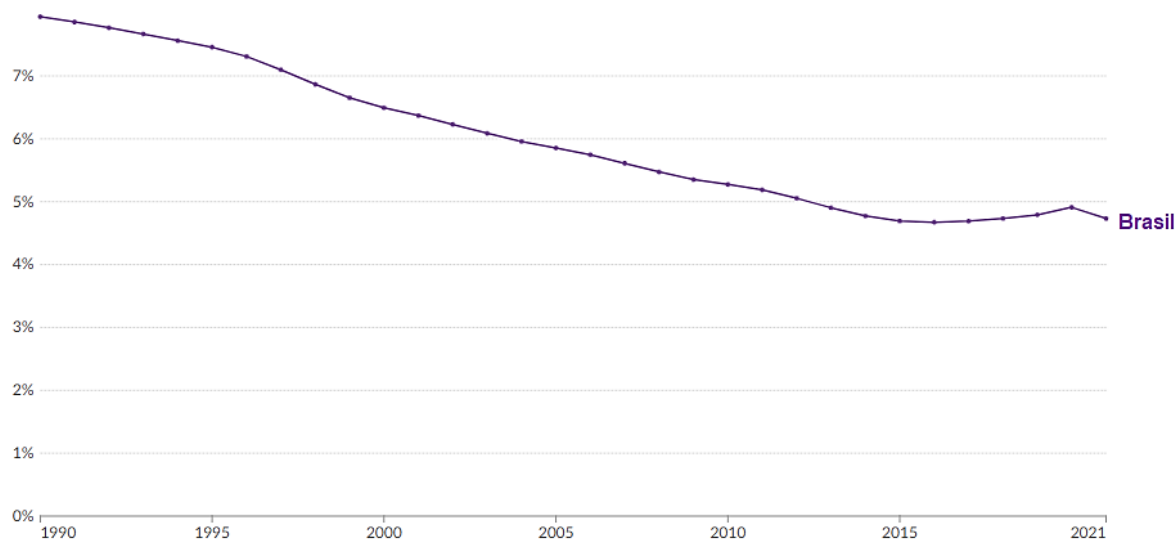
Apesar dos avanços nos serviços públicos de saúde e a maior disponibilidade de medicamentos para o tratamento da doença, a taxa de mortalidade por asma ainda é alta. De acordo com os dados de mortalidade por asma do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) do Ministério da Saúde do Brasil para o período entre 2014 e 2021, o país registrou 18.584 óbitos por asma, com uma prevalência média de 1,16 por 100 mil habitantes por ano. Observou-se também um aumento de 14% nos óbitos durante esse período, com destaque para a região Nordeste (Brum *et al.*, 2024).

A taxa de hospitalizações pode servir como um indicador dos impactos da doença sobre a população e, indiretamente, como indicador do nível de controle. A asma se destaca como a quarta maior causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2019). Mais recentemente, de acordo com o DATASUS, até outubro de 2024, 57.810 internações foram relatadas em decorrência desta doença no Brasil. Destas, aproximadamente 35% do total de casos (20.076) ocorreram na região Nordeste (Brasil, 2024b).

Felizmente, com a melhor compreensão da doença por parte dos portadores e a distribuição de medicamentos para os pacientes asmáticos, vem-se observando uma queda no número de casos por asma no Brasil. A Figura 2 destaca uma redução da prevalência da asma no Brasil entre os anos de 1990-2021. Estes dados refletem a influência de programas que fornecem medicamentos gratuitos para asma no Brasil durante esse período. As políticas públicas de saúde para pacientes asmáticos focam na atenção básica, com as Unidades de Saúde da Família (USFs) fornecendo

diagnóstico, acompanhamento médico e medicamentos essenciais de forma gratuita (Costa *et al.*, 2016; Brasil, 2024a).

Figura 2 – Prevalência da asma no Brasil no período de 1990-2021.



Fonte: IHME, *Global Burden of Disease* (2024).

Apesar disso, fica claro que a asma causa um impacto econômico substancial, tendo em vista que indivíduos com asma não controlada enfrentam frequentemente distúrbios de sono, fadiga diurna e dificuldades de concentração. Além disso, tanto os pacientes como suas famílias podem ter absenteísmo na escola ou no trabalho, gerando consequências financeiras significativas para o núcleo familiar (WHO, 2024).

Embora tenha ocorrido avanços na redução dos casos de asma no Brasil e em outros países, essa condição ainda afeta uma parcela significativa da população, contribuindo consideravelmente com internações, altos custos para o sistema público de saúde e casos de mortalidade. Portanto, é fundamental realizar estudos que aprofundem a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da asma, além de explorar novas opções de tratamento e abordagens complementares, minimizando o impacto da doença sobre os indivíduos acometidos.

2.3 Fisiopatologia da asma alérgica

A asma é uma doença caracterizada principalmente pela obstrução das vias aéreas, causada pela redução do seu diâmetro, resultante de uma inflamação crônica

que envolve a infiltração e ativação de diversas células imunológicas, como as células dendríticas (CDs), eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, células linfoides inatas (ILCs) e mastócitos (Dunican *et al.*, 2018).

A interação complexa entre essas e outras células da imunidade inata, como as células epiteliais, desencadeia características típicas da doença, como a hiper-responsividade das vias aéreas. Nos casos de asma grave, outros mecanismos, como o remodelamento tecidual, também desempenham um papel central na progressão da doença, e incluem alterações como hiperplasia do músculo liso, metaplasia de células caliciformes e deposição excessiva de colágeno subepitelial (Hammad; Lambrecht, 2021).

A asma alérgica tende a começar na infância e está associada a respostas imunológicas dos linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2). Esta forma de asma é induzida no início da vida, geralmente, por contatos com alérgenos ambientais, como ácaros, pólen, barata ou pelos de animais, mas também pode ser induzida de forma tardia, na presença de um novo tipo de alérgeno (Lambrecht; Hammad; Fahy, 2019).

O epitélio das vias aéreas não atua somente como uma barreira física impedindo que os alérgenos penetrem na superfície da mucosa, mas também é altamente ativo no reconhecimento desses alérgenos e no início de respostas imunes inatas. Em resposta ao contato com os alérgenos, estes são detectados pelo epitélio respiratório por meio de um conjunto diverso de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os do tipo *Toll* (TLRs), os do tipo induzíveis pelo ácido retinoico (RLRs), os do tipo domínio de oligomerização de nucleotídeos (tipo NOD ou NLRs), os receptores de lectina tipo C (CLRs) e os receptores ativados por proteases (PARs) (Calvén *et al.*, 2020).

Após a ativação desses receptores, as células epiteliais das vias aéreas liberam várias citocinas inflamatórias, chamadas de alarminas, como a linfopoietina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 (Figura 3). Estas apresentam papéis críticos na patogênese da asma, ativando uma variedade de células, principalmente as CDs e as ILCs (Kouzaki *et al.*, 2009; Kouzaki *et al.*, 2013; Hristova *et al.*, 2016).

A TSLP se liga a um complexo receptor heterodimérico composto pelo receptor TSLP (TSLPR) e pela cadeia IL-7R α . O amplo efeito da TSLP na resposta imune nas vias aéreas é refletido pelos vários tipos de células que expressam o TSLPR, incluindo muitas células do sistema hematopoiético, mas também células musculares lisas das vias aéreas (Zhang; Zhou, 2012; Ziegler *et al.*, 2013).

O papel da TSLP na asma e na inflamação alérgica foi extensivamente investigado. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma ligação entre a expressão da TSLP e a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, que são centrais no desenvolvimento de um fenótipo Th2 na asma (Ito *et al.*, 2005; Omori; Ziegler, 2007; Halim *et al.*, 2012; Nagarkar *et al.*, 2012). A TSLP também pode ativar mastócitos, eosinófilos e ILC2 (Whetstone *et al.*, 2022).

A IL-33 é um membro da família de citocinas IL-1, expressa constitutivamente por células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas das vias aéreas e células epiteliais (Whetstone *et al.*, 2022). Essa citocina se liga a um receptor heterodimérico formado pelo receptor do tipo 1 de IL-1 (IL1RL1, também conhecido como ST2) e pela proteína acessória do receptor IL-1, o que leva à ativação das vias de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB) e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (Palmer *et al.*, 2008). A função mais estabelecida da IL-33 é a ativação de células que expressam seu receptor, como ILC2, células Th2, mastócitos, eosinófilos, basófilos e CDs (Rank *et al.*, 2009; Besnard *et al.*, 2011; Blom *et al.*, 2012; Barlow *et al.*, 2013).

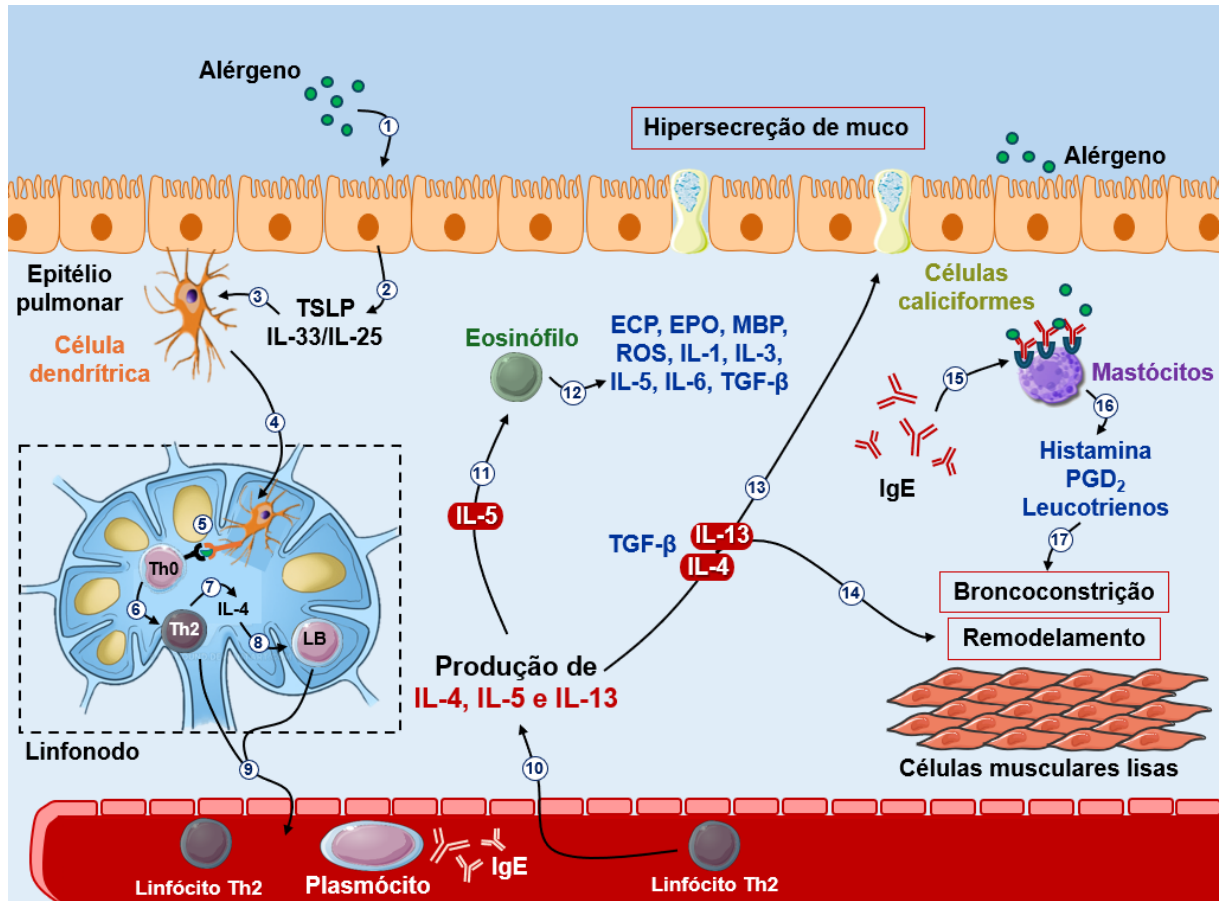
A IL-25 é um membro da família de citocinas IL-17. Mas, diferentemente de outros membros (IL-17A ou IL-17F), que estão envolvidos na inflamação neutrofílica e na resposta Th1, a IL-25 promove a resposta imune Th2 (Whetstone *et al.*, 2022). É armazenada como uma citocina pré-formada no citoplasma e é liberada após exposição a alérgenos. O receptor de IL-25, um heterodímero de IL-17RA/IL-17RB, é expresso em células Th2, ILC2, CDs, eosinófilos e mastócitos (Gauvreau *et al.*, 2023).

Essas alarminas (TSLP, IL-33 e IL-25) ativam as ILC2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-13, além de estimularem as células dendríticas, principais células apresentadoras de antígeno (APCs), a migrarem do pulmão para os linfonodos. Nesses locais, as CDs ativam as células T virgens (Th0) e estimulam sua diferenciação no perfil Th2, via complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC II) (Lambrecht; Hammad; Fahy, 2019; Hammad; Lambrecht, 2021) (Figura 3).

Dentre as citocinas do perfil Th2, a IL-4 tem como uma das principais funções a estimulação do desenvolvimento da própria resposta Th2 ativando o fator de transcrição STAT6 que, aliado aos sinais emitidos pelo receptor da célula T (TCR), induz expressão do fator de transcrição de ação trans específico de células T tipo 3 (GATA-3). Este, por sua vez, é um fator de transcrição que estimula a expressão dos genes das citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Garn; Renz, 2017). Além disso, a IL-4, juntamente com a IL-13, estimulam a diferenciação das células B em

plasmócitos, induzindo a troca de isotipo da cadeia pesada de imunoglobulina (Ig) para IgE (Galli; Tsai, 2012; Gowthaman *et al.*, 2019; Hoof *et al.*, 2020).

Figura 3 – Mecanismo imunológico da asma alérgica.



(1) Na presença do alérgeno, (2) ocorre a liberação de citocinas pelo epitélio, como TSLP, IL-25 e IL-33. (3) Estas citocinas ativam células dendríticas, (4) que migram para os linfonodos locais, (5) e por meio da apresentação de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC II), (6) estimulam as células T virgens (Th0) para se diferenciarem no perfil Th2. Esses linfócitos Th2 migram para as zonas de células B, (7) onde secretam IL-4, (8) que estimulam a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE. (9) Após estes processos, os linfócitos Th2 e os plasmócitos caem na corrente sanguínea, migrando para o pulmão. (10) As células Th2 liberam citocinas do seu perfil (IL-4, IL-5 e IL-13). (11) A IL-5 promove o recrutamento de eosinófilos. (12) Estas células liberam diversos mediadores que contribuem para inflamação das vias aéreas. (13) Dentre eles, o TGF-β, que juntamente com IL-4 e IL-13 contribuem para metaplasia de células caliciformes e consequente hipersecreção de muco, (14) além de contribuírem para hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, resultando no remodelamento das vias aéreas. (15) Os plasmócitos secretam IgE, que se liga a receptores específicos, FcεRI, em mastócitos, sensibilizando-os. (16) Em contatos subsequentes com o alérgeno, ocorre a sua ligação ao complexo IgE-receptor, provocando a degranulação dos mastócitos e a liberação de mediadores inflamatórios e contráteis, como leucotrienos, PGD₂ e histamina. (17) Todos esses fatores culminam na broncoconstrição e na hiperresponsividade das vias aéreas.

Fonte: adaptado de Figueiredo *et al.* (2023).

A ligação da IgE ao seu receptor específico, o FcεRI (receptor de IgE de alta afinidade), na membrana de mastócitos e basófilos, resulta na sensibilização alérgica, que marca o primeiro contato do indivíduo com o alérgeno (Liu *et al.*, 2024). Uma vez sensibilizado, a exposição adicional das vias aéreas ao alérgeno leva à ligação cruzada de IgE ligada à membrana dessas células, induzindo a degranulação celular e a liberação de histamina e proteases neutras, como a triptase, citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, IL-9, além de mediadores lipídicos, como os cisteinil leucotrienos (CysLT) e prostaglandina D₂. Esses mediadores inflamatórios aumentam a permeabilidade vascular e causam hiperprodução de muco pelas células caliciformes e broncoconstrição, características da fase aguda da asma alérgica (Ando; Kitauro, 2021).

IL-4 e IL-13 ao se ligarem ao receptor tipo II (IL-4Rα/IL-13Rα1) em células estruturais das vias aéreas, induzem metaplasia de células caliciformes, favorecendo a hipersecreção de muco, hiperplasia e/ou hipertrofia das células musculares lisas, aumento da deposição de colágeno e de proteínas da matriz extracelular, contribuindo para hiper-responsividade das vias aéreas, culminando em uma obstrução persistente do fluxo aéreo nos pacientes asmáticos (Doran *et al.*, 2017; Rupani *et al.*, 2021). Essas citocinas também estimulam a secreção de quimiocinas, incluindo CCL11 (eotaxina-1), CCL24 (eotaxina-2) e CCL26 (eotaxina-3), que auxiliam no recrutamento de eosinófilos (Gour; Wills-Karp, 2015; Gohal *et al.*, 2024).

Também, as células Th2 migram para o epitélio das vias aéreas e para a camada submucosa, onde secretam IL-5 e IL-13 para mediar a resposta inflamatória, com acúmulo de mastócitos e eosinófilos (McCracken *et al.*, 2017). A IL-5 é a principal responsável pela maturação na medula óssea, ativação, proliferação e sobrevivência dos eosinófilos no pulmão (McBrien; Menzies-Gow, 2017). Essa citocina atua em suas células-alvo por meio da interação com o receptor de IL-5, um heterodímero complexo que consiste em duas subunidades: IL-5Rα e IL-5Rβ (Dougan *et al.*, 2019).

Os eosinófilos exercem seus efeitos imunomoduladores e pró-inflamatórios gerando danos às células estruturais das vias aéreas através da liberação de proteínas granulares pró-inflamatórias e citolíticas, como a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a peroxidase eosinofílica (EPO), a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), a proteína básica principal (MBP), cisteinil leucotrienos, além de diversas citocinas inflamatórias, como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 (Cañas *et al.*, 2018).

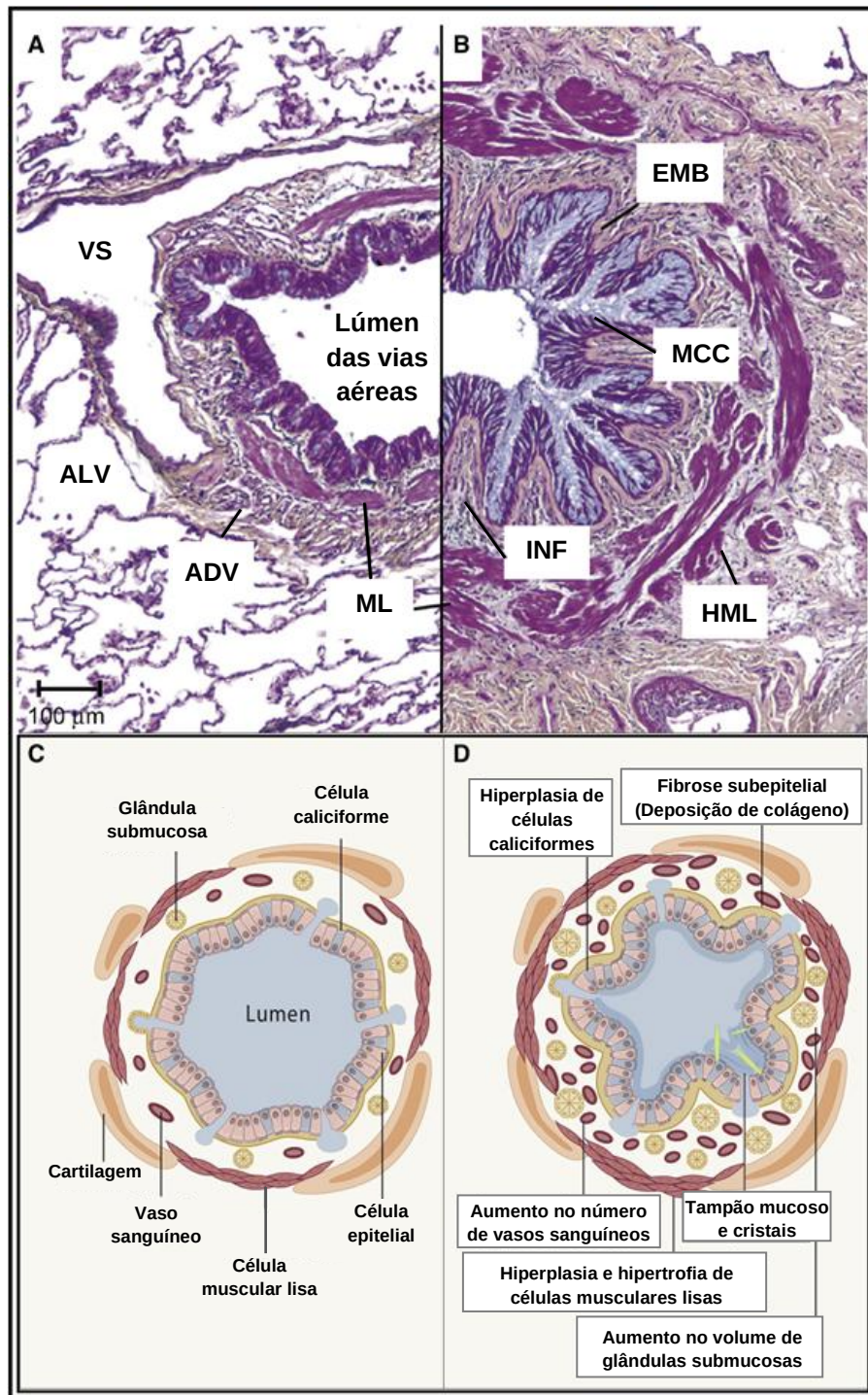
Na asma ocorrem alterações estruturais como o remodelamento (Figura 4), que se refere às mudanças de composição, quantidade, organização dos componentes celulares e moleculares, como genes, fatores de transcrição e quimiocinas que podem alterar a parede das vias aéreas, bem como a deposição excessiva de colágeno tipo I e III (Mauad, 2008; Martire, 2012). Essas alterações ocorrem principalmente nos brônquios primários e, juntamente com o desenvolvimento da doença, envolvem brônquios menores e bronquíolos. O espessamento da parede é a principal característica e envolve o epitélio, a membrana basal, a camada subepitelial e o músculo liso (Guida; Riccio, 2019).

Evidências indicam uma série de anormalidades em vários aspectos da função da barreira epitelial na asma. Parte desse comprometimento é decorrente de uma ruptura da camada epitelial das vias aéreas, que pode facilitar a infiltração de alérgenos inalados e, conseqüentemente, sua interação com células imunes (Xiao *et al.*, 2011; Hackett *et al.*, 2013; Calvén *et al.*, 2020; Frey *et al.*, 2020; Bradding *et al.*, 2024).

Em razão do reparo anormal, a ruptura epitelial leva ao aumento da sua proliferação, contribuindo para o espessamento do epitélio e um aumento da lâmina reticular (ou fibrose subepitelial) (Fehrenbach; Wagner; Wegmann, 2017), acompanhado da metaplasia das células caliciformes e um aumento na área das glândulas mucosas subepiteliais, com regulação positiva da síntese da glicoproteína mucina (MUC) (Ordoñez *et al.*, 2001; Boucherat *et al.*, 2013; Frey *et al.*, 2020).

O espessamento da lâmina reticular, também chamada membrana basal reticular, é uma característica marcante do remodelamento das vias aéreas. Consiste na deposição de proteínas da matriz extracelular, principalmente colágeno I, III e V, fibronectina e proteoglicanos (Burgess, 2009; Busch; Lorenzana; Ryan, 2021). Essas proteínas são produzidas por fibroblastos e miofibroblastos sob o estímulo de células epiteliais. Os miofibroblastos, células especializadas com características fenotípicas de fibroblastos e miócitos, são os principais efetores da fibrose subepitelial (Michalik *et al.*, 2018). Eles expressam a α -actina do músculo liso e são grandes produtores de proteínas da matriz extracelular necessárias para o reparo e remodelamento dos tecidos (Jendzjowsky; Kelly, 2019).

Figura 4 – Representação da morfologia do parênquima pulmonar normal (A e C) e com asma (B e D).



Histologia de um pulmão de um paciente normal (A) e com asma grave (B). Representação esquemática do remodelamento tecidual das vias aéreas normais (C) e asmáticas (D). A permeabilidade do lúmen das vias aéreas é gravemente comprometida no pulmão asmático, com predominância de inflamação e remodelamento das vias aéreas, como espessamento da membrana basal, hipertrofia do músculo liso, metaplasia de células caliciformes e aumento da angiogênese. ALV, alvéolos; ADV, adventícia; VS, vasos sanguíneos; ML, músculo liso; MB: membrana basal; INF: inflamação; MCC: metaplasia de células caliciformes; EMB: espessamento da membrana basal; HML: hipertrofia do músculo liso.

Fonte: adaptado de Lambrecht; Hammad; Fahy, 2019.

A hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas das vias aéreas são características centrais do remodelamento tecidual na asma, contribuindo para o aumento da massa muscular lisa, que é a alteração mais proeminente nesse contexto (Ebina *et al.*, 1993; Camoretti-Mercado; Lockey, 2021). Essas células não apenas aumentam em tamanho e quantidade, mas também são biologicamente ativas, participando da síntese da matriz extracelular, expressando moléculas de adesão celular e receptores em resposta a estímulos, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas provenientes de células epiteliais e inflamatórias. Essas alterações levam ao aumento da contratilidade muscular, que está diretamente ligada à hiper-responsividade brônquica (Berger; Marthan; Tunon de Lara, 2002; Guida; Riccio, 2019).

Uma infinidade de citocinas como o fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) e quimiocinas (CXCL-2, CXCL-3, IL-8/CXCL-8) contribuem direta e indiretamente para o remodelamento das vias aéreas na asma (Batra *et al.*, 2004; Halwani *et al.*, 2011; Kardas *et al.*, 2020).

Em particular, o TGF- β , produzido por células epiteliais, linfócitos, macrófagos e eosinófilos, é o principal responsável pelo remodelamento das vias aéreas ao induzir a transição epitelial-mesenquimal (Hackett, 2012). A IL-4 ativa as células musculares lisas, causando um aumento na síntese de α -actina e colágeno, bem como estimula a liberação de TGF- β pelo epitélio brônquico. A IL-5 promove fibrose subepitelial e peribrônquica por meio do recrutamento e ativação de eosinófilos, uma importante fonte de TGF- β (Dolgachev; Berlin; Lukacs, 2008; Varricchi *et al.*, 2022). Já a IL-13 induz a liberação de TGF- β das células epiteliais brônquicas, o que aumenta a metaplasia para células caliciformes (Marone *et al.*, 2019).

O TGF- β se liga a um complexo heterodimérico de receptores do tipo I (TGF β RI) e tipo II (TGF β RII). Após a ligação e ativação do TGF β RII, a cinase desse receptor fosforila resíduos de serina no TGF β RI no domínio rico em resíduos de glicina e serina. Após a ativação, o TGF β RI fosforila seus substratos, as proteínas Smads, que são translocadas até o receptor. Após a fosforilação das Smad2/3, é criado um sítio de ligação para a Smad4, que se liga à Smad2/3 e este complexo é translocado para o interior do núcleo, onde medeiam a transcrição gênica de proteínas contráteis do músculo liso (Tzavlaki; Moustakas, 2020).

O TGF- β também induz os fibroblastos a expressarem α -actina e assumirem um fenótipo de miofibroblastos, resultando em aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular na lâmina própria, membrana basal reticular e submucosa. A natureza básica e o perfil fenotípico dos fibroblastos asmáticos diferem de suas contrapartes normais, por meio dos quais eles exibem maior capacidade proliferativa (Michalik *et al.*, 2018). Como parte do reparo anormal, o TGF- β induz a expressão e a secreção de proteínas da matriz extracelular (Batra *et al.*, 2004; Kraik *et al.*, 2024).

Ademais, o TGF- β também promove a produção de metaloproteinases (MMPs) que regulam a homeostase da matriz extracelular, clivando proteínas estruturais como as fibras colágenas e elastina. As MMPs 2, 8 e 9, e o TIMP1 e 2 (inibidores teciduais de metaloproteinases) são os mais prevalentes nas vias aéreas de asmáticos. O equilíbrio dinâmico entre as MMPs e seus inibidores é um determinante crítico do remodelamento, de modo que na asma, existe um equilíbrio profibrótico entre os dois (Visse; Nagase, 2003; Kobayashi *et al.*, 2014). Sendo assim, a inflamação persistente das vias aéreas leva a danos contínuos às células estruturais e todos esses fatores contribuem para várias características da asma, incluindo hiper-responsividade e remodelamento tecidual (Drake *et al.*, 2018).

Entre a camada muscular e o parênquima circundante, observa-se um aumento anormal no número e no tamanho dos vasos sanguíneos. Esse processo de angiogênese, mediado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), contribui para o aumento da permeabilidade microvascular, resultando em edema e espessamento das paredes das vias aéreas em pacientes asmáticos. Além disso, os novos vasos sanguíneos facilitam o recrutamento de células inflamatórias para o local (McDonald, 2001; Paľgan; Bartuzi, 2015).

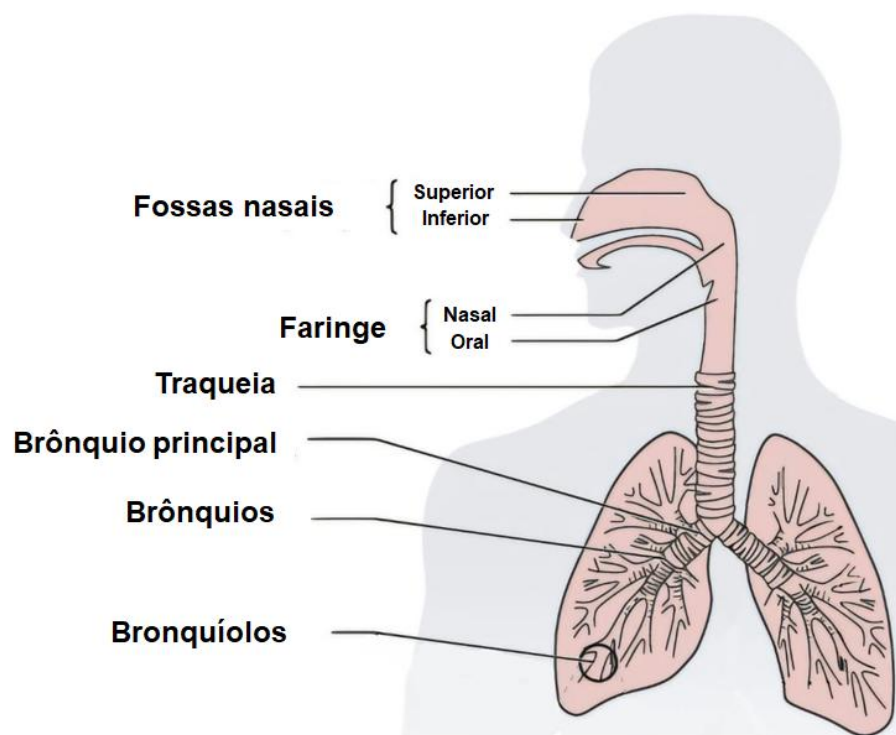
Além disso, alterações sobre a cartilagem também são relatadas, afetando a característica de rigidez e integridade da parede das vias aéreas. A redução do volume da cartilagem e aumento da sua degradação pode resultar em quadro broncoconstritor mais potente (Noble; Turner; Mitchell, 2002).

A avaliação direta do remodelamento das vias aéreas pode ser realizada em biópsias brônquicas em pacientes asmáticos, que identificam informações úteis sobre alterações brônquicas e pulmonares, como espessamento brônquico, infiltração e densidade de células inflamatórias, acúmulo de elementos da matriz extracelular e hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas (Liu *et al.*, 2021).

2.4 Vias aéreas: anatomia e inervação

O sistema respiratório é dividido em trato respiratório superior e inferior, cada um desempenhando funções específicas e complementares. O trato respiratório superior, formado pelas passagens nasais, cavidade oral, laringe e faringe, é responsável por aquecer e umidificar o ar inspirado, além de proteger contra a inalação de corpos estranhos por meio do reflexo da tosse (Figura 5). As passagens nasais desempenham um papel importante ao reter partículas maiores nos pelos nasais e ao garantir que o ar inspirado atinja os pulmões em condições adequadas (Bigatello; Pesenti, 2019; Phyu; Turnbull; Talbot, 2023).

Figura 5 – Esquema anatômico do sistema respiratório.



Fonte: adaptado de Kleinstreuer; Zhang (2010).

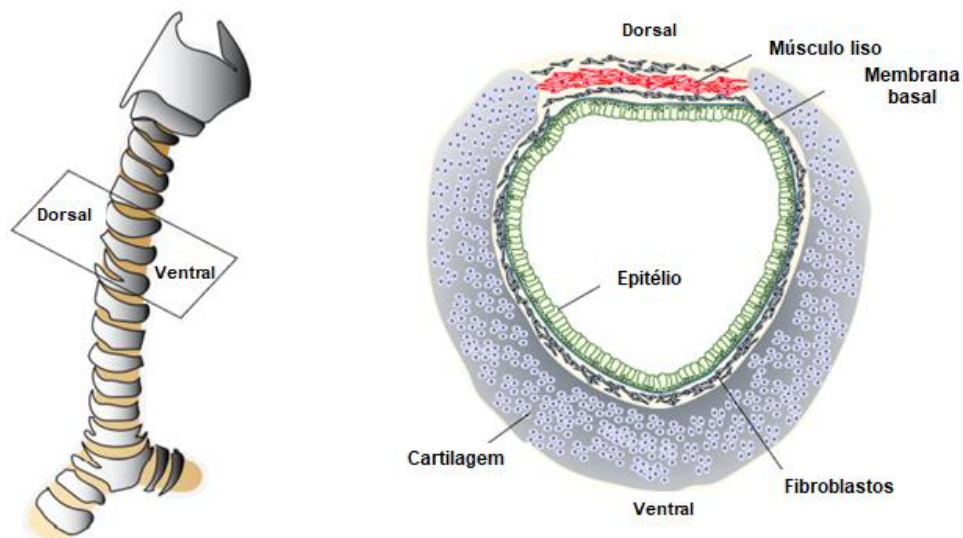
No trato respiratório inferior, que inclui a árvore traqueobrônquica e os alvéolos, ocorre a continuação do processo de depuração por meio do movimento coordenado de cílios que auxiliam na remoção de partículas menores. A árvore traqueobrônquica é composta pela traqueia e 23 gerações de brônquios e bronquíolos ramificados. A troca gasosa, no entanto, ocorre exclusivamente nos bronquíolos respiratórios e nos

alvéolos, que representam as estruturas finais desse sistema. Essa organização garante eficiência na filtração, condução e troca de gases essenciais à respiração (Aung *et al.*, 2019; La Russa *et al.*, 2021; Phyu; Turnbull; Talbot, 2023).

Nesse contexto, a traqueia se destaca como um modelo amplamente utilizado em estudos *in vitro* para investigar os processos de contração e relaxamento das vias aéreas, além de ser um meio que possibilita a avaliação dos mecanismos de ação de substâncias que atuam sobre a musculatura lisa que compõe esse sistema (Sánchez-Recillas *et al.*, 2019; Carroll *et al.*, 2023).

A traqueia é um tubo semiflexível com comprimento entre 10 e 13 cm, localizado após a laringe, que se divide em dois brônquios principais ao alcançar os pulmões. Sua parede é composta por até 20 anéis de cartilagem hialina incompletos, em formato de C, que formam as porções dorsal e ventral (Figura 6). Na parte dorsal, encontra-se uma camada de musculatura lisa, com fibras organizadas de forma transversal e longitudinal (Brand-Saberi; Schäfer, 2014).

Figura 6 – Estrutura anatômica da traqueia.



Fonte: adaptado de Kishimoto; Morimoto (2021).

A homeostase das vias respiratórias ocorre através de uma regulação neuro-hormonal (Figura 7). As fibras nervosas parassimpáticas e a maioria das sensoriais se comunicam com as vias aéreas através do nervo vago. Uma inervação sensorial

se origina dos gânglios da raiz dorsal e, dos segmentos torácicos, se originam os nervos simpáticos espinhais (Belvisi, 2002; Undem; Carr, 2002).

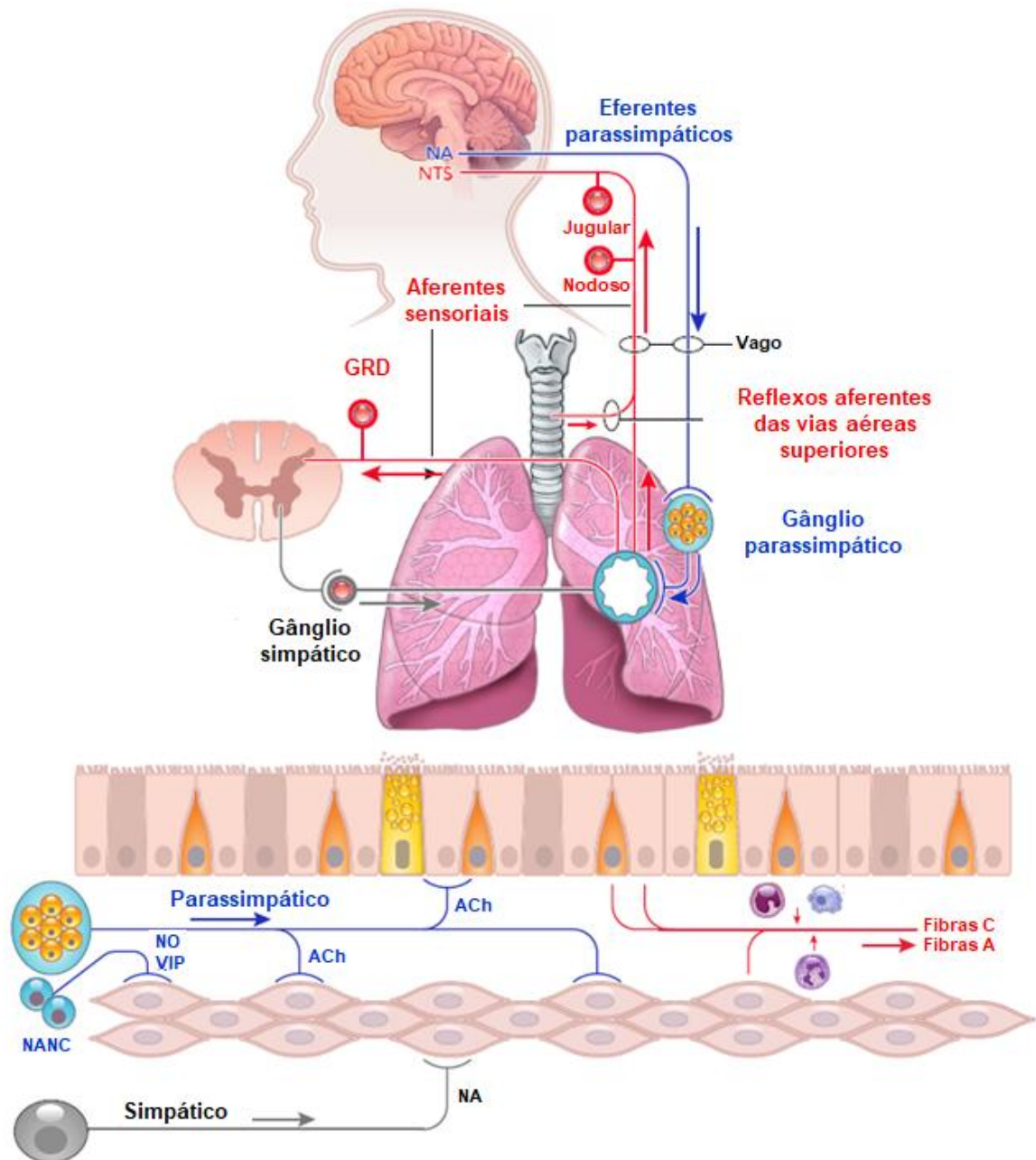
A inervação aferente é derivada dos gânglios vagais nodosos (inferiores) ou jugulares (superiores), com uma pequena proporção proveniente dos gânglios da raiz dorsal torácica (Undem; Carr, 2001). Em geral, considera-se que os nervos aferentes incluem fibras A mielinizadas sensíveis ao estiramento e fibras C amielínicas, essenciais para manutenção da homeostase da função pulmonar, pois detectam forças mecânicas, irritantes inalados e respondem à mediadores inflamatórios (Undem; Kollarik, 2005; La Russa *et al.*, 2021).

Além disso, essas fibras não apenas transmitem estímulos ao sistema nervoso central, mas também podem mediar os reflexos locais das vias aéreas liberando neuropeptídeos, incluindo a substância P (SP), a neurocinina A (NKA) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que regulam a contração do músculo liso das vias aéreas (Verhein *et al.*, 2009; Mazzone, Stuart; Undem, 2016).

As fibras eferentes incluem nervos parassimpáticos, simpáticos e não adrenérgicos não colinérgicos (NANC) (Canning, 2006). Os nervos parassimpáticos derivam principalmente do núcleo do tronco cerebral ambíguo, e fazem sinapse com neurônios intrínsecos das vias aéreas ou gânglios parassimpáticos localizados próximo à árvore brônquica, usam acetilcolina (ACh) como neurotransmissor e inervam as células musculares lisas das vias aéreas e as glândulas mucosas (Lutz; Sulkowski, 2004; Kistemaker; Prakash, 2019).

Os efeitos funcionais da ACh nessas células são mediados por receptores muscarínicos, predominando o subtipo M_2 , acoplado às proteínas $G_{i/o}$, particularmente nas vias aéreas maiores (Gosens; Gross, 2018). Embora as vias aéreas apresentem majoritariamente esse subtipo de receptor, a contração do músculo liso é desempenhada principalmente pela ativação de receptores M_3 , acoplados às proteínas $G_{q/11}$, sendo estes os receptores predominantes que medeiam a secreção de muco espesso nas vias aéreas (Matera *et al.*, 2020).

Os receptores muscarínicos são expressos, além das células musculares lisas, nos fibroblastos, células epiteliais e células inflamatórias (Kistemaker; Gosens, 2015). Portanto, além de contribuir com a hiper-responsividade, a ACh pode estimular a inflamação e o remodelamento das vias aéreas, incluindo hipertrofia do músculo liso e deposição excessiva da matriz extracelular, observados na asma (Vacca; Randerath; Gillissen, 2011; Oenema *et al.*, 2013; Kistemaker *et al.*, 2015).

Figura 7 – Inervação das vias aéreas.

ACh: acetilcolina; GRD: gânglio da raiz dorsal; NA (azul): núcleo do tronco cerebral ambíguo; NA (preto): noradrenalina; NO: óxido nítrico; NTS: núcleo do trato solitário; VIP: peptídeo intestinal vasoativo.

Fonte: adaptado de Kistemaker; Prakash, 2019.

Os nervos simpáticos que inervam o pulmão surgem dos seis segmentos torácicos superiores da medula espinhal e fazem sinapse nos gânglios simpáticos (Belvisi, 2002). Os neurônios pós-ganglionares simpáticos liberam noradrenalina e adrenalina, culminando na redução do tônus muscular liso das vias aéreas. No entanto, a inervação adrenérgica sobre o músculo liso aéreo é escassa, e estudos

funcionais sugerem um papel limitado para os nervos simpáticos na regulação do calibre das vias aéreas. Apesar disso, os receptores adrenérgicos- β_2 , acoplados à proteína G_s , são altamente expressos nas células musculares lisas das vias aéreas humanas (Canning, 2006; Undem; Taylor-Clark, 2014; Kistemaker; Prakash, 2019).

Além disso, a inervação das vias aéreas também inclui o sistema não-adrenérgico não-colinérgico (NANC), que envolve as vias inibitórias (iNANC) e excitatórias (eNANC). Componentes do iNANC incluem substâncias relaxantes, como o peptídeo intestinal vasoativo e o óxido nítrico (NO^*), enquanto os nervos eNANC liberam agentes contráteis, como substância P, trifosfato de adenosina (ATP) e neurocinina A (Kistemaker; Prakash, 2019; Pavón-Romero *et al.*, 2021).

2.5 Bioquímica da contração e relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas

O músculo liso das vias aéreas desempenha papéis funcionais e estruturais importantes ao longo da vida. Sua contração tônica e respostas a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos determinam o calibre das vias aéreas, regulando o fluxo de ar. Esse músculo apresenta tônus intrínseco e contrações adicionais podem ser induzidas em resposta à ACh liberada de nervos parassimpáticos ou a mediadores liberados de outras células, como mastócitos e basófilos. O relaxamento das vias aéreas é, predominantemente, mediado pela adrenalina circulante, embora fatores derivados do epitélio também possam desempenhar esse papel (Lam; Lamanna; Bourke, 2019).

Doenças crônicas das vias aéreas, como asma, estão associadas à desregulação da função do músculo liso das vias aéreas, caracterizadas por uma hiper-responsividade causada pela contração e obstrução exacerbadas com redução no lúmen das vias aéreas e, portanto, uma maior resistência ao fluxo de ar. Adicionalmente à função contrátil, o músculo liso também pode ser uma fonte de mediadores inflamatórios e de proteínas da matriz extracelular, tendo em vista que a hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas contribui para a inflamação, remodelamento e hiper-responsividade na asma (Camoretti-Mercado; Lockety, 2021).

A resposta contrátil das células musculares lisas ocorre em decorrência à elevação da concentração de cálcio citosólica ($[Ca^{2+}]_c$) ocasionada pelo influxo deste íon através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) presentes na membrana plasmática e/ou através da liberação dos estoques intracelulares de cálcio

no retículo sarcoplasmático (RS). Ambas as formas ativam vias bioquímicas que levam à formação de pontes cruzadas e ao desenvolvimento da força contrátil, caracterizando o acoplamento excitação-contração (Du *et al.*, 2021; Ito, 2021). Este acoplamento é normalmente classificado como mecanismos eletromecânico e farmacomecânico de contração (Somlyo; Somlyo, 2003).

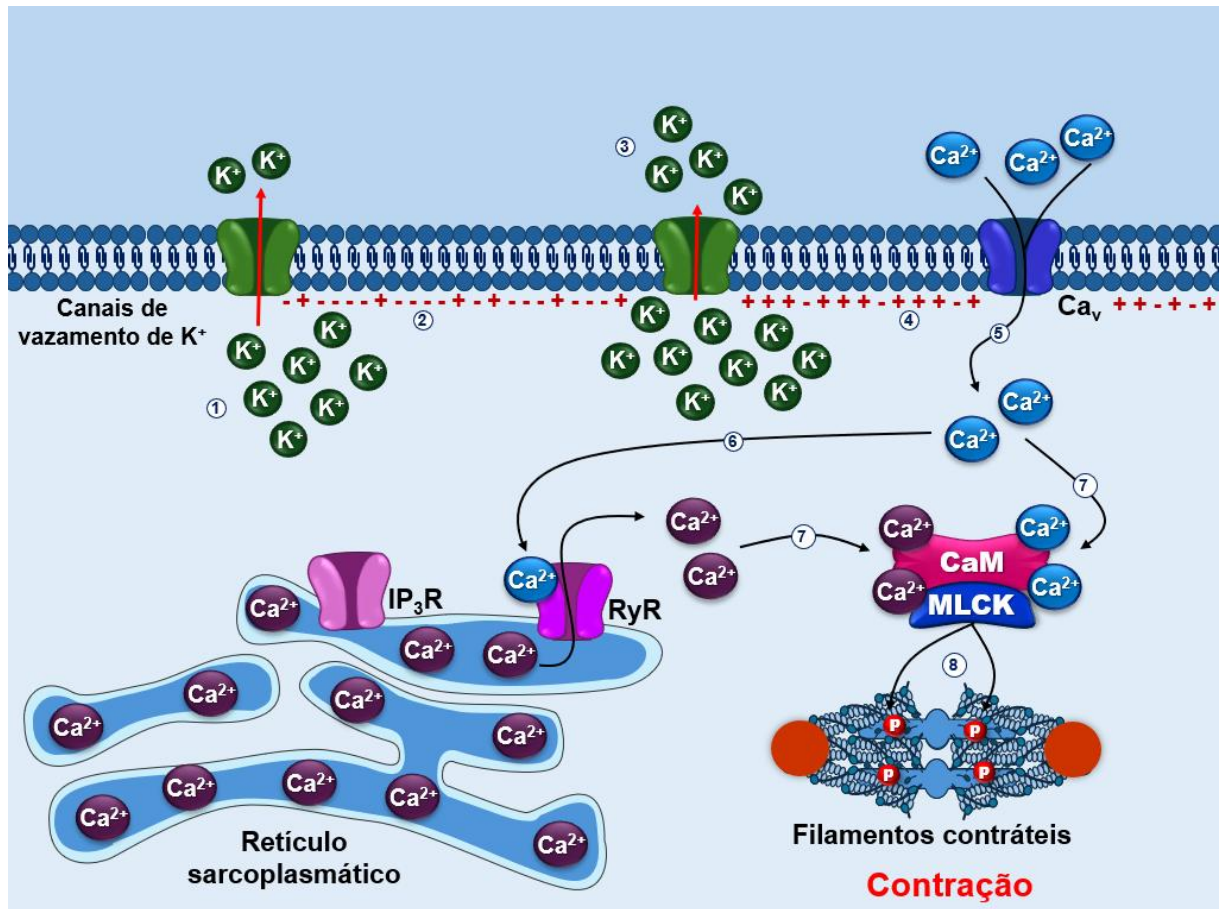
Ao atingirem o limiar de excitação, as células musculares lisas das vias aéreas tornam-se suficientemente despolarizadas, por exemplo, por meio do bloqueio dos canais de K^+ ou pelo aumento da concentração desse íon no meio extracelular ($[K^+]_e$) (Figura 8); nesse último caso, a ferramenta padrão utilizada é a estimulação com cloreto de potássio (KCl), gerando o acúmulo de cargas positivas no interior da célula que estimulam a ativação dos Ca_v e a elevação da $[Ca^{2+}]_c$ (Bolton, 1979; Rembold, 1996).

O aumento da concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) favorece a ligação deste íon à calmodulina (CaM) formando o complexo $4Ca^{2+}$ -calmodulina, que por sua vez, ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), responsável por fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC), mobilizando assim as pontes cruzadas e fazendo com que o filamento de actina deslize ao longo da miosina, gerando uma força de contração que é transmitida em direção ao centro da célula (Ikebe, Hartshorne, Elzinga, 1987; Somlyo; Somlyo, 2000).

Esse aumento da $[Ca^{2+}]_c$ pode também ser ocasionado pela ligação de um agonista ao seu receptor acoplado à proteína G (GPCR) durante o acoplamento farmacomecânico (Figura 9) (Ouedraogo; Roux, 2014). As proteínas G compreendem três subunidades (α , β e γ), e no estado inativo, a subunidade G_α se acopla ao dímero $G_{\beta\gamma}$. A ativação do receptor pelo ligante estimula a troca de difosfato de guanosina (GDP) por trifosfato de guanosina (GTP) na subunidade G_α , e esta, se dissocia do complexo $G_{\beta\gamma}$, ambos sendo capazes de influenciar a atividade de moléculas efetoras nas células (Jiang *et al.*, 2022).

Agonistas como o carbacol (CCh), um análogo sintético da ACh, são potentes estimuladores das contrações do músculo liso por se ligarem aos seus receptores M3, acoplados às proteínas $G_{q/11}$. Após ativação desta proteína, a subunidade G_α ligada ao GTP ativa a fosfolipase C β_1 (PLC β_1), a qual regula a hidrólise do 4,5-bisfosfato de fostatidilinositol (PIP_2) em diacilglicerol (DAG) e em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3). Este último ativa os receptores de IP_3 (IP_3R) presentes membrana do RS, resultando no aumento da $[Ca^{2+}]_c$ (Bai; Edelmann; Sanderson, 2009; Du *et al.*, 2020).

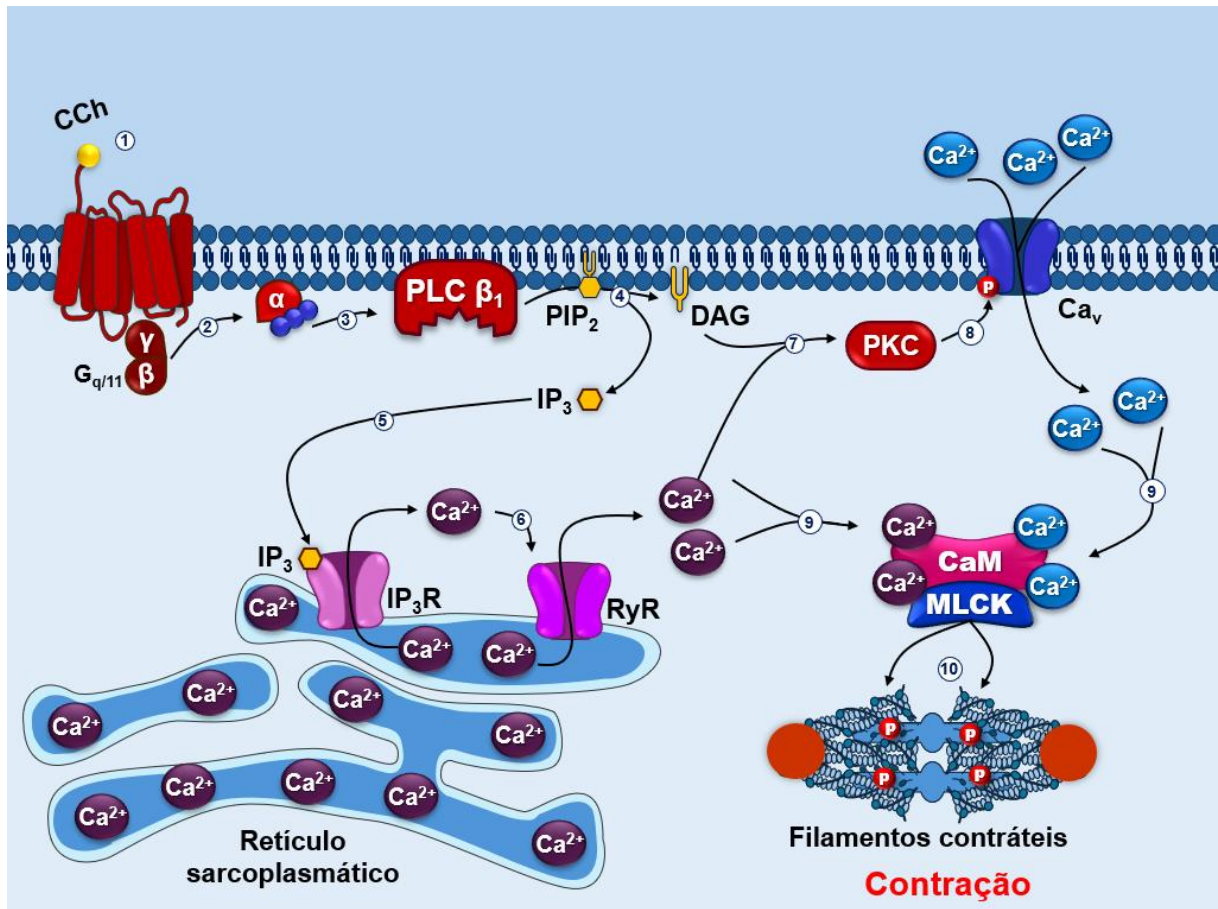
Figura 8 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa das vias aéreas pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



(1) Durante o repouso, o gradiente eletroquímico favorece o efluxo de íons K^+ pelos canais de vazamento, (2) deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; (3) um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, (4) levando ao acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; (5) a membrana despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} ; (6) o Ca^{2+} ativa o RyR, fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (7) o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a sua afinidade pela CaM, formando o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM e ativando a MLCK; (8) a MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2025.

Figura 9 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa das vias aéreas pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ -PLC- β_1 .



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) as proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $PLC\beta_1$; (4) a $PLC\beta_1$ cliva o fosfolípido de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (5) o IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando o Ca^{2+} dos estoques; (6) o Ca^{2+} liberado ativa o RyR , fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (7) o Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) a PKC ativada fosforila os Ca_v promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; (9) o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM e ativando a MLCK; (10) a MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2025.

Além disso, outro mecanismo de liberação de cálcio é mediado por receptores de rianodina (RyR), também presentes na membrana do RS. Estes, são canais de liberação de Ca^{2+} ativados por este próprio íon, modulando um processo chamado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (CICR) (Lam; Lamanna; Bourke, 2019). O Ca^{2+} aumentado no citosol irá promover a translocação da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde será ativada pelo DAG, e esta irá fosforilar proteínas-alvo

específicas, como os Cav, ocasionando influxo deste íon e contração das células musculares lisas das vias aéreas (Berridge, 2012).

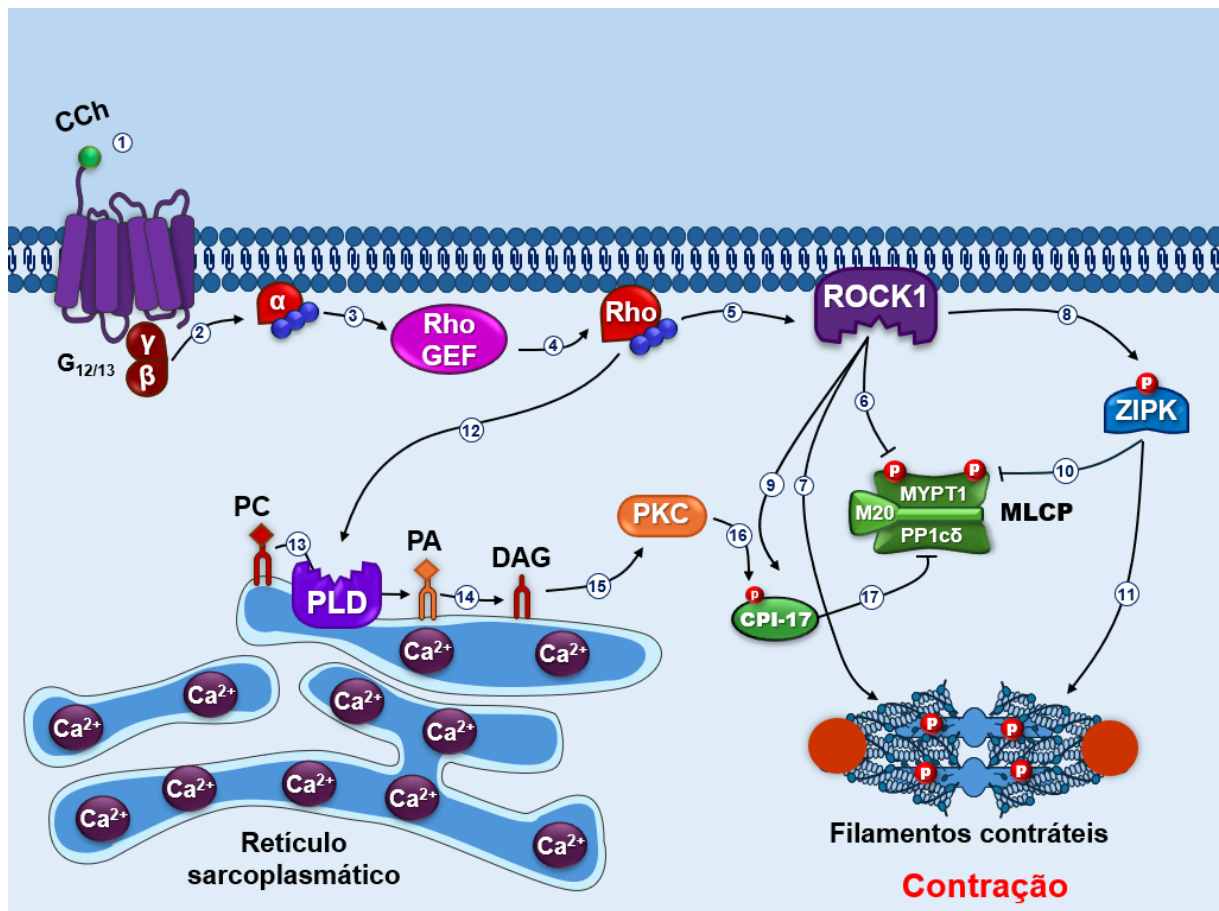
A contração da musculatura lisa depende do estado de fosforilação da MLC, que é regulada principalmente pelo complexo 4Ca^{2+} -CaM. No entanto, a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nem sempre é paralela à quantidade de MLC fosforilada e/ou ao grau de ativação contrátil. A manutenção do componente tônico das contrações na musculatura lisa das vias aéreas pode ocorrer mesmo em baixos níveis da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, em um fenômeno fisiológico conhecido como “sensibilização ao Ca^{2+} ” (Somlyo; Somlyo, 2000).

Após a estimulação de agonistas como a ACh e o CCh, a RhoA é ativada principalmente pela subunidade α das proteínas $\text{G}_{12/13}$, que por sua vez, desencadeia a ativação dos fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), ativando essa proteína monomérica (McDuffie; Panettieri; Scott, 2024) (Figura 10). Em seu estado inativado, a RhoA está ligada ao inibidor da dissociação do GDP, chamado GDI. Este, contém uma bolsa hidrofóbica envolvendo uma porção da RhoA que impede sua associação com os GEFs (Fukumoto *et al.*, 1990; Hancock; Hall, 1993), também diminuindo a atividade GTPásica da RhoA (Read *et al.*, 2000).

Dessa forma, a RhoA se dissocia do GDI e interage com os GEFs, que auxiliam a troca de GDP por GTP nesta proteína. A RhoA-GTP ativa a sua respectiva proteína cinase, a ROCK, uma serina/treonina cinase (Leung *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996), e esta ativação parece envolver uma trans-autofosforilação e dimerização (Chen *et al.*, 2002). Essa proteína é expressa em duas isoformas, a ROCK-1 e ROCK-2, coletivamente chamadas de ROCK. A isoforma ROCK-1 apresenta maior expressão nas vias aéreas (Riento; Ridley, 2003).

Embora a ROCK fosforile diretamente a MLC para manutenção da contração (Totsukawa *et al.*, 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), através da fosforilação direta da subunidade de ligação à miosina (MYPT1), causando a sua dissociação e impedindo-a de expor seu sítio catalítico (PP1c), tornando-a inativa. A ROCK também pode ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , a proteína cinase de interação zíper (ZIPK), que pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto, seu alvo principal é a subunidade MYPT1, a qual é fosforilada inibindo a ação da MLCP (Hagerty *et al.*, 2007; McDuffie; Panettieri; Scott, 2024).

Figura 10 – Mecanismo de manutenção da contração muscular lisa das vias aéreas pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) as proteínas $G_{12/13}$ trocam GDP por GTP nas suas subunidades α (não mostrado da figura), tornando-se ativas; (3) a subunidade $\alpha_{12/13}$ -GTP ativa o RhoGEF; (4) o RhoGEF faz com que a RhoA troque GDP por GTP, sendo translocada para a membrana; (5) a RhoA-GTP ligada estimula a sua cinase ROCK1; A ROCK1 possui vários alvos: (6) inibe a MLCP; (7) fosforila a MLC; (8) ativa a ZIPK; (9) ativa a CPI-17; (10) a ZIPK fosforila diretamente a MLC; (11) a ZIPK fosforila a MLCP, inibindo-a; (12) a RhoA-GTP ligada também estimula a PLD; (13) a PLD cliva o lipídio de membrana PC em PA; (14) o PA é desfosforilado a DAG pela ação da enzima fosfo-hidrolase; (15) o DAG ativa a PKC, de maneira sustentada; (16) a PKC fosforila a CPI-17, ativando-a; (17) a CPI-17 inibe a ação da MLCP. Todos esses mecanismos favorecem o estado fosforilado a MLC e sua interação com os filamentos de actina, mantendo o músculo liso contraído. As definições das abreviações estão presentes na lista de abreviações e no texto.

Fonte: Autor, 2025.

A RhoA-GTP também estimula a fosfolipase D (PLD), uma enzima específica para fosfatidilcolina (PC), liberando o ácido fosfatídico (PA), que através da ação da enzima fosfo-hidrolase é desfosforilado a DAG levando a ativação sustentada da PKC (Berridge, 2012). Esta enzima também pode inibir a atividade da MLCP, através do peptídeo inibidor de fosfatase ativada por PKC de 17 kDa (CPI-17), também substrato

da ROCK. Isso indica que essas vias convergem para aumentar a sensibilidade ao Ca^{2+} no aparelho contrátil (Koyama *et al.*, 2000).

Uma das principais estratégias para reverter o quadro clínico da asma é através da broncodilatação, que depende essencialmente do relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas. Nesse processo é necessária uma diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, promovendo a dissociação deste íon com a calmodulina e redução da ativação da MLCK (Zhang *et al.*, 2010). Isso pode ocorrer tanto por meio do mecanismo eletromecânico, induzindo a repolarização ou a hiperpolarização da membrana, como pelo mecanismo farmacomecânico, a partir da ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (Woodrum; Brophy, 2001; Somlyo; Somlyo, 2003).

O acoplamento eletromecânico de relaxamento do músculo liso é caracterizado pela abertura de canais de K^+ , que regulam o potencial de repouso da membrana e a excitabilidade celular, uma vez que o aumento da condutância ao K^+ gera uma repolarização/hiperpolarização de membrana. A célula hiperpolarizada bloqueia os canais Ca_v , diminuindo a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Knot; Brayden; Nelson, 1996).

Já o relaxamento do músculo liso pelo acoplamento farmacomecânico ocorre por ativação de receptores (Figura 11), como os adrenérgicos- β_2 acoplados à proteína G_s , cuja subunidade G_α ligada ao GTP causa um aumento da atividade da ciclase de adenilil (AC), que converte o ATP em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O aumento de cAMP ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA), que fosforila diversos alvos ocasionando a diminuição $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Wooldridge *et al.*, 2004; Billington *et al.*, 2013).

Dentre estes alvos, pode-se citar a ativação dos canais de K^+ , que resulta na hiperpolarização da membrana e inibição dos Ca_v , além de inibição direta destes canais; aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA), promovendo a extrusão e o estoque de Ca^{2+} , respectivamente; ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), aumentando a extrusão de Ca^{2+} ; inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo Ca^{2+} -CaM, causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada, induzindo assim, o relaxamento das vias aéreas (Du *et al.*, 2021; Camoretti-Mercado; Lockey, 2021).

Outra via que leva ao relaxamento das vias aéreas caracterizado por esse acoplamento é a geração de óxido nítrico (NO^*), um fator relaxante derivado do epitélio, pelas células musculares lisas e, principalmente, pelo sistema NANC (Figura

11). O NO[•] é gerado a partir da L-arginina pela atividade catalítica das isoenzimas da sintase de óxido nítrico (NOS) na presença de vários cofatores, incluindo mononucleotídio (FMN) e dinucleotídio de flavina adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) e fosfato de dinucleotídio de nicotinamida e adenina (NADPH). Três NOS distintas são expressas no pulmão (Kobzik *et al.*, 1993), a neuronal (nNOS ou NOS1), a induzível (iNOS ou NOS2) e a endotelial (eNOS ou NOS3). Como a eNOS e a nNOS são expressas constitutivamente no epitélio e em células endoteliais vasculares das vias aéreas, além de em neurônios iNANC, essas enzimas são também denominadas NOS constitutivas (cNOS) (Van Den Berg; Meurs; Gosens, 2018).

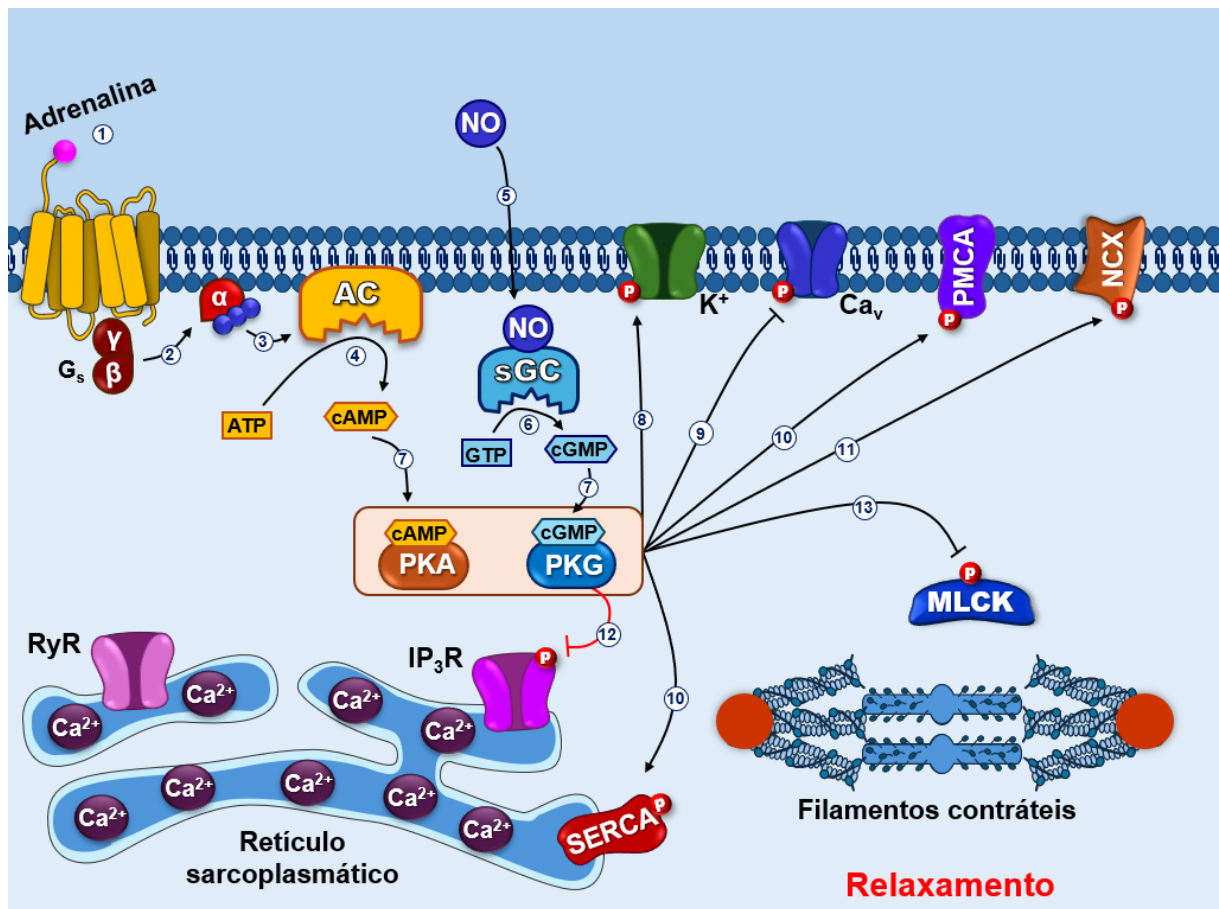
Aumentos nas [Ca²⁺]_c, por meio da ação de agonistas ou despolarização da membrana, também estimulam as cNOS a produzir quantidades relativamente baixas de NO[•]. Já a iNOS é particularmente expressa em células epiteliais, em macrófagos e eosinófilos durante um quadro inflamatório, como a asma. Em contraste com a cNOS, a iNOS produz grandes quantidades de NO[•] e a ativação enzimática é dependente de alterações na expressão gênica ou por citocinas pró-inflamatórias (Paoliello-Paschoalato; Oliveira; Cunha, 2005; Ricciardolo *et al.*, 2006).

No músculo liso das vias aéreas, o NO[•] ativa a ciclase de guanilil solúvel (sGC) que, por sua vez, vai clivar e ciclar o GTP em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), e este irá ativar a cinase dependente de cGMP (PKG), estimulando-a a fosforilar os alvos semelhantes aos da PKA, com adição da inibição do IP₃R, culminando na broncodilatação (Zhao *et al.*, 2015).

Os níveis de cAMP e cGMP são regulados pela ação de uma família de enzimas, as fosfodiesterases (PDEs), responsáveis por hidrolisar esses nucleotídeos cíclicos em metabólitos inativos: 5'-monofosfato de adenosina (AMP) e de guanosina (GMP), respectivamente (Kawamatawong, 2021). Atualmente, são conhecidas 11 PDEs diferentes, que têm diferentes subtipos e cada família tem seletividade variável para cAMP ou cGMP.

Sabe-se que as isoformas de PDEs 1, 2, 3, 10 e 11 degradam ambos os nucleotídeos cíclicos; as 5, 6 e 9 degradam apenas o cGMP; e as 4, 7 e 8 degradam apenas o cAMP (MarshallRaj; Priyadarshini, 2015). Dados transcriptômicos demonstram a presença de todas as isoformas das PDEs, exceto PDE2, em células musculares lisas das vias aéreas de asmáticos e estudos sugerem que as isoformas 3, 4, 5, 7 e 8 desempenham papéis importantes na asma (Johnstone *et al.*, 2018; Matera *et al.*, 2021).

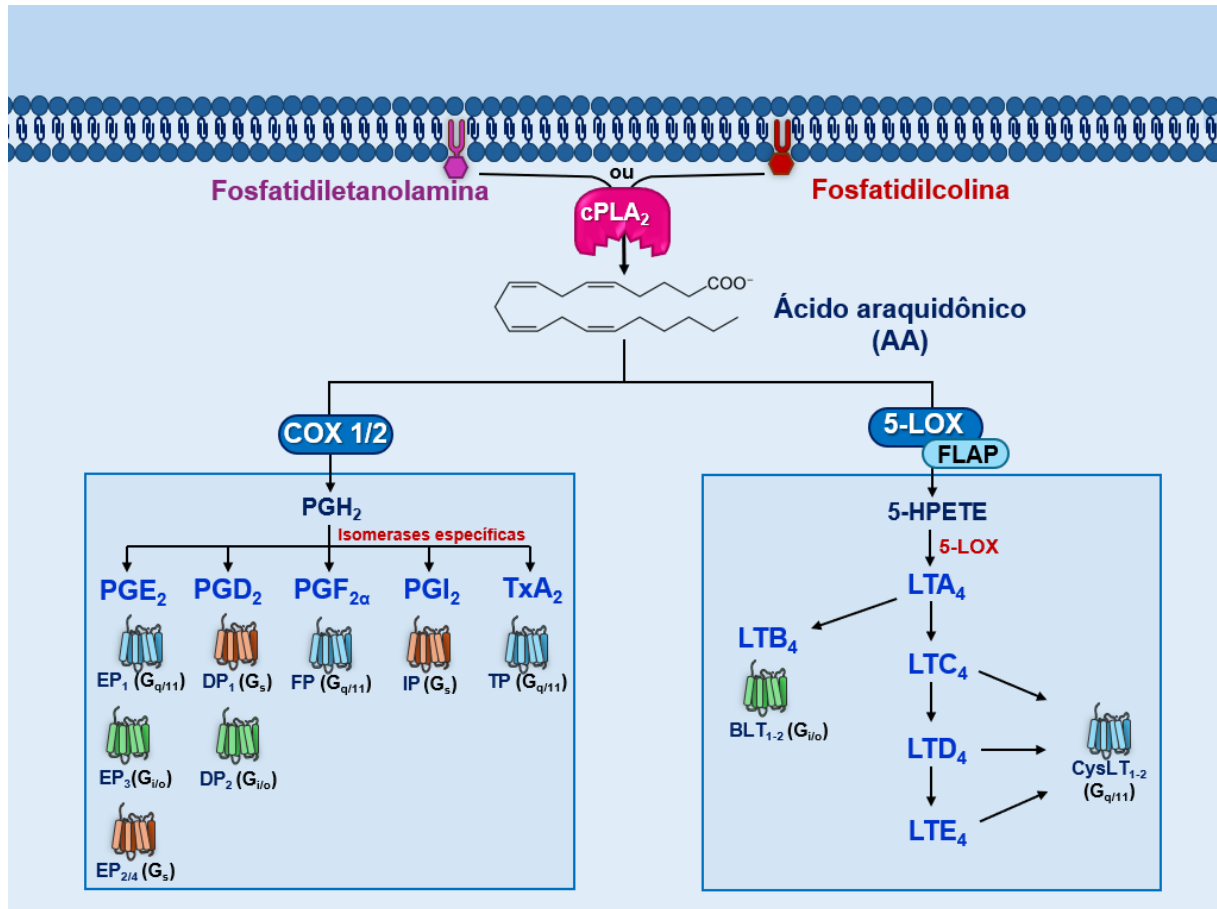
Figura 11 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso das vias aéreas induzido pelo aumento de cAMP e cGMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado tanto dos nervos como das células epiteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) a PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_c$; (13) PKA e PKG inibem ainda a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2025.

Outros mediadores que têm papel importante na homeostase das vias aéreas, assim como em processos fisiopatológicos, como a asma, são os eicosanoides, que incluem fatores tanto contráteis como relaxantes da musculatura lisa (Figura 12). Se originam a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de 20 carbonos, principalmente do ácido araquidônico (AA), esterificado em fosfolipídios na membrana celular (Zhang *et al.*, 2023).

Figura 12 – Biossíntese dos eicosanoides a partir do ácido araquidônico (AA).

O AA pode ser metabolizado pelas COX ou LOX gerando diferentes eicosanoides. Na presença de COX-1/COX-2 ocorre metabolização em PGG₂ e PGH₂. As diferentes sintases induzem a formação dos prostanoides específicos, sendo eles PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TxA₂, que ativam seus respectivos receptores no seu mecanismo primário. Ao ser metabolizado pela 5-LOX, o AA é convertido a 5-HPETE e este em LTA₄, que pode ser transformado em LTB₄ ou nos CysLT, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2025.

O AA é liberado dos fosfolípidios de membrana pela ação da fosfolipase A₂ (PLA₂), que pode ser dependente ou independente do aumento da [Ca²⁺]_c, respondendo a diversos estímulos como adrenalina ou componentes pró-inflamatórios (Leslie, 2015). Os ácidos graxos livres são metabolizados por três vias principais: a das ciclooxigenases (COXs), gerando os prostanoides; a das lipoxigenases (LOXs), produzindo leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs); e do citocromo P450 oxidase, que induz a produção de ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) ou ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) (Wenzel; 1997; Martin; Brash; Murphy, 2016).

Para geração dos prostanoides, tanto COX-1, que é constitutivamente expressa pela maioria das células, como a COX-2, uma isoforma induzível regulada

positivamente por mediadores inflamatórios como lipopolissacarídeo, IL-1 β , IL-6 ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), irão converter o AA em endoperóxidos de prostaglandinas (PGs), como a prostaglandina G₂ (PGG₂) (Ramsay *et al.*, 2003; Ricciotti; Fitzgerald, 2011). Em seguida, uma reação de endoperoxidase reduz a PGG₂ em PGH₂, outro endoperóxido cíclico altamente instável e rapidamente convertido em prostanoídes bioativos pelas sintases específicas, dentre eles a PGD₂, a PGE₂, a PGF_{2 α} , a PGI₂ e o TxA₂ (Zaslona; Peters-Golden, 2015).

A PGD₂ é sintetizada como resultado da conversão da PGH₂ por ação da sintase de PGD, sendo liberada majoritariamente pelos mastócitos, em resposta à ativação mediada por IgE (Smith *et al.*, 2011; Claar; Hartert; Peebles Jr, 2015). Outras células imunes, como as células Th2, basófilos, macrófagos e ILC2, também são fontes desse prostanoide (Vinall; Townsend; Pettipher, 2007; Ugajin *et al.*, 2011; Henkel *et al.*, 2019; Maric *et al.*, 2019). A PGD₂ se liga ao receptor DP₁ e à molécula homóloga do receptor quimioatraente expressa nas células Th2 (CRTH2), também chamada de receptor DP₂ (Pettipher, 2008).

O receptor DP₁, que se acopla à proteína G_s, foi o primeiro receptor da PGD₂ a ser identificado e medeia uma série de efeitos, que são principalmente de natureza não inflamatória, como inibição da migração celular, apoptose de eosinófilos e relaxamento da musculatura lisa (Hirai *et al.*, 2001; Sugimoto *et al.*, 2005; Rittchen; Heinemann, 2019). Ele é expresso em células caliciformes, endotélio vascular, células Th2, células dendríticas, basófilos e eosinófilos (Peebles Jr, 2019). Já o receptor DP₂, acoplado à proteína G_{i/o}, é expresso em eosinófilos, basófilos, células Th2 e ILC2, e sua ativação nessas células induz a produção de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) e a quimiotaxia de células imunes durante a inflamação induzida por alérgenos (Nagata *et al.*, 1999; Hirai *et al.*, 2001; Ugajin *et al.*, 2011).

Além dessas ações, a PGD₂ age sobre os receptores de TxA₂ (TP), que se acoplam à proteína G_{q/11}, para promover agregação plaquetária e contração muscular lisa das vias aéreas (Coleman; Sheldrick, 1989). Estudos relatam que esse prostanoide ativa o receptor TP no músculo liso brônquico humano, provavelmente através da formação de um de seus principais metabólitos, o 9 α ,11 β -PGF₂ (Beasley *et al.*, 1987). Os efeitos broncoconstritores da PGD₂ sobre os receptores TP prevalecem sobre os efeitos broncodilatadores nas vias aéreas, apresentando papel importante na hiper-responsividade brônquica da asma (Arima; Fukuda, 2008).

A PGE_2 é formada pela conversão do precursor PGH_2 por meio da ação da enzima sintase de PGE. Diversos tipos celulares, como células endoteliais, monócitos, macrófagos, osteoblastos e fibroblastos, estão envolvidos na produção de PGE_2 (Harris *et al.*, 2002). Esse mediador lipídico exerce suas funções ao se ligar a receptores específicos (EP_1 - EP_4), amplamente expressos no pulmão (Smith *et al.*, 2011). Estes receptores apresentam diferentes acoplamentos, sendo o EP_1 acoplado a $\text{G}_{q/11}$ ou $\text{G}_{i/o}$, EP_2 e EP_4 acoplados a G_s , e EP_3 acoplado a $\text{G}_{i/o}$ ou $\text{G}_{q/11}$ (Sugimoto; Narumiya, 2007; Clapp *et al.*, 2023).

A PGE_2 pode atuar como um mediador pró ou anti-inflamatório, broncoconstritor ou broncodilatador, dependendo do receptor ativado e do estágio da inflamação, modulando assim a homeostase do tônus das vias aéreas e das respostas imunes. Entretanto, estudos sugerem que a PGE_2 promove processos inflamatórios na maioria dos órgãos, mas, no pulmão, tem predominantemente efeitos anti-inflamatórios (Vancheri *et al.*, 2004) e broncodilatadores em modelos animais, bem como em humanos, mediados pelos receptores EP_2 e EP_4 (Gauvreau; Watson; O'byrne, 1999; Martin *et al.*, 2002).

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é sintetizada a partir da enzima sintase de PGF e se liga a um receptor acoplado à $\text{G}_{q/11}$, o FP (Komoto *et al.*, 2006; Claar; Hartert; Peebles Jr, 2015). Esse receptor é um dos menos seletivos dos receptores de prostanoídes, sendo ativado também por PGD_2 e PGE_2 em concentrações nanomolares (Abramovitz *et al.*, 2000; Hata; Breyer, 2004). Embora a $\text{PGF}_{2\alpha}$ não tenha sido estudada tanto quanto as demais prostaglandinas, estudos sobre seu efeito em reações alérgicas mostraram que a inalação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ diminui a condutância das vias aéreas de maneira dependente de dose e induz broncoconstrição (Mathé *et al.*, 1973; Smith; Cuthbert; Dunlop, 1975; Lee; Lee; Kim, 2020).

Porém, a expressão do mRNA do receptor FP é maior no corpo lúteo ovariano, no miométrio e nos rins, com baixa expressão nos pulmões e praticamente ausente em células imunes (Breyer *et al.*, 2001; Peebles Jr, 2019). Assim, em contraste com as outras prostaglandinas, a sinalização $\text{PGF}_{2\alpha}$ -FP não parece ter um papel regulador forte em processos inflamatórios e imunológicos (Hata; Breyer, 2004; Peebles Jr, 2019).

A prostaciclina (PGI_2) é o produto do metabolismo da sintase de prostaciclina. Vários tipos de células, incluindo fibroblastos, células dendríticas, endoteliais e musculares lisas, demonstraram expressar enzimas que produzem este mediador

lipídico (Dorris; Peebles Jr, 2012). A PGI_2 se liga ao receptor IP, que acopla a proteína G_s , para promover seus efeitos de inibição da agregação plaquetária, vasodilatação e respostas nociceptivas (Masotti *et al.*, 1979; Murata *et al.*, 1997; Oyesola; Tait Wojno, 2021).

Na asma, a PGI_2 apresenta um papel anti-inflamatório, tendo em vista que há relatos de supressão da inflamação induzida por alérgenos nos pulmões de camundongos por induzir a liberação de IL-10 por células Th2 e dendríticas (Jaffar; Wan; Roberts, 2002; Zhou *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2020). Além disso, a PGI_2 também reduz a produção e liberação de IL-4, IL-5 e IL-13, além da IL-2, um fator de sobrevivência dos linfócitos T (Idzko *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). Associado a isso, foi relatado que um análogo sintético da PGI_2 (ONO-1301) reduziu a inflamação alérgica, a hiper-responsividade das vias aéreas e o remodelamento tecidual em modelo de asma induzido por ovalbumina em camundongos (Yamabayashi *et al.*, 2012).

O tromboxano (TxA_2) é produzido por plaquetas ativadas, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e células do parênquima pulmonar por ação da sintase de tromboxano (Ruan, 2004). É um potente indutor da agregação plaquetária (Whittle; Moncada, 1983), além de ser um agente broncoconstritor (Inoue *et al.*, 2002), por se ligar aos receptores TP e DP (Alexander *et al.*, 2013). O receptor TP apresenta duas isoformas, TP_α e TP_β , que acopla principalmente $G_{q/11}$ e $G_{12/13}$, embora também possam interagir com outras proteínas G, como G_s (TP_α) e com $G_{i/o}$ (TP_β) (Hirata *et al.*, 1996).

Os leucotrienos são gerados a partir da metabolização do AA pela 5-lipoxigenase (5-LOX), expressa principalmente em granulócitos, macrófagos e mastócitos (Samuelsson *et al.*, 1987). Após ativação, a 5-LOX é translocada para o envelope nuclear, onde forma um complexo com a proteína ativadora da 5-LOX (FLAP), para catalisar a conversão do AA em ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico (5-HPETE), e deste, em leucotrieno A_4 (LTA_4) (Mashima; Okuyama, 2015).

O LTA_4 é um intermediário instável e pode sofrer adição conjugada de água pela ação da LTA_4 hidrolase para formar leucotrieno B_4 (LTB_4) ou conjugação com glutathione pela ação da LTC_4 sintase para formar leucotrieno C_4 (LTC_4). LTB_4 e LTC_4 são transportados para o espaço extracelular, principalmente, por proteínas de resistência a múltiplas drogas, a MRP4 (LTB_4) e MRP1 (LTC_4) (Johnson; Chen, 2017). O LTC_4 é metabolizado em leucotrieno D_4 (LTD_4) pela γ -glutamil transpeptidase (γ -

GT), que por sua vez, através da remoção do aminoácido glicina pela dipeptidase, é convertido em leucotrieno E₄ (LTE₄) (Butola *et al.*, 2021; Marques *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022).

Os leucotrienos são divididos em duas classes, o LTB₄ e os cisteinil leucotrienos (CysLTs) (Luginina *et al.*, 2023). O LTB₄ tem ação pró-inflamatória e atua em leucócitos polimorfonucleares, como neutrófilos e eosinófilos, por meio da ativação dos receptores BLT₁ e BLT₂, ambos acoplados às proteínas G_{i/o} e G_{q/11}, desencadeando quimiotaxia e a subsequente ativação da resposta inflamatória (Saeki; Yokomizo, 2017; Yokomizo; Shimizu, 2023).

Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ constituem os CysLTs, que atuam por meio dos receptores CysLT₁ e CysLT₂, que se acoplam às proteínas G_{q/11} (Lynch *et al.*, 1999; Mellor *et al.*, 2003; Yokomizo; Nakamura; Shimizu, 2018). Esses mediadores desempenham um papel fundamental na patogênese da asma, induzindo broncoconstrição (O'hickey *et al.*, 1991; Lee; Boyce, 2024); remodelamento tecidual com hiperplasia das células musculares lisas e das glândulas mucosas, hipersecreção de muco, aumento da deposição de colágeno na camada subepitelial e no interstício pulmonar em locais de infiltração de leucócitos (Henderson Jr *et al.*, 2006; Mehrotra *et al.*, 2009); e aumento da inflamação com o recrutamento de eosinófilos, mastócitos, linfócitos T, monócitos e basófilos, além da estimulação da produção de citocinas do perfil Th2 (Kim *et al.*, 2006; Montuschi, 2010).

2.6 Estresse oxidativo na asma alérgica

Associado ao componente inflamatório, é observado na asma um aumento do estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e a capacidade do sistema biológico de desintoxicar os intermediários reativos ou reparar os danos causados pelos radicais oxidativos (Rahal *et al.*, 2014).

Os oxidantes são produzidos por organismos vivos a partir oxigênio molecular (O₂) como resultado do metabolismo celular normal. Além dos oxidantes endógenos, os exógenos, como poluentes do ar, fumaça de cigarro, íons de metais pesados e radiação ionizante, contribuem para a formação destas espécies altamente reativas (Mishra; Banga; Silveyra, 2018). Portanto, o sistema respiratório apresenta maior risco

de sofrer danos causados pelo estresse oxidativo devido à alta suscetibilidade às interações com fatores ambientais (Vasconcelos *et al.*, 2021).

Normalmente, as espécies reativas funcionam em processos celulares fisiológicos, mas em altas concentrações podem danificar estruturas celulares, como carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, e alterar suas funções. Os antioxidantes geralmente são eficazes no bloqueio dos efeitos nocivos das EROs/ERNs. No entanto, sob condições patológicas, os sistemas antioxidantes podem ser sobrecarregados e resultar em um desbalanço do estresse oxidativo (Sahiner *et al.*, 2018).

Dentre as EROs, pode-se citar os radicais livres, que apresentam elétrons desemparelhados, como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\text{HO}^{\cdot}$), radical hidroperóxil ($\text{HO}_2^{\cdot}$) e radical peróxil ($\text{RO}_2^{\cdot}$), além de derivados de oxigênio não radiculares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO) e o ozônio (O_3). Já entre as ERNs, destacam-se o óxido nítrico ($\text{NO}^{\cdot}$) e o dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^{\cdot}$), além do nitrito (NO_2^-) e peroxinitrito (ONOO^-), como espécies não radiculares (Sies; Berndt; Jones, 2017).

Nos pulmões, as espécies reativas podem ser produzidas principalmente por células inflamatórias, como eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, além de células epiteliais, musculares lisas e fibroblastos (Michaeloudes *et al.*, 2022). Em geral, EROs/ERNs são produzidos como intermediários ou subprodutos do metabolismo celular catalisado por enzimas em diferentes localizações, principalmente mitocôndrias, membrana plasmática, citosol, peroxissomos e retículo endoplasmático (Di Meo *et al.*, 2016).

As principais enzimas que produzem EROs/ERNs nos pulmões incluem NADPH oxidase (NOX), mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), xantina oxidase, mono-oxigenases do citocromo P450, NOS, COX e LOX (Albano *et al.*, 2022). Um papel importante é atribuído à NADPH oxidase, responsável pela formação do $\text{O}_2^{\cdot-}$, através da transferência de elétrons do NADPH (Taylor; Hubert, 2021).

Existem sete isoformas da NADPH oxidase, cinco NOX (NOX1-5) e duas oxidases duplas (DUOX1 e 2). O complexo NOX compreende o flavocitocromo b_{558} , que é a montagem heterodimérica de $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (também chamado de NOX2) e p22^{phox} , além de vários cofatores citosólicos, p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox} e pequenas proteínas de ligação ao GTP (Rac). As subunidades reguladoras citosólicas translocam-se para a

membrana, onde se unem com o flavocitocromo *b₅₅₈*. Após a ativação e montagem, o NOX2 catalisa a transferência vetorial sequencial de elétrons através da membrana plasmática, reduzindo o O₂ para sintetizar o O_2^- (Lee; Yang, 2012; Vermot *et al.*, 2021) (Figura 13).

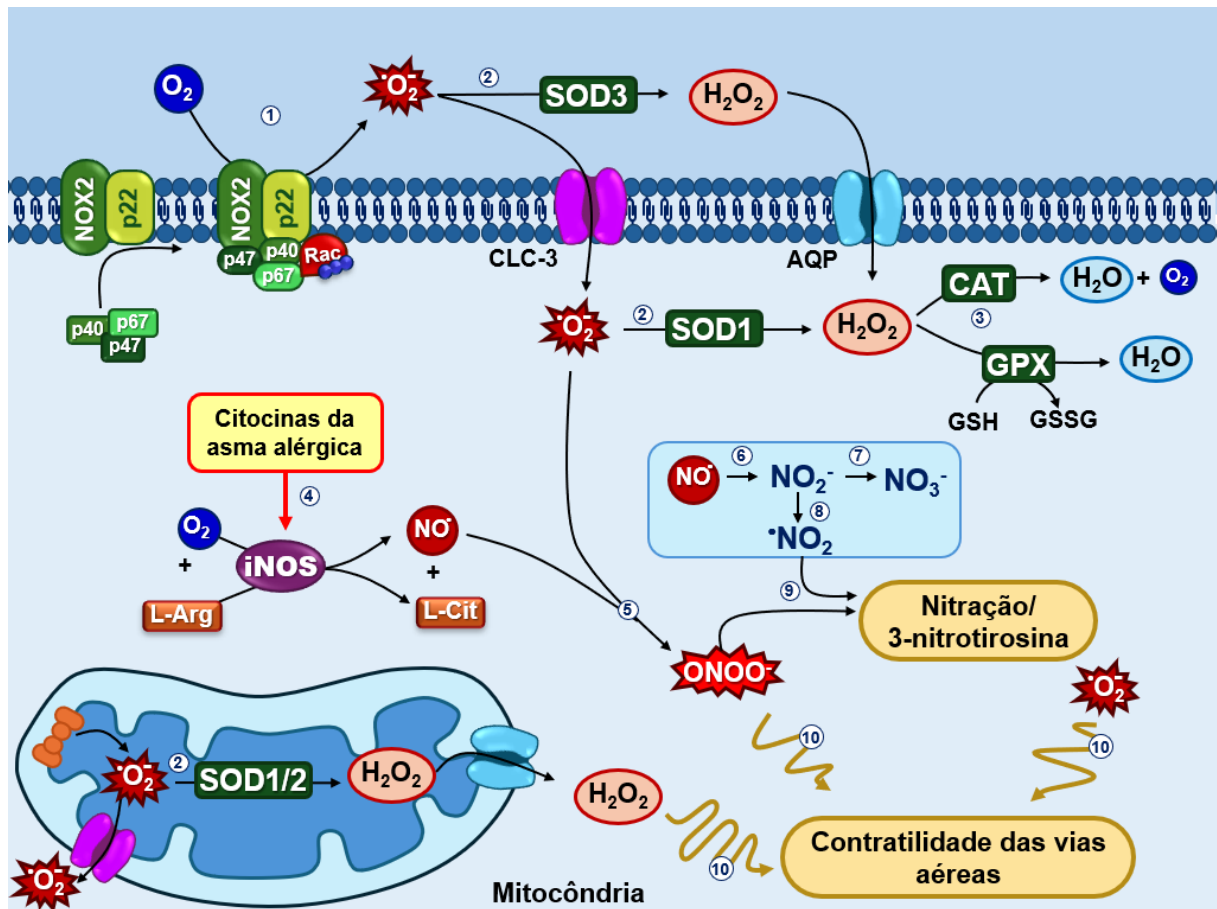
Semelhante ao complexo NOX2, a ativação de NOX1 e NOX3 também requer associação com p22^{phox}, e montagem com Rac e cofatores citosólicos (p47^{phox} e p67^{phox} ou seus homólogos, organizador NOX1 (NOXO1) e ativador NOX1 (NOXA1)) (Geiszt *et al.*, 2004; Lambeth, 2004; Bedard *et al.*, 2007). A NOX4 também requer p22^{phox}, mas parece ser constitutivamente ativa sem a necessidade de ativação de outros cofatores. A NOX5 e a DUOX1/2 diferem dos outros homólogos de NOX e contêm regiões de ligação ao Ca²⁺ intracelular adicionais e são reguladas sem a necessidade de associação com p22^{phox} ou outros cofatores citosólicos (Bánfi *et al.*, 2004; Ameziane-El-Hassani, 2005).

As enzimas NOX são amplamente distribuídas por todo o pulmão, com papéis importantes em macrófagos alveolares, células dendríticas, linfócitos T e B, bem como em células estruturais, como as epiteliais alveolares, endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas, cada uma com propriedades funcionais distintas (Van der Vliet, 2011; Bernard *et al.*, 2014).

Na patogênese da asma, as isoformas de NOX2 e NOX4 desempenham papéis importantes, tendo em vista que estudos demonstram que a NOX2 está relacionada ao agravamento da inflamação (Banerjee; Henderson, 2012) e recrutamento de eosinófilos (Abdala-Valencia *et al.*, 2007) e a NOX4 está associada à hiper-responsividade das vias aéreas (Sutcliffe *et al.*, 2011).

Além disso, o O_2^- também pode ser formado no processo de fosforilação oxidativa pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias ou pela ação da xantina oxidase (Michaeloudes *et al.*, 2022). Esse composto pode ser espontaneamente ou enzimaticamente dismutado a H₂O₂, uma molécula mais estável, com uma meia-vida mais longa, capaz de se difundir no citosol e no núcleo para ativar vias de sinalização redox. Na presença de Fe²⁺ ou outros metais, o H₂O₂ pode ser convertido no radical hidroxila (HO $\cdot$), uma espécie altamente reativa, em reações chamadas de Haber-Weiss e Fenton (Panasenkov; Vladimirov; Sergienko, 2024).

Figura 13 – Mecanismo da formação de ERO/ERNs e sistemas antioxidantes na asma alérgica.



(1) A NOX2 catalisa a transferência de elétrons através da membrana plasmática, reduzindo o O_2 para sintetizar o $O_2^{\bullet-}$. (2) O $O_2^{\bullet-}$ é convertido pela SOD em H_2O_2 , que por sua vez, (3) é neutralizado em água por ação das enzimas catalase e GPx. (4) Citocinas da asma alérgica aumentam a expressão do iNOS, levando à maior produção de $NO^{\bullet}$, (5) e este, na presença do $O_2^{\bullet-}$ é convertido em $ONOO^{\bullet}$. (6) Como produto do metabolismo do $NO^{\bullet}$, também ocorre a formação do $NO_2^{\bullet}$, (7) que rapidamente forma o $NO_3^{\bullet}$ (8) e $NO_2^{\bullet}$. (9) O $ONOO^{\bullet}$ e o $NO_2^{\bullet}$ estão envolvidos na nitração de proteínas e formação da 3-nitrotirosina. (10) O $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 e o $ONOO^{\bullet}$ aumentam a contratilidade das vias aéreas.

AQP: aquaporinas; CAT: catalase; CLC-3: canal de cloreto; GPX: glutathione peroxidase; iNOS: sintase de óxido nítrico induzível; L-Arg: L-arginina; L-Cit: L-citrulina; NOX: NADPH oxidase; SOD: superóxido dismutase.

Fonte: Autor, 2025.

A interação de H_2O_2 com haletos, catalisada por peroxidases de eosinófilos e neutrófilos, leva à formação de hipo-haletos, como o ácido hipobromoso (HOBr) e hipocloroso (HOCl), que podem modificar resíduos de tirosina por bromação e cloração, respectivamente, alterando a função de proteínas (Sahiner *et al.*, 2018).

O $NO^{\bullet}$ pode também reagir com o $O_2^{\bullet-}$ para produzir uma molécula altamente reativa, o $ONOO^{\bullet}$ (Figura 13). Na fase inicial da resposta asmática, o $NO^{\bullet}$ desempenha um papel crucial na diminuição da hiper-responsividade, associado a uma maior

atividade da enzima arginase, a qual utiliza a L-arginina para produzir L-ornitina e ureia, diminuindo o substrato para a formação do NO^* ; ou a uma redução na atividade das isoformas constitutivas da NOS (Ricciardolo, 2003; Samb *et al.*, 2001).

Por outro lado, na fase tardia da resposta asmática, o aumento na expressão e atividade da iNOS, responsável pela produção de grandes quantidades de NO, está relacionado ao desenvolvimento da hiper-responsividade, devido a formação de ONOO^- (Yan *et al.*, 1995; Kharitonov *et al.*, 1995). Esta ERN ativa os eosinófilos, aumenta a expressão da glicoproteína mucina (MUC5AC), aumenta a permeabilidade microvascular, induz dano epitelial e aumenta a contração do músculo liso nas vias aéreas (Sadeghi-Hashjin *et al.*, 1996; Sugiura *et al.*, 1999; Hanazawa; Kharitonov; Barnes, 2000) (Figura 13).

Também como produto do metabolismo do NO^* , na presença de oxigênio molecular, ocorre a formação de nitrito (NO_2^-), amplamente relatado em altas concentrações no ar exalado de indivíduos asmáticos (Hunt *et al.*, 1995; Formanek *et al.*, 2002; Ueno *et al.*, 2008; Rihák *et al.*, 2010). O NO_2^- é posteriormente oxidado à nitrato (NO_3^-) e é substrato para MPO e EPO, resultando na formação do radical dióxido de nitrogênio (NO_2^*) (Ghosh; Erzurum, 2012). O NO_2^* , juntamente com o ONOO^- são responsáveis pela nitração de resíduos de tirosina de proteínas e formação de 3-nitrotirosina, extensamente encontrada no pulmão de asmáticos (Duguet *et al.*, 2001; Dweik *et al.*, 2001; Andreadis *et al.*, 2003; Zuo; Koozechian; Chen, 2014).

Os radicais livres podem desencadear reações em cadeia de peroxidação lipídica, em que extraem um hidrogênio de um carbono metileno da cadeia lateral de ácidos graxos poli-insaturados, resultando na formação de radicais lipídicos instáveis. A inserção subsequente de O_2 leva à geração de radicais peroxil lipídicos, que abstraem outro hidrogênio de uma molécula lipídica diferente, continuando a reação e formando os hidroperóxidos lipídicos (Cordiano *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Nesse processo, tanto os hidroperóxidos quanto os radicais peroxil lipídicos podem passar por processos de ciclização e clivagem, resultando na formação de produtos secundários. O malondialdeído (MDA) é o principal e mais amplamente estudado derivado da peroxidação lipídica, comumente utilizado como medida de estresse oxidativo (Ayala; Muñoz; Arguelles, 2014; Barrera *et al.*, 2018). Os isoprostanos são outro grupo de produtos de peroxidação lipídica que são gerados

por meio da peroxidação do ácido araquidônico e também foram encontrados elevados no plasma de asmáticos (Mas-Bargues *et al.*, 2021).

Uma vez gerado, o MDA pode ser metabolizado por várias enzimas, particularmente em nível mitocondrial pela enzima aldeído desidrogenase, ou pode interagir covalentemente e causar danos a proteínas de membrana, ácidos nucleicos ou ácidos graxos poli-insaturados adjacentes (Marnett, 1999; Ayala; Muñoz; Arguelles, 2014). Como resultado de suas interações, ocorrem modificações adicionais, levando à formação de vários epítomos de MDA que interagem com células do sistema imunológico inato. Os efeitos induzidos por esses epítomos de MDA estão associados à expressão de genes pró-inflamatórios e à ativação de várias vias de sinalização inflamatórias (Busch; Binder, 2017).

Para regular a homeostase na formação das espécies reativas nas vias aéreas, as células dispõem de sistemas enzimáticos antioxidantes, como o complexo da superóxido dismutase (SOD), que converte o O_2^- em H_2O_2 ; a catalase, a qual converte o H_2O_2 em água e O_2 ; e a glutathione peroxidase (GPx) e a peroxirredoxina, que inativam o H_2O_2 e outros hidroperóxidos (Figura 13) (Pietarinen-Runtti *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2023); além dos sistemas antioxidantes não enzimáticos, incluindo a glutathione reduzida (GSH), vitaminas (C e E) e minerais (selênio e zinco) (Sies *et al.*, 2022).

Dentre esses sistemas antioxidantes, a SOD apresenta expressão elevada nos pulmões, em torno do epitélio alveolar, brônquico, células endoteliais dos capilares, células mesenquimais, fibroblastos e macrófagos, e desempenha papel importante em combater o estresse oxidativo na asma (Su *et al.*, 1997). As SODs são metaloenzimas localizadas no citosol e na intermembrana mitocondrial (Cu, Zn-SOD ou SOD1), na matriz mitocondrial e na membrana interna (Mn-SOD ou SOD2) e no compartimento extracelular (Cu, Zn-SOD ou SOD3) (Wang *et al.*, 2018).

A atividade da SOD é prejudicada nas vias aéreas de asmáticos, o que pode estar relacionado à inativação oxidante e/ou nitração de isoformas da SOD, além da alta produção de espécies reativas por células inflamatórias (De Raeve *et al.*, 1997; Comhair *et al.*, 2000). Dessa forma, a redução da atividade da SOD pode estar associada à inflamação e à hiper-responsividade das vias aéreas em asmáticos (Sugiura; Ichinose, 2008).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se a glutathione reduzida (GSH), um tiol tripeptídico, abundante nas vias aéreas, que reduz hidroperóxidos

orgânicos protegendo da peroxidação lipídica (Barnabas *et al.*, 2023). Em resposta aos hidroperóxidos, a GSH se oxida por meio de uma reação envolvendo glutathiona peroxidase (GPx). Esse processo forma dissulfeto de glutathiona (GSSG), que pode ser reduzido a GSH por uma reação de glutathiona redutase (GR) dependente de NADPH (Averill-Bates, 2023). A relação entre GSH e GSSG é um regulador crítico dos processos celulares e da defesa antioxidante. Com o acúmulo excessivo de GSSG, a homeostase da GSH nas vias aéreas é alterada, resultando em maior suscetibilidade a lesões pulmonares (Haddad *et al.*, 2000; Rahman *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2009).

Embora mudanças agudas na proporção de GSH para GSSG sejam necessárias para a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, a formação exacerbada de GSSG pode inibir as capacidades antioxidantes das vias aéreas por meio da depleção acentuada de GSH e aumento da peroxidação lipídica nas vias aéreas. Dessa forma, estudos relatam níveis reduzidos de GSH e da razão GSH/GSSG em indivíduos com asma alérgica (Ercan *et al.*, 2006; Sackesen *et al.*, 2008; Deveci *et al.*, 2004), além de mostrarem que o uso de precursores da GSH contribui para redução da inflamação e da hiper-responsividade em modelo de asma alérgica induzido por ovalbumina em camundongos (Koike *et al.*, 2007).

2.7 Diagnóstico e tratamento da asma alérgica

O diagnóstico da asma é complexo e pode se basear em uma série de fatores, incluindo o histórico de padrões de sintomas característicos e evidências de limitação variável do fluxo de ar expiratório, histórico familiar, exames físicos, testes de função pulmonar para documentar limitação variável do fluxo de ar expiratório, testes de broncoprovocação, testes de alergia, exames de imagem e quantificação de biomarcadores inflamatórios, como a fração de óxido nítrico exalado (FeNO), IgE e eosinófilos (Carvalho-Pinto *et al.*, 2021; Gina, 2024).

A identificação de um padrão característico de sintomas respiratórios inclui a presença de chiado, dispneia, aperto no peito ou tosse, e limitação variável do fluxo de ar expiratório. Os sintomas geralmente pioram à noite ou no início da manhã, variam ao longo do tempo e em intensidade e podem ser desencadeados por diversos fatores, como infecções virais, exercícios, mudanças no clima, exposição a poluentes ou alérgenos (Gina, 2024).

O padrão dos sintomas é importante, pois os sintomas respiratórios podem ocorrer devido a condições agudas ou crônicas diferentes da asma. O início dos sintomas em idade precoce sugere uma associação mais frequente com atopia, ao contrário da asma de início tardio em adultos, que pode ser mais grave e menos associada às alergias (Barría; Holguin; Wenzel, 2015).

Em decorrência da variabilidade dos sintomas, o exame físico de indivíduos asmáticos pode ser normal. A anormalidade mais frequente é sibilância na ausculta pulmonar, um achado que confirma a presença de limitação do fluxo de ar. No entanto, esse sinal pode estar ausente ou ser detectado apenas na expiração forçada, também podendo estar ausente durante exacerbações da asma, devido ao fluxo de ar gravemente reduzido (Baena-Cagnani; Badellino, 2011).

O nível de obstrução das vias aéreas só pode ser estimado indiretamente pela avaliação do trabalho respiratório, como retrações torácicas, batimento de asa nasal e uso de músculos respiratórios acessórios e pela ausculta do tórax para avaliar a relação entre expiração e inspiração e o grau de sibilância (Brand *et al.*, 2008). O objetivo do exame físico adicional é identificar características incomuns ou atípicas que sugeririam outra condição subjacente e alguns sinais de comorbidades (Potter, 2008).

A função pulmonar é avaliada de forma mais confiável por testes de espirometria, com avaliação do volume máximo de ar mobilizado em uma expiração após uma inspiração máxima (capacidade vital forçada, CVF), o volume de ar exalado no primeiro segundo dessa manobra (VEF_1) e a relação VEF_1/CVF são três medidas-chave. Uma relação VEF_1/CVF menor que o limite inferior da normalidade (0,7-0,8 em adultos e 0,9 em crianças) indica limitação do fluxo expiratório e obstrução das vias aéreas. A reversibilidade da obstrução das vias aéreas é indicada pela resposta aguda (10-15 minutos) do VEF_1 à inalação de agonistas adrenérgicos- β_2 de ação curta, considerando um aumento de 200 mL ou de 12% ou mais em relação ao valor basal, confirmando assim, o diagnóstico da asma (McCracken *et al.*, 2017; Danvers; Lo; Gaillard, 2020).

Como a asma é caracterizada por obstrução variável do fluxo de ar, uma relação VEF_1/CVF reduzida pode não estar presente em todos os momentos, portanto, se a suspeita clínica permanecer, a espirometria pode precisar ser repetida para demonstrar a obstrução. Outra maneira de registrar a variação na obstrução do fluxo de ar é realizar várias medições da taxa de pico de fluxo expiratório (PFE) durante 1

a 2 semanas. A variação de 13% ou mais sugere obstrução variável do fluxo de ar. No entanto, a técnica correta deve ser garantida, e isso depende da cooperação e adesão do paciente na realização das medições (Brigham; West, 2015; Saglani; Menzie-Gow, 2019).

Outro recurso diagnóstico é o teste de broncoprovocação (TBP) para avaliar a hiper-responsividade das vias aéreas. Os agentes de desafio incluem metacolina, histamina, exercício físico ou hiperventilação voluntária eucápnica. Esses testes são moderadamente sensíveis para o diagnóstico de asma, mas têm especificidade limitada (Crapo *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 2017; Hallstrand *et al.*, 2018).

Dado que a asma é mais frequente, persistente e grave em pacientes atópicos, é recomendável realizar um estudo alergológico nesses pacientes. É importante destacar que a sensibilização a alérgenos não estará presente em todos os fenótipos de asma, assim como a sensibilização não é exclusiva dessa doença. Os testes cutâneos têm alta sensibilidade e permitem avaliar múltiplos alérgenos de forma rápida e simples, sendo, portanto, o primeiro exame a ser realizado no estudo alergológico (Gil *et al.*, 2019).

Os biomarcadores desempenham um papel fundamental no diagnóstico e manejo da asma, especialmente na identificação de fenótipos, além de preverem a resposta ao tratamento. Entre os mais utilizados, destaca-se a determinação de IgE específica para alérgenos, que pode ser usado para confirmar, quantificar ou complementar os resultados dos testes cutâneos. A medição dos níveis séricos de IgE específicos e totais pode ser útil no diagnóstico de asma e para distinguir entre asma alérgica e não alérgica (Kim *et al.*, 2017).

Na clínica, os níveis totais de IgE são usados para identificar pacientes que podem receber tratamento com anticorpos anti-IgE recombinantes (Narendra; Blixt; Hanania, 2019). Além disso, também pode ser realizada a contagem de eosinófilos no sangue ou no escarro, tendo em vista que níveis elevados dessas células estão associados a maior gravidade e risco de exacerbações da asma e também permitem o direcionamento do tratamento (Wagener *et al.*, 2014; Wagener *et al.*, 2015).

A fração exalada de óxido nítrico (FeNO) é outro biomarcador relevante, que avalia a inflamação eosinofílica de forma não invasiva. Valores elevados de FeNO correlacionam-se com comprometimento da função pulmonar e maior gravidade das exacerbações da asma. Contudo, há variações nos pontos de corte recomendados e o valor da FeNO pode ser influenciado por fatores como adesão ao tratamento e uso

de corticoides. Apesar das limitações, a FeNO, em conjunto com outros biomarcadores, é uma ferramenta valiosa para caracterizar a inflamação na asma e orientar o manejo clínico (Sandrini *et al.*, 2010; Mansur *et al.*, 2018; Price *et al.*, 2019; Menzies-Gow; Mansur; Brightling, 2020).

Após a confirmação do diagnóstico, o tratamento deve ser iniciado com o objetivo de controlar rapidamente as crises asmáticas e aliviar os sintomas por meio da broncodilatação, além de controlar o processo inflamatório crônico. Essas medidas contribuem para a melhora significativa da qualidade de vida do indivíduo com asma. Contudo, é fundamental ressaltar que o tratamento não proporciona a cura da doença (McCracken *et al.*, 2017).

As classes de medicamentos mais utilizadas são os anti-inflamatórios esteroidais (corticosteroides), os agonistas adrenérgicos- β_2 de ações curta (SABA) e longa (LABA) e antimuscarínicos de ações curta (SAMA) e longa (LAMA) (Wendell *et al.*, 2019). Também, podem ser utilizados os cromoglicatos, os modificadores da via dos leucotrienos e os anticorpos monoclonais anti-IgE, anti-IL-5 e anti-IL-4 (Wendell *et al.*, 2019; Gina, 2024).

Os corticosteroides desempenham um papel fundamental no controle da inflamação crônica das vias aéreas e constituem a base para o tratamento da asma. Eles se ligam a receptores específicos no citoplasma, formando um complexo que migra para o núcleo, onde se conecta a regiões específicas do DNA, chamadas elementos de resposta a glicocorticoides (GRES) (Xavier *et al.*, 2016; Adcock; Mumby, 2022). Essa ligação inibe a transcrição de genes que codificam proteínas inflamatórias, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, resultando em uma redução na produção de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-23 e quimiocinas, e aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 (Barnes, 2014; Caramori *et al.*, 2022).

Além disso, os corticosteroides diminuem a ativação e o recrutamento de células inflamatórias, como eosinófilos, mastócitos e linfócitos T, para as vias aéreas. No núcleo, esses corticosteroides também estimulam a transcrição de genes que codificam lipomodulinas, como a lipocortina ou anexina, que inibem a PLA₂, modulando negativamente as vias das COXs e LOXs, reduzindo a formação de prostanoídes e leucotrienos broncoconstritores (Pelaia *et al.*, 2016; Adcock; Mumby, 2022; Ora *et al.*, 2020). Diversos corticosteroides estão disponíveis na terapêutica, tanto na forma oral como inalatória, como a beclometasona, budesonida, fluticasona,

mometasona, dexametasona, dentre outros, que apresentam diferentes seletividades, potências e propriedades físico-químicas (Daley-Yates, 2015).

Os corticosteroides inalatórios são a principal escolha para a maioria dos pacientes asmáticos, apresentando um bom perfil de segurança, enquanto o uso de corticosteroides sistêmicos é limitado a pacientes com asma grave, pois estão correlacionados com maior risco de efeitos adversos (Schleimer, 2004; Umland *et al.*, 2002). Eles incluem ganho de peso, diabetes, úlceras e sangramento gastrintestinais, osteoporose, supressão da adrenal, supressão do crescimento em crianças, dislipidemias, glaucoma, catarata, redução da cicatrização de feridas e aumento do risco de infecção (Ora *et al.*, 2020).

Os SABA administrados por inalação, através de nebulizadores ou de espaçadores e inaladores, como o salbutamol e a terbutalina, são a terapia mais eficaz para a rápida reversão da obstrução do fluxo de ar e alívio imediato dos sintomas asmáticos. Esses broncodilatadores ativam os receptores adrenérgicos- β_2 , levando ao relaxamento do músculo liso e à melhora da obstrução das vias aéreas (Marques; Vale, 2022).

Entretanto, o tratamento com SABA isolado não é mais indicado, devendo ser associado a um corticosteroide inalatório (Redell *et al.*, 2019), tendo em vista que seu uso regular está relacionado à regulação negativa do receptor adrenérgico- β_2 , perda da resposta ao broncodilatador, aumento da inflamação e hiper-responsividade das vias aéreas (Cockcroft *et al.*, 1993; Hancox *et al.*, 2000). Dessa forma, os SABAs são usados para o alívio dos sintomas da asma em crises agudas, conforme necessário, ou preventivamente em situações de atividades que são conhecidas por provocar esses sintomas, como de forma prévia aos exercícios físicos (Gina, 2024).

A combinação de corticosteroides com LABAs inalatórios, como salmeterol ou formoterol, é amplamente reconhecida como uma estratégia eficaz para melhorar os sintomas e reduzir os riscos de exacerbações da asma (Adcock; Caramori; Kirkham, 2012; Henderson *et al.*, 2020). Essa eficácia decorre da ação sinérgica sobre diferentes tipos de células inflamatórias e de interações moleculares entre os dois fármacos. Os corticosteroides também podem aumentar a expressão de receptores adrenérgicos- β_2 na mucosa brônquica, potencializando a resposta aos LABAs (Mak; Nishikawa; Barnes, 1995).

Simultaneamente, os LABAs intensificam a ação dos glicocorticoides ao promover a translocação e aumentar a atividade nuclear do receptor de

glicocorticoides, aumentando assim a sensibilidade aos corticosteroides. Essa interação resulta em um efeito aditivo das ações individuais de cada fármaco, otimizando o tratamento da asma (Chung *et al.*, 2009; Mercado *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 2020).

Na prática clínica, a escolha da droga, do dispositivo inalatório e da respectiva dose deve ser baseada na avaliação do controle dos sintomas, nas características do paciente, como fatores de risco, capacidade de usar o dispositivo de forma correta e custo, no julgamento clínico e na disponibilidade do medicamento. Portanto, não existe uma droga, dose ou dispositivo inalatório que se aplique indistintamente a todos os asmáticos (Pizzichini *et al.*, 2020).

O brometo de tiotrópio ou ipratrópio, antagonistas muscarínicos de ação curta (SAMA) e longa (LAMA), respectivamente, também estão incluídos no manejo da asma, por promoverem broncodilatação e diminuição da secreção de muco, reduzindo os quadros de obstrução das vias aéreas. Esses medicamentos podem ser considerados como terapia complementar em casos de asma persistente, e podem ser utilizados em associação dupla ou tripla com corticosteroide inalatório e LABA, com evidências de melhora da função pulmonar e redução das taxas de exacerbação da asma em pacientes adultos (Kerstjens *et al.*, 2012; Szelfer *et al.*, 2017; Hamelmann *et al.*, 2017; Calhoun; Chupp, 2022; Gina, 2024).

Os cromoglicatos, como o nedocromil e cromogligato de sódio, constituem uma classe de substâncias anti-inflamatórias empregadas no tratamento da asma. Eles atuam principalmente inibindo a liberação de mediadores contráteis pelos mastócitos mediada por IgE, de forma dependente de dose (Leung *et al.*, 1988). Em nível molecular, esses compostos são descritos como agonistas do receptor acoplado à proteína G 35 (GPR35), que é encontrado em mastócitos, basófilos e eosinófilos (Kay *et al.*, 1987; Netzer *et al.*, 2012). Além disso, estudos demonstram que o cromogligato de sódio reduziu o número de eosinófilos, mastócitos, linfócitos T e macrófagos e a expressão de moléculas de adesão para promover seu efeito anti-inflamatório (Hoshino; Nakamura, 1997).

Outros medicamentos utilizados como tratamento de manutenção da asma, são os modificadores da via dos leucotrienos, incluindo o antagonista competitivo dos receptores de leucotrienos (CysLT₁), como o montelucaste e zafirlucaste, e o inibidor da 5-lipoxigenase, a zileutona. Eles têm um efeito broncodilatador, diminuindo a inflamação e a produção e secreção de muco (Hon; Leung; Leung, 2014). Porém, são

menos eficazes do que os corticosteroides, especialmente para asma grave. Além disso, o montelucaste tem sido associado a eventos adversos neuropsiquiátricos, como problemas comportamentais e, em alguns casos, ideação suicida (Gina, 2024).

Para pacientes com asma grave, o uso de agentes biológicos deve ser considerado. A terapia anti-IgE é uma abordagem de tratamento direcionada usada, principalmente para controlar doenças alérgicas por meio da neutralização da IgE. O omalizumabe é atualmente o único anticorpo monoclonal aprovado que se liga seletivamente à IgE livre, impedindo a ligação e acelerando a dissociação dos receptores FcεRI, com consequente inibição da liberação de mediadores inflamatórios e contráteis das vias aéreas (Vogel; Engeroff, 2024; Liu *et al.*, 2025).

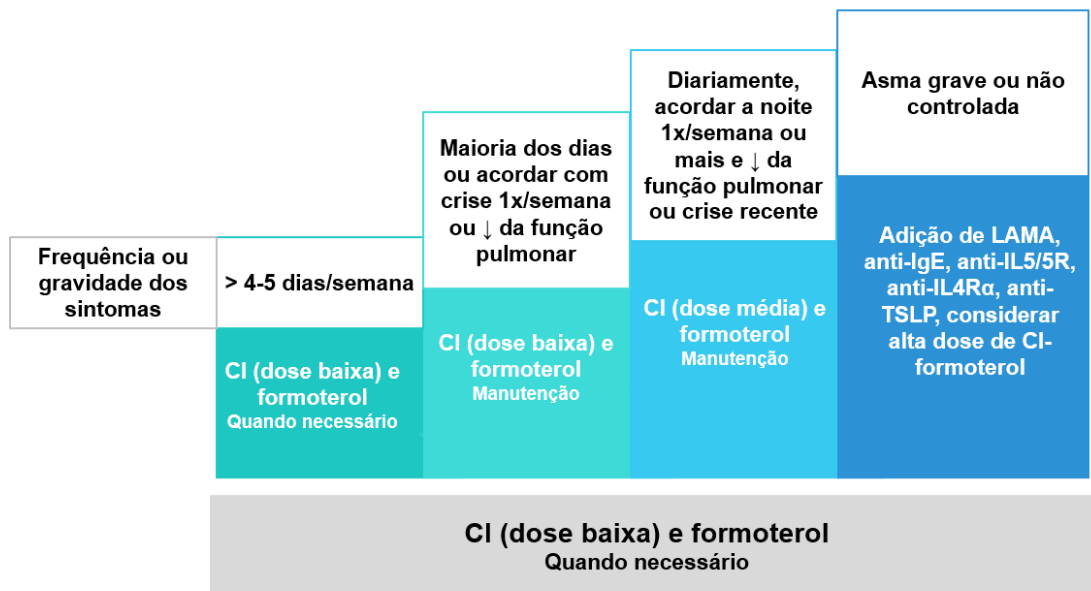
Além disso, vários outros medicamentos biológicos dirigidos a moléculas inflamatórias mediadas pelo perfil de resposta Th2 são indicados para o tratamento da asma cujo controle não é possível com uso da terapia convencional, como os bloqueadores de IL-5 (mepolizumabe e reslizumabe) e o antagonista de receptor de IL-5 (benralizumabe), assim como o dupilumabe, um anticorpo monoclonal humanizado que antagoniza o receptor de IL-4 e IL-13, inibindo a sinalização dessas citocinas e diminuindo a produção de IgE (Agache *et al.*, 2020; Salter *et al.*, 2022).

A utilização de terapias combinadas é incentivada pela Gina (2024), e essa diretriz categoriza o tratamento da asma em duas linhas, cada uma composta por etapas que aumentam em complexidade conforme a gravidade dos sintomas (Figura 14). Na primeira linha de tratamento, recomenda-se o uso de corticosteroides inalatórios em baixas doses em combinação com LABA, que tem demonstrado reduzir o risco de exacerbações graves. Sua administração pode ocorrer diariamente como tratamento de manutenção ou a qualquer momento para o alívio dos sintomas. Entretanto, pode ser necessário aumento das doses e inserção de outras classes de medicamentos a depender da necessidade e gravidade do paciente.

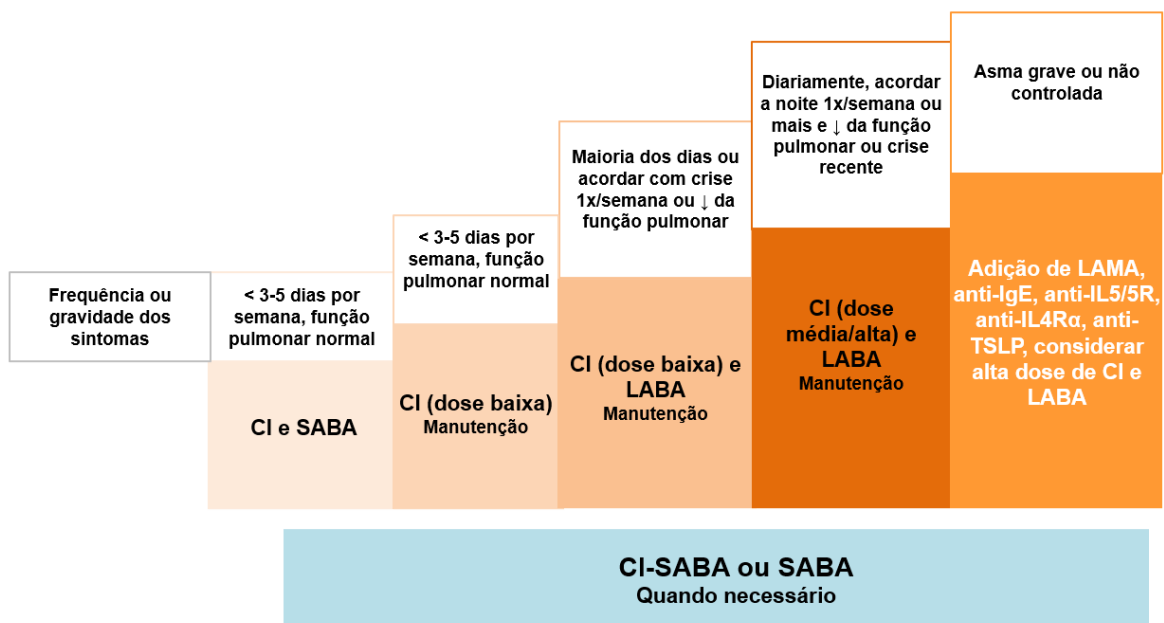
Para a segunda linha de tratamento, uma abordagem alternativa é adotada quando a primeira linha não é adequada. Em casos de asma leve, recomenda-se o uso de corticosteroides inalatórios em baixas doses com um SABA, podendo ser administrados juntos em um inalador combinado ou separadamente para o alívio dos sintomas. Com a progressão dos sintomas, é possível aumentar a dose do corticosteroide inalatório, adicionar um LABA ou outras classes de medicamentos (Gina, 2024).

Figura 14 – Linhas de tratamento da asma de acordo com as características clínicas do paciente e a gravidade da doença. Primeira (A) e segunda abordagem (B).

A



B



CI: corticosteroide inalatório; LABA: agonista adrenérgico-β de ação longa; SABA: agonista adrenérgico-β de ação curta.

Fonte: adaptado de Gina (2024).

2.8 Ácido láurico

Tendo em vista que os principais fármacos disponíveis na terapêutica da asma ainda apresentam diversos efeitos adversos, os quais podem se tornar mais intensos

com o aumento das doses dos medicamentos, uma situação comum em casos mais graves da doença, torna-se de primordial importância a busca por novas alternativas complementares à terapia medicamentosa contra essa desordem respiratória, a fim de minimizar esses efeitos.

Diante disso, destacam-se os produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de medicamentos, sendo estes explicados pela relevância biológica de suas estruturas. Estas substâncias naturais incorporam novidades estruturais e complexidades que geram diferentes atividades biológicas, muitas vezes levando à descoberta de novos alvos ou mecanismos de ação (Yao *et al.*, 2017; Atanasov *et al.*, 2021).

Nesse contexto, destacam-se os óleos vegetais, como o óleo de palmiste (*Elaeis guineensis*), babaçu (*Attalea speciosa*) e de coco (*Cocos nucifera* L.), pertencentes à família Aracaceae. Estes produtos naturais se destacam por serem importantes fontes de ácidos graxos (Deen *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos, que são ácidos carboxílicos acíclicos com caudas alifáticas, geralmente são classificados de acordo com o grau de saturação, em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados. Também, são classificados de acordo com o comprimento da cadeia que variam no número de carbonos, em cadeia curta, que apresentam até 6 átomos de carbono; cadeia média, que contêm de 6-12 carbonos e cadeia longa, com mais de 12 carbonos (Layden *et al.*, 2013; Deen *et al.*, 2021).

Esses compostos são os principais componentes dos triacilgliceróis, fosfolipídios e outros lipídios complexos, portanto, importantes componentes das membranas celulares e fontes essenciais de energia, representando os principais contribuintes para a gordura dietética em humanos. Quando esterificados, sob a forma de triglicerídios, atuam como a principal reserva energética do corpo, armazenados no tecido adiposo branco (Lappano *et al.*, 2017; Jadhav; Annapure, 2023).

Além disso, os ácidos graxos também estão envolvidos em diversos eventos biológicos, como metabolismo celular, inflamação, apoptose e produção de mediadores lipídicos bioativos, contribuindo assim para múltiplas respostas fisiopatológicas (Engelbrecht *et al.*, 2008; Turcotte *et al.*, 2015).

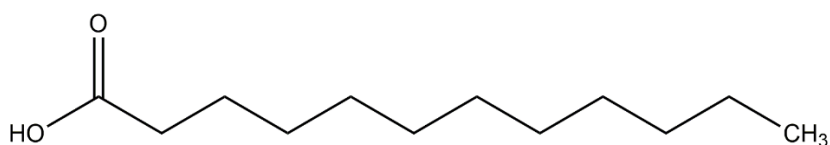
Dentre estes compostos, destaca-se o ácido láurico (AL) ou ácido dodecanoico (Figura 15), um ácido graxo saturado de cadeia média que contém 12 átomos de carbono (Dayrit, 2015; Eyres *et al.*, 2016). De acordo com suas propriedades físico-químicas, o AL é um sólido branco à temperatura ambiente, com um ponto de fusão

em torno de 44 °C. Uma vez que é um ácido graxo saturado, o AL possui alta estabilidade, sendo menos propenso à oxidação em comparação com ácidos graxos insaturados (Jadhav; Annapure, 2023).

O AL está naturalmente presente em várias gorduras e óleos vegetais e animais. Além disso, o AL compõe 6,2% do leite materno humano, 3,1% do leite de cabra e 2,9% do leite de vaca (Sandhya; Talukdar; Bhaishya, 2016). Outra fonte também relatada são as larvas de *Hermetia illucens*, popularmente conhecida como “mosca soldado-negro”, criadas em resíduos de frutas, que apresenta um teor de até 76% de AL (Suryati *et al.*, 2023). Embora presente em pequenas quantidades, o AL pode ser encontrado em plantas como noz-moscada selvagem, semente de pupunha, noz de bétela, tamareira, noz de macadâmia e semente de melancia (Sandhya *et al.*, 2016).

Uma das principais fontes do AL é o óleo de coco, que apresenta este composto como ácido graxo majoritário em sua composição, contendo 45,1-53,2% do total de ácidos graxos (Codex Alimentarius Commission, 2005), sendo o AL associado à algumas atividades farmacológicas promovidas pelo óleo de coco (Alves *et al.*, 2017; Mohammed *et al.*, 2021).

Figura 15 – Estrutura química do ácido láurico.



Fonte: Autor, 2025.

Atualmente, o AL é amplamente utilizado na indústria cosmética, integrando diversas formulações, como cremes, loções, sérums e géis de limpeza facial. Seu uso é destacado devido à ação antiacne, atuando como agente bactericida contra a *Propionibacterium acnes* (Yang *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2016). Na área industrial, o AL também é apontado como um substrato promissor para a produção de biodiesel (Cai *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020b).

É relatado que o AL apresenta vários efeitos benéficos, como a prevenção contra a hiperplasia prostática benigna (Babu *et al.*, 2010), atividades anti-diabética (Sheela; Nazeem; Narayanankutty, 2017; Alex *et al.*, 2020), neuroprotetora (Nishimura *et al.*, 2018; Shaheryar *et al.*, 2023) e de maturação neuronal (Nakajima; Kunugi,

2020), antimicrobiana (Yang *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2021), antitumoral (Lappano *et al.*, 2017; Sheela *et al.*, 2019; Buva *et al.*, 2024) e anti-obesidade (Zhang *et al.*, 2020a; Xia *et al.*, 2021).

Além disso, estudos relatam também que o AL promove a redução de fatores pró-aterogênicos (Ong *et al.*, 2019) e de complicações hepatometabólicas na doença hepática gordurosa (Sedik *et al.*, 2024), reduz a inflamação hepática (Khan *et al.*, 2021), previne a síndrome metabólica (Hernández-Pérez *et al.*, 2022) e melhora os danos reprodutivos induzidos pela hiperglicemia (Anuar *et al.*, 2023).

O AL também apresenta atividade anti-hipertensiva e vasorrelaxante em ratos normotensos e hipertensos, por meio da redução do estresse oxidativo no coração e rins (Alves *et al.*, 2017), previne a redução do relaxamento do corpo cavernoso de ratos diabéticos (Olubiyi *et al.*, 2022), reduz a inflamação e mudanças estruturais pulmonares (Dubo *et al.*, 2019) e o estresse oxidativo nos pulmões de ratos com diabetes *mellitus* tipo 2 (Augustine *et al.*, 2022). Associado a isso, o AL administrado na dose única de 2000 mg/kg por via oral não demonstrou possuir toxicidade aguda em ratas *Sprague Dawley* (Khan *et al.*, 2020) ou crônica em ratos albinos quando administrado na dieta à 10% (Fitzhugh; Schouboe; Nelson, 1960).

A maior parte do AL ingerido é diretamente transportada para o fígado, onde é convertida em energia e outros metabólitos, em vez de ser armazenada na forma de gordura. Dentre esses metabólitos, destacam-se os corpos cetônicos, que podem ser utilizados por tecidos extra-hepáticos, como o cérebro e o coração, como fonte direta de energia. Além disso, o metabolismo do LA pelo fígado não causa prejuízos a órgãos como o pâncreas, o fígado e o sistema digestivo, o que reforça sua segurança para o organismo (Dayrit, 2015).

Isto posto, uma vez que há relatos de que o óleo de coco virgem reverte as alterações de hiper-reatividade do músculo liso traqueal, de inflamação pulmonar e de remodelamento tecidual ocasionados pela indução da asma em animais (Kamalaldin *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2020), e este produto apresenta como componente majoritário o AL, que já apresentou efeito relaxante em modelos de músculo liso (Alves *et al.*, 2017; Olubiyi *et al.*, 2022) e atividade anti-inflamatória (Dubo *et al.*, 2019) e antioxidante (Augustine *et al.*, 2022), levantou-se a hipótese de que este ácido graxo poderia ser o responsável pelos efeitos promovidos pelo óleo de coco virgem.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito preventivo do ácido láurico sobre as alterações promovidas pela asma alérgica induzida por ovalbumina (OVA) nas vias aéreas de ratos Wistar, caracterizando seus possíveis mecanismos de ação *in silico* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar a toxicidade de doses repetidas do ácido láurico (100 mg/kg) em machos e fêmeas Wistar, avaliando:
 - Alterações comportamentais;
 - Aspectos macromorfológicos;
 - Avaliação ponderal, consumo de ração e água, hematológica e bioquímica.
- ✓ Avaliar os efeitos da asma alérgica induzida por OVA e o possível efeito preventivo do ácido láurico em ratos Wistar sobre a:
 - Ventilação pulmonar;
 - Reatividade contrátil e relaxante traqueal *in vitro*.
- ✓ Realizar estudos *in silico* de *docking* molecular com o ácido láurico;
- ✓ Caracterizar possíveis mecanismos de ação do ácido láurico em ratos Wistar sobre a/o:
 - Via das ciclo-oxigenases (COX) e 5-lipoxigenases (5-LOX);
 - Via do óxido nítrico (NO);
 - Desbalanço do estresse oxidativo e defesas antioxidantes;
 - Via da RhoA/ROCK;
 - Via do TGF- β .
- ✓ Avaliar os efeitos preventivos do ácido láurico sobre as alterações anatomopatológicas do parênquima pulmonar.

4 Material e métodos

4.1 Material

4.1.1 Animais

Eram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-300 g, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e mantidos na Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e mantidos sob condições controle de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, sob o nº 9310040522 (ID001692) (Anexo 1).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais, de acordo com o “Guidelines for the Ethical Use of Animals in Applied Ethology Studies” (Sherwin *et al.*, 2003) e o Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Brasil, 2016).

A avaliação da função respiratória *in vivo* era realizada no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial (LACONCHA) do Centro de Biotecnologia/UFPB, sob responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves. Os protocolos de análise bioquímica e hematológica foram realizados no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) do IPeFarM/UFPB, sob responsabilidade da Profa. Daniele Idalino Janebro Ximenes.

A análise histológica e de imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Patologia do Departamento de Ciências Biomédicas/UFPB, em colaboração com o Prof. Dr. Adriano Francisco Alves. As análises *in silico* foram realizadas com a equipe de pesquisa da Profa. Dra. Luciana Scotti do Laboratório de Quimioinformática do IPeFarM/UFPB. Os experimentos bioquímicos, executados com o auxílio da Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio, e os *in vitro*, eram realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas (LFF) do IPeFarM/UFPB.

4.1.2 Substâncias e reagentes

O cloreto de sódio (NaCl), o cloreto de potássio (KCl), o sulfato de magnésio (MgSO_4), o fosfato de potássio (KH_2PO_4), o cloreto de cálcio (CaCl_2), a glicose, o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos pela Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil).

O ácido láurico, o hidróxido de alumínio $[(\text{Al}(\text{OH})_3)]$, a ovalbumina (OVA) (grau II e V), o cloridrato de carbamilcolina (CCh), a aminofilina, a apocinina, o cloridrato de N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), a indometacina, o tempol, a hematoxilina, a eosina e o tricrômico de Masson, o ácido tiobarbitúrico, o ácido tricloacético, a sulfanilamida, a N-(1-naftil) etilenodiamina hidrocloreto, o ácido fosfórico, 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico), o tampão fosfato, o ácido clorídrico, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a L-metionina, o n-butanol, o nitro-azul de tetrazólio e a riboflavina foram obtidos de foram obtidos na Sigma-Aldrich (São Paulo-SP, Brasil).

O nifedipino, a zileutona, o di-hidrocloreto de (R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil) ciclohexanocarboxamida (Y-27632), o hidrato de 4-(5-benzol[1,3]dioxol-5-il-4-piridina-2-il-1H-imidazol-2-il)-benzamida (SB-431542) foram adquiridos da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos).

A cetamina e a xilazina foram adquiridas da Syntec (Barueri, São Paulo, Brasil). A dexametasona foi adquirida da Aché Laboratórios Farmacêuticos (Guarulhos, São Paulo, Brasil); e o soro fisiológico (NaCl 0,9%) foi adquirido da Fresenius Kabi LTDA (Aquiraz – Ceará, Brasil). Os anticorpos anti-alfa actina do músculo liso e anti-ROCK1 foram adquiridos da Induslab Nordeste (Lauro de Freitas-BA, Brasil).

Essas substâncias eram dissolvidas e diluídas com água destilada para a obtenção de cada solução-estoque, exceto cetamina, a xilazina e a dexametasona, que não eram diluídas, a OVA, que era dissolvida em soro fisiológico (NaCl 0,9%) e a apocinina, a indometacina e o Y-27632, que eram dissolvidos em álcool absoluto (96 °GL) para obtenção de cada solução-estoque, as quais eram mantidas sob refrigeração a -20 ou 4 °C. Quando necessário, as substâncias eram diluídas em água destilada para a obtenção das concentrações apropriadas.

O álcool absoluto foi adquirido da Neon Comercial (Suzano-SP, Brasil), o xilol, a parafina e o formaldeído foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea

LTDA (Indaiatuba – SP, Brasil). A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) foi adquirida da White Martins (Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

4.1.3 Solução Nutritiva

Para os protocolos de reatividade traqueal era utilizada solução nutritiva de Krebs, ajustada ao pH 7,4 (com uma solução de HCl ou NaOH, 1 N), gaseificada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 37 °C, apresentando a seguinte composição, em mM: NaCl (118,0), KCl (4,5), MgSO₄ (5,7), KH₂PO₄ (1,1), CaCl₂ (2,5), glicose (11,0) e NaHCO₃ (25,0).

As amostras para procedimentos histológicos eram conservadas em solução de formaldeído tamponado (10%) com a seguinte composição: formaldeído (1:10 v/v), NaH₂PO₄ (0,04:10 m/v), Na₂HPO₄ (0,005:10 m/v) e H₂O (9:10 v/v).

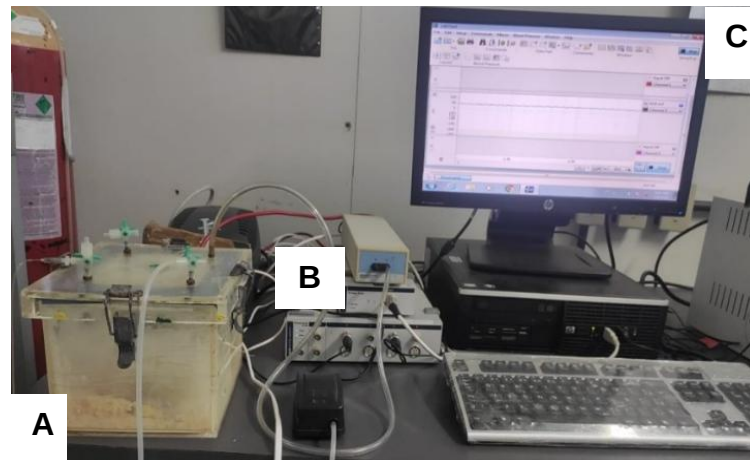
4.1.4 Equipamentos

Para avaliação da ventilação respiratória foi utilizado um espirômetro (ML141, PowerLab, ADInstruments) e o sistema de aquisição de análise de dados LabChart TM Pro (PowerLab, ADInstruments) (Figura 16).

Para o registro das contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL), modelo BOI-04, e conectados a transdutores de força isométricos, modelo TIM 05, acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.5.0 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema continha uma bomba termostática modelo BT 60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, Brasil) (Figura 17).

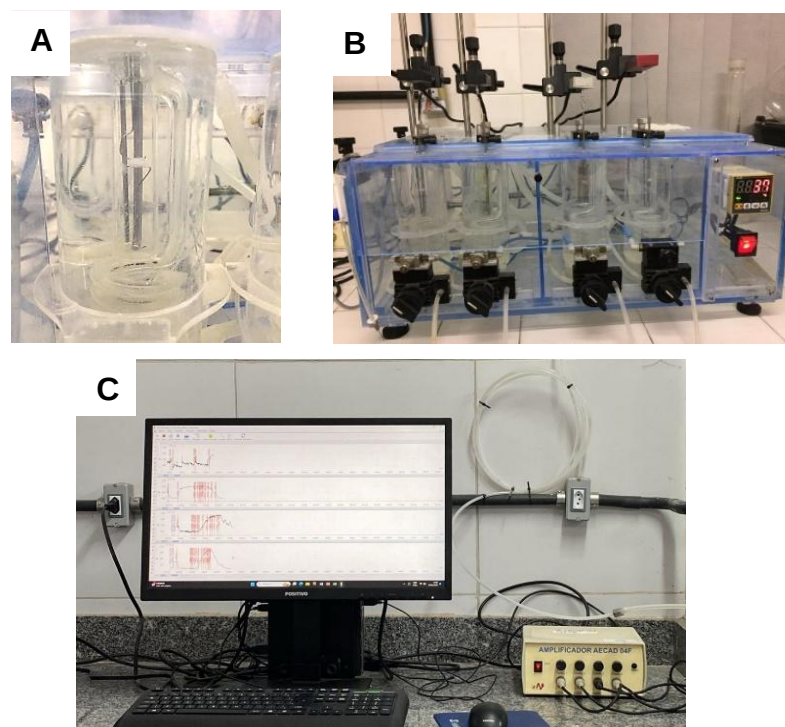
Para a centrifugação das amostras, foi utilizada uma microcentrífuga refrigerada, modelo LIF500R (LabinFarma Scientific, Piracicaba-SP, Brasil). As medidas de absorbância foram feitas utilizando uma leitora de microplacas, modelo MR9600 (Accuris Instruments, Nova Jersey, EUA).

Figura 16 – Câmara pletoimográfica de corpo inteiro (A), transdutor diferencial de pressão e o amplificador de sinais (B) e sistema de aquisição digital de dados conectados ao amplificador (C).



Fonte: Autor, 2025.

Figura 17 – Cuba de banho contendo anel de traqueia suspenso (A), sistema de cubas de banho conectados a transdutores de força isométricos e (B) e sistema de aquisição digital de dados conectados ao amplificador (C).



Fonte: Autor, 2025.

Para a realização dos cortes histológicos, as amostras eram submetidas ao processador de tecidos, modelo PT05 (LUPTEC, Brasil), seccionadas em micrótomo

rotativo, modelo RM 2125 RT (Leica, Alemanha), analisadas em microscópio óptico (Motic BA 410), fotografadas através de câmera, modelo Nikon Ds-Ri2, e posteriormente analisadas por programa analisador de imagem (KS 300 software).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação do ácido láurico

Era utilizado Tween[®] 80 como agente solubilizante e NaCl 0,9%, e a solução era colocada a 40 °C em banho-maria e mantida sob agitação constante até solubilização completa da substância.

4.2.2 Grupos experimentais

Para o protocolo de toxicidade de doses repetidas, os animais foram randomicamente divididos em 2 grupos, com 10 animais, sendo 5 ratos e 5 ratas cada:

- 1) Grupo controle (GC) = tratados com NaCl 0,9% + Tween[®] 80;
- 2) Grupo ácido láurico 100 mg/kg (GAL100) = tratados com o ácido láurico na dose de 100 mg/kg + Tween[®] 80.

Para os demais protocolos, os animais eram divididos randomicamente em 6 grupos experimentais, com 5 ratos cada:

- 1) Grupo controle (GC) – não sensibilizados e tratados com NaCl 0,9% + Tween[®] 80;
- 2) Grupo asmático (GA) – sensibilizados com ovalbumina (OVA) e tratados com NaCl 0,9% + Tween[®] 80;
- 3) Grupo asmático ácido láurico 25 mg/kg (GAAL25) – sensibilizados com OVA e tratados com 25 mg/kg do ácido láurico;
- 4) Grupo asmático ácido láurico 50 mg/kg (GAAL50) – sensibilizados com OVA e tratados com 50 mg/kg do ácido láurico;
- 5) Grupo asmático ácido láurico 100 mg/kg (GAAL100) – sensibilizados com OVA e tratados com 100 mg/kg do ácido láurico;
- 6) Grupo asmático dexametasona 5 mg/kg (GADEXA) – sensibilizados com OVA e tratados com 5 mg/kg de dexametasona.

Nos protocolos *in vivo* foram utilizados grupos com 6 animais. Já nos protocolos *in vitro* foram utilizados grupos com 5 animais. A partir disso, a dose do ácido láurico

mais eficaz em prevenir as alterações induzidas pela asma na maioria dos parâmetros avaliados foi escolhida para iniciar o estudo de caracterização de seu mecanismo de ação.

4.2.3 Tratamento dos animais

No protocolo de toxicidade de doses repetidas, os animais receberam durante 28 dias, por via intragástrica através do método de gavagem, doses diárias de 100 mg/kg (Adaptado de OECD, 2008).

Os animais do grupo GADEXA, durante os últimos 5 dias de indução da asma, receberam 5 mg/kg/dia de dexametasona por via intraperitoneal (i.p.) (Dong *et al.*, 2014). Os grupos com asma e tratados com o ácido láurico receberam doses diárias de 25, 50 ou 100 mg/kg por via intragástrica, baseado em estudos anteriores (Anuar *et al.*, 2023), durante os 21 dias da indução da doença, finalizando no dia anterior ao da eutanásia do animal.

4.2.4 Avaliação da toxicidade de doses repetidas e triagem farmacológica comportamental do ácido láurico em ratos Wistar

Para avaliação da toxicidade oral de doses repetidas, era utilizada a metodologia descrita no guia nº 407 da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Adaptado de OECD, 2008). Neste estudo, foram utilizados 20 animais, distribuídos em 2 grupos, cada qual com 10 animais, sendo 5 machos e 5 fêmeas nulíparas e não grávidas. Os animais eram tratados diariamente com ácido láurico por via intragástrica na dose de 100 mg/kg (GAL100) ou com NaCl 0,9% e Tween® 80 (GC) durante 28 dias. Após o período de tratamento e observação de 28 dias, os animais eram acompanhados por 14 dias sem tratamento para detectar ocorrência tardia ou persistência e recuperação de possíveis efeitos tóxicos.

Além disso, parâmetros comportamentais de avaliação de estimulação do sistema nervoso central (SNC) (como agressividade e ambulação aumentada, etc), depressão do SNC (como analgesia e anestesia, etc) e avaliação da atividade sobre sistema nervoso periférico (como cianose e piloereção, etc) foram avaliados antes do início das administrações e por até 4 horas, seguido de avaliação periódica até o final do protocolo (Almeida *et al.*, 1999) (Material suplementar do Artigo 1 – Tabela S4).

4.2.4.1 Avaliação ponderal, ingestão alimentar e hídrica e peso de órgãos

Os animais eram pesados em balança semi-analítica antes dos tratamentos e, em seguida, semanalmente, sendo calculado o ganho ponderal médio dos animais. Para quantificação da ingestão alimentar e hídrica, o consumo era calculado pela diferença entre a quantidade oferecida e a quantidade restante que não foi ingerida, sendo realizado para cada caixa e dividido pelo número de animais. Após a eutanásia com cetamina (180 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) via intraperitoneal, o coração, rins, fígado, baço, estômago, pulmão, útero, ovários, testículos e intestinos foram removidos, pesados e avaliados macroscopicamente.

4.2.4.2 Análise hematológica e bioquímica

Após o último dia de observação, no 42º dia, os animais foram eutanasiados, seguido de coleta do sangue realizada através de punção venosa da veia cava abdominal inferior, utilizando seringas heparinizadas.

Na análise hematológica, o sangue foi coletado em tubos contendo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), para realização do eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas. No eritrograma realizou-se a contagem de hemácias, determinação da hemoglobina, do hematócrito, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma foi feita a contagem global e diferencial dos leucócitos.

Para avaliação de parâmetros bioquímicos, o sangue foi coletado em tubos com gel separador Microtainer Becton Dickson®, que foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm, com a obtenção do soro. Foram quantificados glicose, colesterol total, transaminases aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), ácido úrico e ureia.

4.2.5 Avaliação do efeito do ácido láurico na hiper-responsividade das vias aéreas em ratos Wistar

4.2.5.1 Indução da asma (sensibilização e desafios com ovalbumina)

Inicialmente, para o protocolo de sensibilização, nos dias 1-3 do experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de 1 mg/kg/dia de OVA (grau V) solubilizada em NaCl 0,9% estéril e utilizando-se como adjuvante 100 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃]. Nos dias 6, 9, 12, 15, 18 e 21, os animais eram colocados individualmente em uma caixa poliacrílica fechada acoplada a um nebulizador ultrassônico (Figura 18). Logo após, eram desafiados com OVA 1% (grau II), por até 20 minutos diários. Os animais não sensibilizados eram submetidos ao mesmo processo, porém utilizando apenas NaCl 0,9%, tanto para as administrações i.p. como para as nebulizações. Todos os animais eram eutanasiados 24 horas após o último desafio com OVA ou NaCl 0,9% (dia 22) (Salmon *et al.*, 1999; adaptado de Galvão *et al.*, 2017) (Figura 19).

Figura 18 – Aparato utilizado para nebulização dos ratos, contendo caixa poliacrílica fechada acoplada a um nebulizador ultrassônico.



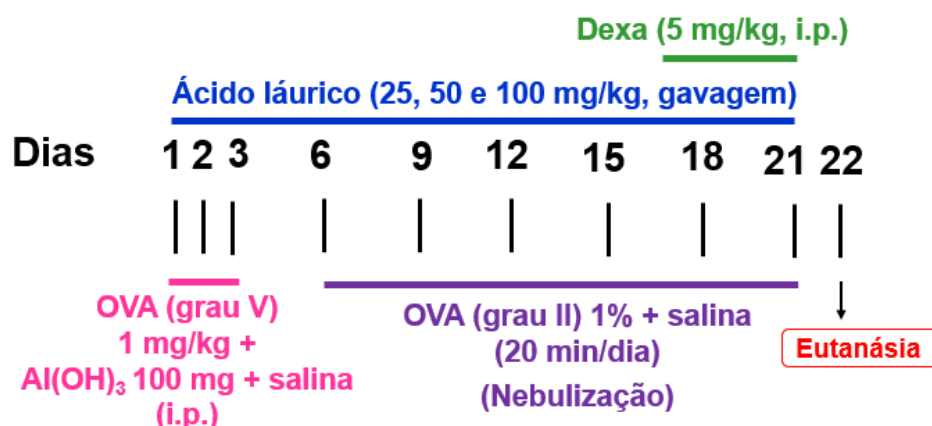
Fonte: Autor, 2025.

4.2.5.2 Avaliação da ventilação pulmonar

Nos dias 1, 12 e 21 do protocolo de indução de asma, após a nebulização (OVA ou solução salina), os animais eram submetidos a medidas de ventilação pela técnica de pletismografia em câmara de corpo inteiro, adaptado da literatura (Malan, 1973). O

procedimento consistia em inserir o animal em um sistema fechado para entrada dos gases. As flutuações de pressão dentro do sistema eram consideradas devido à diferença de temperatura entre o gás inspirado (~ 25 °C) e o gás expirado (~ 37 °C) para a análise dos parâmetros ventilatórios.

Figura 19 – Protocolo de indução da asma em ratos.



OVA: ovalbumina; Al(OH)₃: hidróxido de alumínio; Dexa: dexametasona.

Fonte: Autor, 2025.

Inicialmente, os animais eram aclimatados à câmara por um período de 15 min, a qual era ventilada com ar ambiente neste período. Após este período, era interrompido o fluxo de ar e realizada a medição dos parâmetros por um período de 3 minutos. As oscilações causadas pela ventilação do animal eram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém um transdutor de pressão diferencial e amplificador de sinais. O sinal era enviado para o sistema de aquisição de análise de dados e quantificava a amplitude e frequência dos sinais respiratórios.

A calibração do volume era obtida durante cada experimento, injetando um volume conhecido de ar (10 mL) na câmara do animal por meio de uma seringa graduada. O sistema permite o registro das medidas da frequência respiratória (FR) em volts (V) que, posteriormente, eram analisadas em ciclos por minuto (CPM). A quantificação da FR era realizada retirando do registro total, de aproximadamente 3 minutos, um trecho correspondente a 10 segundos, livre de ruído e representativo do padrão de resposta gerado (Bartlett Jr; Tenney, 1970).

O volume corrente (VC) foi calculado através da fórmula:

$$VC = \frac{PT}{Pk} \times V_k \times \frac{T_c (PB-PA)}{T_c (PB-PA) - TA (PB-PC)}$$

Sendo,

PT: deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente;

PK: deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração;

Vk: volume de ar injetado na câmara do animal para calibração;

Tc: temperatura corporal;

PB: pressão barométrica;

PA: pressão de vapor d'água à temperatura da câmara;

TA: temperatura do ar dentro da câmara;

PC: pressão de vapor d'água à temperatura corporal.

O volume minuto (VM) foi calculado pelo produto de FR pelo VC. O VC e o VM estão apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente, à temperatura constante e saturados com vapor d'água.

4.2.5.3 Obtenção dos anéis de traqueia

Após 24h do último tratamento, os animais eram eutanasiados com cetamina (180 mg/kg, i.p.) e xilazina (30 mg/kg, i.p.), seguido de exsanguinação. Em seguida, a traqueia era isolada, dissecada e, então, cortada em fragmentos contendo de 3 a 4 anéis cartilagosos. Esses segmentos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL) contendo solução nutritiva de Krebs e sob tensão de 1 g. As preparações eram mantidas a uma temperatura de 37 °C, gaseificadas com carbogênio e permaneceram em repouso durante 60 minutos, sendo a solução de Krebs trocada a cada 15 minutos, para evitar a influência de metabólitos liberados pelo órgão no meio.

4.2.5.4 Avaliação da reatividade contrátil à ovalbumina em traqueia de ratos: reação de Schultz-Dale

A traqueia era montada como descrito no item anterior. Após o período de estabilização, quando a linha de base se mantinha constante, os anéis de traqueia eram estimulados com OVA 100 µg/mL e a amplitude da contração era comparada entre os grupos GC, GA, GAAL e GADEXA (Chand; Eyre, 1978; Lima; Silva, 1998).

4.2.5.5 Avaliação da reatividade contrátil ao KCl e ao CCh em traqueia de ratos

A traqueia era montada como descrito no item 4.2.5.3. Após o período de estabilização, quando a linha de base se mantinha constante, era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa por um agente eletromecânico (KCl) (Du *et al.*, 2006) ou por um agente farmacomecânico (CCh) (Ouedraogo; Roux, 2014).

A reatividade contrátil era calculada com base na amplitude média da resposta da traqueia de rato do GC, e as comparações foram feitas entre os grupos com base nos valores de efeito máximo ($E_{\max}$) e da concentração de uma substância que produz 50% do seu $E_{\max}$ (CE_{50}) dos agentes contráteis, calculados a partir das curvas cumulativas concentrações-resposta obtidas.

4.2.5.6 Avaliação da reatividade relaxante ao nifedipino ou à aminofilina em traqueia de rato pré-contraída com CCh

A traqueia era montada como descrito no item 4.2.5.3. Após o período de estabilização, quando a linha de base se mantinha constante, uma contração com 10^{-5} M de CCh era induzida e sobre o componente tônico era adicionado em concentrações cumulativas o nifedipino, um bloqueador dos canais de cálcio (Cheng; Townley, 1983), ou a aminofilina, um inibidor de fosfodiesterase (Matsuda *et al.*, 2000), eram adicionados em concentrações cumulativas até atingirem o seu $E_{\max}$.

A resposta relaxante era expressa como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo CCh. As comparações eram feitas entre os grupos com base nos valores de $E_{\max}$ e de CE_{50} dos agentes relaxantes, calculados a partir das curvas cumulativas concentrações-resposta obtidas.

4.2.6 Possíveis alvos farmacológicos do ácido láurico *in silico*

4.2.6.1 *Docking* molecular

A estruturas 3D das enzimas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (Bernstein *et al.*, 1977). Dentre as proteínas analisadas (Material suplementar do Artigo 1 - Tabela S1), as selecionadas para estudo de interação com o ácido láurico foram o receptor adrenérgico- β_2 , o canal de cálcio dependente de voltagem (Cav), os canais de potássio ativados pelo cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) e sensíveis ao ATP (K_{ATP}), a ciclase de adenilil (AC), a proteína cinase dependente de cGMP (PKG), a sintase de óxido nítrico (NOS) endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) e a cicloxigenases-2 (COX-2).

Destas proteínas selecionadas foram removidas todas as moléculas de água da estrutura cristalina e o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das posturas, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å.

O software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) com os parâmetros predefinidos foi utilizado nas simulações de *docking* molecular. O ligante complexado com a enzima foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, a estrutura do ácido láurico foi importada, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do Moldock Score.

Para tanto, foi utilizado o algoritmo Moldock SE (*Simplex Evolution*) com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2000 etapas de minimização global por corre. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções sp^2 - sp^2 .

4.2.7 Investigação do mecanismo de ação envolvido nas alterações induzidas pela asma e pelo tratamento com o ácido láurico sobre a reatividade contrátil da traqueia de ratos

4.2.7.1 Avaliação da participação dos produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico pelas enzimas cicloxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX)

Após o período de estabilização, era obtida uma curva controle concentrações-resposta cumulativa ao CCh. Após 30 minutos, a traqueia era pré-incubada com indometacina 10^{-5} M, um inibidor da COX (Hua; Back; Tam, 1996; Sousa *et al.*, 2010), ou zileutona 10^{-5} M, um inibidor da 5-LOX (Adaptado de Malo *et al.*, 1994), durante 30 minutos e, em seguida, era induzida uma nova curva cumulativa ao CCh.

A resposta contrátil da traqueia na presença dos inibidores foi calculada com base na média da amplitude máxima do GC. A reatividade contrátil foi avaliada tendo como base os valores de E_{max} e CE_{50} do CCh, e o efeito de cada inibidor sobre a curva cumulativa concentrações-resposta ao CCh foi comparada entre o GC, GA e GAAL25 na ausência e na presença da indometacina ou da zileutona.

4.2.7.2 Avaliação do envolvimento da via do NO

Após o período de estabilização, era obtida uma curva controle concentrações-resposta cumulativa ao CCh. Após 30 minutos, a traqueia era pré-incubada com L-NAME 3×10^{-4} M, um inibidor não seletivo da sintase do óxido nítrico (Sousa *et al.*, 2010) durante 30 minutos e, em seguida, era induzida uma nova curva cumulativa ao CCh (Ouedraogo; Roux, 2014). A resposta contrátil da traqueia na presença do inibidor foi calculada e avaliada como descrito anteriormente.

4.2.7.3 Avaliação do envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ROS)

Após o período de estabilização, era obtida uma curva controle concentrações-resposta cumulativa ao CCh. Após 30 minutos, a traqueia era pré-incubada com apocinina 10^{-4} M, um inibidor da NADPH oxidase (Shabir *et al.*, 2014), ou com tempol 10^{-3} M, um mimético da SOD (De Boer *et al.*, 2001; adaptado de Schnackenberg; Wilcox, 2001). Após esse tempo, era induzida uma nova curva cumulativa ao CCh. A

resposta contrátil da traqueia na presença dos inibidores foi calculada e avaliada como descrito anteriormente.

4.2.7.4 Avaliação do envolvimento da via da Rho cinase (ROCK)

Após o período de estabilização, era obtida uma curva controle concentrações-resposta cumulativa ao CCh. Após 30 minutos, a traqueia era pré-incubada com Y-27632 10^{-4} M, um inibidor da ROCK (Shibata *et al.*, 2006) durante 30 minutos e, em seguida, era induzida uma nova curva cumulativa ao CCh. A resposta contrátil da traqueia na presença do inibidor foi calculada e avaliada como descrito anteriormente.

4.2.7.5 Avaliação da participação do fator de crescimento transformador β (TGF- β)

Após o período de estabilização, era obtida uma curva controle concentrações-resposta cumulativa ao CCh. Após 30 minutos, a traqueia era pré-incubada com o SB-431542 10^{-5} M, um inibidor dos receptores do tipo I de TGF- β (Inman *et al.*, 2002; adaptado de Vasconcelos *et al.*, 2024), durante 30 minutos e, em seguida, era induzida uma nova curva cumulativa ao CCh. A resposta contrátil da traqueia na presença do antagonista foi calculada e avaliada como descrito anteriormente.

4.2.8 Avaliação dos efeitos da asma alérgica e do tratamento com o ácido láurico sobre o balanço entre o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes

4.2.8.1 Obtenção do homogenato pulmonar

Após a eutanásia dos animais, o pulmão esquerdo era coletado e congelado a -20 °C até o preparo do homogenato. Para isso, o tecido era pesado, macerado e homogeneizado com KCl 10% na proporção de 1:1. Para realização dos protocolos experimentais bioquímicos, os testes foram feitos em duplicatas.

4.2.8.2 Determinação do nível de peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica nos ratos era analisado pela medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O homogenato pulmonar era misturado com ácido tricloacético (10%) e ácido tiobarbitúrico (0,67%), que era então colocado em banho-maria, por 15 minutos. Após esse tempo, era adicionado n-butanol à solução e a amostra era centrifugada (800 g, 5 min). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico eram determinadas medindo a absorbância por espectrofotometria a 535 nm. Os resultados eram expressos em nmol de malonaldeído (MDA)/g de peso do órgão (Draper; Hadley, 1990).

4.2.8.3 Determinação de nitrito

Os níveis de nitrito do pulmão dos ratos eram determinados pela reação de Griess (Green; Goldman, 1981; Radenovic; Selakovic, 2005). O homogenato pulmonar era centrifugado (800 g/10 min, 24 °C), o sobrenadante era coletado e adicionado o reagente de Griess (sulfanilamida 1%, cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1%, ácido fosfórico 5% e água destilada, 1:1:1:1) e incubado, em temperatura ambiente, por 10 minutos. A concentração de nitrito era expressa em nM de nitrito/g de órgão e a absorbância das amostras era determinada por espectrofotometria a 560 nm.

4.2.8.4 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida

Este teste era executado de acordo com a reação do reagente de Ellman (DTNB - 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico), com os grupos tiois. O homogenato pulmonar era diluído em EDTA 0,02 M (10%) e misturado com solução de ácido tricloroacético (50%). Em seguida, as amostras eram centrifugadas (3000 rpm/15 min). O sobrenadante era coletado e misturado com tampão HCl (0,4M; pH 8.9) e DTNB (0,01M). A concentração de GSH (ng de GSH/g de órgão) era determinada por espectrofotometria a 412 nm (Sedlak; Lindsay, 1968).

4.2.8.5 Determinação da atividade da superóxido dismutase

O sobrenadante era centrifugado (20 min, 12.000 rpm, 4° C) e o sobrenadante resultante era estudado. Em uma câmara escura, 1 mL do reagente (50 mM de tampão fosfato, 100 nM de EDTA e 13 mM de L-metionina, pH 7,8) era misturado com 30 mL da amostra, 150 µL de NBT 75 µM (azul de nitrotetrazólio) e 300 µL de riboflavina 2 µM. Os tubos contendo a solução resultante era exposta a lâmpada fluorescente (15 W) por 15 minutos. A absorbância era determinada por espectrofotometria a 560 nm. O resultado era expresso em unidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50% por µg de proteína (U/µg proteína) (Beauchamp; Fridovich, 1971).

4.2.9 Avaliação dos efeitos da asma alérgica e do tratamento com o ácido láurico sobre a anatomopatologia do parênquima pulmonar

Após a eutanásia, o pulmão direito era coletado e imediatamente fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 72 horas. Após isso, era realizado o processamento histológico padrão, que consiste na desidratação em soluções crescentes de álcool do 70 °GL ao absoluto por 1h em cada solução, em seguida as amostras eram adicionadas duas vezes em um banho de xilol por 1 hora.

Por fim, os tecidos eram incluídos em parafina e cortados em micrótomo rotativo na espessura de 4 µm, montadas em lâminas histológicas e desparafinadas em xilol durante 30 minutos, hidratadas em álcoois em concentrações decrescentes (absoluto, 90, 80 e 70 °GL) por 25 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos, e após, lavadas em água destilada. As amostras então eram tratadas pela hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas novamente em água destilada por 5 minutos e novamente coradas pela eosina por 3 minutos.

As amostras também eram submetidas a uma coloração com solução do tricrômico de Masson por 12 minutos e, posteriormente lavadas em água corrente durante mais 30 segundos. Finalmente as lâminas eram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois (70, 80, 90 e absoluto °GL), diafanizadas em xilol, e montadas com Entellan®. As lâminas obtidas eram analisadas em microscópio óptico com câmera acoplada modelo Nikon Ds-Ri2 (Tóquio, Japão), onde foram fotografadas na objetiva de 40x (Alves *et al.*, 2019).

Para a análise imuno-histoquímica, as amostras foram reativadas com solução de citrato de recuperação com pH de 6,0 (EasyPath Diagnósticos) em câmara pressurizada Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca) e a peroxidase endógena foi bloqueada por 30 minutos (EasyPath Diagnósticos). Após essa etapa, foi realizado o bloqueio proteico inespecífico e os cortes foram preenchidos com anticorpo primário anti- α -actina do músculo liso (Novus/NBP130894/Polyclonal Antibody; 1:100). Posteriormente, foi adicionado anticorpo secundário biotinilado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho e anti-camundongo na diluição de 1:100, Link System- HRP-Dako 4061). A reação foi visualizada utilizando a solução de diaminobenzidina (DAB-HRP) 0,024% (EasyPath Diagnosticos) e contrastada com hematoxilina de Harris.

4.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.), e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* para comparações entre dois grupos experimentais, ou a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do pós-teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos experimentais. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism® 5.01 (Neubig *et al.*, 2003).

5 Resultados e discussão

5. 1 Artigo 1



Article

Repeated-Dose Toxicity of Lauric Acid and Its Preventive Effect Against Tracheal Hyper-responsiveness in Wistar Rats with Possible *In Silico* Molecular Targets

Indyra Alencar Duarte Figueiredo ^{1,2,*}, Alissa Maria de Oliveira Martins ^{1,2}, Alexya Mikelle Teixeira Cavalcanti ¹, Jayne Muniz Fernandes ¹, Ludmila Emilly da Silva Gomes ¹, Mateus Mendes Vieira ¹, Gabriel Nunes Machado de Oliveira ¹, Isabela Motta Felício ^{1,2}, Lucas Nóbrega de Oliveira ^{1,2}, Igor Gabriel da Silva Ramalho ^{1,2}, Natália Ferreira de Sousa ^{1,2}, Luciana Scotti ², Marcus Tullius Scotti ^{2,3}, José Luiz de Brito Alves ⁴, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz ^{2,5}, Daniele Idalino Janebro Ximenes ⁵, Luiz Henrique César Vasconcelos ^{1,2,6,*} and Fabiana de Andrade Cavalcante ^{1,2,6}

¹ Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; alissaoliveira@ltf.ufpb.br (A.M.d.O.M.); alexyacavalcanti08@gmail.com (A.M.T.C.); jaynemunizf@gmail.com (J.M.F.); ludmilaesgomes@gmail.com (L.E.d.S.G.); mateusmvd89@gmail.com (M.M.V.); gabrielsoad619@gmail.com (G.N.M.d.O.); isabela_motta@ltf.ufpb.br (I.M.F.); lucasnobrega@ltf.ufpb.br (L.N.d.O.)

² Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; igorgabriel0809@gmail.com (I.G.d.S.R.); nataliafsousa@ltf.ufpb.br (N.F.d.S.); luciana.scotti@gmail.com (L.S.);

³ Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; mtscotti@gmail.com (M.T.S.)

⁴ Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; jose.lui@academico.ufpb.br

⁵ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; dijanebro@yahoo.com.br; margarethdiniz.ufpb@gmail.com (M.d.F.F.M.D.)

⁶ Departamento de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; lhcv@academico.ufpb.br (L.H.C.V.); fabianacavalcante@ltf.ufpb.br (F.d.A.C.)

*Correspondence: indyrafigueiredo@hotmail.com (I.A.D.F.); lhcv@academico.ufpb.br (L.H.C.V.).

Abstract: Background/Objectives: Lauric acid (LA), a medium-chain fatty acid, is a promising drug for asthma treatment. This study evaluated the toxicity of repeated doses and the effect of LA on pulmonary ventilation and tracheal reactivity in asthmatic Wistar rats and identified possible molecular targets of LA action *in silico*. Methods: The rats were divided into control (CG) and LA-treated groups at 100 mg/kg (LA100G) for toxicity analysis. Pulmonary ventilation and tracheal reactivity were assessed in the control (CG), asthmatic (AG), asthmatic treated with LA at 25, 50, or 100 mg/kg (ALA25G, ALA50G, and ALA100G), and dexamethasone-treated groups (ADEXAG). Results: The results showed that LA at a dose of 100 mg/kg did not cause death or toxicity. A pulmonary ventilation analysis indicated that AG had reduced minute volume, which was prevented in ALA25G. LA at all doses prevented carbachol-induced tracheal hyper-responsiveness and the reduction of the relaxing effect of aminophylline, as observed in AG. An *in silico* analysis revealed that LA had a good affinity for nine proteins (β_2 -adrenergic receptor, Cav, BK_{Ca}, K_{ATP}, adenylyl cyclase, PKG, eNOS, iNOS, and COX-2). Conclusions: LA at 100 mg/kg has low toxicity, prevents hyper-responsiveness in an asthma model in rats, and acts as a multitarget compound with a good affinity for proteins related to airway hyper-responsiveness.

Keywords: dodecanoic acid; allergic inflammation; pulmonary ventilation; tracheal reactivity; ovalbumin; molecular docking

1. Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by airway hyper-responsiveness, varying degrees of airflow obstruction, and lung inflammation. It affects more than 300 million individuals worldwide, with prevalence rates ranging from 1 to 29% of the population in different countries [1].

Therefore, studies aimed at gaining a better understanding of the pathophysiological mechanisms of asthma, as well as the search for more efficient and effective additional treatments, are necessary [2]. In this context, natural products stand out as a starting point for discovery, as they contain compounds with structural novelty and complexity that generate various biological activities [3,4], such as vegetable oils, including coconut oil obtained from the species *Cocos nucifera* L.

There are reports that the inhalation of virgin coconut oil (VCO) in an ovalbumin-induced allergic asthma model in rabbits prevented the infiltration of inflammatory cells, tissue remodeling, and the number of goblet and proliferative cells [5]. Furthermore, VCO supplementation prevented peribronchial inflammatory infiltration, epithelial hyperplasia, smooth muscle thickening, and tracheal hyper-reactivity in an ovalbumin-induced asthma model in guinea pigs through antioxidant mechanisms and the nitric oxide (NO) pathway [6]. This natural product is an essential source of fatty acids [7,8]. Based on this, it was hypothesized that lauric acid could be the compound responsible for the prevention activities of the changes promoted by the asthma induction models exerted by virgin coconut oil.

Among the main compounds found in coconut oil, lauric acid (LA) or dodecanoic acid is highlighted, a medium-chain saturated fatty acid that contains 12 carbon atoms [9,10], accounting for 45.1–53.2% of the total fatty acids [11], and is associated with some of the pharmacological activities promoted by coconut oil [12,13].

Lauric acid (LA) has been reported to have several beneficial effects, such as the prevention of benign prostatic hyperplasia [14], antidiabetic [15], neuroprotective [16,17], neuronal maturation [18], antimicrobial [19,20], antitumor effects [21,22], anti-obesity [23], reduction in pro-atherogenic factors [24], reduction in hepatometabolic complications in non-alcoholic fatty liver disease [25], and reduction in liver inflammation [26], in addition to exhibiting antihypertensive and vasorelaxant activity [12].

Therefore, this study aimed to evaluate the safety of using lauric acid in repeated doses and investigate its effects in preventing alterations in pulmonary ventilation and tracheal hyper-responsiveness in an ovalbumin-induced asthma model in Wistar rats. Additionally, *in silico* molecular docking studies were conducted to evaluate the potential molecular interaction targets related to airway smooth muscle reactivity.

2. Results and Discussion

2.1. Repeated-Dose Toxicity and Behavioral Pharmacological Screening of Lauric Acid

To ensure the safety of using lauric acid in the other *in vivo* experimental protocols, a repeated-dose toxicity test was conducted by administering 100 mg/kg of lauric acid daily for 28 days, followed by an observation period of 14 days without the drug to assess the persistence of any potential toxic effects after treatment. No animal deaths were observed at the end of the 42-day observation period.

Additionally, a behavioral, pharmacological screening test was conducted on the first day following a single dose administration of 100 mg/kg of lauric acid to quantify behavioral and physiological parameters regarding consciousness, motor coordination, muscle tone, and reflexes related to changes in the central and peripheral nervous systems [27]. These parameters were observed within 30 min and every hour for 4 h after administration.

The control group animals showed no clinical signs during the initial 4 h evaluation. In contrast, one male rat in the GAL100 group exhibited increased analgesia during the first 30 min; however, this condition reversed in the subsequent hours of observation.

Overall, lauric acid at a dose of 100 mg/kg did not produce toxic effects on the behavioral parameters observed in the days following the first administration, nor was there any lethality throughout the treatment protocol, ensuring the safety of the oral administration of this drug in the other *in vivo* experimental protocols.

2.2. Effect of Lauric Acid on Weight Gain, Food and Water Intake, and Organ Weight

Signs of systemic toxicity can be defined by a reduction in the body mass of experimental animals due to decreased food consumption, serving as indicators of intense pain, distress, suffering, or imminent death, and thus address the results characterized as exceeding the threshold of suffering [28,29]. The animals were weighed before administering lauric acid and periodically during the 28-day treatment, extending to the end of the observation period, totaling 42 days. When assessing the weight evolution of the group treated with lauric acid at a dose of 100 mg/kg, no significant changes in weight gain were observed when comparing females (47.0 ± 2.9 g) and males (111.6 ± 9.2 g) with the control group animals (48.0 ± 4.2 g and 113.8 ± 8.2 g, respectively) (Table 1).

Table 1. Weight evolution (g) of female and male Wistar rats from the control group (CG) and the group subjected to repeated-dose treatment with lauric acid at a dose of 100 mg/kg/day (LA100G).

Weight Evolution	CG (g)		LA100G (g)	
	Female	Male	Female	Male
Weight initial	210.4 ± 5.5	343.2 ± 10.1	216.8 ± 6.1	345.0 ± 10.6
Weight final	258.4 ± 7.5 *	457.0 ± 15.7 *	263.8 ± 5.1 *	456.6 ± 6.9 *
Weight gain	48.0 ± 4.2	113.8 ± 8.2	47.0 ± 2.9	111.6 ± 9.2

Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Student's *t*-test, * $p < 0.05$ (Weight initial vs. final) ($n = 5$).

Concurrently, the average weekly food and water consumption for all the animals was monitored (Table 2). The females in the AL100 group exhibited a weekly food (162.9 ± 22.3 g) and water intake (90.2 ± 5.5 mL) that did not differ from the control group (CG) (178.2 ± 24.8 g and 103.2 ± 5.6 mL, respectively). Similarly, the males in the LA100G group also showed no differences in food (236.6 ± 20.3 g) and water intake (145.6 ± 10.4 mL) when compared to the control group (254.8 ± 16.9 g; 180.3 ± 12.5 mL, respectively).

Table 2. The average weekly consumption of water and feed of female and male Wistar rats in the control group (CG) and the group subjected to repeated dose treatment with lauric acid at 100 mg/kg/day (LA100G).

Consumption	CG		LA100G	
	Female	Male	Female	Male
Food (g)	178.2 ± 24.8	254.8 ± 16.9	162.9 ± 22.3	236.6 ± 20.3
Water (mL)	103.2 ± 5.6	180.3 ± 12.5	90.2 ± 5.5	145.6 ± 10.4

Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Student's *t*-test ($n = 5$).

At the end of the experimental period, the animals were euthanized, and the internal organs were observed for the macromorphological evaluation and identification of possible lesions, followed by their removal and weighing, considering that organ weight is one of the most sensitive indicators of the potential toxic effects of the test drug. Variations in organ weight are generally accompanied by

differences in body weight among the treatment groups, which complicates the interpretation of the results related to organ weight [30].

Thus, the relative weights of the organs were determined across different groups, with no significant differences observed between the experimental groups (Table 3). Furthermore, no macromorphological changes were evident, indicating that the daily consumption of lauric acid at a dose of 100 mg/kg did not induce macroscopic morphological alterations or changes in the weight of the evaluated organs.

Table 3. The relative weight of the internal organs of female and male Wistar rats in the control group (CG) and the group subjected to repeated dose treatment with lauric acid at 100 mg/kg/day (LA100G).

Organs	CG (g/100 g)		LA100G (g/100 g)	
	Female	Male	Female	Male
Heart	0.33 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.29 ± 0.01
Kidneys	0.80 ± 0.03	0.77 ± 0.04	0.82 ± 0.03	0.87 ± 0.04
Liver	3.52 ± 0.15	3.39 ± 0.04	3.53 ± 0.12	3.54 ± 0.14
Spleen	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.01
Stomach	0.95 ± 0.11	0.68 ± 0.05	0.76 ± 0.06	0.71 ± 0.08
Lungs	0.64 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.63 ± 0.05
Uterus and ovaries	1.22 ± 0.13	-	1.39 ± 0.13	-
Testicles	-	1.19 ± 0.07	-	1.19 ± 0.15
Intestines	6.03 ± 0.36	5.49 ± 0.51	6.03 ± 0.36	5.52 ± 0.24

Data are expressed as the mean ± S.E.M. Student's *t*-test (n = 5).

The results obtained are consistent with those described by Khan et al. (2020), where an acute toxicity protocol was performed with lauric acid in female Sprague Dawley rats, with a minimum dose of 300 mg/kg and a maximum of 2000 mg/kg [31], indicating that lauric acid up to a dose of 100 mg/kg can be considered a safe drug for use in *in vivo* experimental protocols in animals as it did not present a toxic profile at the tested doses.

2.3. Effect of Lauric Acid on Hematological Parameters

The analysis of hematological parameters is recommended in toxicological studies, as the hematopoietic system is most affected by therapeutic or toxic agents [32]. It was observed that no hematological parameters were altered in males between the experimental groups (Table 4).

Table 4. Hematological parameters were obtained from the blood of male Wistar rats from the control group (CG) and the group subjected to repeated dose treatment with lauric acid at 100 mg/kg/day (LA100G).

Parameters	CG	LA100G	Reference Values *
Red blood cells ($10^6/\mu\text{L}$)	7.9 ± 0.2	8.3 ± 0.4	6.0–10.0
Hematocrit (g/dL)	41.6 ± 0.8	43.4 ± 2.2	39.0–55.0
Hemoglobin (%)	14.1 ± 0.3	14.9 ± 0.7	11.0–19.5
M.V.C. (fL)	52.7 ± 0.8	52.0 ± 0.4	55.0–65.0
M.C.H. (%)	17.8 ± 0.2	17.8 ± 0.2	18.3–19.5
C.H.C.M. (pg)	33.9 ± 0.09	34.2 ± 0.2	28.2–35.4
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	8.0 ± 0.7	8.7 ± 0.9	6.0–15.0
Myelocytes (%)	0	0	0
Metamyelocytes (%)	0	0	0
Rods (%)	0	0	0
Segmented (%)	29.4 ± 1.5	30.4 ± 1.2	9.0–34.0
Eosinophils (%)	0	0	0–6.0
Basophils (%)	0	0	0–1.5
Lymphocytes (%)	68.6 ± 1.5	67.4 ± 1.0	65.0–85.0
Monocytes (%)	2.0	2.2 ± 0.2	0–5.0
Platelets ($10^3/\text{mm}^3$)	1069.0 ± 65.6	1107.0 ± 77.7	500.0–1300.0

Data are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. Student's *t*-test ($n = 5$). M.C.V = mean corpuscular volume; M.C.H. = mean corpuscular hemoglobin; C.H.C.M. = mean corpuscular hemoglobin concentration. * [33].

In females, although some parameters such as mean corpuscular hemoglobin (17.5 ± 0.3 and $18.6 \pm 0.1\%$), segmented neutrophils (23.0 ± 1.7 and $27.8 \pm 0.6\%$), lymphocytes (74.6 ± 1.9 and $69.8 \pm 0.6\%$), and platelets (1069.0 ± 65.6 and 1075.0 ± 53.9 $10^3/\text{mm}^3$) were changed in the LA100G group compared to the control group (CG), respectively, all the alterations are within the reference value limits stipulated [33] and are related to the expected homeostatic variation among individuals (Table 5). Consequently, these effects are considered incidental, unrelated to the administration of lauric acid, and therefore, without toxicological relevance.

These results also agree with those observed by Khan et al. (2020), in which lauric acid, in the acute toxicity protocol at doses of 300 and 2000 mg/kg, did not present changes in hematological parameters in Sprague Dawley rats [31].

Table 5. Hematological parameters obtained from the blood of female Wistar rats from the control group (CG) and the group subjected to repeated dose treatment with lauric acid at a dose of 100 mg/kg/day (LA100G).

Parameters	CG	LA100G	Reference Values *
Red blood cells (10 ⁶ /μL)	7.3 ± 0.2	7.3 ± 0.2	6.0–10.0
Hematocrit (g/dL)	37.6 ± 1.4	38.8 ± 0.8	39.0–55.0
Hemoglobin (%)	12.9 ± 0.5	13.5 ± 0.3	11.0–19.5
M.V.C. (fL)	51.3 ± 0.8	53.6 ± 0.7	55.0–65.0
M.C.H. (%)	17.5 ± 0.3	18.6 ± 0.1 *	18.3–19.5
C.H.C.M. (pg)	34.2 ± 0.1	34.9 ± 0.3	28.2–35.4
Leukocytes (10 ³ /mm ³)	5.7 ± 0.8	3.8 ± 0.5	6.0–15.0
Myelocytes (%)	0	0	0
Metamyelocytes (%)	0	0	0
Rods (%)	0	0	0
Segmented (%)	23.0 ± 1.7	27.8 ± 0.6 *	9.0–34.0
Eosinophils (%)	0	0	0–6.0
Basophils (%)	0	0	0–1.5
Lymphocytes (%)	74.6 ± 1.9	69.8 ± 0.6 *	65.0–85.0
Monocytes (%)	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2	0–5.0
Platelets (10 ³ /mm ³)	765.0 ± 49.0	1075.0 ± 53.9 *	500.0–1300.0

Data are expressed as the mean ± S.E.M. Student's *t*-test, * *p* < 0.05 (n = 5). M.C.V = mean corpuscular volume; M.C.H. = mean corpuscular hemoglobin; C.H.C.M. = mean corpuscular hemoglobin concentration.

2.4. Effect of Lauric Acid on Biochemical Parameters

Evaluations of hepatic and renal function in biochemical analyses are essential for monitoring the toxicity or dysfunction of specific organs caused by toxic agents, as the toxicity of substances often manifests as hepatic and/or renal irregularities due to the involvement of these organs in metabolism [34].

Exposure to toxic compounds can lead to hepatotoxicity, resulting in cirrhosis, fibrosis, and liver damage, which can be assessed by measuring glucose and cholesterol levels, given that the liver is a central organ in regulating the homeostasis of these macromolecules [35,36]. Additionally, the quantification of liver enzymes ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase), which are markers of hepatocyte injury, is necessary [37]. Urea and uric acid are byproducts of protein metabolism that the kidneys remove, making them essential for evaluating renal function [38].

It was observed that the males in the LA100G group showed an increase in cholesterol (85.4 ± 5.3 mg/dL) compared to the CG (66.4 ± 2.3 mg/dL); however, these values are within the reference limits [33]. This result is consistent with what has been reported in the literature regarding lauric acid administration. Denke (2006) concluded that all the saturated fatty acids with chain lengths of 8 to 16 carbon atoms resulted in increased cholesterol levels [39]. Furthermore, it was demonstrated that lauric acid caused an increase in total cholesterol, with a more significant proportion of the increase in high-density lipoprotein (HDL), which is involved in the reverse transport of cholesterol from peripheral organs to the liver, thus contributing to a lower risk of atherosclerotic cardiovascular disease [40,41,42,43,44,45,46,47,48,49]. No changes were observed regarding the other biochemical parameters (Table 6).

Table 6. Biochemical parameters obtained from the blood of male Wistar rats from the control group (CG) and the group subjected to repeated dose treatment with lauric acid at a dose of 100 mg/kg/day (LA100G).

Parameters	CG	LA100G	Reference Values *
Glucose (mg/dL)	157.6 ± 15.5	167.0 ± 16.7	85.0–130.0
Cholesterol (mg/dL)	66.4 ± 2.3	85.4 ± 5.3 *	46.0–92.0
ALT (U/L)	36.0 ± 2.7	43.2 ± 6.7	17.0–50.0
AST (U/L)	82.0 ± 6.6	100.6 ± 12.8	39.0–92.0
Uric acid (U/L)	2.6 ± 0.8	3.5 ± 0.4	0.66–1.60
Urea (U/L)	46.8 ± 1.4	50.8 ± 3.1	32.0–54.0

Data are expressed as the mean ± S.E.M. Student's *t*-test, * $p < 0.05$ (n = 5). * [33].

The females in the LA100G group showed a reduction in serum urea levels (34.4 ± 2.7 U/L) compared to those in the CG (42.4 ± 1.2 U/L). However, despite the difference between the groups, this parameter remains within the reference values [33]. In the quantification of urea, no changes were observed between the experimental groups of males (Table 7). Similar results were also observed by Khan et al. (2020), where lauric acid in an acute toxicity protocol at doses of 300 and 2000 mg/kg did not show alterations in biochemical parameters in Sprague Dawley rats [31].

Thus, according to the results obtained from the biochemical markers related to liver and kidney function, it can be concluded that the toxicological evaluation with lauric acid at a dose of 100 mg/kg did not produce liver and kidney damage, making it a safe drug for oral administration at the dose tested.

Table 7. Biochemical parameters obtained from the blood of female Wistar rats from the control group (CG) and the group subjected to repeated dose treatment with lauric acid at a dose of 100 mg/kg/day (LA100G).

Parameters	CG	LA100G	Reference Values *
Glucose (mg/dL)	150.6 ± 23.9	133.8 ± 30.4	85.0–130.0
Cholesterol (mg/dL)	93.0 ± 6.8	75.4 ± 8.9	46.0–92.0
ALT (U/L)	36.0 ± 1.6	50.4 ± 9.9	17.0–50.0
AST (U/L)	63.8 ± 17.2	59.8 ± 18.7	39.0–92.0
Uric acid (U/L)	1.8 ± 0.2	2.6 ± 0.9	0.66–1.60
Urea (U/L)	42.4 ± 1.2	34.4 ± 2.7 *	32.0–54.0

Data are expressed as the mean ± S.E.M. Student's *t*-test, * $p < 0.05$ (n = 5).

2.5. Effect of Lauric Acid on Airway Hyper-responsiveness

2.5.1. Respiratory Parameters

The pulmonary ventilation test is an essential component in evaluating the outcomes of experimental models of respiratory diseases in rodents. It can assess the physiological parameters of underlying lung disease [42].

Whole-body plethysmography chambers are commonly used to assess ventilatory function and directly monitor changes in lung volume or airflow generated by thoracic movements [43]. During inspiration, the incoming air is heated and humidified within the lungs, increasing water vapor pressure and causing the thermal expansion of the gas. This effect causes a change in air volume, increasing pressure within the plethysmography chamber. The opposite occurs during expiration, creating a respiratory waveform in the animal [44].

One of the respiratory parameters evaluated was tidal volume (VT), which corresponds to the air inhaled or exhaled during a normal breath at rest [45]. VT is an essential physiological parameter to ensure efficient pulmonary ventilation and gas homeostasis in the body. During inspiration, the oxygen in atmospheric air is transported to the lungs, crossing the alveolar-capillary barrier by diffusion and

entering the arterial circulation. Simultaneously, carbon dioxide, continuously produced as a byproduct of cellular metabolism, is transferred from the venous blood to the pulmonary alveoli. The expiration process eliminates carbon dioxide, preventing its accumulation in the body. Thus, the volume of air mobilized in each respiratory cycle called tidal volume is crucial to maintaining balanced oxygen and carbon dioxide levels in arterial and venous blood, supporting the body's metabolic demands [46].

The animals in the AG (10.4 ± 2.5 mL/kg), ALA25G (6.4 ± 0.8 mL/kg), ALA50G (9.3 ± 1.7 mL/kg), ALA100G (6.2 ± 0.4 mL/kg), and ADEXAG (6.5 ± 0.4 mL/kg) groups did not show changes in the tidal volume (VT) compared to the control group (10.1 ± 0.9 mL/kg) on the first day of asthma induction (Figure 1). However, on days 12 (5.8 ± 0.7 ; 6.6 ± 1.4 ; 6.5 ± 1.1 ; 5.9 ± 0.4 ; and 5.6 ± 0.4 mL/kg, respectively) and 21 (5.1 ± 0.3 ; 7.6 ± 0.7 ; 6.7 ± 0.2 ; 6.8 ± 0.4 ; and 7.5 ± 0.4 mL/kg, respectively), all the groups exhibited a reduction in VT when compared to the CG (11.6 ± 1.1 and 11.5 ± 1.5 mL/kg) ($n = 6$). In other studies of allergic asthma induced by ovalbumin in rats, a reduction in tidal volume was also observed in the asthmatic group compared to the control group [47,48,49].

The respiratory frequency (RF) is represented by the total number of respiratory cycles per minute (inspiration and expiration). It is a crucial physiological parameter the central nervous system regulates in response to chemical stimuli, such as carbon dioxide levels, oxygen, and pH in the blood [50]. RF was not altered on days 1, 12, or 21 (Figure 1) in the AG (131.3 ± 12.2 ; 120.0 ± 9.1 ; and 119.6 ± 11.4 breaths/min, respectively), ALA25G (141.4 ± 6.0 ; 142.6 ± 14.8 ; and 142.5 ± 11.5 breaths/min, respectively), ALA50G (140.9 ± 9.1 ; 120.6 ± 6.0 ; and 109.1 ± 4.8 breaths/min, respectively), ALA100G (120.9 ± 6.8 ; 110.6 ± 4.4 ; and 124.8 ± 10.0 breaths/min, respectively), and ADEXAG (112.9 ± 3.0 ; 117.3 ± 3.1 ; and 154.3 ± 5.4 breaths/min, respectively) compared to the CG (125.2 ± 5.3 ; 110.8 ± 3.2 ; and 120.8 ± 2.8 breaths/min, respectively) ($n = 6$). Other studies in an ovalbumin-induced allergic asthma model in rodents reported an increase in respiratory frequency in the asthmatic group compared to the control group [51,52,53,54,55].

Studies by Mukherjee et al. (2017) and Parlar and Arslan (2020) reported that in a rat model of allergic asthma induced by ovalbumin, a reduction in ventilation minute (VE) can be observed in the asthmatic group compared to the control group [47,48]. This parameter refers to the product of the respiratory frequency and the tidal volume, representing the total volume of air inhaled in one minute [50].

Similarly, ventilation minute ($n = 6$) was not altered on day 1 in the AG (1270 ± 182.0 mL/kg/min), ALA25G (910.7 ± 136.1 mL/kg/min), ALA50G (1333 ± 291.4 mL/kg/min), ALA100G (744.0 ± 42.2 mL/kg/min), and ADEXAG (731.1 ± 26.2 mL/kg/min) groups. On days 12 and 21, VE was reduced in AG (797.1 ± 123.4 and 636.2 ± 31.5 mL/kg/min, respectively) when compared with CG (1353 ± 151.3 and 1379 ± 179.5 mL/kg/min, respectively).

The animals of ALA50G and ALA100G showed a reduction in VE on days 12 (790.6 ± 137.4 and 651.7 ± 55.6 mL/kg/min, respectively) and 21 (731.7 ± 31.1 and 855.6 ± 97.0 mL/kg/min, respectively) when compared with the CG. ALA25G did not show any change in this parameter on days 1 and 12 (910.7 ± 136.1 ; 911.6 ± 195.1 mL/kg/min) when compared with the CG. On the other hand, ALA25G prevented the reduction in minute volume observed in GA on day 21 (1203 ± 224.3 mL/kg/min) of asthma induction. Minute volume was reduced in ADEXAG on day 12 (653.1 ± 39.1 mL/kg/min) when compared with CG, and on day 21, treatment with dexamethasone reversed the reduction in ventilation minute (1151 ± 39.9 mL/kg/min) presented in AG (Figure 1).

Thus, these results show an alteration in respiratory mechanics and suggest a reduction in airflow, characteristic of increased airway resistance and hyper-responsiveness in AG, which was prevented by treatment with lauric acid at 25 mg/kg.

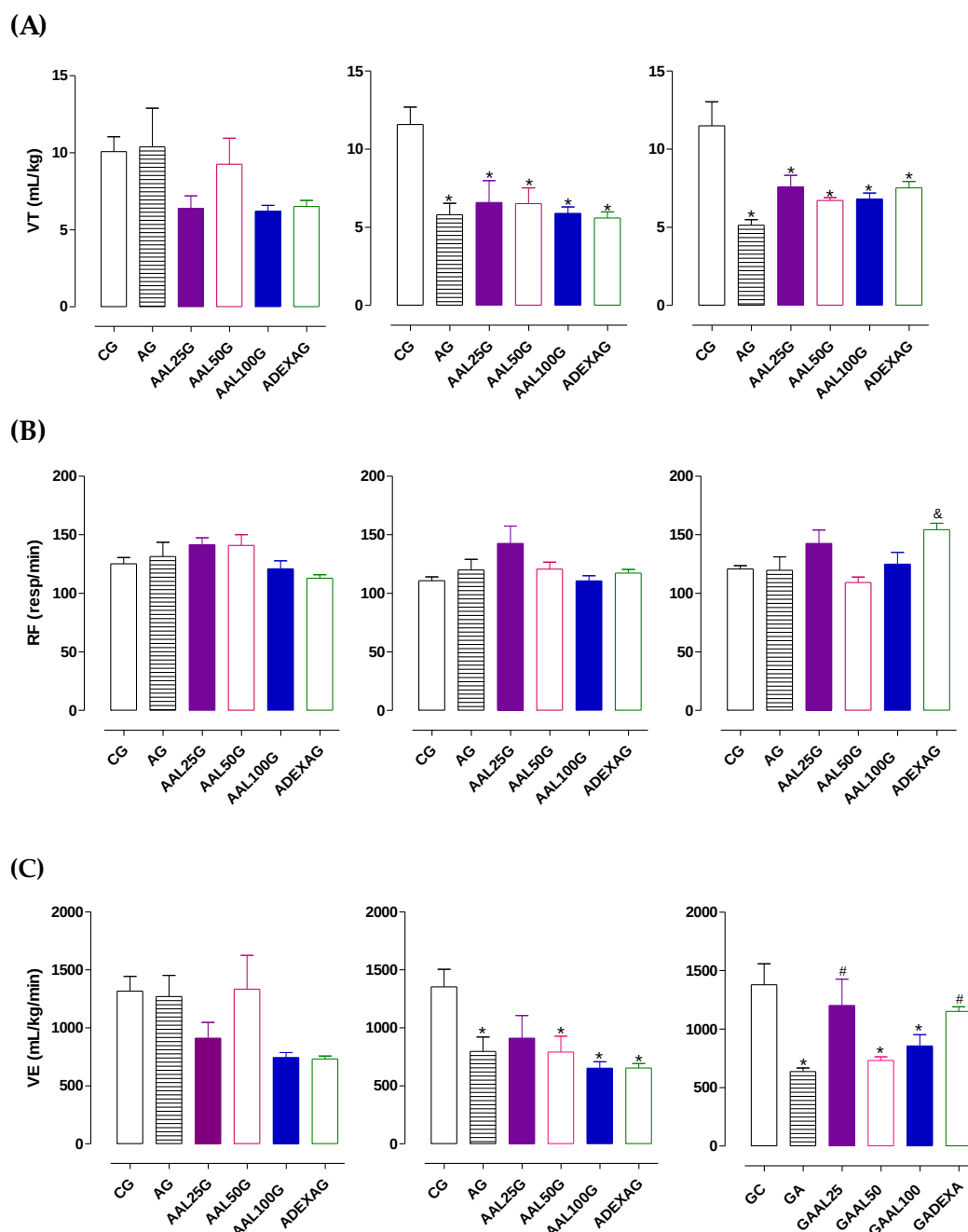


Figure 1. Tidal volume (A), respiratory rate (B), and minute volume (C) of the animals from CG, AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG on days 1, 12, and 21 of asthma induction. The symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 6$). * $p < 0.05$ (CG vs. AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); & $p < 0.05$ (ALA50G vs. ADEXAG).

2.5.2. Investigation of Contractile Reactivity to Ovalbumin—Schultz–Dale Reaction

The establishment of the asthma model in Wistar rats can also be demonstrated in *in vitro* protocols through the Schultz–Dale reaction, a standard technique to confirm a model of local anaphylactic response. This reaction is characterized by the release of contractile mediators, primarily histamine, and contractile factors derived from the epithelium, such as prostaglandins and leukotrienes [56], in antigenically sensitized animals upon re-exposure to OVA, culminating in the constriction of the smooth muscle and subsequent increase in airway resistance [57,58].

Thus, the trachea of the sensitized and previously challenged rats with OVA were again exposed *in vitro* to 100 $\mu\text{g/mL}$ of the same antigen. It was observed that prior sensitization and challenge with OVA in the AG promoted contractile reactivity in the trachea of these animals ($E_{\text{max}} = 100\%$) compared to the CG, which showed no contractile reactivity to stimulation with 100 $\mu\text{g/mL}$ of OVA ($E_{\text{max}} = 0\%$), consistent with the expected results. This suggests that the reduction in ventilation minute observed *in vivo* in the AG may be associated with a possible hyper-reactivity of the smooth muscle (Figure 2). Similar results were observed in the trachea of asthmatic rats after stimulation with OVA [49,59,60,61,62,63].

The increase in contractile reactivity observed in the AG ($E_{\text{max}} = 100\%$) was prevented by treatment with lauric acid only at doses of 25 ($E_{\text{max}} = 37.9 \pm 8.7\%$) and 50 mg/kg ($E_{\text{max}} = 53.0 \pm 7.9\%$), showing no difference between the ALA100G ($E_{\text{max}} = 79.4 \pm 11.4\%$) and the AG ($E_{\text{max}} = 100\%$). These data suggest that lauric acid may partially inhibit the release of contractile factors by immune cells stimulated with OVA and smooth muscle contractility to reduce the bronchoconstriction observed in the GA (Figure 2). Similar results were observed for virgin coconut oil. This product contains lauric acid as a major component, thus suggesting that lauric acid may be one of those responsible for the preventive effect of changes promoted by OVA-induced lung inflammation in guinea pigs [6].

One of the most important classes for the treatment of asthma is corticosteroids, such as dexamethasone, fluticasone, or beclomethasone [64]. These drugs act on nuclear receptors, inhibiting the production of pro-inflammatory mediators and the enzyme phospholipase A₂, resulting in the inhibition of cyclooxygenase-2, prostaglandins, and leukotrienes, as well as reducing the migration of neutrophils, eosinophils and mast cells to the sites affected by inflammation [65]. Based on this, it was observed that in the group treated with dexamethasone (ADEXAG) after re-exposure to OVA, the increase in contractile reactivity to this allergen was partially prevented ($E_{\text{max}} = 53.2 \pm 7.6\%$), suggesting a reduction in the release of these inflammatory mediators (Figure 2).

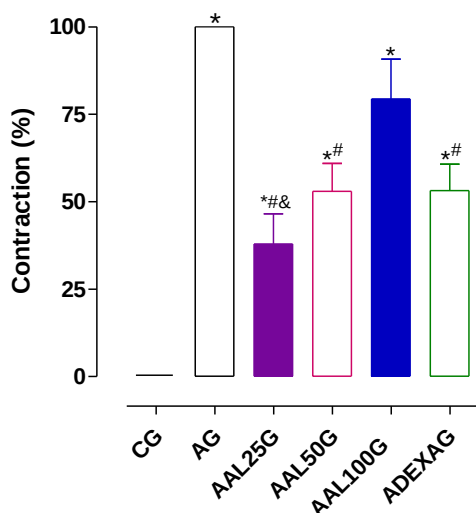


Figure 2. Contractile reactivity to OVA in the rat trachea of CG, AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG. The symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 6$). * $p < 0.05$ (CG vs. AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); & $p < 0.05$ (ALA100G vs. ALA25G).

2.5.3. Evaluation of Contractile Reactivity to KCl and CCh in Rat Trachea

The tracheal hyper-responsiveness to contractile stimuli, such as KCl, was evaluated. KCl is an electromechanical coupling agent that promotes contraction due to changes in membrane potential that lead to the accumulation of positive charges inside the cell and depolarization, which in turn stimulates the activation of voltage-dependent calcium channels (Cav) and increases the cytosolic calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [66].

It was observed that the trachea of the rat contracted in response to cumulative concentrations of KCl (10^{-3} – 3×10^{-1} M) without the alteration of efficacy or contractile potency in the AG animals ($E_{\max} = 99.8 \pm 6.2\%$ and $EC_{50} = 3.5 \pm 0.2 \times 10^{-2}$ M; $n = 5$) compared to the CG ($E_{\max} = 100\%$ and $EC_{50} = 3.2 \pm 0.03 \times 10^{-2}$ M; $n = 5$) (Figure 3), suggesting that the electromechanical coupling of contraction does not contribute to the increased hyper-responsiveness of the airways observed in the induction of the asthma model.

Since there was no alteration in the contraction induced by electromechanical coupling in the trachea of AG rats, it was decided to investigate whether the pharmacomechanical coupling of contraction in this organ would be modified by performing cumulative concentration–response curves to carbachol (CCh), a muscarinic agonist and analog of acetylcholine (ACh), due to the cholinergic innervation being the primary factor responsible for maintaining airway tone [67].

Airway contraction is primarily controlled by the vagus nerve, which releases acetylcholine (ACh) and activates the post-junctional muscarinic ACh receptors in the smooth muscle of the airways, mainly M3. This neurotransmitter also contributes to the inflammation and remodeling of the airways and regulates the hypertrophy of smooth muscle cells in the airways [68]. Blocking these receptors is part of the clinical management of asthma through muscarinic antagonists, such as ipratropium or tiotropium, which function as bronchodilators [69].

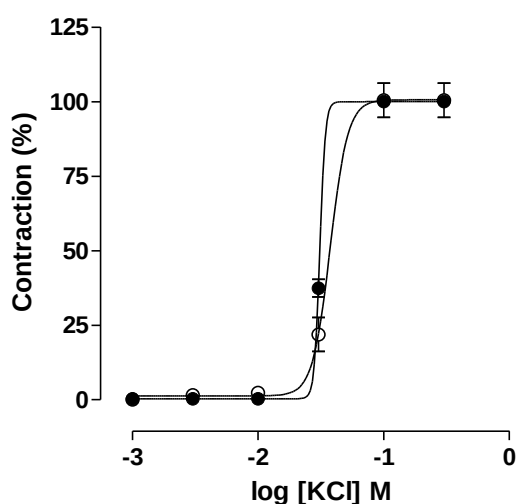


Figure 3. Cumulative concentration–response curves to potassium chloride (KCl) in the rat trachea of the CG (●) and AG (○) animals. The symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. Student's *t*-test ($n = 5$).

Vasconcelos et al. (2019), in a model of chronic allergic pulmonary inflammation induced by OVA in guinea pigs [63], and Sousa et al. (2011) [70] in rats sensitized to this allergen, observed an increase only in the efficacy, not in the contractile potency to CCh of the trachea, in sensitized animals compared to a control group.

Similarly, in this study, it was observed that the trachea of the control group contracted in response to the addition of cumulative concentrations of CCh (10^{-9} – 3×10^{-4} M) ($E_{\max} = 100\%$ and $EC_{50} = 9.6 \pm 1.7 \times 10^{-7}$ M). In contrast, the AG animals exhibited an increase in contractile efficacy without alteration in potency ($E_{\max} = 146.3 \pm 5.6\%$ and $EC_{50} = 1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$ M) compared to the CG (Figure 4), indicating a greater contribution of the pharmacomechanical component to the hyper-responsiveness of the trachea in asthmatic rats.

Treatment with lauric acid at doses of 25 ($E_{\max} = 106.0 \pm 9.0\%$ and $EC_{50} = 5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$ M), 50 ($E_{\max} = 99.6 \pm 9.7\%$ and $EC_{50} = 9.7 \pm 2.1 \times 10^{-7}$ M) and 100 mg/kg ($E_{\max} = 67.2 \pm 6.9\%$ and $EC_{50} = 1.5 \pm 0.6 \times 10^{-6}$ M) prevented the increase in contractile efficacy observed in AG ($E_{\max} = 146.3 \pm 5.6\%$ and $EC_{50} = 1.3 \pm 0.6$

$\times 10^{-6}$ M) without changing contractile power. Furthermore, ALA100G showed a reduction in contractile efficacy compared to the CG and other groups treated with lauric acid, indicating a more pronounced effect in reducing hyper-responsiveness at higher doses of this fatty acid (Figure 4). Thus, it is suggested that the preventive mechanism of the increase in hyper-responsiveness to lauric acid to CCh in the trachea of asthmatic rats appears to be through the negative modulation of the cholinergic pharmacomechanical pathway of contraction.

In animals treated with dexamethasone was observed prevention of hyper-responsiveness, similarly to what was observed in the groups treated with lauric acid, with a reduction in contractile efficacy and without change in potency ($E_{\max} = 105.3 \pm 9.1\%$ and $EC_{50} = 5.3 \pm 0.9 \times 10^{-7}$ M), when compared with AG ($E_{\max} = 146.3 \pm 5.6\%$ and $EC_{50} = 1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$ M). Since LA is the major component of coconut oil and it was observed by Vasconcelos et al. (2020) that coconut oil prevented the increase in hyper-responsiveness to CCh in the isolated trachea of guinea pigs sensitized with OVA in a similar manner to that observed in this study, it is suggested that this effect of coconut oil may be mediated by lauric acid.

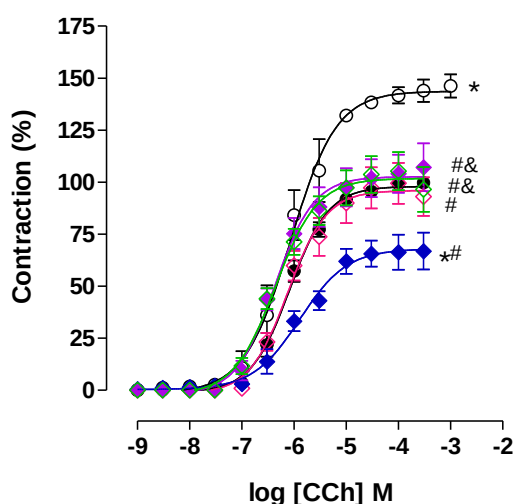


Figure 4. Cumulative concentration–response curves to carbachol (CCh) in the rat trachea of CG (●), AG (○), ALA25G (◆) [purple], ALA50G (◇) [pink], ALA100G (◆) [blue], and ADEXAG (◇) [green]. The symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 6$). * $p < 0.05$ (CG vs. AG and ALA100G); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); & $p < 0.05$ (ALA100G vs. ALA25G and AGDEXA).

2.5.4. Evaluation of Relaxant Reactivity to Nifedipine and Aminophylline in Rat Trachea

Considering that the contractile reactivity of the rat trachea to KCl was evaluated in the investigation of the participation of the electromechanical mechanism, whose concentration–response curves did not differ between the control and sensitized animals (Figure 3), it was decided to evaluate the involvement of the electromechanical coupling of relaxation using nifedipine, a Cav blocker [71].

Nifedipine relaxed in a concentration-dependent manner (10^{-7} – 10^{-3} M) the rat trachea pre-contracted with 10^{-5} M CCh in the CG ($E_{\max} = 101.5 \pm 0.8\%$ and $EC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ M). No change in efficacy or relaxant potency was observed in the AG animals ($E_{\max} = 99.3 \pm 2.4\%$ and $EC_{50} = 1.3 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ M) when compared with CG (Figure 5).

Thus, it is suggested that this model of asthma induction by ovalbumin in Wistar rats does not alter the electromechanical component of relaxation, which is not the major pathway for altering tracheal hyper-responsiveness. These results are in agreement with what was observed for the contractile reactivity of the trachea to KCl in GA (Figure 3) and with those observed by Vasconcelos et al. (2019) in

the trachea of guinea pigs with OVA-induced lung inflammation [63] and by Ferreira et al. (2022) [49], where no change in the relaxing reactivity of the trachea to nifedipine was observed.

In order to assess whether the disorders investigated in this study would alter the pharmacomechanical coupling of airway relaxation, aminophylline, a non-selective inhibitor of phosphodiesterases (PDEs) [72], was used. This type of coupling can occur through an increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and/or guanosine monophosphate (cGMP), which in turn activate PKA and PKG, respectively, leading to the relaxation of airway smooth muscle. PDEs are enzymes that inactivate, through hydrolysis, cAMP and cGMP into the respective 5'-monophosphates of adenosine (AMP) and guanosine (GMP). Thus, the inhibition of these enzymes favors the process of smooth muscle relaxation [73,74].

Aminophylline relaxed in a concentration-dependent manner (10^{-6} – 3×10^{-2} M) the rat trachea pre-contracted with 10^{-5} M CCh in the CG ($E_{\max} = 98.7 \pm 2.3\%$ and $EC_{50} = 5.7 \pm 0.7 \times 10^{-4}$ M). In the AG animals, a reduction in the relaxing efficacy was observed without alteration in the potency ($E_{\max} = 85.1 \pm 1.5\%$ and $EC_{50} = 1.0 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ M) when compared with the CG (Figure 6).

Thus, a possible involvement of the pharmacomechanical mechanism of relaxation in the trachea of asthmatic rats is suggested, considering that relaxation was hampered in this group and that the reduction in bronchodilator mechanisms may be associated with the reduction in airflow observed in the *in vivo* protocol. Furthermore, it is reported that in the airway smooth muscle cells of asthmatic individuals, the expression of the PDE4 isoform is increased by up to two times when compared with that of non-asthmatic individuals [75], which justifies the increased degradation of cAMP and reduced relaxant activity in AG.

Different results were observed by Ferreira et al. (2022) [49], in which there was no significant difference in the relaxant efficacy of AG when compared with CG in a model of asthma induced by ovalbumin and exacerbated by obesity in Wistar rats.

Treatment with lauric acid at 25 ($E_{\max} = 105.6 \pm 1.9\%$ and $EC_{50} = 1.3 \pm 0.1 \times 10^{-3}$ M), 50 ($E_{\max} = 101.4 \pm 3.4\%$ and $EC_{50} = 8.2 \pm 1.1 \times 10^{-4}$ M), and 100 mg/kg ($E_{\max} = 100.6 \pm 3.2\%$ and $EC_{50} = 2.4 \pm 1.0 \times 10^{-3}$ M) prevented the reduction in relaxant efficacy observed in AG ($E_{\max} = 85.1 \pm 1.5\%$ and $EC_{50} = 1.0 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ M), suggesting a possible negative modulation of the phosphodiesterase pathway in the preventive effect of lauric acid (Figure 6). In ADEXAG, there was no change in the efficacy or relaxing potency ($E_{\max} = 90.4 \pm 0.9\%$ and $EC_{50} = 2.3 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ M) compared to AG, showing a statistical difference in the relaxing efficacy compared to ALA25G and ALA50G, suggesting that treatment with dexamethasone does not alter the pharmacomechanical component of relaxation (Figure 6).

Other fatty acids have already shown potential for the treatment of asthma, such as oleic acid, a long-chain fatty acid that inhibits the infiltration of inflammatory cells; the production of interleukin (IL)-7, IL-5, and immunoglobulin E (IgE); and airway hyper-responsiveness [76].

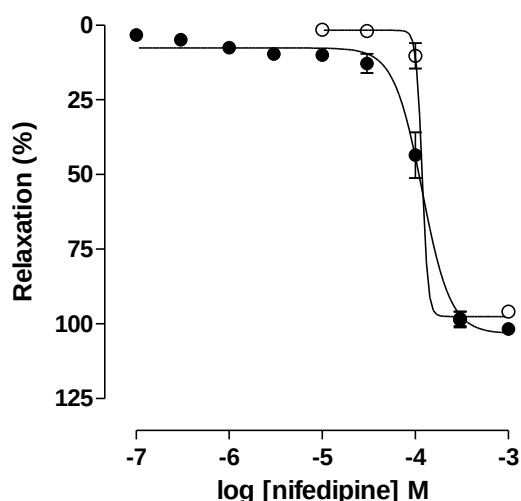


Figure 5 – Cumulative concentration–response curves to nifedipine in pre-contracted rat trachea with 10^{-5} M CCh of the CG (●) and AG (○) animals. The symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. Student's *t*-test ($n = 5$).

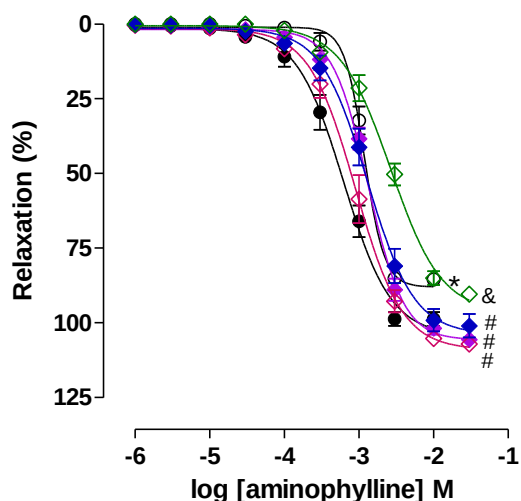


Figure 6 – Cumulative concentration–response curves to aminophylline in pre-contracted rat trachea with 10^{-5} M CCh of CG (●), AG (○), ALA25G (◆) [purple], ALA50G (◇) [pink], ALA100G (◼) [blue], and ADEXAG (◊) [green]. The symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 6$). * $p > 0.05$ (CG vs. AG); # $p > 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, and ALA100G); & $p > 0.05$ (ADEXAG vs. ALA25G and ALA50G).

2.6. Possible Pharmacological Targets of Lauric Acid In Silico

To evaluate the potential molecular targets of lauric acid involved in inflammation, remodeling, and airway smooth muscle reactivity, this compound was subjected to molecular docking simulations with 18 proteins. The results were generated using two scoring functions, the Moldock score and the Rerank score. More negative values indicated a higher likelihood of affinity for most scoring functions. The protein in which the compound achieved more negative binding energy values, or values close to the standard drug in at least one scoring function, was considered a potential target. Before performing the molecular docking simulations, the studied targets and their respective co-crystallized ligands were validated through redocking (Supplementary Material – Table S1).

Molecular docking techniques allow predicting and visualizing, with high precision, the interaction modes between molecules at the atomic level, providing detailed insights into mechanisms that are often challenging to observe by *in vitro* experimental methods. Furthermore, these tools can be used to improve functional macromolecules, making them more efficient, as well as to screen bioactive compounds in extensive databases containing millions of molecules [77,78].

By employing such strategies, the dependence on animal models for experimental validation is also significantly reduced, within the perspective of the 3Rs, with the use of these alternative computational models of substitution, promoting the optimization of the use of animals. This study will provide guidance for the possible mechanisms of action of AL that will be observed *in vitro* [79].

The redocking values for the proteins analyzed in this study can be found in Table S1, highlighting the RMSD (root mean square deviation) value, which is calculated using the coordinates of the heaviest atoms of the experimentally determined crystallographic structure and the docked pose, i.e., the quadratic mean distance between these atoms of the ligand in the crystal structure and the corresponding atoms in the docked pose.

Observing the RMSD value (best score) is a way to evaluate a method's ability to find a ligand's binding mode in a set of positions. For a docking simulation to be considered reliable, the RMSD value must be equal to or less than 2.0 Å. Therefore, an RMSD lower than 2.0 Å is widely accepted as a discriminator in reproducing a known binding mode, indicating whether the method was successful or not [80]. Accordingly, during the redocking analysis, it was observed that all the RMSD values were below 2.0 Å, meaning that the generated poses correctly positioned the ligand in the active site. This indicates that the program provided satisfactory values for docking validation (Supplementary Material—Table S1).

For proteins that do not have a co-crystallized ligand, the coordinates of the active site were determined through Web User-Friendly platforms, as well as by identifying the key residues essential for maintaining the activity of each target, as described in the reference article from the Protein Data Bank (PDB) platform. The platform used for this purpose was Bite Net-Skoltech I Molecule (<https://sites.skoltech.ru/imolecule/tools/bitenet>) (accessed on 23 July 2024). The enzymes in question included the voltage-dependent calcium channel (Cav) (PDB: 3G43), which is represented by a unique crystalline structure of a 77-residue fragment from the carboxyl terminal of the $\alpha 1$ subunit (Cav1.2), comprising a tandem of pre-IQ and IQ domains in complex with Ca^{2+} -calmodulin (CaM) in two distinct binding modes. Important residues in the active site include glutamate (Glu) 104, methionine (Met) 109, and Met 124, which are the key residues involved in the modulation of Cav1.2 by calmodulin [81]. Based on these residues, the coordinates used for calculation were X: 34.20; Y: 44.98, and Z: 39.49.

For the BKCa channel (PDB: 3NAF), it is notable that this corresponds to a structure with four intracellular subunits, each comprising two tandem RCK domains, assembled into a gating ring, with three observed Ca^{2+} binding sites. The residues involved in its inhibition include aspartic acid (Asp) 367, Glu 374, and Glu 399, which are located in the RCK domain [82]. The coordinates of the docking region were as follows: X: -55.58; Y: 42.44, and Z: 61.39.

The last target without a co-crystallized ligand was the enzyme 5-lipoxygenase (5-LOX) (PDB: 3O8Y), characterized as an iron-dependent metalloprotein with β -helix-rich N-terminal domains, a catalytic C-terminal domain, a substrate-binding pocket, a heme group, and a key residue for its inhibition, histidine (His) 367, which acts as a binding site for the direct inhibitors of the 5-LOX enzyme, such as zileuton [83]. The docking region coordinates were as follows: X: -12.24, Y: 25.37, and Z: -8.62.

Among the 15 proteins evaluated, those that presented greater interaction affinity compared to the positive control, based on the binding energy values, were the β_2 -adrenergic receptor, Cav, BKCa and K_{ATP}, adenylate cyclase, PKG, eNOS, iNOS, and COX-2, described below.

2.6.1. Molecular Interaction Between Lauric Acid and the β_2 -Adrenergic Receptor (PDB: 2RH1)

β_2 -adrenergic receptors are widely expressed in the respiratory tract, particularly in the smooth muscle of the airways [84], and it has been reported that the desensitization and polymorphism of these

receptors are involved in the severity of asthma [85,86]. Furthermore, they are highlighted as one of the main targets for asthma treatment [1]. Based on this, the molecular interaction of lauric acid with this receptor was evaluated.

The binding affinity values of the lauric acid- β_2 -adrenergic receptor complex (Supplementary Material—Table S2) were -98.8103 and -84.1847 kJ/mol, lower than those observed between the positive control, isoproterenol, a β -adrenergic agonist, and the β_2 -adrenergic receptor (-83.772 and -67.412 kJ/mol).

Regarding the active site of the β_2 -adrenergic receptor, lauric acid established two hydrogen bonds involving the asparagine (Asn) 312 and Asp 113 residues. Additionally, four hydrophobic interactions were identified with the amino acids valine (Val) 114, Val 117, phenylalanine (Phe) 290, and Phe 193, which are key interactions for maintaining the enzyme's activity [87]. The positive control, isoproterenol, exhibited three hydrogen bonds with the serine (Ser) 204, Ser 203, and Asp 113 residues, as well as three hydrophobic interactions among the amino acids Phe 193, Phe 290, and Val 114 (Supplementary Material—Figure S6).

It was evident that there were common interactions between the two compounds under study, corresponding to the hydrogen bond with the residue Asp 113 and the hydrophobic interactions with the residues Val 114, Phe 290, and Phe 193 (Supplementary Material—Figure S6). Thus, it is suggested that β_2 -adrenergic receptors may be a potential activation target in the mechanism of action of lauric acid, contributing to airway relaxation.

2.6.2. Molecular Interaction Between Lauric Acid and the Voltage-Dependent Calcium Channel (Cav) (PDB: 3G43)

Given that airway hyper-responsiveness in asthma is associated with smooth muscle contraction, which in turn is regulated by cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$), the importance of calcium homeostasis in asthma is emphasized [88,89]. Generally, the increase in $[Ca^{2+}]_c$ is regulated by the release of this ion from intracellular stores of the sarcoplasmic reticulum or through the influx of Ca^{2+} via a variety of ion channels in the plasma membrane, including the Cav channels [90]. Based on this, the molecular interaction of lauric acid with the Cav was evaluated.

The binding affinity values of the lauric acid-Cav macromolecule complex (Supplementary Material—Table S2) were -83.2615 and -60.699 kJ/mol, lower than those observed between the positive control, nifedipine, a Cav blocker, and the Cav (-73.8608 and -12.9409 kJ/mol). Lauric acid established only hydrophobic interactions with the residues arginine (Arg) 74, lysine (Lys) 75, methionine (Met) 71, Val 55, and alanine (Ala) 57. The positive control, nifedipine, established hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and steric bonds (Supplementary Material—Figure S7).

The hydrophobic interactions corresponded to the residues Arg 74, Met 71, Val 55, and Ala 57 (establishing two interactions), in addition to a steric interaction through the residue Met 71 and hydrogen bonds through the residues Arg 74, glutamic acid (Glu) 67, and Val 55. Notably, similar hydrophobic interactions were observed between the two compounds under study, with the residues Arg 74, Met 71, Val 55, and Ala 57 (Supplementary Material—Figure S7). Thus, it is suggested that these channels may be potential targets for lauric acid through the negative modulation of Cav, thereby contributing to the reduction in $[Ca^{2+}]_c$ and airway hyper-responsiveness.

2.6.3. Molecular Interaction Between Lauric Acid and BK_{Ca} (PDB: 3NAF) and K_{ATP} (PDB: 6C3P)

Various subtypes of K⁺ channels can regulate the basal tone of smooth muscle, among which the most important identified in the airways are the BK_{Ca} and K_{ATP} channels. This importance has been established based on several studies that characterize K⁺ channel activators inducing hyperpolarization, reducing the infiltration of inflammatory cells, the levels of inflammatory cytokines, and hyper-responsiveness in animal models of allergic asthma [91]. Therefore, the molecular interaction of lauric acid with these channels was evaluated.

The binding affinity values of the lauric acid–BK_{Ca} and lauric acid–K_{ATP} macromolecule complexes were –112.247 and –93.4303 kJ/mol for BK_{Ca} and –92.7847 and –73.4965 kJ/mol for K_{ATP}, respectively. These values were lower compared to those observed between the channels and their respective positive controls (Supplementary Material—Table S2) nicorandil, a BK_{Ca} activator, and glibenclamide, a K_{ATP} blocker (–103.044 and –78.6007 kJ/mol; –130.484 and –22.5303 kJ/mol, respectively).

At the active site of BK_{Ca}, lauric acid exhibited hydrogen bonding interactions with the amino acids Met 663, threonine (Thr) 946, and glycine (Gly) 944. The other interactions observed were with the residues Arg 664, isoleucine (Ile) 579, Arg 974, and cysteine (Cys) 975, with the last residue showing two interactions. The positive control, nicorandil, established hydrophobic interactions with the residues Arg 974 and Ile 581. Hydrogen bond interactions were established in greater numbers with the residues Asn 745 and Arg 974, leucine (Leu) 940, Cys 975, Arg 976, Leu 940, and Cys 975. Common interactions occurred between the two analyzed compounds, being hydrophobic through the residue Arg 974 (Supplementary Material—Figure S8).

The molecular docking simulation with the K_{ATP} channel demonstrated that lauric acid interacted through six binding sites, including three hydrogen bonding interactions with the amino acids Ser 1482 and Gln 774, which are important residues for stabilizing the SUR1 structure of the channel [92], and with Val 715 and Gly 716. Additionally, there were two hydrophobic interactions with the residues tryptophan (Trp) 688 and Met 409 (Supplementary Material—Figure S9).

The positive control glibenclamide exhibited a greater number of interactions, which were of hydrophobic, steric, and hydrogen bond types. The hydrogen bond interactions corresponded to the amino acids Trp 688, Ser 721, Ser 720, Gly 718, Gln 774, Gly 716, Ser 1482, and Asn 1480. The hydrophobic bonds were formed with Trp 688 and Met 409, while the steric interactions corresponded to Ser 1482 and Met 409. These residues are fundamental for stabilizing the SUR1 structure of the ATPase degeneracy site of the channel [92].

The residues Ser 1482, Gln 774, and Gly 716 (hydrogen bond interactions) and Trp 688 and Met 409 (hydrophobic interactions) were established by both compounds (Supplementary Material—Figure S9). Thus, it is suggested that the BK_{Ca} and K_{ATP} channels may be potential targets for activation in the mechanism of action of lauric acid.

2.6.4. Molecular Interaction Between Lauric Acid and Adenylyl Cyclase (PDB: 4CLZ)

Based on the fact that the activation of adenylyl cyclase leads to an increase in cAMP levels, an important second messenger directly related to the relaxation of smooth muscle in the airways [93], the molecular interaction of lauric acid with this enzyme was evaluated.

The binding affinity values of the ligand–macromolecule complex between lauric acid and adenylyl cyclase (Supplementary Material—Table S2) were –67.0243 and –54.6923 kJ/mol, lower than those observed between the positive control, forskolin, an activator of adenylyl cyclase, and adenylyl cyclase (–40.7844 and –35.1598 kJ/mol).

Lauric acid formed three hydrophobic interactions with the amino acids Arg 15, Val 14, and Ala 18 (establishing two interactions), as well as two hydrogen bonds with the amino acids Ala 18 and Arg 250, and one steric interaction with the residue Val 14. The positive control forskolin formed four hydrophobic interactions with the residues Phe 8, Val 14, and Ala 18, and also established two hydrogen bonds with the amino acids Asp 10 (establishing two interactions) and Arg 15 (establishing three interactions) (Supplementary Material—Figure S10).

It is noteworthy that coinciding interactions occurred between the molecules under study, involving the hydrophobic interaction encompassing the residue Ala 18. Additionally, lauric acid formed a hydrophobic interaction with the amino acid Val 14, which was also presented by forskolin (Supplementary Material—Figure S10). Thus, it is suggested that adenylyl cyclase may be a potential target for activation in the mechanism of action of lauric acid, contributing to the relaxation of the smooth muscle in the airways.

2.6.5. Molecular Interaction Between Lauric Acid and cGMP-Dependent Protein Kinase (PKG) (PDB: 6BQ8)

Knowing that the activation of soluble guanylyl cyclase (sGC) leads to an increase in cGMP levels, which in turn activates PKG, and that this enzyme phosphorylates various targets that result in the relaxation of smooth muscle in the airways [90], the molecular interaction of lauric acid with this enzyme was evaluated.

The binding affinity values of the ligand–macromolecule complex between lauric acid and PKG (Supplementary Material—Table S2) were -104.44 and -85.5268 kJ/mol, showing a lower value only in the Rerank score function compared to those observed between the positive control, cGMP, and the enzyme PKG (-120.89 and -37.4022 kJ/mol).

In the mechanism of PKG, lauric acid established three hydrogen bonds with Lys 358, Leu 408, and Gln 335, in addition to five hydrophobic interactions with Lys 358, two interactions with Ala 368, Arg 366, and Leu 408, the last two being key residues for the inhibition of the enzyme [94], and Ala 359 (Supplementary Material—Figure S11).

The ligand cGMP established hydrogen, steric, and hydrophobic interactions. The hydrogen interactions involved the residues Ala 368, Ala 359, Ser 367, Arg 366, Gly 356, Lys 358, and Asp 412. The hydrophobic interactions corresponded to the amino acids Ala 368, Leu 408, and Val 333. The steric interactions occurred with Gly 356 and Lys 358. The interactions with Lys 358 (hydrogen bond), Leu 408, and Ala 368 (steric interactions) were present in both compounds (Supplementary Material—Figure S11). Thus, it is suggested that this enzyme may also be a potential target for activation in the mechanism of action of lauric acid.

2.6.6. Molecular Interaction Between Lauric Acid and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) (PDB: 1M9J) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) (PDB: 4NOS)

In the respiratory tract, there are three isoforms of nitric oxide synthase (NOS), with the endothelial isoform (eNOS) located in the epithelium of the bronchi, alveoli, and trachea. The inducible isoform (iNOS) is found in macrophages, neutrophils, fibroblasts, and vascular and epithelial endothelial cells of the airways, and the neuronal isoform (nNOS) located in nerves that innervate the lamina propria, blood vessels, and smooth muscle of the airways in both humans and animals. Nitric oxide (NO) is, therefore, an important mediator of bronchodilation in the airways [95,96]. Thus, the molecular interaction of lauric acid with these isoforms of NOS was evaluated.

The binding affinity values of the ligand–macromolecule complex between lauric acid and eNOS (-95.2229 and -78.9643 kJ/mol) and iNOS (-98.2345 and -83.3349 kJ/mol) were lower than those observed between the positive controls, GW-274150 (an eNOS inhibitor) and 1400 W (an iNOS inhibitor), and their respective isoforms, eNOS (-79.1829 and -64.7938 kJ/mol) and iNOS (-87.3824 and -74.6874 kJ/mol) (Supplementary Material—Table S2).

Lauric acid established hydrogen bonds and steric interactions with the active site of the endothelial isoform (eNOS), with predominant hydrophobic interactions involving the amino acids proline (Pro) 334, Trp 178 (2 interactions), Leu 193, and Phe 353. The positive control GW-274150 formed hydrogen bonds through the residue Trp 356, and hydrophobic interactions were observed through the residue Pro 334, along with a steric interaction involving the residue Phe 353. In this mechanism, similar interactions were noted between the studied molecules corresponding to the residue Pro 334 in the hydrophobic interaction (Supplementary Material—Figure S12).

Regarding the inducible isoform (iNOS), lauric acid formed hydrogen bonds and hydrophobic interactions with the active site of the iNOS enzyme. The residue Trp 463 was involved in the established hydrogen bond, while the amino acids His 477, Ile 462, Met 120, Trp 461, Phe 476, and Trp 463 were associated with hydrophobic interactions, with the residue Trp 463 being important for the formation of the enzyme's catalytic dimer [97].

The positive control 1400 W established two steric interactions through the residues Arg 381 and Met 120, as well as three hydrogen bonds with the residues Trp 463, Ile 462, and Phe 476, and four

hydrophobic interactions through the residues Phe 476, Met 120, Ile 462, and Trp 463. Similarly to the results demonstrated in the eNOS enzyme, a coincidence in the hydrogen bond formed by the residue Trp 463 was observed, along with similar hydrophobic interactions involving the residues Trp 463, Phe 476, and Met 120 (Supplementary Material—Figure S13). Thus, it is suggested that the NOS isoforms may be potential activation targets in the mechanism of action of lauric acid.

2.6.7. Molecular Interaction Between Lauric Acid and Cyclooxygenase-2 (PDB: 5IKR)

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is responsible for metabolizing arachidonic acid to form lipid mediators known as prostanoids. This enzyme is expressed in epithelial cells and macrophages and is inducible by cytokines and other inflammatory mediators, promoting the synthesis of inflammatory prostaglandins during asthma [98].

There is an increased production of prostaglandins, such as PGD₂ and PGE₂, during the allergic inflammation of the airways, and they are known to participate in the pathogenesis of asthma in humans [99,100] and in animal models [101,102]. Given the importance of these prostanoids in the contraction of airway smooth muscle [103], the molecular interaction of lauric acid with this enzyme was evaluated.

The binding affinity values of the ligand–macromolecule complex between lauric acid and COX-2 (Supplementary Material—Table S2) were -97.5696 and -81.663 kJ/mol, which are lower than those observed with the positive control, etoricoxib (a COX-2 inhibitor), and the COX-2 enzyme (-90.7927 and -82.8298 kJ/mol).

It is important to mention that in the study conducted by Jack, Asruddin, and Bhawani (2022) regarding the target COX-2, when compared to the positive controls acetylsalicylic acid, ibuprofen, and paracetamol, lauric acid did not exhibit lower binding energy scores than these compounds, corresponding to -6.62 kcal/mol. In contrast, the control drugs displayed more negative binding energy values of -7.14 , -7.72 , and -6.76 kcal/mol, respectively. However, regarding etoricoxib, the positive control of this study, it showed greater affinity according to the mentioned binding energy scores [104].

Furthermore, the simulation analysis demonstrated that lauric acid formed two hydrogen bonds involving the residues Ser 530 and tyrosine (Tyr) 385, which are key interactions for inhibiting the enzyme [105]. Additionally, it established seven hydrophobic interactions with the amino acids Trp 387, Tyr 385, Ala 527, Leu 352, Val 523, Val 349, and Tyr 355 (Supplementary Material—Figure S14).

Regarding etoricoxib, steric and hydrophobic interactions were established with the active site of the protein under study. Steric interactions involved the residues Leu 392, Val 523, and Phe 518, while hydrophobic interactions were more numerous, being Leu 392, Val 523, Val 116, Leu 359, Leu 531, Ala 527, Val 349, Met 522, Leu 384, Trp 387 and Tyr 385.

It is worth noting that, unlike etoricoxib, lauric acid established hydrogen bonds, which is very important since this type of molecular interaction is considered the strongest. Furthermore, it was found that similar bonds occurred comprising hydrophobic interactions through residues Trp 387, Tyr 385, Ala 527, Val 523, and Val 349 (Supplementary material—Figure S14). Thus, it is suggested that COX-2 is a possible target of inhibition in the mechanism of action of lauric acid, inhibiting the formation of contractile prostanoids.

Molecular docking studies, despite their effectiveness in predicting interactions between drugs and biological targets, do not fully simulate the real biological environment. One of the main limitations of this method is the ability to reliably simulate the pharmacokinetic aspects and pharmacogenetic specifications that significantly affect the interaction between the ligand and the target. In addition, many docking models consider proteins as rigid structures, while in reality, proteins can undergo substantial conformational changes during interaction with the ligand [106].

Based on the results obtained, these molecular docking studies point to future *in vitro* results that will be investigated regarding the mechanism of action of LA. Thus, the integration of *in vitro* and *in vivo* studies as a validation step of *in silico* methods is an indispensable part of the drug discovery process.

3. Materials and Methods

3.1. Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 250 and 300 g, sourced from the Animal Production Unit (UPA) of the Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) at the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), were used. The animals were kept under controlled temperature conditions (22 ± 1 °C) and a 12 h light–dark cycle with free access to food and water. Experimental procedures were conducted in accordance with the principles of the guidelines for the ethical use of animals in applied etiology studies [107] and the Brazilian Guide for the Production, Maintenance, or Use of Animals in Educational or Scientific Research Activities by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) [108]. The experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UFPB (n° 9310040522).

3.2. Chemicals

Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate (MgSO_4), potassium phosphate (KH_2PO_4), calcium chloride (CaCl_2), glucose, sodium bicarbonate (NaHCO_3), hydrochloric acid (HCl), and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Êxodo Científica (Sumaré, Brazil).

Lauric acid, aluminum hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$), ovalbumin (OVA) (grade II and V), carbamylcholine hydrochloride (CCh), nifedipine, and aminophylline were obtained from Sigma-Aldrich (Brazil). Tween® 80 was obtained from Fischer BioReagents. Dexamethasone was purchased from Aché Laboratórios Farmacêuticos (Guarulhos, São Paulo, Brazil). Ketamine and xylazine were purchased from Syntec (Barueri, São Paulo, Brazil). Biochemical analyses were performed using specific reagent kits from Labtest (Lagoa Santa, Brazil).

3.3. Physiological Solutions

For the tracheal reactivity protocols, a Krebs nutrient solution was used in an organ bath, adjusted to pH 7.4 (with a solution of HCl or NaOH, 1 N), aerated with a carbogen mixture (95% O_2 and 5% CO_2) and maintained at 37 °C. It had the following composition in mM: NaCl (118.0), KCl (4.5), MgSO_4 (5.7), KH_2PO_4 (1.1), CaCl_2 (2.5), glucose (11.0), and NaHCO_3 (25.0).

3.4. Experimental Groups

For the repeated dose toxicity protocol, the animals were randomly divided into 4 groups, with 5 animals each: Groups 1 and 2 = control group of females and males (CG): treated with NaCl 0.9% + Tween® 80; Groups 3 and 4 = lauric acid group 100 mg/kg of females and males (LA100G): treated with lauric acid at a dose of 100 mg/kg.

For the protocols involving asthmatic animals, they were randomly divided into 5 experimental groups, with 5 male rats each: control group (CG) = not sensitized and treated with NaCl 0.9% + Tween® 80; asthmatic group (AG) = sensitized with OVA and treated with NaCl 0.9% + Tween® 80; asthmatic lauric acid 25 mg/kg group (ALA25G) = sensitized with OVA and treated with 25 mg/kg of lauric acid; asthmatic lauric acid 50 mg/kg group (ALA50G) = sensitized with OVA and treated with 50 mg/kg of lauric acid; asthmatic lauric acid 100 mg/kg group (ALA100G) = sensitized with OVA and treated with 100 mg/kg of lauric acid; and asthmatic dexamethasone 5 mg/kg group (ADEXAG) = sensitized with OVA and treated with 5 mg/kg of dexamethasone.

The doses of lauric acid were based on previous studies [109].

3.5. Preparation of Lauric Acid

Tween® 80 was used as a solubilizing agent, and the solution was placed at 40 °C in a water bath and kept under constant stirring until the substance was completely solubilized. Subsequently, a saline solution was added for the administration of lauric acid.

3.6. Assessment of Repeated-Dose Toxicity and Behavioral Pharmacological Screening of Lauric Acid

To assess the oral toxicity of repeated doses, the methodology described in guideline n° 407 of the Organisation for Economic Co-operation and Development [110] was used. In this study, 20 animals were utilized, distributed into 2 groups, each with 10 animals, consisting of 5 males and 5 nulliparous, non-pregnant females. The animals were treated daily by oral gavage with lauric acid at a dose of 100 mg/kg (LA100G) or with saline and Tween® 80 (CG) for 28 days. After the treatment period and a 28-day observation, the animals were monitored for an additional 14 days without treatment to detect late occurrence or persistence and recovery from potential toxic effects.

Furthermore, behavioral parameters assessing central nervous system (CNS) stimulation (such as increased aggression and ambulation), CNS depression (such as analgesia and anesthesia), and activity on the peripheral nervous system (such as cyanosis and piloerection) were evaluated before the onset of administrations and for up to 4 h, followed by periodic evaluations until the end of the protocol [27] (Supplementary Material – Table S4).

3.6.1. Assessment of Weight, Food and Water Intake, and Organ Weight

The animals were weighed on a semi-analytical balance model BG4001, from Gehaka (São Paulo, Brazil), before treatments and then weekly, with the average weight gain calculated for the animals. To quantify food and water intake, consumption was calculated by the difference between the amount offered and the remaining amount that was not ingested. After euthanasia with ketamine (180 mg/kg) and xylazine (30 mg/kg) via intraperitoneal injection, the heart, kidneys, liver, spleen, stomach, lungs, uterus, ovaries, testes, and intestines were removed, weighed, and evaluated macroscopically.

3.6.2. Hematological and Biochemical Analysis

After the last day of observation, on the 42nd day, the animals were euthanized and after that, blood was collected by the venipuncture of the inferior abdominal vena cava using heparinized syringes.

In the hematological analysis, blood was collected into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for the erythrogram, leukogram, and platelet count. The SCIL Vet abc-Bomba ABX® automatic veterinary cell was used. The erythrogram included the counting of red blood cells, and determination of hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The leukogram included the total and differential leukocyte counts.

For the evaluation of biochemical parameters, the blood was collected into Microtainer Becton Dickinson® tubes (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) with a separator gel, which was centrifuged for 10 min at 3500 rpm to obtain serum. The ChemWell-T® automated analyzer was used to quantify glucose, total cholesterol, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), uric acid, and urea.

3.7. Evaluation of the Effect of Lauric Acid on Airway Hyper-responsiveness

3.7.1. Sensitization and Challenges with Ovalbumin for Asthma Induction

For the sensitization protocol, on days 1–3 of the experiment, the animals received intraperitoneal (i.p.) injections of 1 mg/kg/day of ovalbumin (OVA) (grade V) solubilized in sterile NaCl 0.9% using 100 mg/mL of aluminum hydroxide (Al(OH)₃) as an adjuvant. On days 6, 9, 12, 15, 18, and 21, the animals were individually placed in a closed polyacrylic chamber connected to an ultrasonic nebulizer. They were then challenged with 1% OVA (grade II) for up to 20 min daily. The non-sensitized animals underwent the same process but were administered only sterile NaCl 0.9% for both the i.p. injections and nebulizations. All the animals were euthanized 24 h after the last challenge with OVA or NaCl 0.9% (day 22). Throughout the asthma induction, the asthmatic group animals received daily doses of lauric acid via oral gavage (v.o.). The animals in the ADEXAG during the last 5 days of disease induction

received 5 mg/kg/day of dexamethasone i.p., while the other groups received NaCl 0.9% via the same route [111,112] (Figure 7).

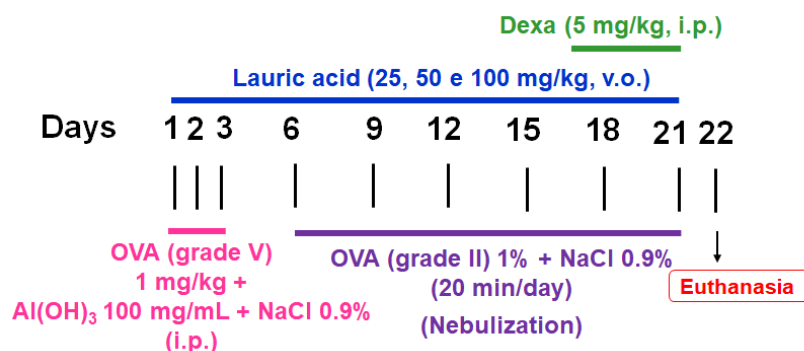


Figure 7. Flowchart and timeline of the study design for asthma induction on rats. OVA: ovalbumin; Al(OH)₃: aluminum hydroxide; Dexa: dexamethasone; i.p.: intraperitoneally; v.o.: oral route.

3.7.2. Respiratory Parameters Analysis

On days 1, 12, and 21 of the asthma induction protocol, the animals were subjected to the measurements of the respiratory rate, tidal volume, and minute volume using whole-body plethysmography, adapted from the literature [113,114].

3.7.3. Assessment of Tracheal Contractile and Relaxant Reactivity

Contractile Reactivity to Ovalbumin in Rat Trachea: Schultz–Dale Reaction

The rats were euthanized as previously described. The trachea was divided into rings, and to record isometric contractions, the organs were suspended in isolated organ bath chambers (6 mL), model BOI-04, and connected to isometric force transducers, model TIM 05, coupled to an amplifier, model AECAD04F. This, in turn, was connected to a digital acquisition system with the AQCAD software version 2.5.0 for data acquisition and ANCAD for analysis. The system contained a BT 60 thermostatic pump that controlled the bath temperature. All the devices were purchased from AVS Projetos (São Paulo, Brazil).

The trachea was stimulated with 100 µg/mL OVA and the amplitude of contraction was compared between CG, AG, ALAG, and ADEXAG [115,116].

Contractile Reactivity to KCl and CCh in Rat Trachea

Two cumulative concentration–response curves to KCl, an electromechanical agent [117], or to CCh, a pharmacomechanical agent [67], were induced. Contractile reactivity was calculated based on the mean amplitude of the response of the rat trachea of the CG, and comparisons were made between the groups based on the values of maximum effect ($E_{\max}$) and the concentration of a substance that produces 50% of its $E_{\max}$ (EC_{50}) of the contractile agents, calculated by nonlinear regression.

Relaxant Reactivity to Nifedipine and Aminophylline in Rat Trachea

A contraction with 10^{-5} M CCh was induced and over the tonic component, nifedipine, a voltage-dependent calcium channel blocker [71], or aminophylline, a phosphodiesterase inhibitor [72], was added in cumulative concentrations until their $E_{\max}$ was reached.

The relaxant response was expressed as the percentage reversed from the initial contraction produced by CCh. Comparisons were made between the groups based on the $E_{\max}$ and EC_{50} values of the relaxant agents, calculated from the cumulative concentration–response curves obtained by nonlinear regression.

3.8. Molecular Docking

The 3D structures of the enzymes were obtained from the Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (accessed on 10 January 2024) [118]. The analyses were carried out in January 2022 and updated in July 2024. Among the analyzed proteins (Supplementary Material—Table S1), those selected for interaction studies with lauric acid were the β_2 -adrenergic receptor, the voltage-dependent calcium channel (Cav), the large conductance calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) and ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}), adenylate cyclase (AC), cGMP-dependent protein kinase (PKG), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2).

All the water molecules were removed from the crystalline structure of the selected proteins, and the root mean square deviation (RMSD) was calculated based on the poses, indicating the degree of reliability of the fit. The RMSD provides the proximity of the connection to the experimental structure and is considered successful if the value is below 2.0 Å.

Molecular docking simulations were performed using the Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) software with predefined parameters [119]. The ligand complexed with the enzyme was used to define the active site. Next, the structure of lauric acid was imported to analyze the system's stability through the interactions identified with the enzyme's active site using the Moldock and Rerank score energy value as a reference.

For this purpose, the Moldock SE (Simplex Evolution) algorithm was employed with the following parameters: a total of 10 runs with a maximum of 1500 interactions using a population of 50 individuals, 2000 minimization steps for each flexible residue, and 2000 global minimization steps per run. The MolDock score (GRID) scoring function was used to calculate the docking energy values. A GRID was set at 0.3 Å, and the search sphere was fixed at a radius of 15 Å. For the ligand energy analysis, internal electrostatic interactions, internal hydrogen bonds, and sp²-sp² torsions were evaluated [120].

3.9. Statistical Analysis

The results were expressed as the percentage of the mean and the standard error of the mean (S.E.M.), and the E_{max} and EC₅₀ were compared and analyzed statistically using Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test. The null hypothesis was rejected when *p* < 0.05. All the data were analyzed using GraphPad Prism® version 5.01.

4. Conclusions

Based on the results obtained, it is concluded that lauric acid administered at a dose of 100 mg/kg in repeated doses presents low toxicity considering the absence of mortality and changes related to food and water consumption, organ weight, and significant hematological and biochemical parameters, ensuring the safety of this drug for *in vivo* use in other experimental protocols.

In addition, lauric acid prevented tracheal contractile and relaxant hyper-responsiveness in Wistar rats in an ovalbumin-induced allergic asthma model. In *in silico* studies, it was shown that lauric acid has several possible molecular targets of interaction, among them, the β_2 -adrenergic receptor, Cav, BK_{Ca} and K_{ATP}, adenylate cyclase, PKG, eNOS, iNOS, and COX-2. These targets of interaction involved in smooth muscle reactivity and airway inflammation should be confirmed in future *in vitro* experimental protocols.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at www.mdpi.com/xxx/s1.

Figure S1 – Original representative recordings of contractile reactivity to KCl in the rat trachea of CG (A) and AG (B) animals; **Figure S2** – Representative original recordings of tracheal reactivity induced by 100 µg/mL OVA in CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) rats; **Figure S3** – Original representative recordings of contractile reactivity to CCh from rat trachea of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) rats; **Figure S4** – Original recordings representing the relaxant reactivity to nifedipine from rat trachea of CG (A) and AG (B) animals; **Figure S5** – Original representative recordings of relaxant reactivity to

aminophylline from rat trachea of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) animals; **Table S1** - RMSD values for proteins selected in the study; **Table S2** - Binding energy values (kJ/mol) analyzed in the proteins selected in the study. The best scores in relation to the positive control are highlighted in bold; **Table S3** - Information on proteins selected in the study; **Table S4** - Behavioral screening of lauric acid at a dose of 100 mg/kg (p.o.) (Adapted from Almeida et al., 1999); **Figure S6** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with the β_2 -adrenergic receptor (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and isoprenaline (C) with the receptor amino acid residues; **Figure S7** - 3D interactions of lauric acid (green) under binding domain conditions with Cav (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and nifedipine (C) with Cav amino acid residues; **Figure S8** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with BK_{Ca} (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and nicorandil (C) with BK_{Ca} amino acid residues; **Figure S9** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with K_{ATP} (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and glibenclamide (C) with K_{ATP} amino acid residues; **Figure S10** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with adenylyl cyclase (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and forskolin (C) with amino acid residues of adenylyl cyclase; **Figure S11** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with PKG (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and cGMP (C) with PKG amino acid residues; **Figure S12** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with eNOS (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and GW-274150 (C) with eNOS amino acid residues; **Figure S13** - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with iNOS (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and 1400-W (C) with iNOS amino acid residues; **Figure S14** - 3D interactions of lauric acid (green) under binding domain conditions with COX-2 (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and etoricoxib (C) with COX-2 amino acid residues. References [121-145] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, I.A.D.F., L.S., M.T.S., J.L.d.B.A., M.d.F.F.M.D., D.I.J.X., L.H.C.V., and F.d.A.C.; formal analysis, I.A.D.F.; investigation, I.A.D.F., A.M.d.O.M., A.M.T.C., J.M.F., L.E.d.S.G., M.M.V., G.N.M.d.O., I.M.F., L.N.d.O., I.G.d.S.R., and N.F.d.S.; project administration, L.H.C.V. and F.d.A.C.; resources, L.S., M.T.S., J.L.d.B.A., M.d.F.F.M.D., and D.I.J.X.; supervision, L.H.C.V. and F.d.A.C.; writing—original draft, I.A.D.F., A.M.d.O.M., A.M.T.C., J.M.F., L.E.d.S.G., M.M.V., G.N.M.d.O., I.M.F., L.N.d.O., I.G.d.S.R., and N.F.d.S.; writing—review and editing, L.H.C.V. and F.d.A.C. All the authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received specific funding from the Foundation for Research Support of the State of Paraíba-Fapesq (grant number 3158/2021) from Call for Proposals No. 09/2021.

Institutional Review Board Statement: Experimental procedures were conducted in accordance with the principles of the guidelines for the ethical use of animals in applied etiology studies [107] and the Brazilian Guide for the Production, Maintenance, or Use of Animals in Educational or Scientific Research Activities by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) (Brazil, 2016). The experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UFPB (n° 9310040522).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: The authors would like to thank Fapesq, Capes, and CNPq for their financial support; the Laboratory of Toxicological Assays (LABETOX), the Laboratory of Neural Control of Circulation and Arterial Hypertension/UFPB, and the Cheminformatics Laboratory for their experimental support; and José Crispim Duarte and Roberta Nunes Parentoni for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. GINA (Global Initiative for Asthma). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2024. Available online: www.ginasthma.org (accessed on 23 May 2024).
2. Castillo, J.R.; Peters, S.P.; Busse, W.W. Asthma exacerbations: Pathogenesis, prevention, and treatment. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2017**, *5*, 918–927. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.05.001>.
3. Yao, H.; Liu, J.; Xu, S.; Zhu, Z.; Xu, J. The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12*, 121–140. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1272757>.
4. Atanasov, A.G.; Zotchev, S.B.; Dirsch, V.M.; Supuran, C.T. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
5. Kamalaldin, N.A.; Sulaiman, S.A.; Yusop, M.R.; Yahaya, B. Does Inhalation of Virgin Coconut Oil Accelerate Reversal of Airway Remodelling in an Allergic Model of Asthma? *Int. J. Inflamm.* **2017**, *2017*, 8741851. <https://doi.org/10.1155/2017/8741851>.
6. Vasconcelos, L.H.C.; Silva, M.D.C.C.; Costa, A.C.; Oliveira, G.A.D.; Souza, I.L.L.D.; Righetti, R.F.; Queiroga, F.R.; Cardoso, G.A.; Silva, A.S.; Silva, P.M.; et al. Virgin coconut oil supplementation prevents airway hyperreactivity of guinea pigs with chronic allergic lung inflammation by antioxidant mechanism. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, *2020*, 5148503. <https://doi.org/10.1155/2020/5148503>.
7. Layden, B.T.; Angueira, A.R.; Brodsky, M.; Durai, V.; Lowe, W.L., Jr. Short chain fatty acids and their receptors: New metabolic targets. *Transl. Res.* **2013**, *161*, 13140. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.10.007>.
8. Deen, A.; Visvanathan, R.; Wickramarachchi, D.; Marikkar, N.; Nammi, S.; Jayawardana, B.C.; et al. Chemical composition and health benefits of coconut oil: An overview. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 2182–2193. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10870>.
9. Dayrit, F.M. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2015**, *92*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2562-7>.
10. Eyres, L.; Eyres, M.F.; Chisholm, A.; Brown, R.C. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 267–280. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw002>.
11. Codex Alimentarius Commission. *Guidelines for Vitamin and Mineral Food Supplements (CAC/GL 55—2005)*; Food and Agricultural Organization of the United Nations and the World Health Organization: Rome, Italy, 2005.
12. Alves, N.F.B.; Queiroz, T.M.; Travassos, R.A.; Magnani, M.; Braga, V.A. Acute treatment with lauric acid reduces blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *120*, 348–353. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12700>.
13. Mohammed, N.K.; Samir, Z.T.; Jassim, M.A.; Saeed, S.K. Effect of different extraction methods on physicochemical properties, antioxidant activity, of virgin coconut oil. *Mater. Today Proc.* **2021**, *42*, 2000–2005. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.248>.
14. Babu, S.V.; Veeresh, B.; Patil, A.A.; Warke, Y.B. Lauric acid and myristic acid prevent testosterone induced prostatic hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol.* **2010**, *626*, 262–265. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.037>.
15. Sheela, D.L.; Nazeem, P.A.; Narayanankutty, A.; Shylaja, R.M.; Davis, S.P.; James, P.; et al. Coconut phytochemicals inhibits polyol pathway enzymes: Implication in prevention of microvascular diabetic complications. *Prostaglandins Leukot Essent. Fat. Acids* **2017**, *127*, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.10.004>.
16. Nishimura, Y.; Moriyama, M.; Kawabe, K.; Satoh, H.; Takano, K.; Azuma, Y.T.; et al. Lauric acid alleviates Neuroinflammatory responses by activated microglia: Involvement of the GPR40-dependent pathway. *Neurochem. Res.* **2018**, *43*, 1723–1735. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2587-7>.
17. Shaheryar, Z.A.; Khan, M.A.; Hameed, H.; Zaidi, S.A.A.; Anjum, I.; Rahman, M.S.U. Lauric acid provides neuroprotection against oxidative stress in mouse model of hyperglycaemic stroke. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, *956*, 175990. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175990>.
18. Nakajima, S.; Kunugi, H. Lauric acid promotes neuronal maturation mediated by astrocytes in primary cortical cultures. *Heliyon* **2020**, *6*, e03892. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03892>.
19. Yang, H.T.; Chen, J.W.; Rathod, J.; Jiang, Y.Z.; Tsai, P.J.; Hung, Y.P.; et al. Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth *in vitro* and reduces inflammation in a mouse infection model. *Front. Microbiol.* **2018**, *8*, 2635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02635>.

20. Jin, X.; Zhou, J.; Richey, G.; Wang, M.; Hong, S.M.C.; Hong, S.H. Undecanoic acid, lauric acid, and N-tridecanoic acid inhibit *Escherichia coli* persistence and biofilm formation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *31*, 130–136. <https://doi.org/10.4014/jmb.2008.08027>.
21. Lappano, R.; Sebastiani, A.; Cirillo, F.; Rigiracciolo, D.C.; Galli, G.R.; Curcio, R.; et al. The lauric acid-activated signaling prompts apoptosis in cancer cells. *Cell Death Discov.* **2017**, *3*, 17063. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.63>.
22. Sheela, D.L.; Narayanankutty, A.; Nazeem, P.A.; Raghavamenon, A.C.; Muthangaparambil, S.R. Lauric acid induce cell death in colon cancer cells mediated by the epidermal growth factor receptor downregulation: An *in silico* and *in vitro* study. *Hum. Exp. Toxicol.* **2019**, *38*, 753–761. <https://doi.org/10.1177/0960327119839185>.
23. Zhang, F.; Song, M.; Chen, L.; Yang, X.; Li, F.; Yang, Q.; et al. Dietary Supplementation of lauric acid alleviates the irregular estrous cycle and the impaired metabolism and thermogenesis in female mice fed with high-fat diet (HFD). *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 12631–12640. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05235>.
24. Ong, M.H.L.; Wong, H.K.; Tengku-Muhammad, T.S.; Choo, Q.C.; Chew, C.H. Pro-atherogenic proteoglycanase ADAMTS-1 is down-regulated by lauric acid through PI3K and JNK signaling pathways in THP-1 derived macrophages. *Mol. Biol. Rep.* **2019**, *46*, 2631–2641. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04661-6>.
25. Sedik, A.A.; Elgohary, R.; Khalifa, E.; Khalil, W.K.B.; Shafey, H.I.; Shalaby, M.B.; Gouida, M.S.O.; Tag, Y.M. Lauric acid attenuates hepato-metabolic complications and molecular alterations in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Toxicol. Mech. Methods* **2024**, *34*, 454–467. <https://doi.org/10.1080/15376516.2023.2301344>.
26. Khan, H.U.; Aamir, K.; Jusuf, P.R.; Seth, I.G.; Sisinthy, S.P.; Ghildyal, R.; et al. Lauric acid ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced liver inflammation by mediating TLR4/MyD88 pathway in Sprague Dawley (SD) rats. *Life Sci.* **2021**, *265*, 118750. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118750>.
27. Almeida, R.N. *Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos*; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2006; p. 357.
28. Chapman, K.; Sewell, F.; Allais, L.; Delongas, J.L.; Donald, E.; Festag, M.; et al. A global pharmaceutical company initiative: An evidence-based approach to define the upper limit of body weight loss in short term toxicity studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *67*, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.04.003>.
29. Van Berlo, D.; Woutersen, M.; Muller, A.; Pronk, M.; Vriend, J.; Hakker, B. 10% Body weight (gain) change as criterion for the maximum tolerated dose: A critical analysis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2022**, *134*, 105235. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105235>.
30. Nirogi, R.; Goyal, V.K.; Jana, S.; Pandey, S.K.; Gothi, A. What suits best for organ weight analysis: Review of relationship between organ weight and body/brain weight for rodent toxicity studies. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2014**, *5*, 1525–1532. <https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>.
31. Khan, H.U.; Aamir, K.; Sisinthy, S.P.; Nagojappa, N.B.S.; Arya, A. Food additive “lauric acid” possess non-toxic profile on biochemical, haematological and histopathological studies in female Sprague Dawley (SD) rats. *PeerJ* **2020**, *8*, e8805. <https://doi.org/10.7717/peerj.8805>. eCollection 2020.
32. Zhu, J.; Wang, H.; Yang, S.; Guo, L.; Li, Z.; Wang, W.; et al. Comparison of toxicity of benzene metabolite hydroquinone in hematopoietic stem cells derived from murine embryonic yolk sac and adult bone marrow. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071153>.
33. Quinton, J.F. *Novos Animais de Estimação-Pequenos Mamíferos*; Editora Roca: São Paulo, Brasil, 2005. ISBN: 85-7241-579-3.
34. Dixon, J.; Lane, K.; MacPhee, I.; Philips, B. Xenobiotic metabolism: The effect of acute kidney injury on non-renal drug clearance and hepatic drug metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *13*, 2538–2553. <https://doi.org/10.3390/ijms15022538>.
35. Scoditti, E.; Sabatini, S.; Carli, F.; Gastaldelli, A. Hepatic glucose metabolism in the steatotic liver. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2024**, *21*, 319–334. <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00888-8>.
36. Li, H.; Yu, X.H.; Ou, X.; Ouyang, X.P.; Tang, C.K. Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **2021**, *83*, 101109. [10.1016/j.plipres.2021.101109](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101109).
37. Sharma, P. Value of liver function tests in cirrhosis. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **2022**, *12*, 948–964. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2021.11.004>.

38. John, A.; Pasha, T. Laboratory tests of renal function. *Anaesth. Intens. Care Med.* **2024**, *25*, 303–307. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2024.03.002>.
39. Denke, M.A. Dietary Fats, fatty acids, and their effects on lipoproteins. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2006**, *8*, 466–471. <https://doi.org/10.1007/s11883-006-0021-0>.
40. Di Angelantonio, E.; Sarwar, N.; Perry, P.; Kaptoge, S.; Ray, K.K.; Thompson, A.; et al. Major Lipids, Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease. *JAMA* **2009**, *302*, 1993–2000. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1619>.
41. Rosenson, R.S.; Brewer, H.B.; Davidson, W.S.; Fayad, Z.A.; Fuster, V.; Goldstein, J.; et al. Cholesterol Efflux and Atheroprotection: Advancing the Concept of Reverse Cholesterol Transport. *Circulation* **2012**, *125*, 1905–1919. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589>.
42. Zhu, Y.; Aghai, Z.H.; Betal, S.G.N.; Favara, M.; Fong, G.; Rahman, T.; et al. A novel noninvasive approach for evaluating work of breathing indices in a developmental rat model using respiratory inductance plethysmography. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 20730. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77731-6>.
43. Nirogi, R.; Shanmuganathan, D.; Jayarajan, P.; Abraham, R.; Kancharla, B. Comparison of whole body and head out plethysmography using respiratory stimulant and depressant in conscious rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2012**, *65*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2011.10.001>.
44. Lynch, I.I.I.J.; Rossignol, E.; Moehrle, J.J.; Van Vleet, T.R.; Marsh, K.C.; Parman, T.; et al. Increased stress associated with head-out plethysmography testing can exacerbate respiratory effects and lead to mortality in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2019**, *99*, 106580. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106580>.
45. Null, D.M.; Suresh, G.K. Pulmonary function and graphics. Assisted Ventilation of the Neonate. In *An Evidence-Based Approach to Newborn Respiratory Care*, 6th ed.; Goldsmith, J.P., Karotkin, E.H., Keszler, M., Suresh, G.K., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2016; pp. 108–117.
46. Hallett, S.; Toro, F.; Ashurst, J.V. Physiology, Tidal Volume. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023. PMID: 29494108.
47. Mukherjee, A.A.; Kandhare, A.D.; Rojatkhar, S.R.; Bodhankar, S.L. Ameliorative effects of *Artemisia pallens* in a murine model of ovalbumin-induced allergic asthma via modulation of biochemical perturbations. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *94*, 880–889. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.017>.
48. Parlar, A.; Arslan, S.O. CB2 Agonist (AM1241) improving effect on ovalbumin-induced asthma in rats. *Iran J. Pharm. Res.* **2020**, *19*, 3–17. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1101002>.
49. Ferreira, S.R.D.; Pessoa, R.F.; Figueiredo, I.A.D.; Lima, J.P.M.; de Moura, T.M.C.F.; Bezerra, C.O.; et al. Functional and morphologic dysfunctions in the airways of rats submitted to an experimental model of obesity-exacerbated asthma. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9540. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13551-0>.
50. Lim, R.; Zavou, M.J.; Milton, P.L.; Chan, S.T.; Tan, J.L.; Dickinson, H.; et al. Measuring respiratory function in mice using unrestrained whole-body plethysmography. *J. Vis. Exp.* **2014**, *12*, e51755. <https://doi.org/10.3791/51755>.
51. Mahajan, S.G.; Mehta, A.A. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *650*, 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.075>.
52. Kandhare, A.D.; Bodhankar, S.L.; Singh, V.; Mohan, V.; Thakurdesai, P.A. Anti-asthmatic effects of type-A procyanidine polyphenols from cinnamon bark in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in laboratory animals. *Biomed. Aging Pathol.* **2013**, *3*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.biomag.2013.01.003>.
53. Arora, P.; Ansari, S.H.; Najmi, A.K.; Anjum, V.; Ahmad, S. Investigation of anti-asthmatic potential of dried fruits of *Vitis vinifera* L. in animal model of bronchial asthma. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2016**, *12*, 42. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0145-x>.
54. Thakur, V.R.; Khuman, V.; Beladiya, J.V.; Chaudagar, K.K.; Mehta, A.A. An experimental model of asthma in rats using ovalbumin and lipopolysaccharide allergens. *Heliyon* **2019**, *5*, e02864. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02864>.
55. Azman, S.; Sekar, M.; Wahidin, S.; Gan, S.H.; Vaijanathappa, J.; Bonam, S.R.; et al. Embelin Alleviates Severe Airway Inflammation in OVA-LPS-Induced Rat Model of Allergic Asthma. *J. Asthma Allergy* **2021**, *14*, 1511–1525. <https://doi.org/10.2147/JAA.S298613>.

56. Jonsson, E.W.; Dahlén, S.E. Leukotrienes and other mediators of the Schultz-Dale reaction in guinea-pig lung parenchyma. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* **1995**, *23*, 353–355.
57. Seegal, B.C. Experimental anaphylaxis in lower animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, *50*, 681–691. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1949.tb39875.x>.
58. Coulson, E.J. The Schultz-Dale technique. *J. Allergy* **1953**, *24*, 458–473. [https://doi.org/0021-8707\(53\)90048-3](https://doi.org/0021-8707(53)90048-3).
59. Macedo, S.M.D.; Vaz, S.C.M.; Lourenco, E.L.B.; De Sousa, M.D.G.; Ligeiro-Oliveira, A.P.; Ferreira, J.M.C., Jr.; et al. *In vivo* hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. *Toxicology* **2007**, *241*, 47–57. <https://doi.org/j.tox.2007.08.085>.
60. Ghorani, V.; Marefati, N.; Shakeri, F.; Rezaee, R.; Boskabady, M.; Boskabady, M.H. The Effects of *Allium cepa* Extract on Tracheal Responsiveness, Lung Inflammatory Cells and Phospholipase A₂ Level in Asthmatic Rats. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* **2018**, *17*, 221–231.
61. Shakeri, F.; Roshan, N.M.; Kaveh, M.; Eftekhari, N.; Boskabady, M.H. Curcumin affects tracheal responsiveness and lung pathology in asthmatic rats. *Pharmacol. Rep.* **2018**, *70*, 981–987. <https://doi.org/j.pharep.2018.04.007>.
62. Kaveh, M.; Eftekhari, N.; Boskabady, M.H. The effect of alpha linolenic acid on tracheal responsiveness, lung inflammation, and immune markers in sensitized rats. *Iran J. Basic Med. Sci.* **2019**, *22*, 255–261. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.27381.6684>.
63. Vasconcelos, L.H.C.; Silva, M.C.C.; Costa, A.C.; Oliveira, G.A.; Souza, I.L.L.; Righetti, R.F.; et al. Guinea pig model of airway smooth muscle hyperreactivity induced by chronic allergic lung inflammation: Contribution of epithelium and oxidative stress. *Front. Pharmacol.* **2019**, *9*, 1547. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01547>.
64. O'byrne, P.; Fabbri, L.M.; Pavord, I.D.; Papi, A.; Petruzzelli, S.; Lange, P. Asthma progression and mortality: The role of inhaled corticosteroids. *Eur. Respir. J.* **2019**, *54*, 1900491. <https://doi.org/10.1183/13993003.00491-2019>.
65. Derendorf, H.; Nave, R.; Drollmann, A.; Cerasoli, F.; Wurst, W. Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma. *Eur. Respir. J.* **2006**, *28*, 1042–1050. <https://doi.org/10.1183/09031936.00074905>.
66. Bolton, T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* **1979**, *59*, 606–718. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.606>.
67. Ouedraogo, N.; Roux, E. Physiology of Airway Smooth Muscle Contraction: An Overview. *J. Pulm. Respir. Med.* **2014**, *4*, 221. <https://doi.org/10.4172/2161-105X.1000221>.
68. Kistemaker, L.E.M.; Gosens, R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: Roles in inflammation and remodeling. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 164–171. <https://doi.org/j.tips.2014.11.005>.
69. Cazzola, M.; Calzetta, L.; Matera, M.G. Long-acting muscarinic antagonists and small airways in asthma: Which link? *Allergy* **2021**, *76*, 1990–2001. <https://doi.org/10.1111/all.14766>.
70. Sousa, C.T.; Brito, T.S.; Lima, F.J.B.; Siqueira, R.J.B.; Magalhães, P.J.C.; Lima, A.A.M.; et al. Sildenafil decreases rat tracheal hyperresponsiveness to carbachol and changes canonical transient receptor potential gene expression after antigen challenge. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2011**, *44*, 562–572. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2011007500056>.
71. Cheng, J.B.; Townley, R.G. Pharmacological characterization of effects of nifedipine on isolated guinea-pig and rat tracheal smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1983**, *263*, 228–244. PMID: 6349566.
72. Matsuda, F.; Sugahara, K.; Sugita, M.; Sadohara, T.; Kiyota, T.; Terasaki, H. Comparative effect of amrinone, aminophylline and diltiazem on rat airway smooth muscle. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **2000**, *44*, 763–766. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2000.440617.x>.
73. Beavo, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* **1995**, *75*, 725–748. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.4.725>.
74. Fan Chung, K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *533*, 110–117. <https://doi.org/j.ejphar.2005.12.059>.

75. Trian, T.; Burgess, J.K.; Niimi, K.; Moir, L.M.; Ge, Q.; Berger, P.; et al. β 2-Agonist induced cAMP is decreased in asthmatic airway smooth muscle due to increased PDE4D. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020000>.
76. Kim, S.H.; Hong, J.H.; Yang, W.K.; Kim, H.J.; An, H.J.; Lee, Y.C. Cryptotympana pustulata extract and its main active component, oleic acid, inhibit ovalbumin-induced allergic airway inflammation through inhibition of Th2/GATA-3 and interleukin-17/ROR γ t signaling pathways in asthmatic mice. *Molecules* **2021**, *26*, 1854. <https://doi.org/10.3390/molecules26071854>.
77. Agnihotry, S.; Pathak, R.K.; Srivastav, A.; Shukla, P.K.; Gautam, B. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design. In *Computer-Aided Drug Design*; Singh, D.B., Ed.; Springer: Singapore, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6815-2_6.
78. Yu, Y.; Xu, S.; He, R.; Liang, G. Application of molecular simulation methods in food science: Status and prospects. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 2684–2703. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06789>.
79. Lewis, D.I. Animal experimentation: Implementation and application of the 3Rs. *Emerg. Top. Life Sci.* **2019**, *3*, 675–679. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190061>.
80. Schneider, N.; Hindle, S.; Lange, G.; Klein, R.; Albrecht, J.; Briem, H.; et al. Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2012**, *26*, 701–723. <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9531-0>.
81. Fallon, J.L.; Baker, M.R.; Xiong, L.; Loy, R.E.; Yang, G.; Dirksen, R.T.; et al. Crystal structure of dimeric cardiac L-type calcium channel regulatory domains bridged by Ca²⁺-calmodulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807487106>.
82. Wu, Y.; Yang, Y.; Ye, S.; Jiang, Y. Structure of the gating ring from the human large-conductance Ca²⁺-gated K⁺ channel. *Nature* **2010**, *466*, 393–397.
83. Gilbert, N.C.; Bartlett, S.G.; Waight, M.T.; Neau, D.B.; Boeglin, W.E.; Brash, A.R.; et al. The structure of human 5-lipoxygenase. *Science* **2011**, *331*, 217–219. <https://doi.org/10.1126/science.1198482>.
84. Deshpande, D.A.; Theriot, B.S.; Penn, R.B.; Walker, J.K. β -Arrestins specifically constrain β 2-adrenergic receptor signaling and function in airway smooth muscle. *FASEB J.* **2008**, *22*, 2134–2141. <https://doi.org/10.1096/fj.07-102459>.
85. Barnes, P.J. β -adrenergic receptors and their regulation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, *152*, 838–860. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.3.7663795>.
86. Paiva, A.C.Z.; Lima Marson, F.A.; Ribeiro, J.D.; Bertuzzo, C.S. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2014**, *10*, 8. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-8>.
87. Cherezov, V.; Rosenbaum, D.M.; Hanson, M.A.; Rasmussen, S.G.F.; Thian, F.S.; Kobilka, T.S. High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258–1265. <https://doi.org/10.1126/science.1150577>.
88. Jude, J.A.; Wylam, M.E.; Walseth, T.F.; Kannan, M.S. Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2008**, *5*, 15–22. <https://doi.org/10.1513/pats.200704-047VS>.
89. Xu, J.; Meng, Y.; Jia, M.; Jiang, J.; Yang, Y.; Ou, Y.; et al. Epithelial expression and role of secreted STC1 on asthma airway hyperresponsiveness through calcium channel modulation. *Allergy* **2021**, *76*, 2475–2487. <https://doi.org/10.1111/all.14727>.
90. Du, X.; Zhi, J.; Yang, D.; Wang, Q.; Luo, X.; Deng, X. Research progress in the mechanism of calcium ion on contraction and relaxation of airway smooth muscle cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2021**, *41*, 117–122. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1806315>.
91. Kocmalova, M.; Oravec, M.; Adamkov, M.; Sadlonova, V.; Kazimierova, I.; Medvedova, I.; et al. Potassium ion channels and allergic asthma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *838*, 35–45. https://doi.org/10.1007/5584_2014_76.
92. Lee, K.P.K.; Chen, J.; MacKinnon, R. Molecular structure of human K_{ATP} in complex with ATP and ADP. *eLife* **2017**, *6*, e32481. <https://doi.org/10.7554/eLife.32481>.
93. Billington, C.K.; Ojo, O.O.; Penn, R.B.; Ito, S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2013**, *26*, 112–120. <https://doi.org/j.pupt.2012.05.007>.

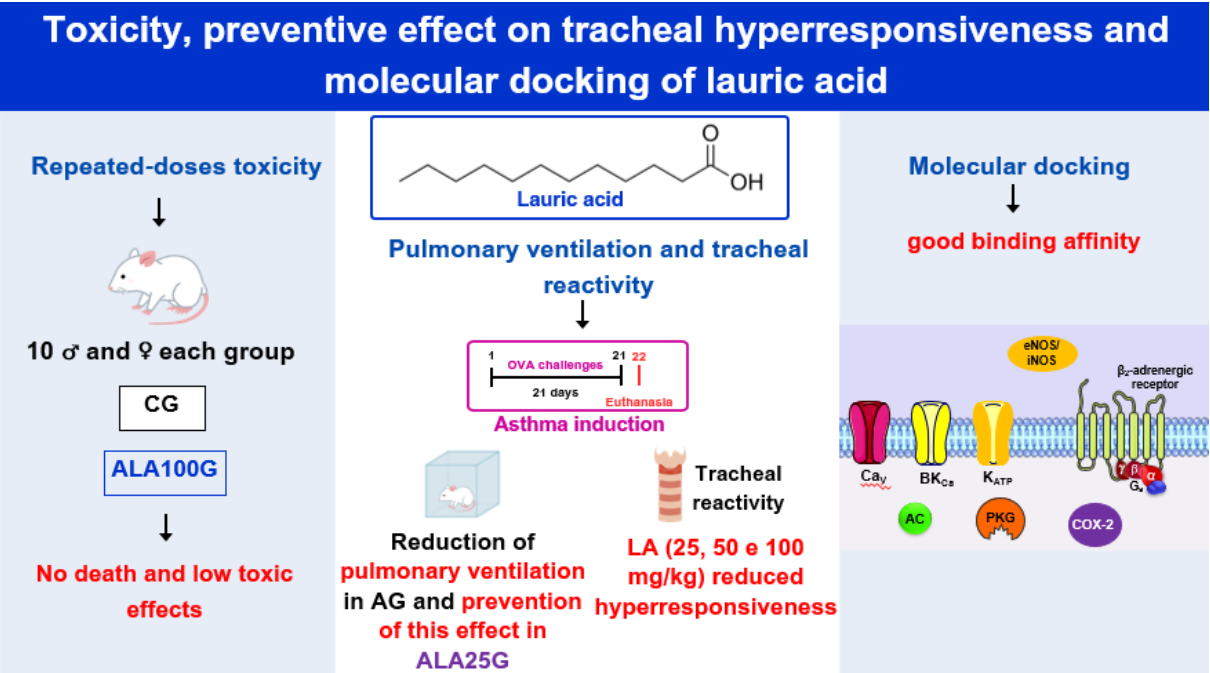
94. Gerlits, O.; Campbell, J.C.; Blakeley, M.P.; Kim, C.; Kovalevsky, A. Neutron Crystallography Detects Differences in Protein Dynamics: Structure of the PKG II Cyclic Nucleotide Binding Domain in Complex with an Activator. *Biochemistry* **2018**, *57*, 1833–1837. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00010>.
95. Antosova, M.; Mokra, D.; Pepucha, L.; Plevkova, J.; Buday, T.; Sterusky, M.; et al. Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiol. Res.* **2017**, *66* (Suppl. S2), S159–S172. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933673>.
96. Bayarri, M.A.; Milara, J.; Estornut Cortijo, J. Nitric oxide system and bronchial epithelium: More than a barrier. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 687381. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.687381>.
97. Fischmann, T.O.; Hruza, A.; Niu, X.D.; Fossetta, J.D.; Lunn, C.A.; Dolphin, E.; et al. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 233–242. [10.1038/6675](https://doi.org/10.1038/6675).
98. Rumzhum, N.N.; Ammit, A.J. Cyclooxygenase 2: Its regulation, role and impact in airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* **2016**, *46*, 397–410. <https://doi.org/10.1111/cea.12697>.
99. Fajt, M.L.; Gelhaus, S.L.; Freeman, B.; Uvalle, C.E.; Trudeau, J.B.; Holguin, F.; et al. Prostaglandin D₂ pathway upregulation: Relation to asthma severity, control, and TH2 inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 1504–1512. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.035>.
100. Peebles, R.S., Jr. Prostaglandins in asthma and allergic diseases. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *193*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.001>.
101. Shiraishi, Y.; Asano, K.; Niimi, K.; Fukunaga, K.; Wakaki, M.; Kagyo, J.; et al. Cyclooxygenase-2/prostaglandin D₂/CYP2C8 pathway mediates double-stranded RNA-induced enhancement of allergic airway inflammation. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 541–549. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.541>.
102. Herrerias, A.; Torres, R.; Serra, M.; Marco, A.; Pujols, L.; Picado, C.; et al. Activity of the cyclooxygenase 2-prostaglandin-E prostanoïd receptor pathway in mice exposed to house dust mite aeroallergens, and impact of exogenous prostaglandin E₂. *J. Inflamm.* **2009**, *6*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-6-30>.
103. Zaslona, Z.; Peters-Golden, M. Prostanoids in asthma and COPD. *Chest* **2015**, *148*, 1300–1306. <https://doi.org/10.1378/chest.15-1029>.
104. Jack, K.S.; Asaruddin, M.R.B.; Bhawani, S.A. Pharmacophore study, molecular docking, and molecular dynamic simulation of virgin coconut oil derivatives as anti-inflammatory agents against COX-2. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **2022**, *9*, 73. <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00245-7>.
105. Orlando, B.J.; Malkowski, M.G. Substrate-selective inhibition of cyclooxygenase-2 by fenamic acid derivatives is dependent on peroxide tone. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 15069–15081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725713>.
106. Cava, C.; Castiglioni, I. Integration of molecular docking and *in vitro* studies: A powerful approach for drug discovery in breast cancer. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 6981. <https://doi.org/10.3390/app10196981>.
107. Sherwin, C.M.; Christiansen, S.B.; Duncan, I.J.; Erhard, H.W.; Lay, D.C., Jr.; Mench, J.A.; et al. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2003**, *81*, 291–305. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00288-5).
108. Brazil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, **2016**. Available online: www.antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/guia.html (accessed on 31 May 2024).
109. Anuar, N.S.; Shafie, S.A.; Maznan, M.A.F.; Zin, N.S.N.M.; Azmi, N.A.S.; Raoof, R.A. Lauric acid improves hormonal profiles, antioxidant properties, sperm quality and histomorphometric changes in testis and epididymis of streptozotocin-induced diabetic infertility rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2023**, *470*, 116558. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116558>.
110. OECD. *Chronic Toxicity Studies. OECD Guideline for Testing of Chemicals n° 407, Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents*: Paris, France, 2008.
111. Salmon, M.; Walsh, D.A.; Huang, T.J.; Barnes, P.J.; Leonard, T.B.; Hay, D.W.; et al. Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *127*, 1151–1158. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702669>.

112. Galvão, J.G.F.; Cavalcante-Silva, L.H.A.; Carvalho, D.C.M.; Ferreira, L.K.D.; Monteiro, T.M.; Alves, A.F.; et al. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. *Inflamm. Res.* **2017**, *66*, 1117–1130. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1092-9>.
113. Malan, A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir. Physiol.* **1973**, *17*, 32–44. [https://doi.org/0034-5687\(73\)90108-4](https://doi.org/0034-5687(73)90108-4).
114. Bartlett, D., Jr.; Tenney, S.M. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* **1970**, *10*, 384–395. [https://doi.org/0034-5687\(70\)90056-3](https://doi.org/0034-5687(70)90056-3).
115. Chand, N.; Eyre, P. The Schultz-Dale reaction: A review. *Agents Actions* **1978**, *8*, 171–184. <https://doi.org/10.1007/BF01966600>.
116. Lima, W.T.; Silva, Z.L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: Role of connective tissue mast cells. *Gen. Pharmacol.* **1998**, *30*, 689–695. [https://doi.org/s0306-3623\(97\)00377-7](https://doi.org/s0306-3623(97)00377-7).
117. Du, W.; McMahon, T.J.; Zhang, Z.S.; Stiber, J.A.; Meissner, G.; Eu, J.P. Excitation-contraction coupling in airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30143–30151. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606541200>.
118. Bernstein, F.C.; Koetzle, T.F.; Williams, G.J.B.; Meyer Jr, E.F.; Brice, M.D.; Rodgers, J.R.; et al. The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542. [https://doi.org/s0022-2836\(77\)80200-3](https://doi.org/s0022-2836(77)80200-3).
119. *Mollegro Virtual Docker*, version 6.0; CLC Bio Company: Aarhus, Denmark, 2014.
120. Thomsen, R.; Christensen, M.H. MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>.
121. Akif, U.M.; Miyan, J.; Rana, R.; Moinuddin Goswami, N.K.; Tanzeela; et al. Selective COX-2 inhibitor etoricoxib's liposomal formulation attenuates M2 polarization of TAMs and enhances its anti-metastatic potential. *Pharm. Res.* **2023**, *40*, 551–566. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03491-z>.
122. Bhatia, V.; Maghsoudi, S.; Hinton, M.; Bhagirath, A.Y.; Singh, N.; Jaggupilli, A.; et al. Characterization of adenylyl cyclase isoform 6 residues interacting with forskolin. *Biology* **2023**, *12*, 572. <https://doi.org/10.3390/biology12040572>.
123. Chaikuad, A.; Tacconi, E.M.C.; Zimmer, J.; Liang, Y.; Gray, N.S.; Tarsounas, M. A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 853–860. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1629>.
124. Chatterjee, P.K.; Patel, N.S.; Sivarajah, A.; Kvale, E.O.; Dugo, L.; Cuzzocrea, S.; et al. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 853–865. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00703.x>.
125. Evlakhov, V.I.; Poyasov, I.Z.; Berezina, T.P. Changes of pulmonary microhemodynamics in experimental pulmonary thromboembolism after pretreatment with K-channel activators. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2022**, *173*, 302–305. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05802-3>.
126. Hanrahan, J.P.; de Boer, I.H.; Bakris, G.L.; Wilson, P.J.; Wakefield, J.D.; Seferovic, J.P.; et al. Effects of the soluble guanylate cyclase stimulator praliciguat in diabetic kidney disease: A randomized placebo-controlled clinical trial. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2021**, *16*, 59–69. <https://doi.org/10.2215/CJN.03450320>.
127. Harikrishnan, L.S.; Warriar, J.; Tebben, A.J.; Tonukunuru, G.; Madduri, S.R.; Baligar, V.; et al. Heterobicyclic inhibitors of transforming growth factor beta receptor I (TGFβRI). *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1026–1034. <https://doi.org/j.bmc.2018.01.014>.
128. Jacobs, M.; Hayakawa, K.; Swenson, L.; Bellon, S.; Fleming, M.; Taslimi, P.; et al. The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 260–268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508847200>.
129. Jafarian-Tehrani, M.; Louin, G.; Royo, N.C.; Besson, V.C.; Bohme, G.A.; Plotkine, M.; et al. 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats. *Nitric. Oxide.* **2005**, *12*, 61–69. <https://doi.org/j.niox.2005.01.001>.
130. Kidger, A.M.; Munck, J.M.; Saini, H.K.; Balmanno, K.; Minihane, E.; Courtin, A.; et al. Dual-mechanism ERK1/2 inhibitors exploit a distinct binding mode to block phosphorylation and nuclear accumulation of ERK1/2. *Mol. Cancer Ther.* **2020**, *19*, 525–539. <https://doi.org/10.1158/1535-7163>.

131. Kim, S.M.; Yuen, T.; Iqbal, J.; Rubin, M.R.; Zaidi, M. The NO–cGMP–PKG pathway in skeletal remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2021**, *1487*, 21–30. <https://doi.org/10.1111/nyas.14645>.
132. Kleinboelting, S.; Diaz, A.; Moniot, S.; van den Heuvel, J.; Weyand, M.; Levin, L.R.; et al. Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3727–3732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322778111>.
133. Lauber, B.S.; Hardegger, L.A.; Asraful, A.K.; Lund, B.A.; Dumele, O.; Harder, M.; et al. Addressing the glycine-rich loop of protein kinases by a multi-faceted interaction network: Inhibition of PKA and a PKB mimic. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 211–221. <https://doi.org/10.1002/chem.201503552>.
134. Lee, A.J.; Mahoney, C.M.; Cai, C.C.; Ichinose, R.; Stefani, R.M.; Marra, K.G.; et al. Sustained delivery of SB-431542, a type I transforming growth factor beta-1 receptor inhibitor, to prevent arthrofibrosis. *Tissue Eng. Part A* **2021**, *27*, 1411–1421. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2021.0204>.
135. Levin, E.D.; Slade, S.; Wells, C.; Pruitt, M.; Cousins, V.; Cauley, M.; et al. Histamine H1 antagonist treatment with pyrilamine reduces nicotine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *650*, 256–260. <https://doi.org/j.ejphar.2010.10.012>.
136. Liu, R.; Kang, Y.; Chen, L. Activation mechanism of human soluble guanylate cyclase by stimulators and activators. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25617-0>.
137. Pensa, A.V.; Cinelli, M.A.; Li, H.; Chreifi, G.; Mukherjee, P.; Roman, L.J.; et al. Hydrophilic, potent, and selective 7-substituted 2-aminoquinolines as improved human neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7146–7165. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00835>.
138. Rosenfeld, R.J.; Garcin, E.D.; Panda, K.; Andersson, G.; Aberg, A.; Wallace, A.V.; et al. Conformational changes in nitric oxide synthases induced by chlorzoxazone and nitroindazoles: Crystallographic and computational analyses of inhibitor potency. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13915–13925. <https://doi.org/10.1021/bi026313j>.
139. Rossi, A.; Pergola, C.; Koeberle, A.; Hoffmann, M.; Dehm, F.; Bramanti, P.; et al. The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *161*, 555–570. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00861.x>.
140. Scala, R.; Maquoud, F.; Zizzo, N.; Mele, A.; Camerino, G.M.; Zito, F.A.; et al. Pathophysiological consequences of K_{ATP} channel overactivity and pharmacological response to glibenclamide in skeletal muscle of a murine model of Cantù syndrome. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 604885. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.604885>.
141. Shimamura, T.; Shiroishi, M.; Weyand, S.; Tsujimoto, H.; Winter, G.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Liu, W.; Han, G.W. Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* **2011**, *475*, 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature10236>.
142. Spadeto, J.P.M.; Freitas, M.P.; Cormanich, R.A. Fluorinated dihydropyridines as candidates to block L-type voltage-dependent calcium channels. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2022**, *40*, 13456–13471. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1963620>.
143. Wang, H.Y.; Qin, Y.; Li, H.; Roman, L.J.; Martásek, P.; Poulos, T.L.; et al. Potent and selective human neuronal nitric oxide synthase inhibition by optimization of the 2-aminopyridine-based scaffold with a pyridine linker. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4913–4925. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00123>.
144. Yang, F.; Ling, S.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Lv, P.; Liu, S.; et al. Different conformational responses of the β_2 -adrenergic receptor-Gs complex upon binding of the partial agonist salbutamol or the full agonist isoprenaline. *Natl. Sci. Rev.* **2021**, *8*, nwaa284. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa284>.
145. Zhang, H.; Kong, Q.; Wang, J.; Jiang, Y.; Hua, H. Complex roles of cAMP–PKA–CREB signaling in cancer. *Exp. Hematol. Oncol.* **2020**, *9*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00159-7>.

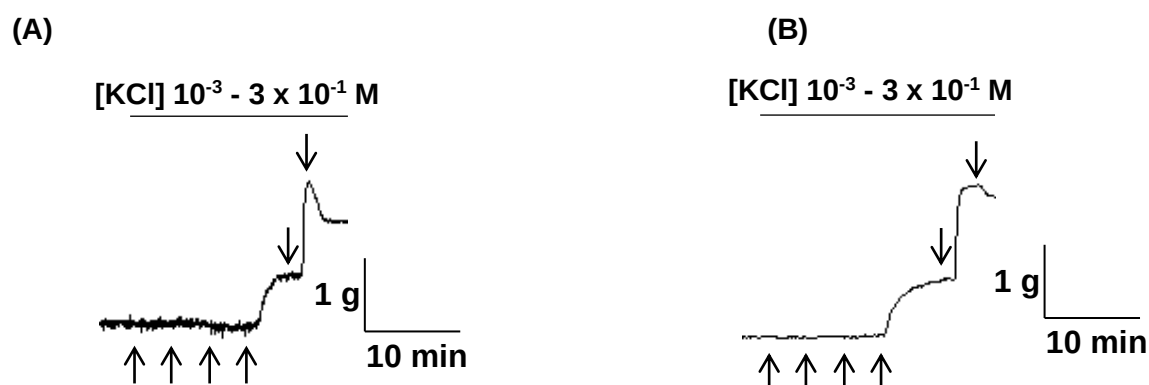
Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Graphical abstract



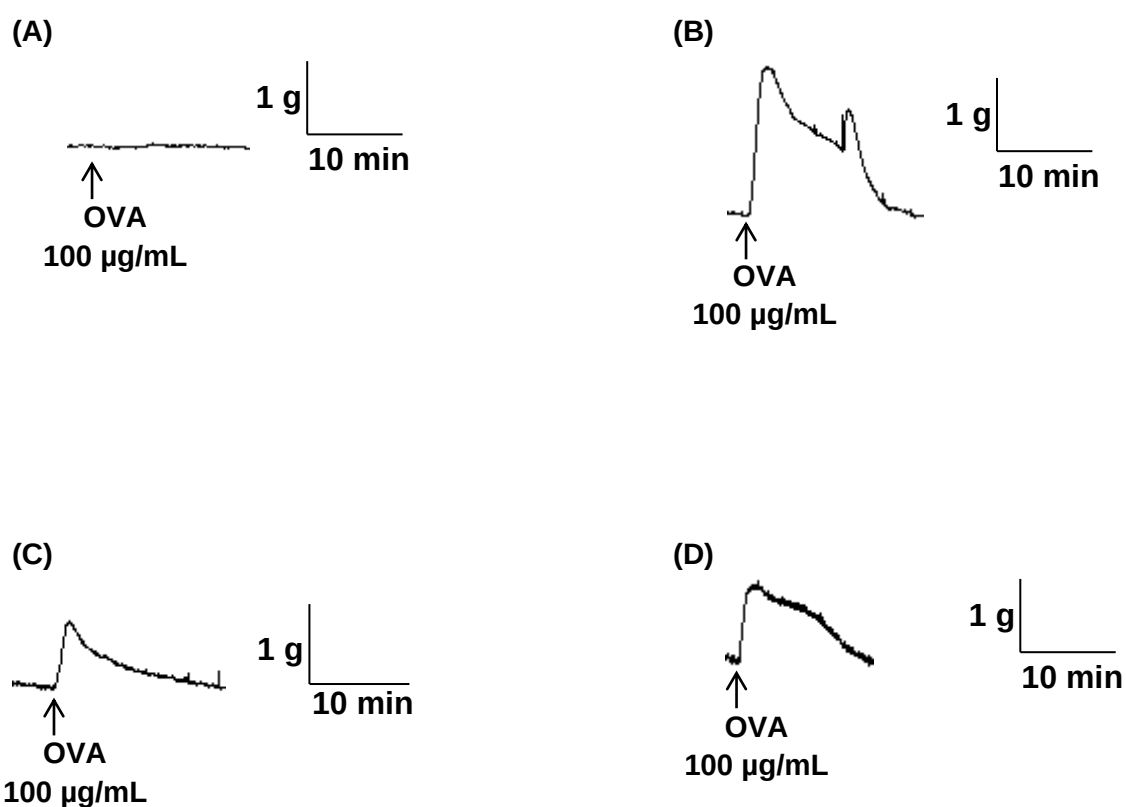
5. 1. 1 Material suplementar

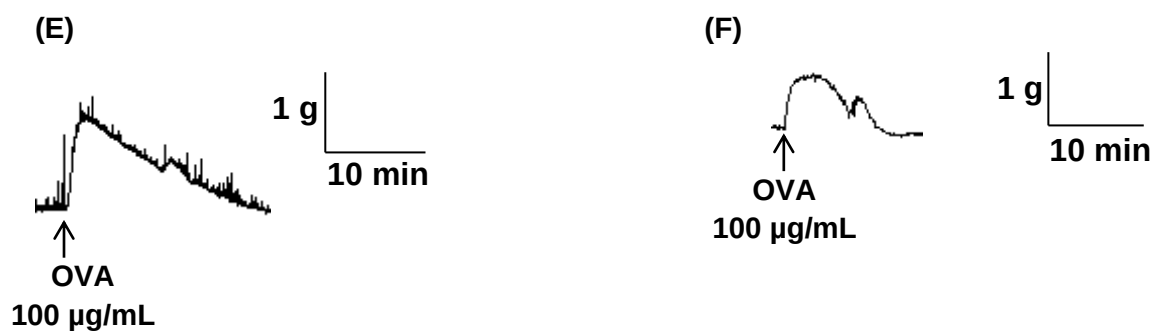
Figure S1 – Original representative recordings of contractile reactivity to KCl in the rat trachea of CG (A) and AG (B) animals.



KCl: potassium chloride.

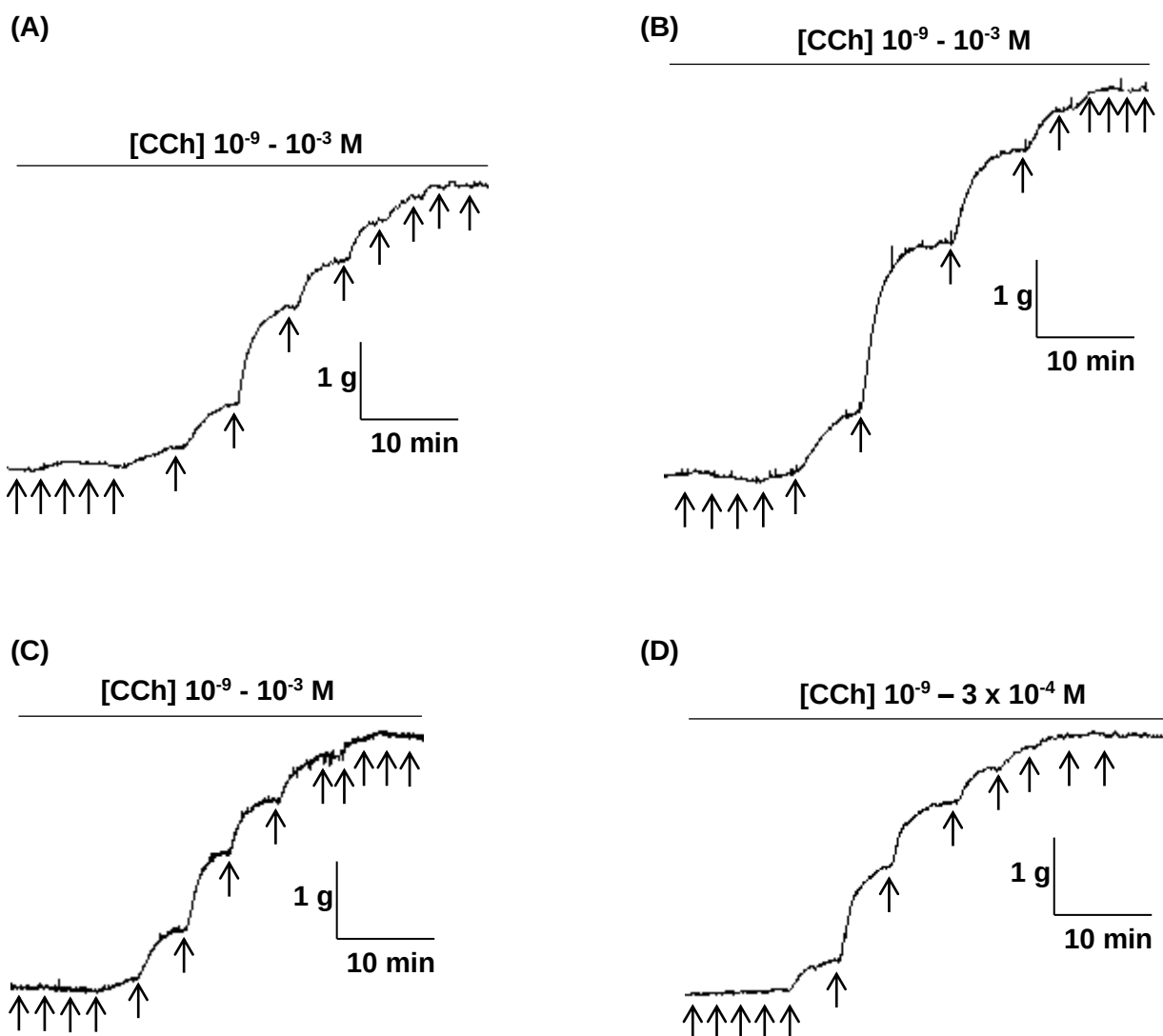
Figure S2 – Representative original recordings of tracheal reactivity induced by 100 $\mu\text{g/mL}$ OVA in CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) rats.

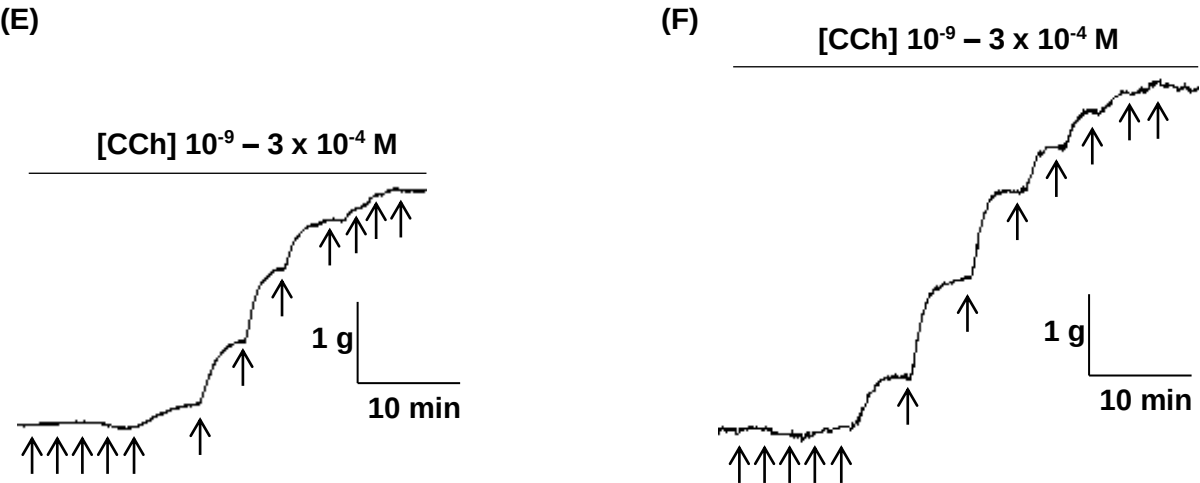




OVA: ovalbumin.

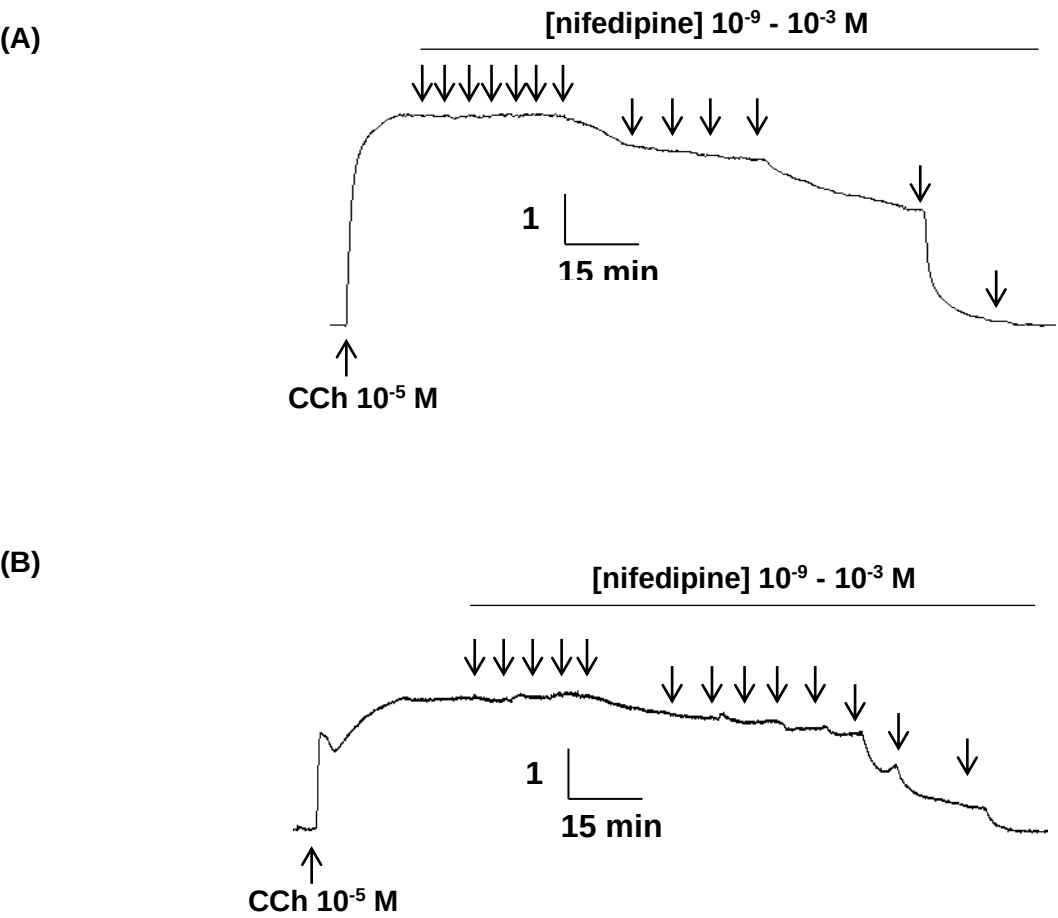
Figure S3 – Original representative recordings of contractile reactivity to CCh from rat trachea of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) rats.





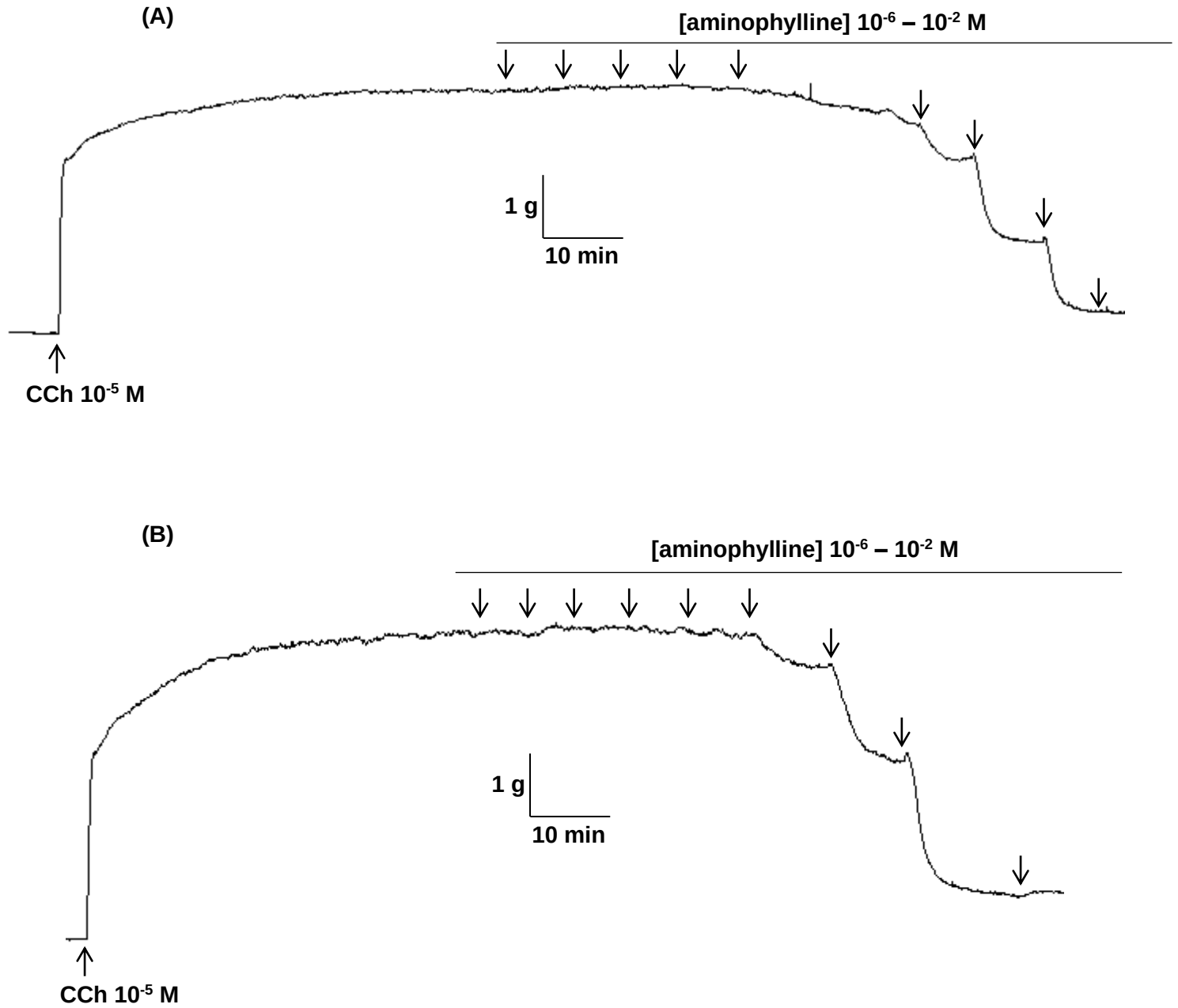
CCh: carbachol.

Figure S4 – Original recordings representing the relaxant reactivity to nifedipine from rat trachea of CG (A) and AG (B) animals.

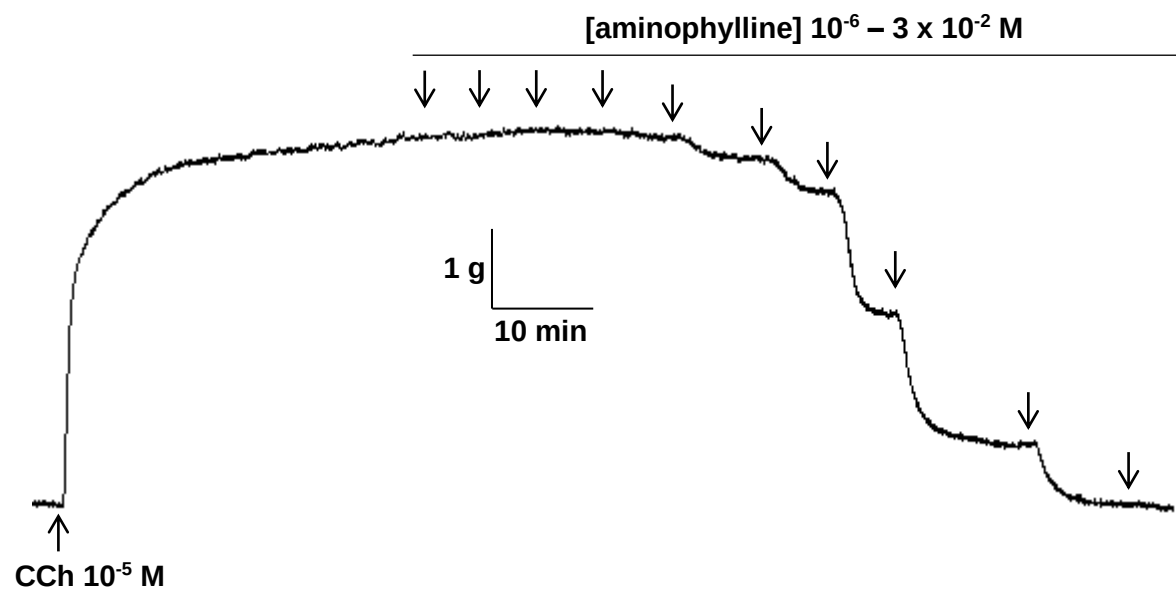


CCh: carbachol.

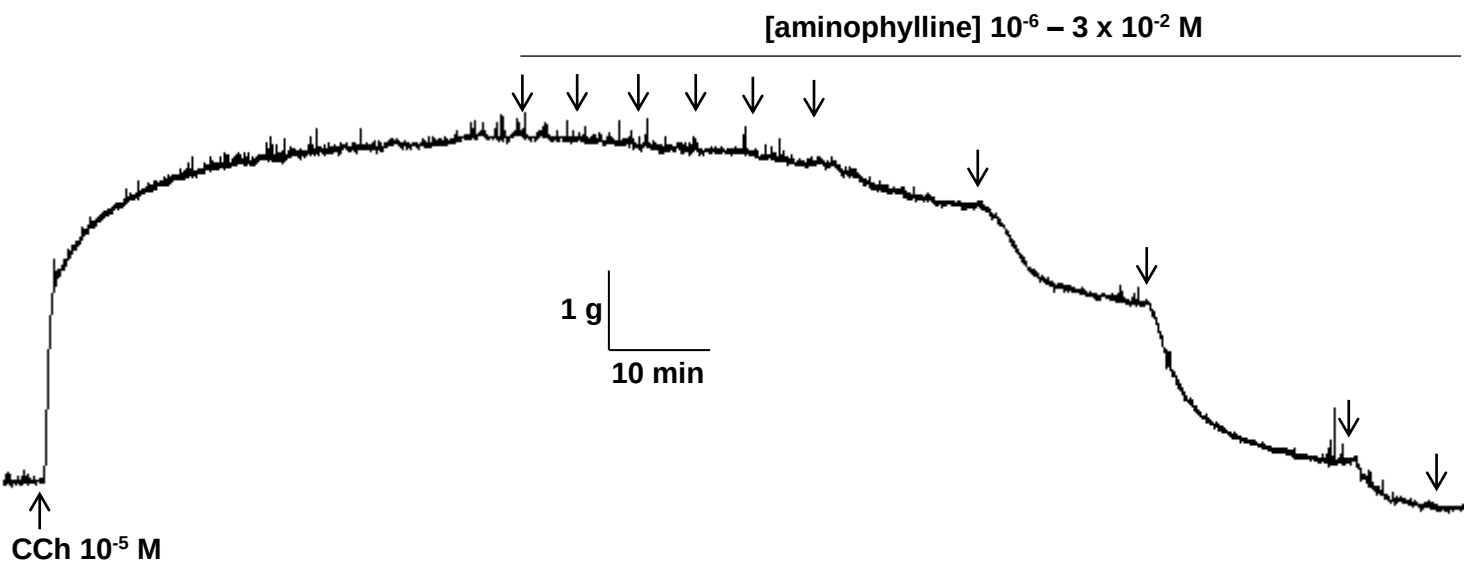
Figure S5 – Original representative recordings of relaxant reactivity to aminophylline from rat trachea of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) animals.



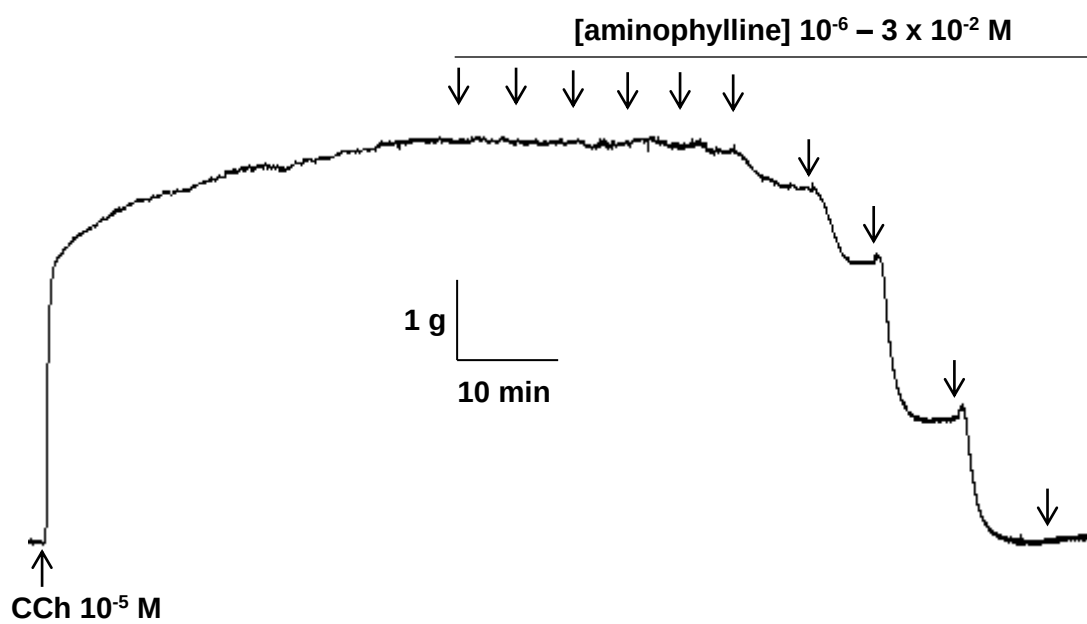
(C)



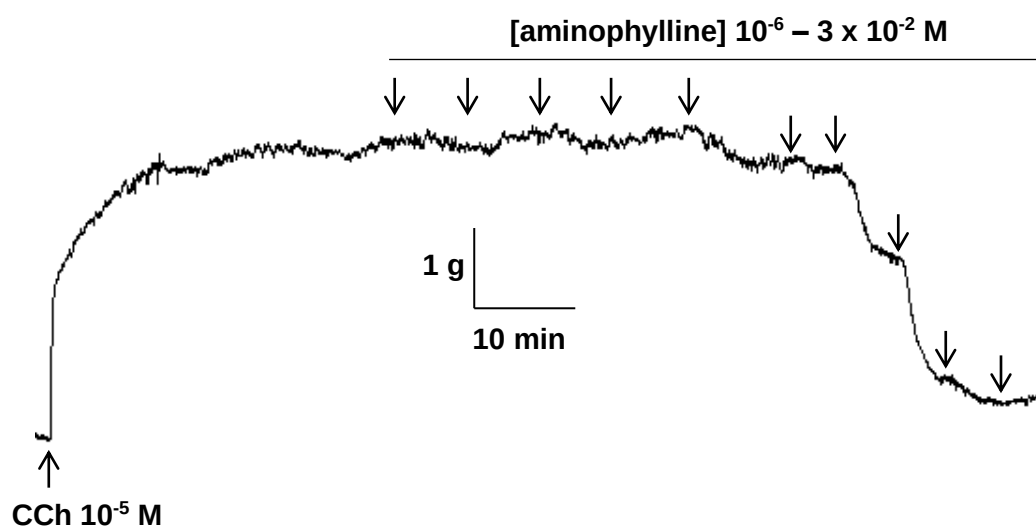
(D)



(E)



(F)



CCh: carbachol.

Table S1 - RMSD values for proteins selected in the study.

Proteins	PDB ID Binder	RMSD
β_2 -adrenergic receptor (PDB: 2RH1)	CAU – (2S)-1-(9H-Carbazol-4-iloxi)-3-(isopropilamino)propan-2-ol	0,23
H ₁ receptor (PDB: 3RZE)	5EH – Doxepina (E)	0,56
K _{ATP} (PDB: 6C3P)	ATP – Trifosfato de adenosina	0,46
AC (PDB: 4CLZ)	4DS – Ácido 4,4'-diisotiociano-2,2'-estilbenodissulfônico	0,19
sCG (PDB: 7D9S)	YC1 – [5-[1-(fenilmetil)indazol-3-il]furan-2-il]metanol	0,25
PKA (PDB: 4UJ9)	S3N – 7-[(3S,4R)-4-[4-(trifluorometil)fenil]carbonilpirrolidin-3-il]-3H-quinazolin-4-ona	0,30
PKG (PDB: 6BQ8)	6FW – 2-amino-8-[(4-clorofenil)sulfanil]-9-[(2S,4aR,6R,7R,7aS)-2,7-dihidroxi-2-oxotetrahydro-2H,4H-2lambda~5~-furo[3,2-d][1,3,2]dioxafosfinin-6-il]-3,9-di-hidro-6H-purin-6-ona	0,70
eNOS (PDB: 1M9J)	CLW – Cloroxazona	0,09
iNOS (PDB: 4NOS)	H4B – 5,6,7,8 - Tetrahidrobiopterina	0,20
COX-2 (PDB: 5IKR)	ID8 – Ácido mefenâmico	0,14
nNOS (PDB: 5VV5)	9OJ – 4-(2-[(2-amino-4-metilquinolin-7-il)metil]amino)etil)-2-metilbenzonitrila	0,38
ERK-1 (PDB: 4QTB)	38Z – (3R)-1-(2-oxo-2-{4-[4-(pirimidin-2-il)fenil]piperazin-1-il}etil)-N-[3-(piridin-4-il)-2H-indazol-5-il]pirrolidina-3-carboxamida	0,14
ERK-2 (PDB: 6RQ4)	KE8 – 6,6-dimetil-2-[2-[(2-metilpirazol-3-il)amino]pirimidin-4-il]-5-(2-morfolin-4-iletil)tieno[2,3-c]pirrol -4-ona	0,22
ROCK-1 (PDB: 2ETR)	Y27 – Y-27632	0,17
TGF- β (PDB: 6B8Y)	D0A - N-(3-fluoropiridin-4-yl)-2-[6-(trifluorometil)piridin-2-yl]-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine	0,29

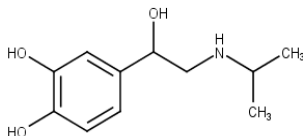
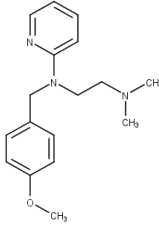
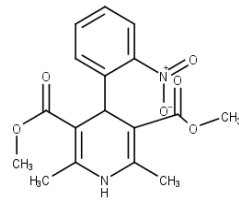
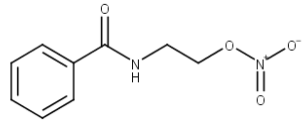
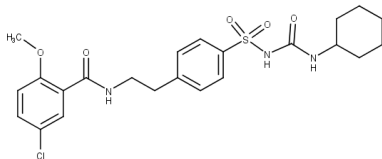
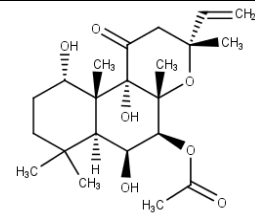
H₁ receptor: histamine receptor 1; Ca_v: voltage-dependent calcium channel; BK_{Ca}: large-conductance calcium-activated potassium channel; K_{ATP}: ATP-sensitive potassium channel; AC: adenylyl cyclase; sCG: soluble guanylyl cyclase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKG: cGMP-dependent protein kinase; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; iNOS: inducible nitric oxide synthase; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; COX-2: cyclooxygenases-2; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 or 2; ROCK-1: Rho-associated protein kinase 1; 5-LOX: lipoxygenase-5; TGF- β : transforming growth factor beta receptor.

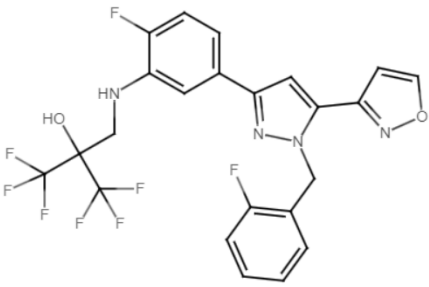
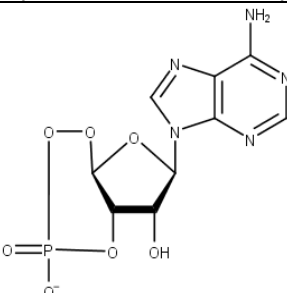
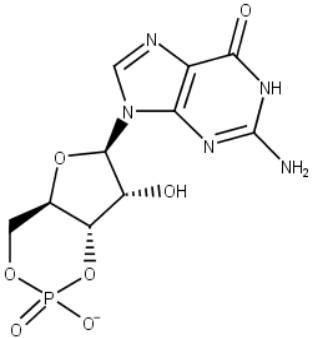
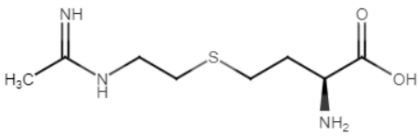
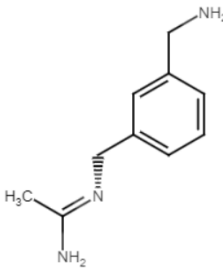
Table S2 - Binding energy values (kJ/mol) analyzed in the proteins selected in the study. The best scores in relation to the positive control are highlighted in bold.

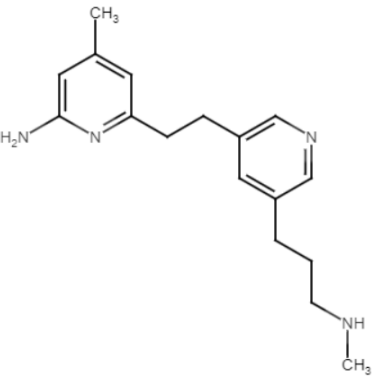
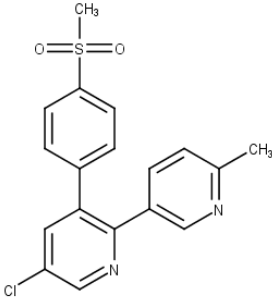
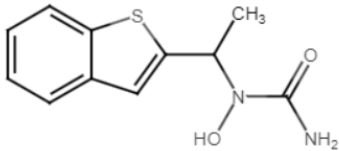
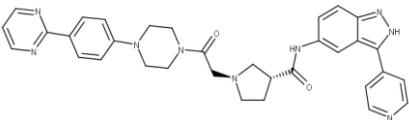
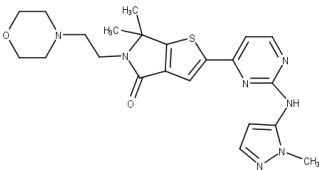
Proteins	Lauric acid		Positive control	
	Moldockscore	Rerankscore	Moldockscore	Rerankscore
β_2-adrenergic receptor (PDB: 2RH1)	-98.8103	-84.1847	-83.772	-67.412
H ₁ receptor (PDB: 3RZE)	-112.517	-87.3363	-141.782	-104.695
Ca_v (PDB: 3G43)	-83.2615	-60.699	-73.8608	12.9409
BK_{Ca} (PDB: 3AF)	-112.247	-93.4303	-103.044	-78.6007
K _{ATP} (PDB: 6C3P)	-92.7847	-73.4965	-130.484	-22.5303
AC (PDB: 4CLZ)	-67.0243	-54.6923	-40.7844	-35.1598
sCG (PDB: 7D9S)	-86.1641	-72.5884	-148.771	-77.6362
PKA (PDB: 4UJ9)	-105.561	-84.7153	-121.77	-97.8553
PKG (PDB: 6BQ8)	-104.44	-85.5268	-120.89	-37.4022
eNOS (PDB: 1M9J)	-95.2229	-78.9643	-79.1829	-64.7938
iNOS (PDB: 4NOS)	-98.2345	-83.3349	-87.3824	-74.6874
nNOS (PDB: 5VV5)	-48.2912	-39.512	-58.2198	-47.108
COX-2 (PDB: 5IKR)	-97.5696	-81.663	-101.049	45.5035
ERK-1 (PDB: 4QTB)	-96.5065	-78.8602	-220.281	-192.848
ERK-2 (PDB: 6RQ4)	-66.1648	-53.8009	-153.659	-125.458
ROCK-1 (PDB: 2ETR)	-74.9619	-63.9444	-77.4056	-74.2477
LOX-5 (PDB: 3O8Y)	-102.922	-83.7358	-108.331	-84.5529
TGF- β R1 (PDB: 6B8Y)	-102.555	-84.7495	-135.327	-104.73

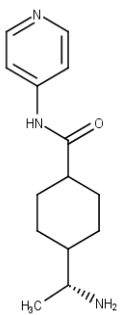
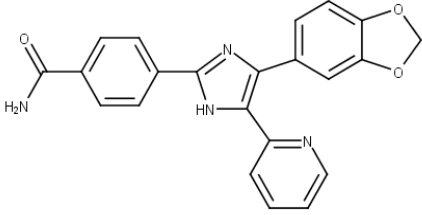
H₁ receptor: histamine receptor 1; Ca_v: voltage-dependent calcium channel; BK_{Ca}: large-conductance calcium-activated potassium channel; K_{ATP}: ATP-sensitive potassium channel; AC: adenylyl cyclase; sCG: soluble guanylyl cyclase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKG: cGMP-dependent protein kinase; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; iNOS: inducible nitric oxide synthase; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; COX-2: cyclooxygenase-2; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 or 2; ROCK-1: Rho-associated protein kinase 1; 5-LOX: lipoxigenase-5; TGF- β R1: transforming growth factor beta receptor type 1.

Table S3 - Information on proteins selected in the study.

Proteins	PDB ID	Positive Control	Resolution
β_2 -adrenergic receptor	2RH1 (Cherezov et al., 2007)	 Isoprenaline (Yang et al., 2021)	2.40 Å
H ₁ receptor	3RZE (Shimamura et al., 2011)	 Pyrilamine (Levin et al., 2011)	3.10 Å
Cav	3G43 (Fallon et al., 2009)	 Nifedipine (Spadeto; Freitas; Comanich, 2021),	2.10 Å
BK _{Ca}	3NAF (Wu et al., 2010)	 Nicorandil (Evlakhov; Poyasov; Berezina, 2021)	3.10 Å
K _{ATP}	6C3P (Lee, Chen Mackinnon, 2017)	 Glibenclamide (Scala et al., 2020)	5.60 Å
AC	4CLZ (Kleinboelting et al., 2014)	 Forskolin (Bhatia et al., 2023)	1.90 Å

sCG	7D9S (Liu; Kang; Chen, 2021)	 Cinaciguat (Hanrahan et al., 2020)	3.90 Å
PKA	4UJ9 (Lauber et al., 2016)	 cAMP (Zhang et al., 2020)	1.87 Å
PKG	6BQ8 (Gerlits et al., 2018)	 cGMP (Kim et al., 2021)	2.00 Å
eNOS	1M9J (Rosenfeld et al., 2002)	 GW-274150 (Chatterjee et al., 2003)	2.43 Å
iNOS	4NOS (Fischmann et al., 1999)	 1400-W (Jafarian-Therani, 2005)	2.25 Å

nNOS	5VV5 (Pensa et al., 2017)	 4-methyl-6-(2-{5-[3-(methylamino)propyl]pyridin-3-yl}ethyl)pyridin-2-amine (Wang et al., 2016)	2.15 Å
COX-2	5IKR (Orlando; Malkovisk, 2016)	 Etoricoxib (Akif et al, 2023)	2.34 Å
LOX-5	3O8Y (Gilbert et al., 2011)	 Zileuton (Rossi et al., 2010)	2.39 Å
ERK-1	4QTB (Chaikuad et al., 2014)	 (3R)-1-(2-oxo-2-{4-[4-(pyrimidin-2-yl)phenyl]piperazin-1-yl}ethyl)-N-[3-(pyridin-4-yl)-2H-indazol-5-yl]pyrrolidine-3-carboxamide (Chaikuad et al., 2014)	1.40 Å
ERK-2	6RQ4 (Kidger et al, 2020)	 6,6-dimethyl-2-[2-[(2-methylpyrazol-3-yl)amino]pyrimidin-4-yl]-5-(2-morpholin-4-ylethyl)thieno[2,3-c]pyrrol-4-one (Kidger et al, 2020)	1.96 Å

ROCK-1	2ETR (Jacobs et al., 2006)	 Y-27632 (Jacobs et al., 2006)	2.60 Å
TGF-βR1	6B8Y (Harikrishnan et al., 2018)	 SB-431542 (Lee et al., 2021)	1.65 Å

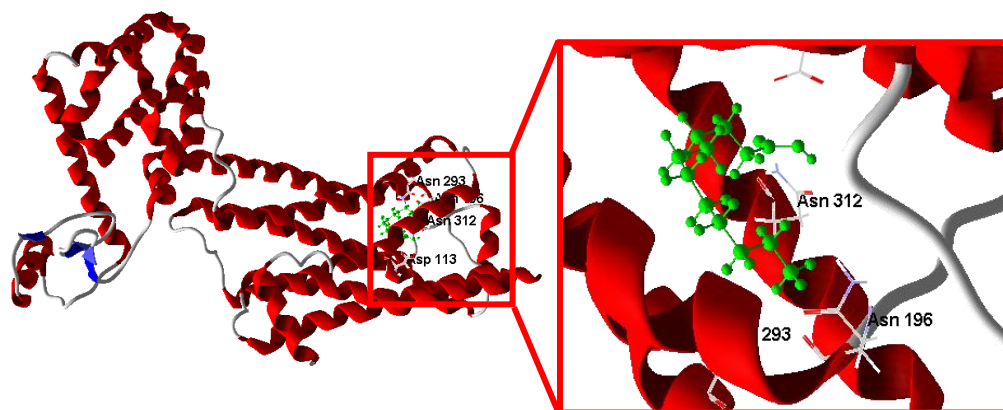
H₁ receptor: histamine receptor 1; Ca_v: voltage-dependent calcium channel; BK_{Ca}: large-conductance calcium-activated potassium channel; K_{ATP}: ATP-sensitive potassium channel; AC: adenylyl cyclase; sCG: soluble guanylyl cyclase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKG: cGMP-dependent protein kinase; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; iNOS: inducible nitric oxide synthase; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; COX-2: cyclooxygenases-2; ERK1/2: extracellular signal-regulated kinases 1 or 2; ROCK-1: Rho-associated protein kinase 1; 5-LOX: lipoxygenase-5; TGF-βR1: transforming growth factor beta type 1.

Table S4 - Behavioral screening of lauric acid at a dose of 100 mg/kg (p.o.) (Adapted from Almeida et al., 1999).

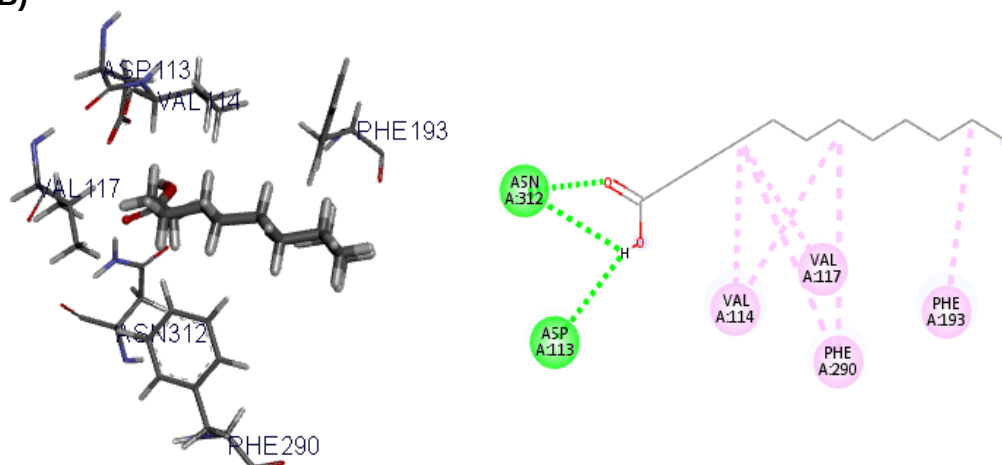
CNS (Central Nervous System) - Stimulant:	Until 30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Aggressiveness					
Increased ambulation					
Circling					
Self-grooming					
Yawning					
Abdominal writhing					
Convulsions					
Climbing					
Stereotypy					
Irritability					
Standing up					
Intense vibrissae movement					
Pedaling					
Head shaking					
Jumping					
Tremors					
Vocalization					
CNS - Depressant:	Until 30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Hind limb abduction					
Decreased ambulation					
Analgesia					
Anesthesia					
Ataxia					
Catatonia					
Straub tail					
Hypnosis					
Loss of auricular reflex					
Loss of corneal reflex					
Eyelid ptosis					
Righting reflex					
Decreased touch response					
Sedation					
ANS (Autonomic Nervous System):	Until 30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
Cyanosis					
Constipation					
Defecation					
Diarrhea					
Grip strength					
Lacrimation (tearing)					
Urination					
Piloerection (hair standing on end)					
Respiration					
Salivation					
Muscle tone					
DEATH					

Figure S6 - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with the β_2 -adrenergic receptor (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and isoprenaline (C) with the receptor amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Asn = asparagine; Asp = aspartic acid; Phe = phenylalanine; Ser = serine; Val = valine.

(A)



(B)



(C)

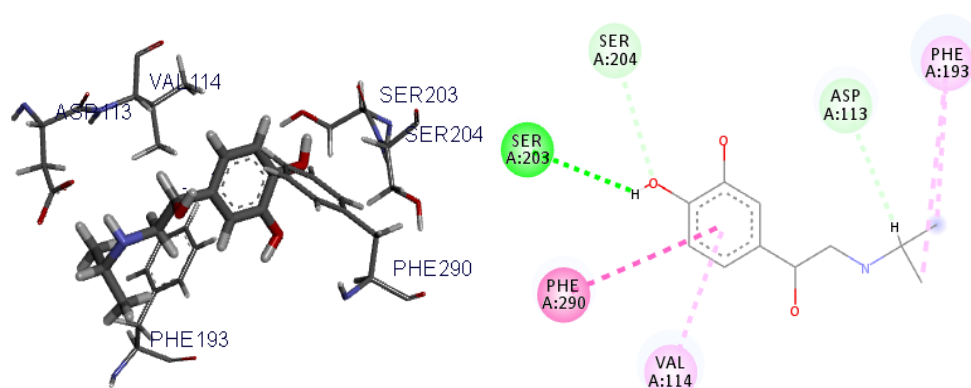
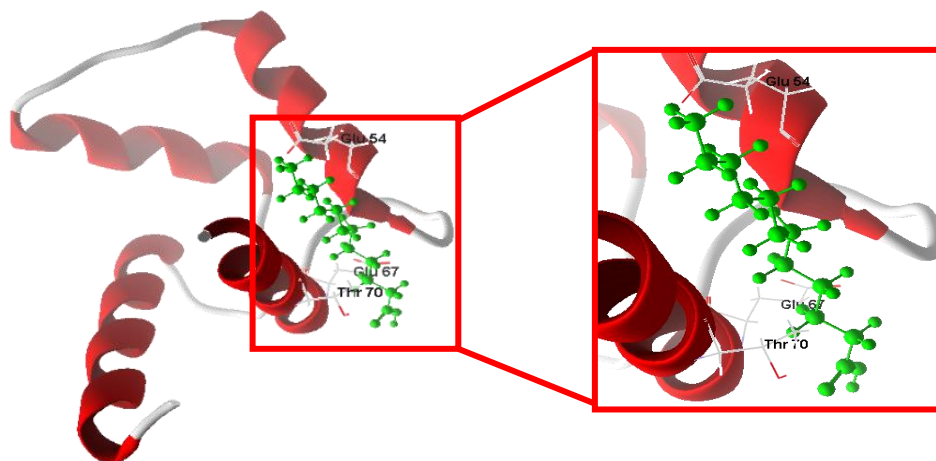
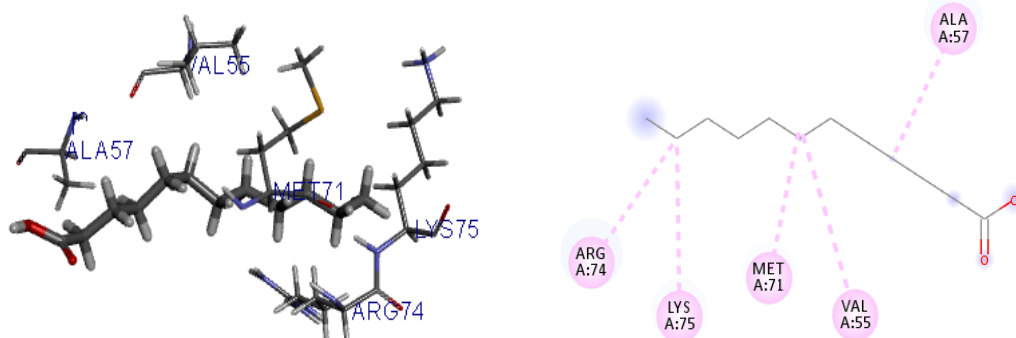


Figure S7 - 3D interactions of lauric acid (green) under binding domain conditions with Cav (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and nifedipine (C) with Cav amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (red dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Ala = alanine; Arg = arginine; Glu = glutamic acid; Met = methionine; Val = valine.

(A)



(B)



(C)

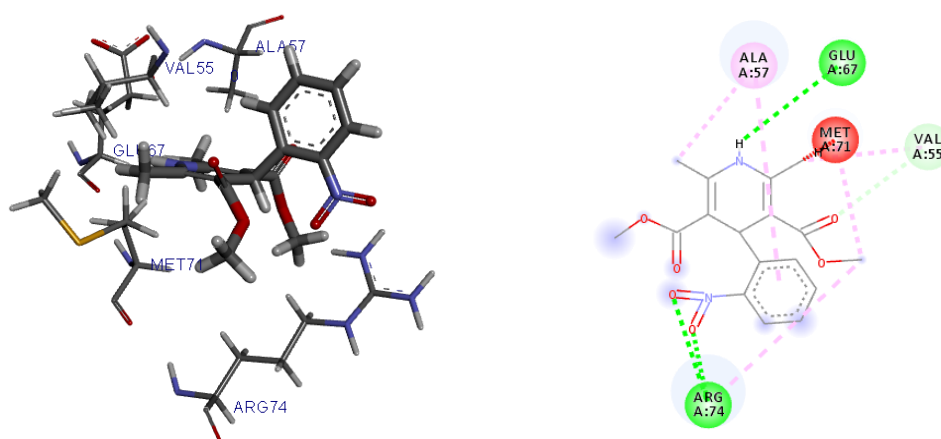
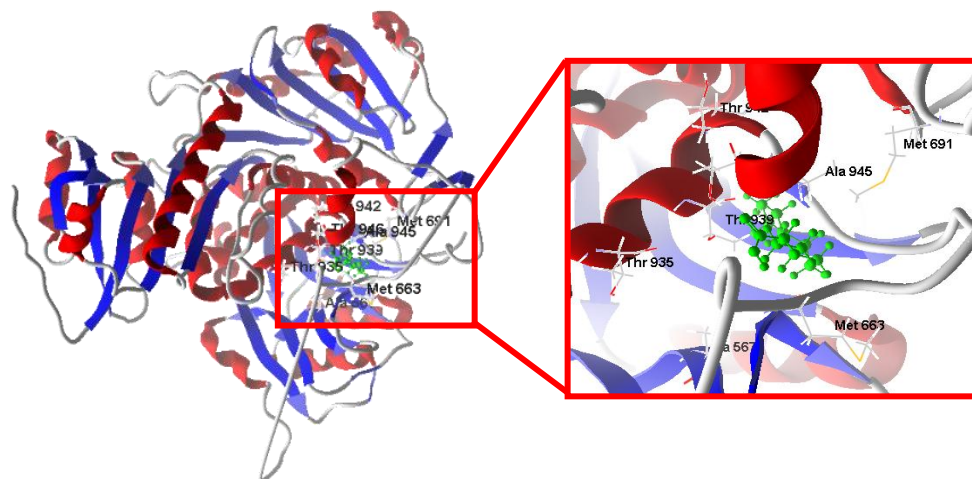
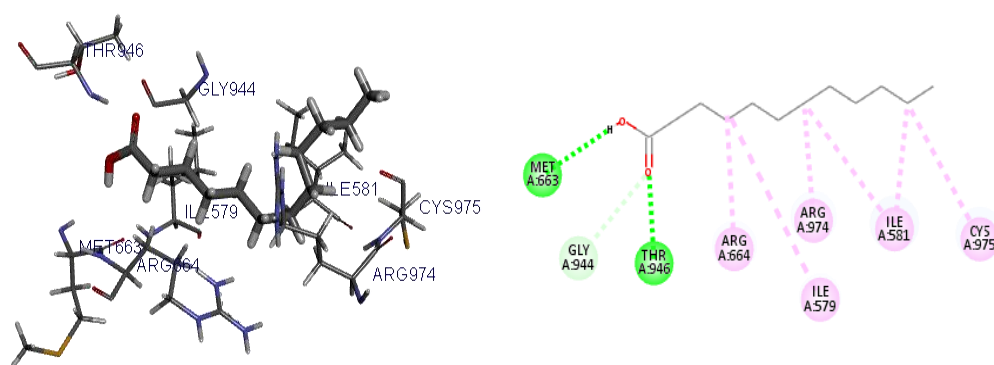


Figure S8 - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with BK_{Ca} (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and nicorandil (C) with BK_{Ca} amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (red dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Asn = asparagine; Cys = cysteine; Gly = glycine; Gln = glutamine; Met = methionine; Ser = serine; Thr = threonine; Trp = tryptophan; Val = valine.

(A)



(B)



(C)

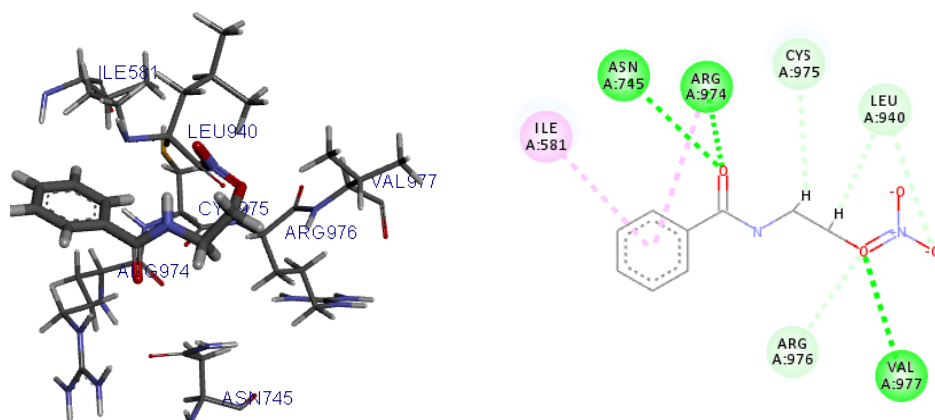


Figure S9 - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with K_{ATP} (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and glibenclamide (C) with K_{ATP} amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (red dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Asn = asparagine; Gly = glycine; Gln = glutamine; Met = methionine; Ser = serine; Trp = tryptophan; Val = valine.

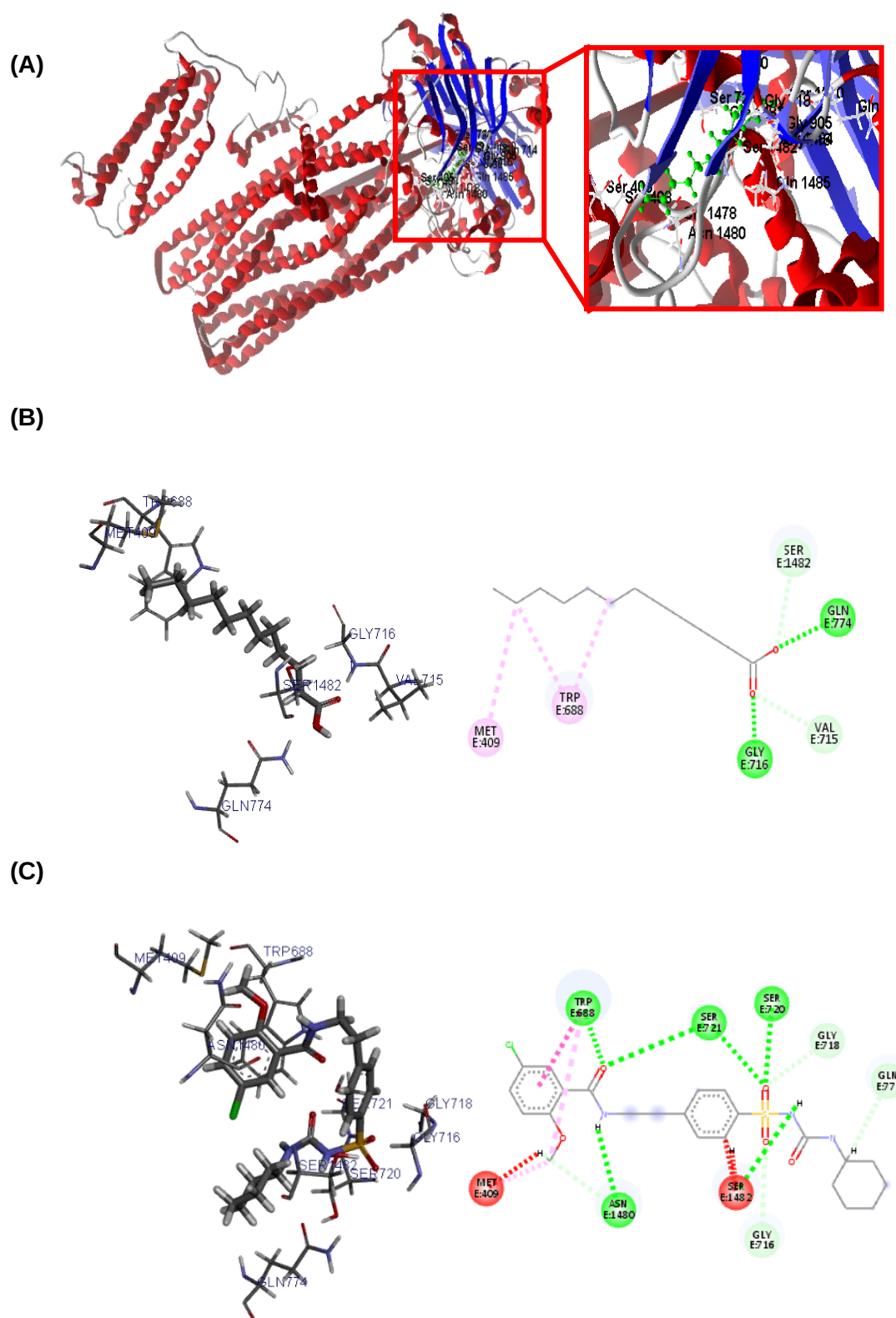
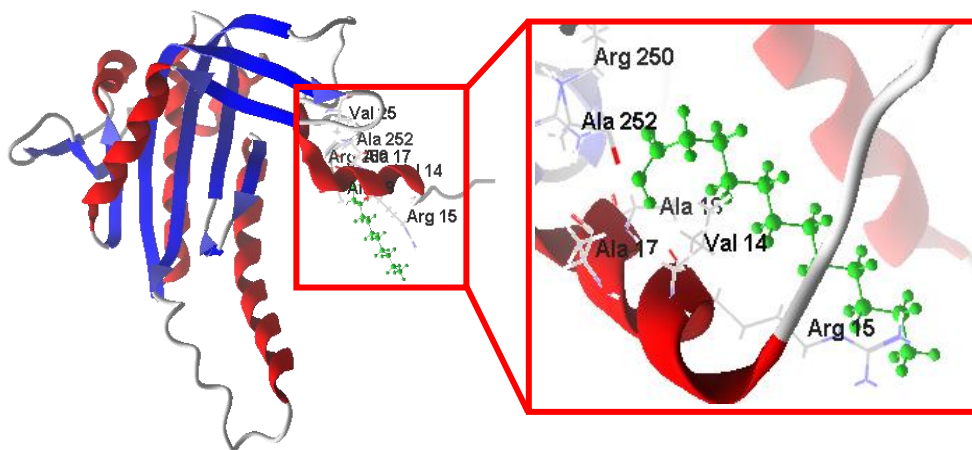
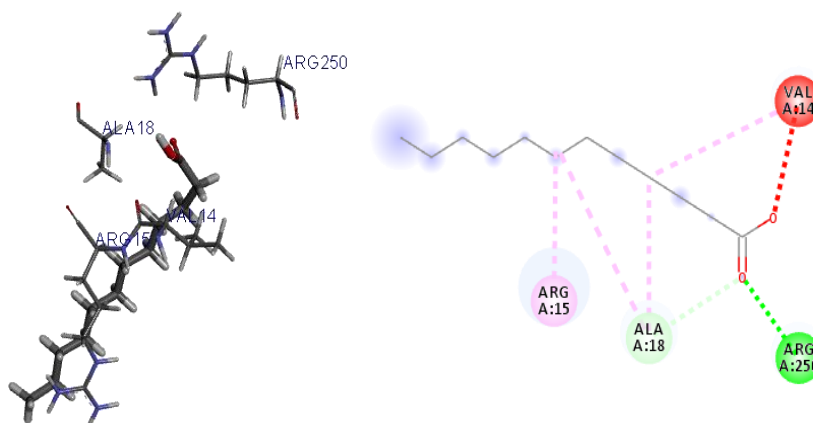


Figure S10 - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with adenylyl cyclase (**A**) and binding maps representing the interactions between lauric acid (**B**) and forskolin (**C**) with amino acid residues of adenylyl cyclase. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (red dotted lines); hydrogen bonds (blue dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Ala = alanine; Arg = arginine; Asp = aspartic acid; Phe = phenylalanine; Val = valine.

(A)



(B)



(C)

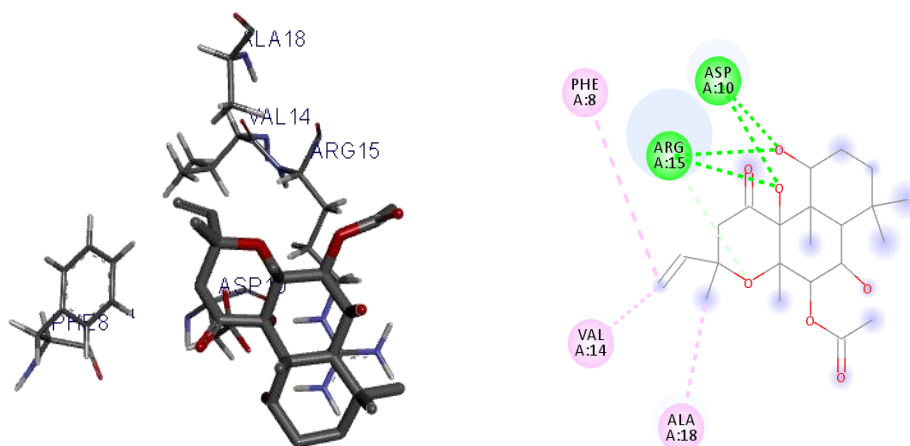
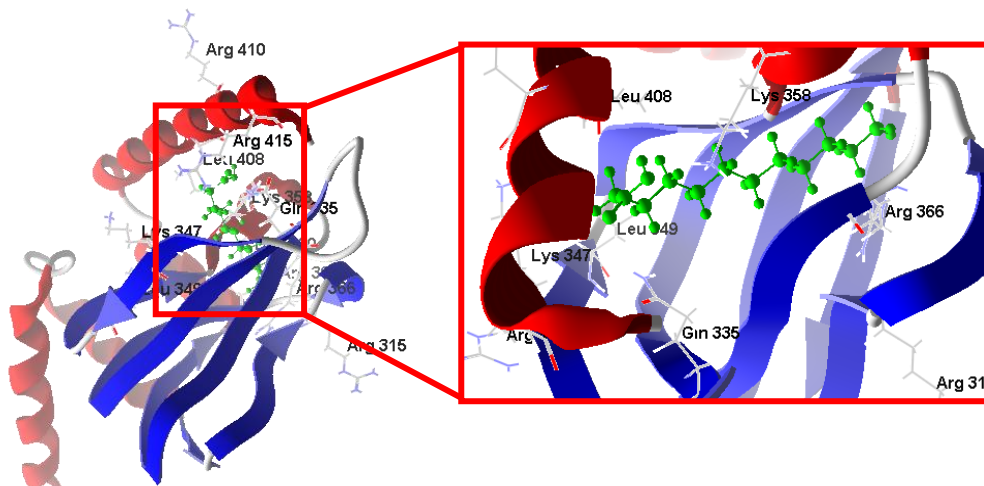
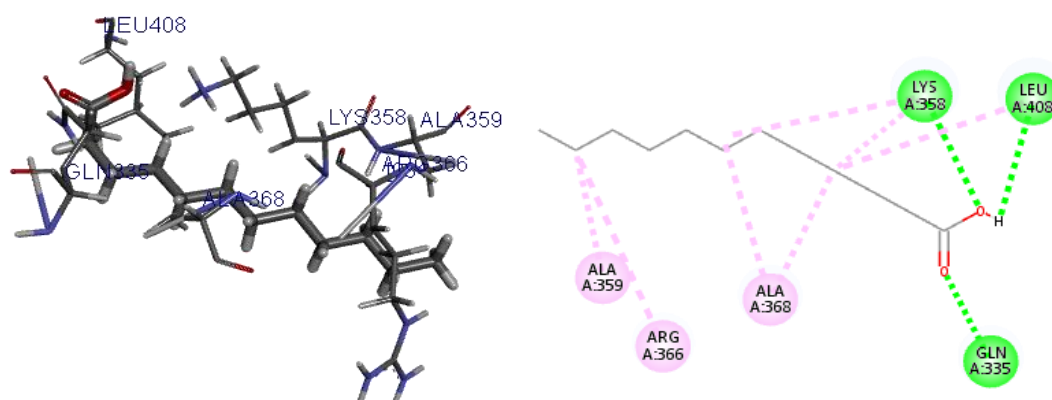


Figure S11 – 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with PKG (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and cGMP (C) with PKG amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (red dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Ala = alanine; Arg = arginine; Asp = aspartate; Gln = glutamine; Gly = glycine; Leu = leucine; Lys = lysine; Ser = serine; Val = valine.

(A)



(B)



(C)

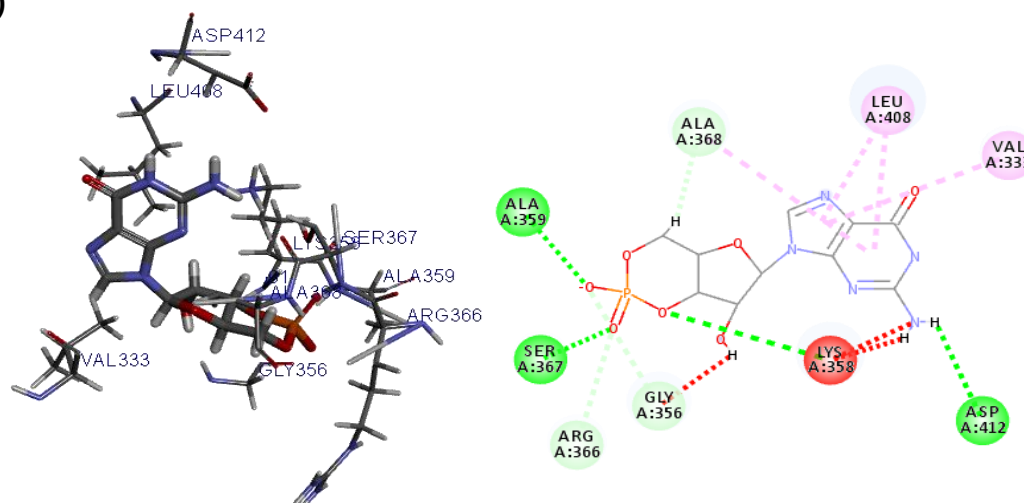
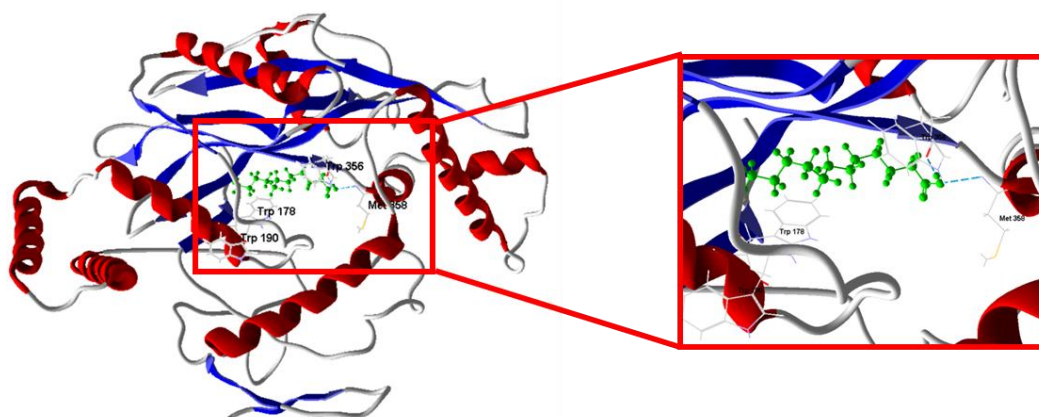
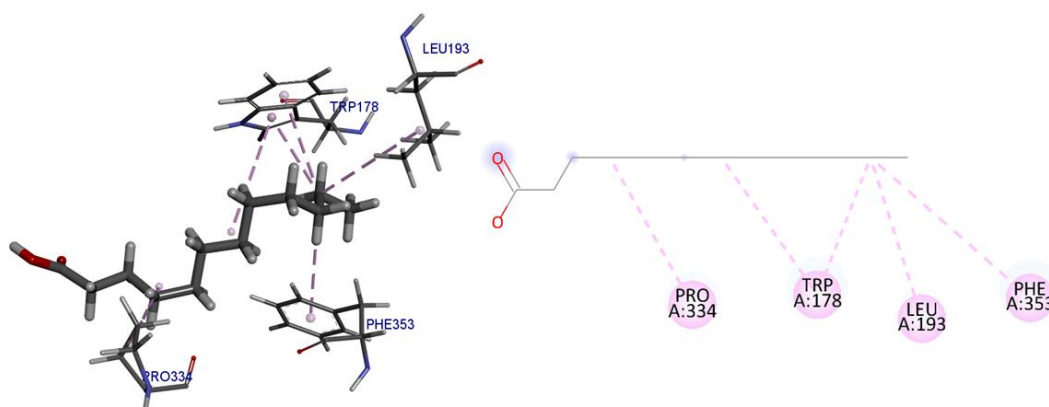


Figure S12 - 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with eNOS (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and GW-274150 (C) with eNOS amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); steric interactions (orange dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Phe = phenylalanine; Pro = proline; Trp = Tryptophan; Leu = Leucine; Phe = phenylalanine.

(A)



(B)



(C)

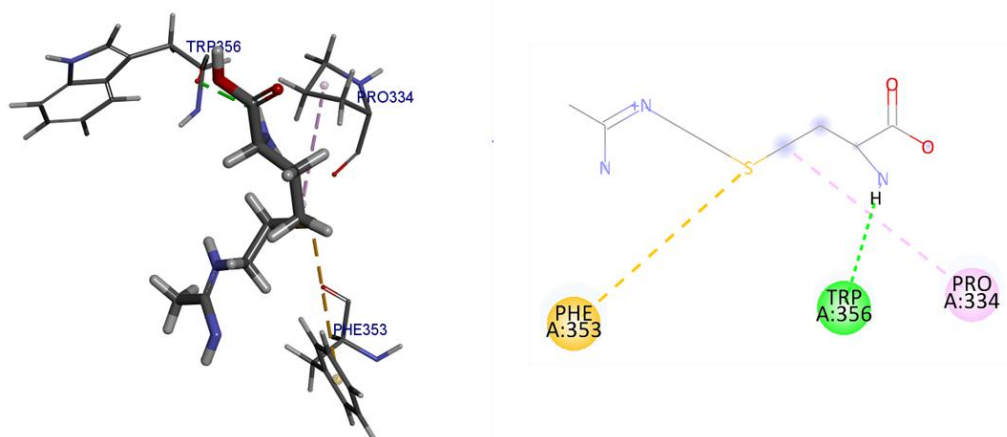
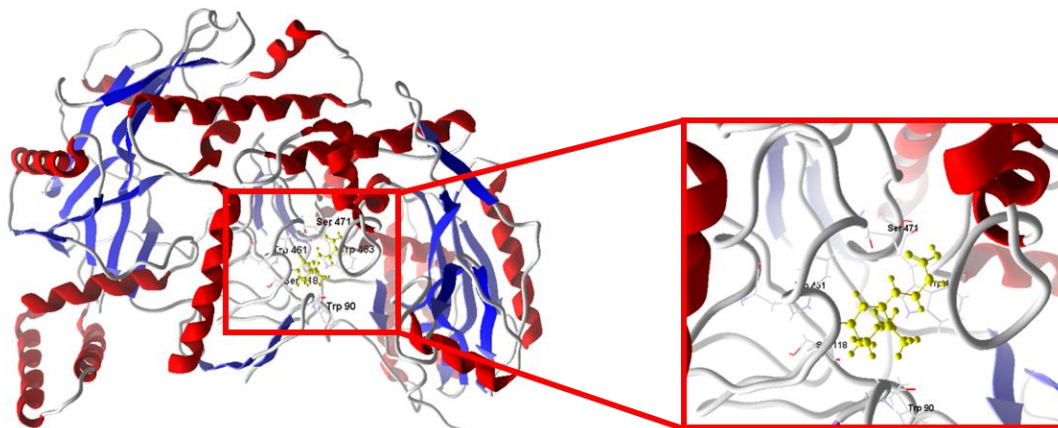
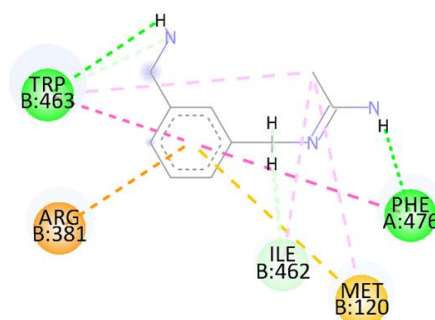
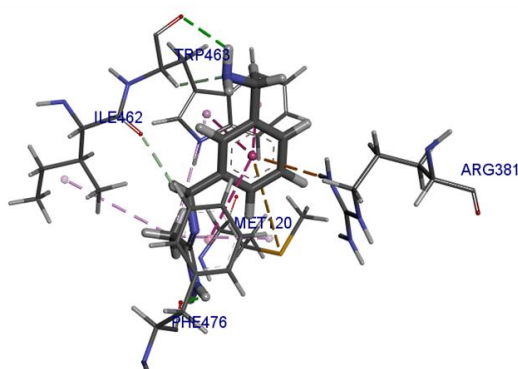


Figure S13 – 3D interactions of lauric acid (green) under domain-binding conditions with iNOS (A) and binding maps representing the interactions between lauric acid (B) and 1400-W (C) with iNOS amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (orange dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Arg = arginine; Ile = isoleucine; Met = methionine; Trp = tryptophan; Phe = phenylalanine.

(A)



(B)



(C)

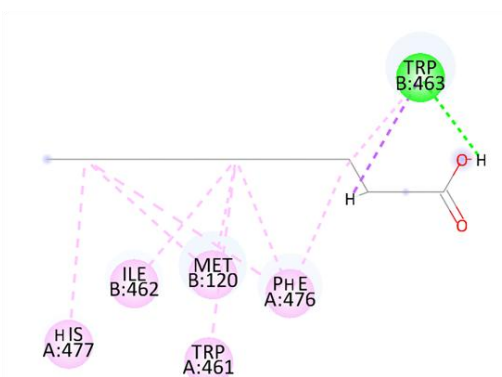
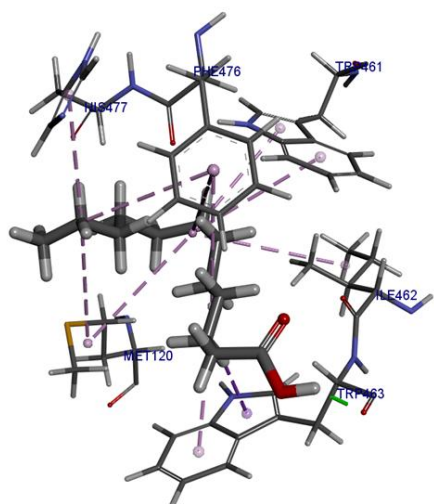
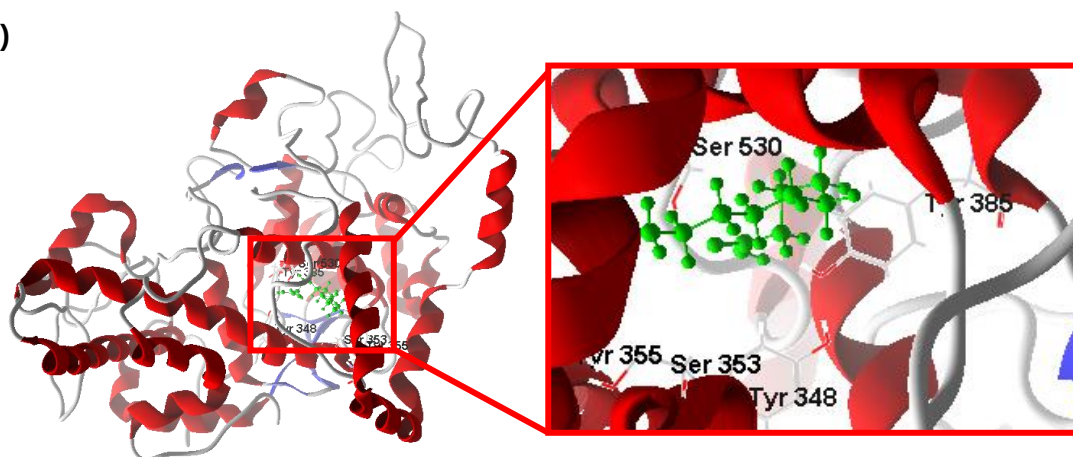
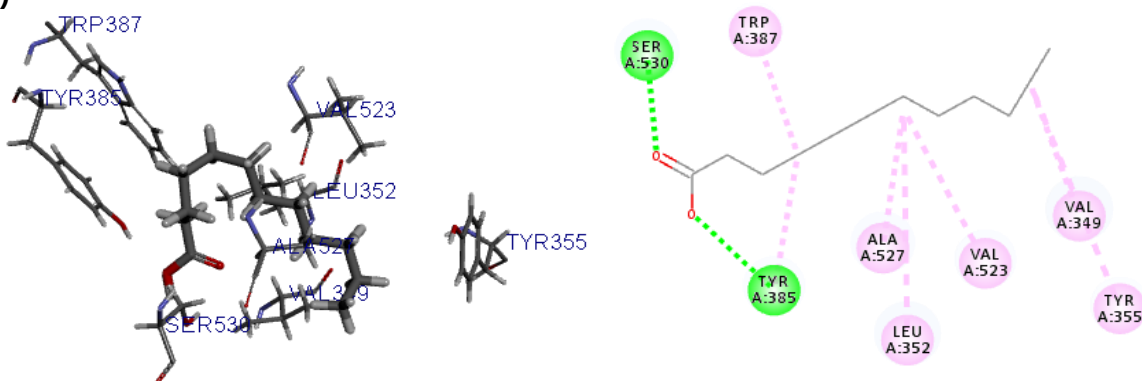
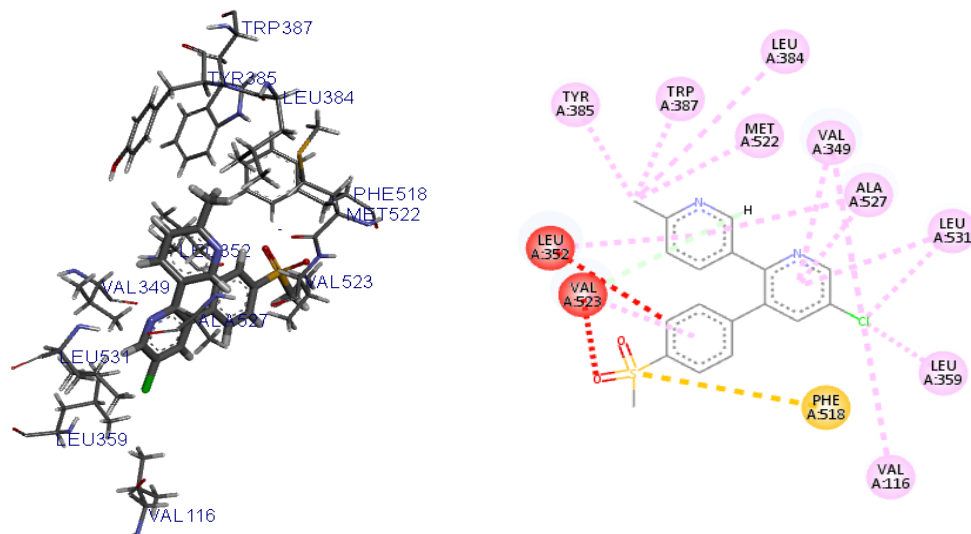


Figure S14 – 3D interactions of lauric acid (green) under binding domain conditions with COX-2 **(A)** and binding maps representing the interactions between lauric acid **(B)** and etoricoxib **(C)** with COX-2 amino acid residues. Hydrophobic interactions (pink dotted lines); steric interactions (red and orange dotted lines); hydrogen bonds (green dotted lines); oxygen atoms (red); amino acid residues: Ala = alanine; Leu = leucine; Met = methionine; Phe = phenylalanine; Ser = serine; Trp = tryptophan; Tyr = tyrosine; Val = valine.

(A)**(B)****(C)**

5.2 Artigo 2

DADOS NÃO PUBLICADOS**Lauric acid modulates the cyclooxygenases and nitric oxide pathways and reduces oxidative stress in preventing tracheal hyperresponsiveness in asthmatic Wistar rats**

Indyra Alencar Duarte Figueiredo^{a,b*}, Alissa Maria de Oliveira Martins^{a,b}, Alexya Mikelle Teixeira Cavalcanti^a, Jayne Muniz Fernandes^a, Ludmila Emilly da Silva Gomes^a, Gabriel Nunes Machado de Oliveira^{a,b}, Lucas Nóbrega de Oliveira^{a,b}, Isabela Motta Felício^{a,b}, Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio^c, Luiz Henrique César Vasconcelos^{a,b,d*} and Fabiana de Andrade Cavalcante^{a,b,d}

^a Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^c Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^d Departamento de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil.

***CORRESPONDENTE**

Luiz Henrique César Vasconcelos

Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa/PB, Zip Code 58.051 970, Brazil.

E-mail: lhcv@academico.ufpb.br

Abstract

Lauric acid, or dodecanoic acid, a medium-chain fatty acid, prevents alterations in pulmonary ventilation and tracheal hyper-responsiveness in Wistar rats with allergic asthma induced by ovalbumin (OVA). Therefore, the aim was to evaluate the mechanism of action of LA in its preventive effect on changes caused by asthma. Rats were randomly divided into the control group (CG), asthmatic group (AG), and asthmatic lauric acid 25 mg/kg group (ALA25G). AG and ALA25G were sensitized and challenged with OVA. For the experimental protocols, after euthanasia, the trachea and lungs were isolated. A reduction in the contractile reactivity to CCh was observed

DADOS NÃO PUBLICADOS

in the asthmatic group in the presence of indomethacin, zileuton, L-NAME, apocynin, and tempol, inhibitors of COX, 5-LOX, NOS, NADPH oxidase, and a mimetic of SOD, respectively. In the ALA25G, the contractile reactivity was reduced in the presence of indomethacin, L-NAME, and apocynin. Furthermore, an increase in lipid peroxidation (MDA) and nitrite levels, and a reduction in of reduced glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activity were observed in the pulmonary homogenate of the AG. Treatment with lauric acid at a dose of 25 mg/kg prevented all of these alterations, except for the reduction in GSH levels. In conclusion, LA reduces tracheal hyper-responsiveness in Wistar rats with allergic asthma by negatively modulating both the COX and NO pathways and oxidative stress imbalance.

Keywords: dodecanoic acid; ovalbumin; pulmonary homogenate; oxidative stress.

1. Introduction

Asthma is a chronic inflammatory airway disease characterized by the combined action of innate and adaptive immune system cells. This leads to hyperresponsiveness, increased mucus production, tissue remodeling, and narrowing of the airway lumen (Hammad; Lambrecht, 2021). It affects more than 300 million individuals worldwide, with prevalence rates ranging from 1% to 29% of the population across different countries (Gina, 2024).

Nitric oxide (NO^{*}) has been well described in the literature as an important signaling molecule involved in the pathogenesis of asthma. NO^{*} is generated from L-arginine through the catalytic activity of nitric oxide synthase (NOS) isoenzymes in the presence of various cofactors. Three distinct NOS isoforms are expressed in the lung (Kobzik et al., 1993): neuronal (nNOS or NOS1), inducible (iNOS or NOS2), and endothelial (eNOS or NOS3) (Van Den Berg; Meurs; Gosens, 2018).

Other mediators that play an important role in airway homeostasis and pathophysiological processes such as asthma are eicosanoids, which include both contractile and relaxing factors of smooth muscle. They originate from oxidation of arachidonic acid (AA), which is esterified in phospholipids within the cell membrane and released by the action of phospholipase A₂ (Zhang et al., 2023). Free fatty acids are metabolized by the cyclooxygenase (COX) pathway, generating prostanoids, and the lipoxygenase (LOX) pathway, producing leukotrienes (LTs) (Martin; Brash; Murphy, 2016).

DADOS NÃO PUBLICADOS

Associated with the inflammatory component, asthma is characterized by an increase in oxidative stress, defined as an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) and the biological system's ability to detoxify reactive intermediates or repair damage caused by oxidative radicals (Rahal et al., 2014). Reactive species normally function in physiological cellular processes, but at high concentrations, they can damage cellular structures such as carbohydrates, nucleic acids, lipids, and proteins, altering their functions. Under pathological conditions, antioxidant systems may become overwhelmed, leading to an oxidative stress imbalance (Sahiner et al., 2018).

Lauric acid (LA), or dodecanoic acid, is a medium-chain saturated fatty acid and the major component of virgin coconut oil, which, in turn, has already shown a preventive effect on changes induced by asthma in animals (Dayrit, 2015; Eyres et al., 2016; Vasconcelos et al., 2020). LA exhibits antihypertensive and vasorelaxant activity in both normotensive and hypertensive rats (Alves et al., 2017), prevents the reduction of cavernous body relaxation in diabetic rats (Olubiyi et al., 2022), reduces inflammation and structural pulmonary changes (Dubo et al., 2019), and mitigates oxidative stress in the lungs of rats with type 2 diabetes mellitus (Augustine et al., 2022). Additionally, LA administered as a single oral dose of 2000 mg/kg did not exhibit acute toxicity in Sprague Dawley rats (Khan et al., 2020) nor chronic toxicity in albino rats when included in the diet at 10% (Fitzhugh; Schouboe; Nelson, 1960).

In a previous study carried out by our research group, it was evidenced that LA, administered at a dose of 100 mg/kg/day for 28 days, showed low toxicity, considering the absence of mortality and significant changes related to food and water consumption, organ weight, and hematological and biochemical parameters. It was also shown that LA, at different doses, prevented tracheal hyper-responsiveness induced by carbachol (CCh) and alterations in pulmonary ventilation in Wistar asthmatic rats. Furthermore, among the possible molecular targets of LA's action identified through *in silico* studies, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase were highlighted, among other proteins (Figueiredo et al., 2025).

Based on this, the objectives of this study were to confirm these potential interaction targets of LA, highlighting its mechanism of action *in vitro*, and to evaluate LA's role in the oxidative stress imbalance for the prevention of tracheal hyper-responsiveness in Wistar asthmatic rats.

2. Methods

2.1 Animals

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 250 and 300 g, at 6 to 8 weeks of age, sourced from Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) and kept at the Animal Production Unit (UPA) of the Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) at the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), were used. Animals were kept under controlled temperature conditions (22 ± 1 °C) and a 12 h light-dark cycle with free access to food and water. Experimental procedures were conducted following the principles of the guidelines for the ethical use of animals in applied etiology studies (Sherwin *et al.*, 2003) and the Brazilian Guide for the Production, Maintenance, or Use of Animals in Educational or Scientific Research Activities by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) (Brasil, 2016). Experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UFPB (n° 9310040522).

2.2 Materials

2.2.1 Chemicals

Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate (MgSO_4), potassium phosphate (KH_2PO_4), calcium chloride (CaCl_2), glucose, sodium bicarbonate (NaHCO_3), hydrochloric acid (HCl), and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Êxodo Científica (Sumaré, Brazil).

Lauric acid, aluminum hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$), ovalbumin (OVA) (grade II and V), carbamylcholine hydrochloride (CCh), apocynin, N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), indomethacin, tempol, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, sulfanilamide, N-(1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride, phosphoric acid, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), phosphate buffer, hydrochloric acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), L-methionine, n-butanol, nitroblue tetrazolium and riboflavin were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo-SP, Brazil).

Zileuton was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, United States). Tween® 80 was obtained from Fischer BioReagents. Ketamine and xylazine were purchased from Syntec (Barueri, São Paulo, Brazil). The carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂) was purchased from White Martins (Brazil).

DADOS NÃO PUBLICADOS**2.2.2 Equipment**

To record isometric contractions, the organs were suspended in isolated organ baths (6 mL), model BOI-04, and connected to isometric force transducers, model TIM 05, coupled to an amplifier model AECAD04F. This, in turn, was connected to a digital acquisition system with AQCAD software version 2.5.0 for data acquisition and ANCAD for analysis. The system contained a thermostatic pump model BT 60 that controlled the temperature of the tanks. All equipment was purchased from AVS Projetos (São Paulo, Brazil).

A refrigerated microcentrifuge, model LIF500R (LabinFarma Scientific, Piracicaba-SP, Brazil), was used to centrifuge the samples. Absorbance measurements were performed using a microplate reader, model MR9600 (Accuris Instruments, New Jersey, USA).

2.3 Experimental groups

Rats were randomly divided into 5 experimental groups, with 5 male rats each: control group (CG) = not sensitized and treated with NaCl 0.9% + Tween[®] 80; asthmatic group (AG) = sensitized with OVA and treated with NaCl 0.9% + Tween[®] 80; and asthmatic lauric acid 25 mg/kg group (ALA25G) = sensitized with OVA and treated with 25 mg/kg of lauric acid + Tween[®] 80.

The dose of lauric acid chosen for this study was based on results obtained previously (Figueiredo et al., 2025).

2.4 Asthma induction

For the sensitization protocol, on days 1–3 of the experiment, the animals received intraperitoneal (i.p.) injections of 1 mg/kg/day of ovalbumin (OVA) (grade V) solubilized in sterile NaCl 0.9% using 100 mg/mL of aluminum hydroxide (Al(OH)₃) as an adjuvant. On days 6, 9, 12, 15, 18, and 21, the animals were individually placed in a closed polyacrylic chamber connected to an ultrasonic nebulizer. They were then challenged with 1% OVA (grade II) for up to 20 minutes daily. Non-sensitized animals underwent the same process but were administered only sterile NaCl 0.9% for both the i.p. injections and nebulizations.

All the animals were euthanized 24 hours after the last challenge with OVA or NaCl 0.9% (day 22). Throughout the asthma induction, the asthmatic group animals received daily doses of lauric acid intragastrically. The animals in the CG received

DADOS NÃO PUBLICADOS

NaCl 0.9% via the same route (Salmon et al., 1999; adapted de Galvão et al., 2017; Figueiredo et al., 2025).

2.5 Obtaining tracheal rings

Animals were euthanized with ketamine (180 mg/kg, i.p.) and xylazine (30 mg/kg, i.p.), followed by exsanguination. Trachea was then isolated, dissected, and cut into fragments containing 3 to 4 cartilaginous rings. These segments were individually suspended in an isolated organ bath (6 mL), containing Krebs nutrient solution with the following composition in mM: NaCl (118.0), KCl (4.5), MgSO₄ (5.7), KH₂PO₄ (1.1), CaCl₂ (2.5), glucose (11.0), and NaHCO₃ (25.0), and adjusted to pH 7.4 (with a solution of HCl or NaOH, 1 N). Preparations were kept at a temperature of 37 °C, aerated with carbogen, under tension of 1 g, and allowed to rest for 60 minutes, with the Krebs solution being changed every 15 minutes to avoid the influence of metabolites released by the organ into the medium.

2.6 Investigation of the mechanism of action involved in the changes induced by asthma and lauric acid on the contractile reactivity of rat trachea

Trachea was set up as described previously. After the 60-minute stabilization period, when the baseline remained constant, a control cumulative concentration-response curve to CCh was obtained. After 30 minutes, the trachea was pre-incubated with indomethacin 10⁻⁵ M, a COX inhibitor (Hua; Back; Tam, 1996; Sousa et al., 2010); zileuton 10⁻⁵ M, a 5-LOX inhibitor (Adapted from Malo et al., 1994); L-NAME 3 x 10⁻⁴ M, a non-selective nitric oxide synthase inhibitor (Sousa et al., 2010); apocynin 10⁻⁴ M, a NADPH oxidase inhibitor (Shabir et al., 2014); tempol 10⁻³ M, a SOD mimetic (De Boer et al., 2001; adapted from Schnackenberg; Wilcox, 2001). The inhibitors were pre-incubated individually for 30 minutes, after which a new cumulative concentration-response curve to CCh was induced.

Contractile response of the trachea in the presence of the inhibitors was calculated based on the average of the maximum amplitude of the CG. Contractile reactivity was assessed based on the E_{max} and EC₅₀ values of CCh, and the effect of each inhibitor on the cumulative concentration-response curve to CCh was compared between CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of inhibitors.

DADOS NÃO PUBLICADOS**2.7 Effect of lauric acid on the balance between oxidative stress and antioxidant defenses in the lung homogenate****2.7.1 Determination of lipid peroxidation levels**

After euthanasia of the animals, lungs were isolated and kept at -20 °C until the preparation of the homogenate. For this, tissue was weighed, macerated, and homogenized with 10% KCl in a 1:1 ratio. Level of lipid peroxidation in rats was analyzed by measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Lung homogenate was mixed with trichloroacetic acid (10%) and thiobarbituric acid (0.67%), and then placed in a water bath for 15 minutes. After this period, n-butanol was added to the solution, and the sample was centrifuged (800 g, 5 minutes). Thiobarbituric acid-reactive substances were determined by measuring absorbance via spectrophotometry at 535 nm. Results were expressed in nmol of malondialdehyde (MDA)/g of organ weight (Draper; Hadley, 1990). The protocol was performed in duplicate.

2.7.2 Determination of nitrite levels

Nitrite levels in the rat lungs were determined using the Griess reaction (Green; Goldman, 1981; Radenovic; Selakovic, 2005). Lung homogenate was centrifuged (800 g/10 minutes, 24 °C), and the supernatant was collected. Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine hydrochloride, 5% phosphoric acid, and distilled water in a 1:1:1:1 ratio) was added and incubated at room temperature for 10 minutes. Nitrite concentration was expressed in nM of nitrite/g of the organ, and absorbance of the samples was measured using spectrophotometry at 560 nm. The protocol was performed in duplicate.

2.7.3 Determination of reduced glutathione levels

This test was performed according to the reaction of Ellman's reagent (DTNB - 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) with thiol groups. Lung homogenate was diluted in 0.02 M EDTA (10%) and mixed with a trichloroacetic acid solution (50%). Samples were then centrifuged (3000 rpm/15 minutes). Supernatant was collected and mixed with HCl buffer (0.4 M; pH 8.9) and DTNB (0.01 M). Concentration of GSH (ng of GSH/g of organ) was determined using spectrophotometry at 412 nm (Sedlak; Lindsay, 1968). The protocol was performed in duplicate.

DADOS NÃO PUBLICADOS**2.7.4 Determination of superoxide dismutase activity**

Supernatant was centrifuged (20 minutes, 12,000 rpm, 4 °C), and the resulting supernatant was analyzed. In a dark chamber, 1 mL of the reagent (50 mM phosphate buffer, 100 nM EDTA, and 13 mM L-methionine, pH 7.8) was mixed with 30 µL of the sample, 150 µL of 75 µM NBT (nitro blue tetrazolium), and 300 µL of 2 µM riboflavin. Tubes containing the resulting solution were exposed to a fluorescent lamp (15 W) for 15 minutes. Absorbance was measured using spectrophotometry at 560 nm. Results were expressed as the unit of SOD required to inhibit the NBT reduction rate by 50% per µg of protein (U/µg protein) (Beauchamp; Fridovich, 1971). The protocol was performed in duplicate.

2.8 Statistic analysis

Results were expressed as the mean and standard error of the mean (S.E.M.) and statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test for multiple comparisons between the experimental groups. The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$. All data were analyzed using the GraphPad Prism® program 5.01 (Neubig et al., 2003).

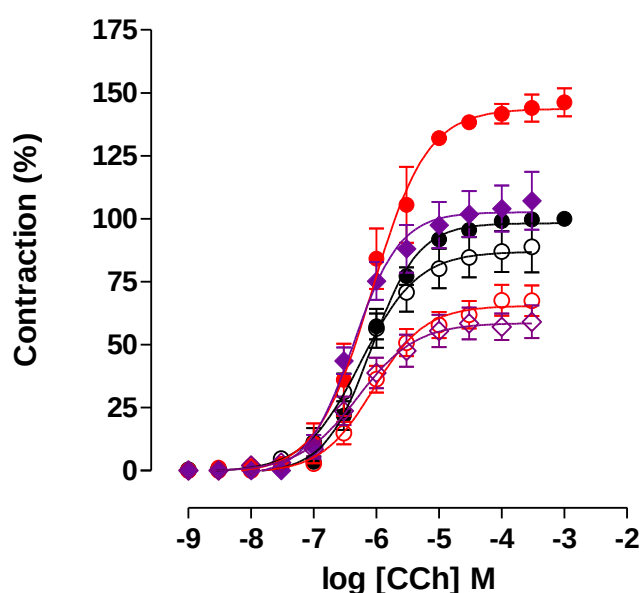
DADOS NÃO PUBLICADOS

3. Results

3.1 Involvement of the cyclooxygenase pathway in the contractile reactivity of rat trachea

Cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the CG was not altered in the presence of indomethacin regarding efficacy or potency. Conversely, the contractile reactivity of the trachea in AG animals was reduced in the presence of the inhibitor, showing lower efficacy but no change in potency. In animals treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg, the cumulative concentration-response curve to CCh showed a reduction in contractile efficacy in the presence of indomethacin, also without changes in potency (Figure 1, Table 1).

Figure 1 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of indomethacin, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 1 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of indomethacin.

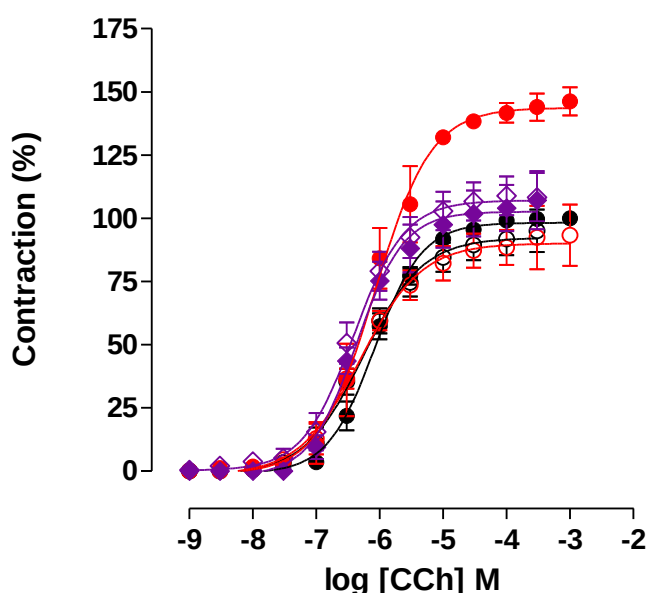
Group	Indomethacin	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	87.7 ± 8.5	$6.9 \pm 1.7 \times 10^{-7}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$64.0 \pm 5.8^{\#}$	$9.2 \pm 1.2 \times 10^{-7}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	$62.6 \pm 6.1^{\&}$	$7.4 \pm 1.3 \times 10^{-6}$

Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). $^{\#}p < 0.05$ and $^{\&}p < 0.05$ (absence vs. indomethacin) on AG and ALA25G, respectively.

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.2 Participation of the 5-lipoxygenases pathway on the contractile reactivity of rat trachea**

Cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the CG was not altered in the presence of zileuton regarding efficacy or potency. Conversely, the contractile reactivity of the trachea in AG animals was reduced in the presence of the inhibitor, showing lower efficacy but no change in potency. In animals treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg, the cumulative concentration-response curve to CCh was not altered in the presence of zileuton (Figure 2, Table 2).

Figure 2 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of zileuton, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 2 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of zileuton.

Group	Zileuton	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	92.8 ± 6.9	$6.5 \pm 1.5 \times 10^{-7}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$90.4 \pm 6.9^{\#}$	$5.3 \pm 0.7 \times 10^{-7}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	109.7 ± 7.6	$4.6 \pm 0.9 \times 10^{-7}$

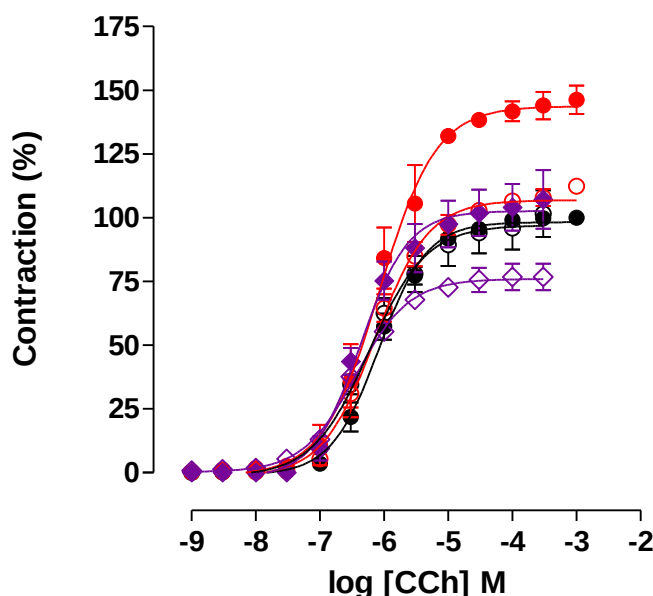
Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). $^{\#}p < 0.05$ (absence vs. zileuton) on AG.

DADOS NÃO PUBLICADOS

3.3 Participation of the nitric oxide pathway in the contractile reactivity of rat trachea

Cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the CG was not altered in the presence of L-NAME regarding efficacy or potency. Conversely, the contractile reactivity of the trachea in AG animals was reduced in the presence of the inhibitor, showing lower efficacy but no change in potency. In animals treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg, the cumulative concentration-response curve to CCh showed a reduction in contractile efficacy in the presence of L-NAME, also without changes in potency (Figure 3, Table 3).

Figure 3 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of L-NAME, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 3 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of L-NAME.

Group	L-NAME	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	96.4 ± 8.8	$6.1 \pm 0.5 \times 10^{-7}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$107.9 \pm 3.4^{\#}$	$8.2 \pm 1.3 \times 10^{-7}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	$76.1 \pm 4.1^{\&}$	$3.9 \pm 0.6 \times 10^{-7}$

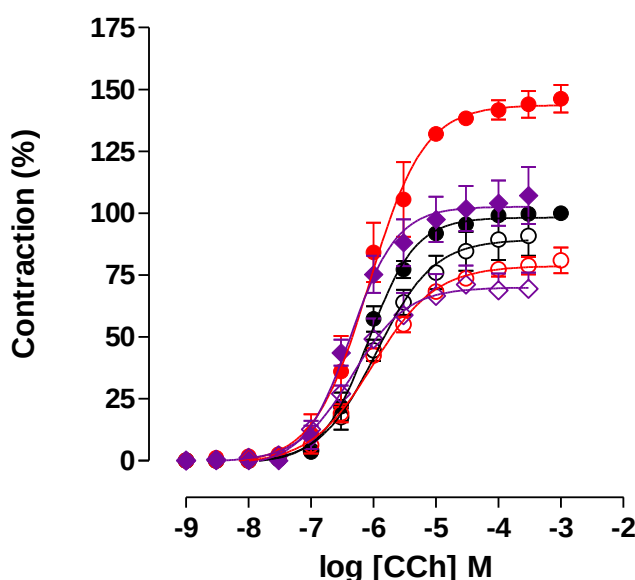
Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). $^{\#}p < 0.05$ and $^{\&}p < 0.05$ (absence vs. L-NAME) on AG and ALA25G, respectively.

DADOS NÃO PUBLICADOS

3.4 Participation of NADPH enzymes in the contractile reactivity of rat trachea

Cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the CG was not altered in the presence of apocynin regarding efficacy or potency. Conversely, the contractile reactivity of the trachea in AG animals was reduced in the presence of the inhibitor, showing lower efficacy but no change in potency. In animals treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg, the cumulative concentration-response curve to CCh showed a reduction in contractile efficacy in the presence of apocynin (Figure 4, Table 4).

Figure 4 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of apocynin, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 4 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of apocynin.

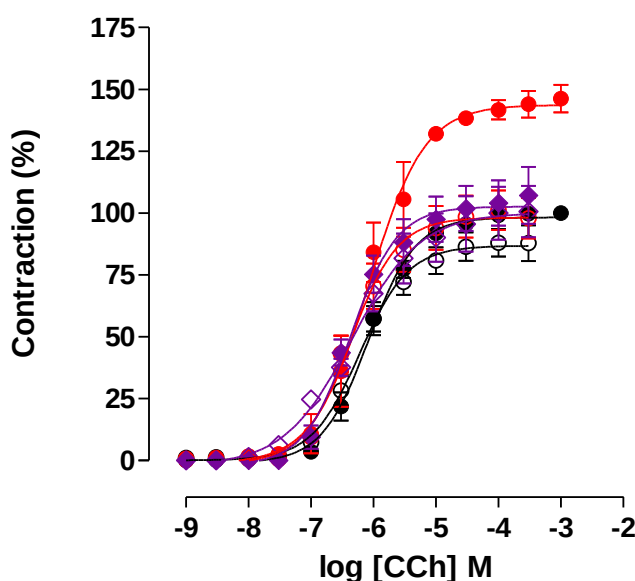
Group	Apocynin	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	90.8 ± 7.9	$1.3 \pm 0.3 \times 10^{-6}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$78.8 \pm 3.1^{\#}$	$1.1 \pm 0.1 \times 10^{-6}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	$73.9 \pm 6.8^{\&}$	$6.4 \pm 1.0 \times 10^{-7}$

Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). $^{\#}p < 0.05$ and $^{\&}p < 0.05$ (absence vs. apocynin) on AG and ALA25G, respectively.

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.5 Involvement of the SOD enzyme on the contractile reactivity of rat trachea**

Cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the CG was not altered in the presence of tempol regarding efficacy or potency. Conversely, the contractile reactivity of the trachea in AG animals was reduced in the presence of the inhibitor, showing lower efficacy but no change in potency. In animals treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg, the cumulative concentration-response curve to CCh was not altered in the presence of tempol (Figure 5, Table 5).

Figure 5 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of tempol, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 5 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of tempol.

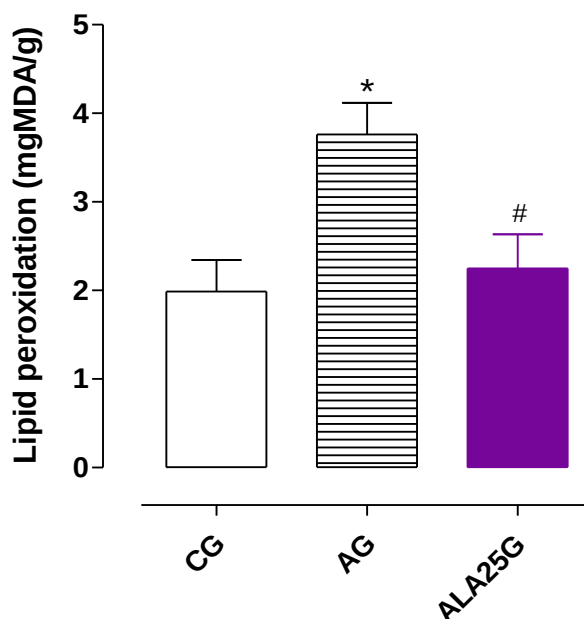
Group	Tempol	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	88.3 ± 5.7	$6.9 \pm 1.1 \times 10^{-7}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$102.1 \pm 7.6^{\#}$	$5.8 \pm 1.1 \times 10^{-7}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	100.6 ± 10.4	$5.1 \pm 0.9 \times 10^{-7}$

Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). $^{\#}p < 0.05$ (absence vs. tempol) on AG.

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.6 Lipid peroxidation levels in the lung homogenate**

AG showed an increase in MDA concentration (3.8 ± 0.4 mgMDA/g) compared to the CG (1.9 ± 0.3 mgMDA/g). This increase was prevented when the animals were treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg (2.3 ± 0.4 mgMDA/g) (Figure 6).

Figure 6 – MDA levels (mgMDA/g) in lung homogenate.

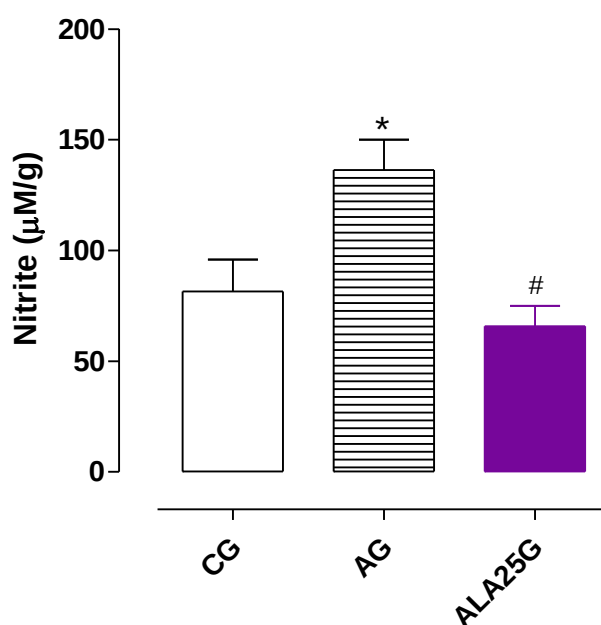


Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 5$). * $p < 0.05$ (CG vs. AG and ALA25G); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G).

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.7 Nitrite levels in the lung homogenate**

Nitrite levels were increased in the AG ($136.3 \pm 13.7 \mu\text{M/g}$) compared to the CG ($81.5 \pm 14.3 \mu\text{M/g}$). This increase was prevented when the animals were treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg ($65.8 \pm 9.1 \mu\text{M/g}$) (Figure 7).

Figure 7 –Nitrite levels ($\mu\text{M/g}$) in lung homogenate.

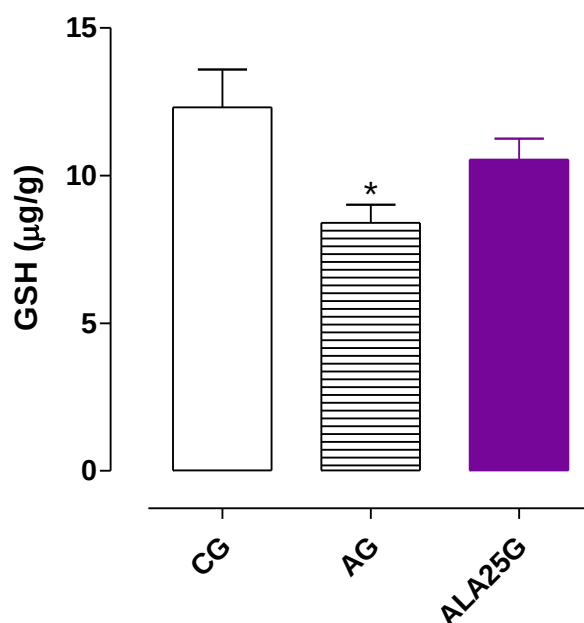


Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 5$). $*p < 0.05$ (CG vs. AG and ALA25G); $\#p < 0.05$ (AG vs. ALA25G).

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.8 GSH levels in the lung homogenate**

AG showed a reduction in GSH levels ($8.4 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$) compared to the CG ($12.3 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$). However, treatment with lauric acid at a dose of 25 mg/kg did not prevent this reduction ($10.5 \pm 0.7 \mu\text{g/g}$), as there was no significant difference between the ALA25G and both CG and AG (Figure 8).

Figure 8 – GSH levels ($\mu\text{g/g}$) in lung homogenate.

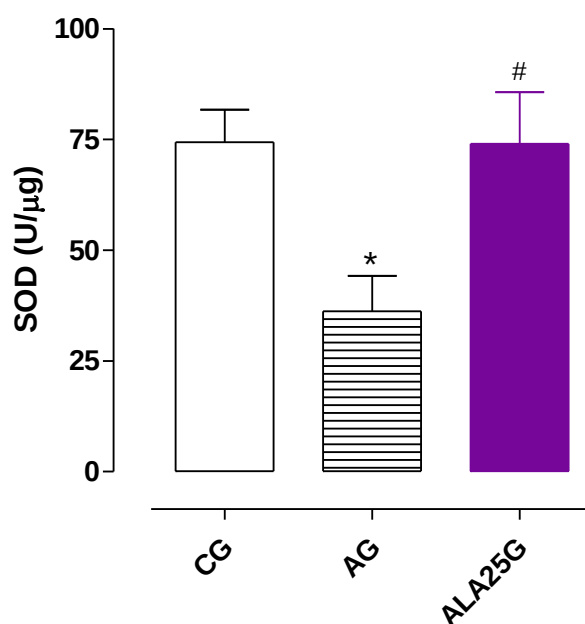


Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 5$). $*p < 0.05$ (CG vs. AG).

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.9 SOD activity in the lung homogenate**

SOD activity was increased in AG (36.2 ± 8.0 U/ μ g) compared to CG (74.4 ± 7.3 U/ μ g). This increase was prevented when the animals were treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg (74.1 ± 11.6 U/ μ g) (Figure 9).

Figure 9 – SOD activity (U/ μ g) in lung homogenate.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 5$). * $p < 0.05$ (CG vs. AG and ALA25G); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G).

DADOS NÃO PUBLICADOS**4. Discussion and conclusions**

In the present study, it was demonstrated that lauric acid (LA) exerts its preventive effect on tracheal hyperresponsiveness by negatively modulating the cyclooxygenase and nitric oxide pathways, in addition to reducing oxidative stress imbalance, in an ovalbumin-induced allergic asthma model in Wistar rats.

Previous studies (Figueiredo et al., 2025) have shown the preventive effect of LA at doses of 25, 50, and 100 mg/kg on carbachol (CCh)-induced tracheal hyperresponsiveness and the reduction of aminophylline-induced relaxation, with the 25 mg/kg dose being the lowest effective dose in promoting these effects. Additionally, LA at 25 mg/kg was only dose prevented minute volume alterations observed in the AG. Thus, further investigation was carried out to elucidate the mechanism of action of LA at a dose of 25 mg/kg in the airway changes promoted by the OVA-induced allergic asthma model.

Given that in previous *in silico* studies (Figueiredo et al., 2025), LA exhibited good binding affinity to various proteins related to airway contractility and remodeling, including COX-2, it was decided to investigate the involvement of this pathway in LA's preventive mechanism of action.

COX metabolites have diverse effects on the lungs and are known to modify airway tone as well as inflammatory responses. For prostanoid generation, both COX-1, which is constitutively expressed by most cells, and COX-2, an inducible isoform upregulated by inflammatory mediators such as lipopolysaccharide, IL-1 β , IL-6, or tumor necrosis factor- α (TNF- α), convert AA into prostaglandin endoperoxides (PGs), such as prostaglandin G₂ (PGG₂) (Ramsay et al., 2003; Ricciotti; Fitzgerald, 2011). Subsequently, an endoperoxidase reaction reduces PGG₂ to PGH₂, a highly unstable cyclic endoperoxide that is rapidly converted into bioactive prostanoids by specific synthases, including PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂, and TxA₂ (Zaslona; Peters-Golden, 2015).

Among the contractile prostaglandins of airway smooth muscle, PGD₂ and PGF_{2 α} stand out. Studies have already demonstrated an increase in prostanoids in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of individuals with allergic asthma compared to healthy individuals, showing a 12- to 22-fold increase in PGD₂ and PGF_{2 α} levels, respectively (Liu et al., 1990).

Thus, given that COXs are key enzymes involved in the release of mediators that either exacerbate or alleviate airway hyperresponsiveness in asthma, the

DADOS NÃO PUBLICADOS

participation of COX products was evaluated to determine whether these metabolites influence tracheal contractile responsiveness. For this purpose, indomethacin, a non-selective COX inhibitor (Hua; Back; Tam, 1996), was used, and it was observed in the CG, there was no change in contractile efficacy or potency in the presence of this inhibitor (Figure 1, Table 1).

In the asthmatic animals, there was a reduction in contractile efficacy in the presence of indomethacin, without changes in potency, indicating that in this asthma induction model, inhibition of this enzyme resulted in reduced production of contractile prostanoids, such as PGD₂ and PGF_{2α} (Figure 1, Table 1). Conversely, Vasconcelos et al. (2020) demonstrated that in the presence of indomethacin, the trachea of guinea pigs with OVA-induced allergic inflammation exhibited an increase in contractile efficacy. It can be inferred that methodological differences, such as the animal model, duration of ovalbumin exposure, and other factors, may account for these discrepancies. However, similar to the findings of the present study, Ferreira et al. (2025) observed a reduction in tracheal contractile efficacy, also without change in potency, in the asthmatic group of an OVA-induced asthma model in Wistar rats.

In the ALA25G, there was a reduction in tracheal contractile efficacy in the presence of indomethacin, suggesting that LA may negatively modulate the cyclooxygenase pathway, further decreasing the production of contractile mediators (Figure 1, Table 1). These results align with findings from studies on supplementation with virgin coconut oil (VCO) in guinea pigs with pulmonary inflammation, where, in the presence of indomethacin, tracheal contractile efficacy and potency in response to CCh were not altered. This suggests that COX blockade by VCO would still allow sufficient production of relaxing prostanoids to reduce CCh-induced contractility (Vasconcelos et al., 2020), indicating that LA, the major component of VCO, may be responsible for this effect. Furthermore, a study by Henry et al. (2002) demonstrated that LA have inhibitory effects on both COX-1 and COX-2.

Another important enzyme in arachidonic acid metabolism is 5-lipoxygenase (5-LOX), which leads to the production of leukotrienes (Samuelsson et al., 1987). These are divided into two classes: LTB₄ and cysteinyl leukotrienes (CysLTs) (Luginina et al., 2023). LTB₄ has pro-inflammatory activity, triggering chemotaxis and subsequently activating the inflammatory response (Saeki; Yokomizo, 2017; Yokomizo; Shimizu, 2023).

DADOS NÃO PUBLICADOS

LTC₄, LTD₄, and LTE₄ constitute the CysLTs, which play a key role in the pathogenesis of asthma by inducing bronchoconstriction (O'Hickey et al., 1991; Lee; Boyce, 2024); promoting tissue remodeling (Henderson Jr et al., 2006; Mehrotra et al., 2009); and increasing inflammation through the recruitment of eosinophils, mast cells, T lymphocytes, monocytes, and basophils, in addition to stimulating the production of Th2 cytokines (Kim et al., 2006; Montuschi, 2010). Studies report that CysLT and LTB₄ levels in bodily fluids (sputum, BAL, serum, and urine) of asthmatic patients are significantly higher than those in healthy individuals and increase with asthma severity (Kazani et al., 2013; Uchida et al., 2019).

Thus, the present study evaluated the effect of the 5-LOX pathway on the mechanisms underlying the changes caused by asthma and LA. For this purpose, zileuton, a 5-LOX inhibitor (Malo et al., 1994), was used as a pharmacological tool. It was observed that in the CG, the presence of this inhibitor did not alter contractile efficacy or potency. Conversely, in the AG, there was a reduction in contractile efficacy but not in potency in the presence of the inhibitor, indicating that the increased tracheal hyperresponsiveness in AG may be due to the high production of CysLTs (Figure 2, Table 2). These findings are consistent with previous literature demonstrating the role of 5-LOX inhibition in reducing airway reactivity (Malo et al., 1994; Irvin et al., 1997).

On the other hand, LA does not negatively modulate the 5-LOX pathway, as no differences in contractile reactivity to CCh were observed in the ALA25G in the presence of zileuton. These results are in line with *in silico* studies by Figueiredo et al. (2025), in which LA, despite presenting a negative binding energy with 5-LOX, this energy was not more favorable compared to zileuton.

Another important airway mediator is nitric oxide (NO^{*}), which is produced by different isoforms of nitric oxide synthase (NOS), including nNOS, eNOS, and iNOS. This liposoluble gas activates soluble guanylyl cyclase (sGC), which cleaves and cyclizes GTP into cyclic guanosine monophosphate (cGMP). cGMP then activates cGMP-dependent kinase (PKG), leading to smooth muscle relaxation (Zhao et al., 2015).

In the airways of asthmatic individuals, there is an increased expression of iNOS, particularly in epithelial and inflammatory cells, including macrophages, neutrophils, and eosinophils. This increased and/or expression of iNOS activity occurs due to induction by inflammatory cytokines, and this isoform is responsible for producing large amounts of NO^{*} (Yan et al., 1995; Ricciardolo et al., 2004). High NO^{*}

DADOS NÃO PUBLICADOS

levels have been associated with airway hyperresponsiveness due to the formation of the free radical peroxynitrite (ONOO^-) (Sadeghi-Hashjin et al., 1998).

Thus, it was decided to investigate whether the tracheal hyperresponsiveness to CCh in asthmatic rats was associated with the NO^* pathway and whether lauric acid exerts its preventive effect by modulating this pathway. To this end, L-NAME, a NOS inhibitor (Sousa et al., 2010), was used, and it was observed that the contractile response to CCh in the CG was not altered in the presence of this inhibitor. Since NO^* has a bronchodilator effect, it would be expected that inhibiting its synthesis with L-NAME would enhance CCh-induced contraction. However, this effect was not observed in the present study for the CG, suggesting that in non-asthmatic animals, NO^* does not exert significant tonic control over airway contractility (Figure 3, Table 3).

In the GA, a reduction in contractile efficacy to CCh was observed in the presence of L-NAME (Figure 3, Table 3), indicating that in this asthma induction model, there is an exacerbated formation of NO^* , which consequently reacts with the superoxide anion $^*\text{O}_2^-$ to form ONOO^- , responsible for the hyperresponsiveness of asthmatic airways (Sadeghi-Hashjin et al., 1998).

Different results were observed in the trachea of guinea pigs with chronic pulmonary inflammation in the presence of L-NAME, where an increase in both contractile efficacy and potency to CCh was noted. This suggests that in this airway inflammation model, L-NAME exhibits a different activity on NOS isoforms, presumably blocking eNOS but not iNOS (Vasconcelos et al., 2020).

In the ALA25G, the contractile response to CCh in the presence of L-NAME was also reduced (Figure 3, Table 3), suggesting a negative modulation of NOS by LA. These data align with the findings from *in silico* analyses of LA, where this fatty acid showed better binding affinity to both eNOS and iNOS isoforms compared to their respective inhibitors (Figueiredo et al., 2025). In addition, LA has been shown to reduce iNOS activity in the lungs of type II diabetic Wistar rats (Augustine et al., 2022).

Asthma is characterized by an oxidative stress imbalance, caused by an overload of oxidant species and a reduction in antioxidant defenses (Sahiner et al., 2018). Among the reactive oxygen species (ROS), free radicals with unpaired electrons, such as the superoxide anion ($^*\text{O}_2^-$), hydroxyl radical (HO^*), hydroperoxyl radical (HO_2^*), and peroxy radical (RO_2^*), as well as non-radical oxygen derivatives like hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid (HClO), and ozone (O_3), can be mentioned. Among reactive nitrogen species (RNS), nitric oxide (NO^*) and nitrogen

DADOS NÃO PUBLICADOS

dioxide ($\text{NO}_2^{\bullet}$) are notable, as well as non-radical species such as nitrite (NO_2^-) and peroxynitrite (ONOO^-) (Sies; Berndt; Jones, 2017).

An important role is attributed to NADPH oxidase, which is responsible for the formation of $\text{O}_2^{\bullet -}$ through electron transfer from NADPH. This compound can be spontaneously or enzymatically dismutated to H_2O_2 (Taylor; Hubert, 2021). Studies report that these ROS induce contraction of the guinea pig trachea both directly (Rhoden; Barnes, 1989) and by influencing airway reactivity to contractile agonists, such as acetylcholine and methacholine (Kudo et al., 1996; Nishikawa et al., 1996; Henricks; Nijkamp, 2001), and on electrical field stimulation-induced contractile responses of isolated rat intrapulmonary bronchi (Szarek; Schmidt, 1990).

To regulate homeostasis in the formation of reactive species in the airways, cells have antioxidant enzymatic systems, such as the superoxide dismutase (SOD) complex, which converts $\text{O}_2^{\bullet -}$ into H_2O_2 ; catalase, which converts H_2O_2 into water and O_2 ; and glutathione peroxidase (GPx) and peroxiredoxin, which inactivate H_2O_2 and other hydroperoxides (Pietarinen-Runtti et al., 2000; Wang et al., 2023). Additionally, there are non-enzymatic antioxidant systems, including reduced glutathione (GSH), vitamins (C and E), and minerals (selenium and zinc) (Sies et al., 2022).

Initially, the participation of the superoxide anion produced by NADPH oxidase in CCh-mediated contraction in the rat trachea was evaluated. For this, apocynin, a blocker of this enzymatic complex (Shabir et al., 2014), was used as a pharmacological tool. It was observed that there was no difference in contractile efficacy or potency in the CG in the presence of this inhibitor (Figure 4, Table 4). Conversely, since the inhibition of NADPH oxidase generates a lower amount of $\text{O}_2^{\bullet -}$, a reduction in contractile efficacy was observed in the AG in the presence of apocynin, indicating that in this asthma model, $\text{O}_2^{\bullet -}$ production appears to contribute to oxidative stress and increased airway hyperresponsiveness. A similar result was observed by Ferreira et al. (2025) in an ovalbumin-induced asthma model in Wistar rats.

In the ALA25G a reduction in contractile efficacy in the presence of apocynin, compared to its absence, was observed, without changes in potency (Figure 4, Table 4). This suggests a negative modulatory effect on NADPH oxidase or the production of reactive species, indicating that LA may improve the oxidative stress imbalance. These results align with previous findings, as it was suggested that LA may reduce the formation of peroxynitrite (ONOO^-) by negatively modulating iNOS. Complementarily, this reduction in ONOO^- production could also occur through a decrease in the

DADOS NÃO PUBLICADOS

production of $\cdot\text{O}_2^-$. Another study demonstrated the reduction of NADPH oxidase-derived $\cdot\text{O}_2^-$ production by LA in the heart and kidneys of spontaneously hypertensive rats (Alves et al., 2017).

Similar results were observed in the presence of tempol, a SOD mimetic (De Boer et al., 2001). No difference in contractile efficacy or potency was observed in the CG in the presence of this inhibitor (Figure 5, Table 5). However, the reduction in contractility observed in the presence of tempol in the AG may be due to the conversion of $\cdot\text{O}_2^-$ into H_2O_2 stimulated by this mimetic, thereby reducing the amount of $\cdot\text{O}_2^-$ and its availability for ONOO^- formation, which is produced through its reaction with $\text{NO}\cdot$, ultimately decreasing tracheal hyperresponsiveness.

In the ALA25G, contractile efficacy or potency was not altered in the presence of tempol (Figure 5, Table 5). Nevertheless, based on the previously presented data, it is suggested that LA negatively modulates $\cdot\text{O}_2^-$ formation, leading to insufficient substrate available for conversion into H_2O_2 , which justifies the absence of changes in tracheal contractility in the presence of tempol. Furthermore, LA may be stimulating antioxidant defenses to neutralize these ROS.

Increased ROS production can trigger chain reactions of lipid peroxidation, leading to the formation of unstable lipid radicals (Cordiano et al., 2023; Wang et al., 2023). Malondialdehyde (MDA) is the primary and most widely studied product of lipid peroxidation, commonly used as a measure of oxidative stress (Ayala; Muñoz; Arguelles, 2014; Barrera et al., 2018). MDA can covalently interact and cause damage to membrane proteins, nucleic acids, or adjacent polyunsaturated fatty acids (Marnett, 1999; Ayala; Muñoz; Arguelles, 2014).

Thus, oxidative stress balance and antioxidant defenses in the pulmonary homogenate of rats were evaluated to support the functional data observed. Initially, lipid peroxidation levels were quantified by measuring MDA production, and an increase in these levels was observed in the AG when compared to the CG (Figure 6). These data align with other studies on OVA-induced asthma models in mice, which also reported an increase in MDA levels in the AG (Nesi et al., 2017; Bao et al., 2018; Hanna et al., 2019; Jasemi et al., 2022).

Treatment with lauric acid at a dose of 25 mg/kg prevented the increase in lipid peroxidation observed in the AG, supporting the data indicating that LA mitigates the oxidative stress imbalance (Figure 6). Other studies have already reported the reduction of MDA levels promoted by LA, in the rat liver with non-alcoholic fatty liver

DADOS NÃO PUBLICADOS

disease (Sedik et al., 2024), with ethanol-induced hepatotoxicity (Namachivayam; Gopalakrishnan, 2023), and in the serum, testes, and epididymis of diabetic rats (Anuar et al., 2023).

Another marker of oxidative stress is nitrite (NO_2^-), a product of NO^* metabolism in the presence of molecular oxygen, which is widely reported in high concentrations in the exhaled air of asthmatic individuals (Hunt et al., 1995; Formanek et al., 2002; Ueno et al., 2008; Rihák et al., 2010). NO_2^- is a substrate for the enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase, resulting in the formation of the nitrogen dioxide radical (NO_2^*) (Ghosh; Erzurum, 2012). NO_2^* , along with ONOO^- , is responsible for the nitration of tyrosine residues in proteins and the formation of 3-nitrotyrosine, which is extensively found in the lungs of asthmatic individuals (Duguet et al., 2001; Dweik et al., 2001; Andreadis et al., 2003; Zuo; Koozechian; Chen, 2014).

An increase in nitrite levels was observed in the pulmonary homogenate of asthmatic animals compared to the CG, which was prevented in ALA25G (Figure 7). These data are consistent with those previously obtained, suggesting that by reducing the exacerbated production of NO^* through the inhibition of iNOS, LA also decreases the metabolism of NO^* to nitrite.

In the analysis of the effect of asthma-induced alterations and LA on antioxidant systems, the levels of GSH, a non-enzymatic antioxidant, and the activity of SOD were quantified. GSH reduces organic hydroperoxides, protecting against lipid peroxidation. It is oxidized through a reaction involving glutathione peroxidase (GPx), forming glutathione disulfide (GSSG) (Barnabas et al., 2023).

Studies report reduced levels of GSH and the GSH/GSSG ratio in individuals with allergic asthma (Ercan et al., 2006; Sackesen et al., 2008; Deveci et al., 2004), as well as showing that the use of GSH precursors contributes to the reduction of inflammation and hyper-responsiveness in an ovalbumin-induced allergic asthma model in mice (Koike et al., 2007). These data are consistent with the findings of the present study, as a reduction in GSH levels was observed in the AG, compared to the CG (Figure 8). This reduction was not prevented in ALA25G, suggesting that LA exerts its effect in reducing oxidative stress imbalance through mechanisms that do not involve an increase in this antioxidant. Preventive effect of LA in reducing GSH levels has also been reported in the rat liver with ethanol-induced hepatotoxicity (Namachivayam; Gopalakrishnan, 2023).

DADOS NÃO PUBLICADOS

In vitro studies have shown that reactive oxygen and nitrogen species lead to oxidative and nitrative modification of tyrosine and inactivation of superoxide dismutases (SOD) (MacMillan-Crow; Thompson, 1999; Alvarez et al., 2004). Therefore, the reduction in SOD activity may be associated with inflammation and airway hyper-responsiveness in asthmatic individuals (Sugiura; Ichinose, 2008).

Similar to what was observed for GSH, SOD activity was also reduced in the AG compared to the CG (Figure 9), supporting the findings in tracheal reactivity in the presence of tempol, a SOD mimetic, where a reduction in contractile efficacy was observed. This suggests that tempol is likely compensating for SOD activity, given that this enzyme's function is impaired in this group.

Reduction in SOD activity in the AG was prevented when animals were treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg (Figure 9), suggesting that AL may exert an antioxidant effect by positively modulating this enzyme's activity. Furthermore, these findings align with previous observations, where contractile reactivity to CCh was not altered in the ALA25G in the presence of tempol compared to its absence (Figure 5, Table 5). This indicates that, as AL decreases $\cdot\text{O}_2^-$ production, the lower availability of this ROS allows it to be metabolized by SOD, whose activity reduction was prevented by LA, thereby preventing tempol from exerting its action. The preventive effect of LA in reducing SOD activity has also been reported in the rat liver with ethanol-induced hepatotoxicity and ischemic brain (Namachivayam; Gopalakrishnan, 2023; Shaheryar et al., 2023).

Based on the results obtained, it can be concluded that lauric acid reduces tracheal hyper-responsiveness in Wistar rats with allergic asthma by negatively modulating both the COX and NO pathways, as well as the imbalance of oxidative stress. Thus, it is suggested that the pharmacological effects of coconut oil in preventing asthma-associated alterations in murine models may be, at least in part, attributed to the action of lauric acid. Further studies may be carried out to complement the mechanism of action of lauric acid.

Author Contributions: Figueiredo, I. A. D.: conceptualization, investigation, data analysis and interpretation, and writing - original draft; Martins, A. M. O. M.: Conceptualization, investigation; Cavalcanti, M. T. C., Fernandes, J. M. F., Gomes, L. E. S., Oliveira, G. N. M., Oliveira, L. N., Felício, I. M.: investigation; Golzio, A. M. F. O.:

DADOS NÃO PUBLICADOS

investigation and resources; Vasconcelos, L. H. C., Cavalcante, F. A.: project administration, resources, supervision, and writing - review.

Acknowledgments: The authors would like to thank Fapesq, Capes, and CNPq for their financial support.

Funding: This research received specific funding from the Foundation for Research Support of the State of Paraíba-Fapesq (grant number 3158/2021) from Call for Proposals No. 09/2021.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

References

- Alvarez, B., Demicheli, V., Durán, R., Trujillo, M., Cerveñansky, C., Freeman, B.A., Radi, R., 2004. Inactivation of human Cu, Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 37(6), 813–822. 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.006
- Alves, N.F.B., Queiroz, T.M., Travassos, R.A., Magnani, M., Braga, V.A., 2017. Acute treatment with lauric acid reduces blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 120(4), 348–353. 10.1111/bcpt.12700
- Andreadis, A.A., Hazen, S.L., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic. Biol. Med.* 35(3), 213–225. 10.1016/s0891-5849(03)00278-8
- Anuar, N.S., Shafie, S.A., Maznan, M.A.F., Zin, N.S.N.M., Azmi, N.A.S., Raoof, R.A., 2023. Lauric acid improves hormonal profiles, antioxidant properties, sperm quality and histomorphometric changes in testis and epididymis of streptozotocin-induced diabetic infertility rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 470, 116558. 10.1016/j.taap.2023.116558
- Augustine, B. D., Farrau, U., Olubiyi, M., Danboyi, T., Dawud, F. A., & Umar, I. A., 2022. Lung oxidative and nitrosative changes in Type II diabetic male wistar rats treated with lauric acid. *J. Med. Basic Sci. Res.* 3(1), 13–22. 10.5281/zenodo.6342043
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014(1), 360438. 10.1155/2014/360438
- Bao, W., Zhang, Y., Zhang, M., Bao, A., Fei, X., Zhang, X., Zhou, X., 2018. Effects of ozone repeated short exposures on the airway/lung inflammation, airway hyperresponsiveness and mucus production in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *Biomed. Pharmacother.* 101, 293–303. 10.1016/j.biopha.2018.02.079

DADOS NÃO PUBLICADOS

Barnabas, M., Awakan, O.J., Rotimi, D.E., Akanji, M.A., Adeyemi, O.S., 2023. Exploring redox imbalance and inflammation for asthma therapy. *Mol. Biol. Rep.* 50(9), 7851–7865. 10.1007/s11033-023-08688-8

Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G.P., Giordano, J., Cucci, M.A., Graf, M., Gentile, F., 2018. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants* 7(8), 102. 10.3390/antiox7080102

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44(1), 276–287. 10.1016/0003-2697(71)90370-8

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, 2016. Disponível em: <www.antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/pagina/s/guia.html>. Accessed on: May 31, 2024.

Cordiano, R., Di Gioacchino, M., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangemi, S., Minciullo, P.L., 2023. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update. *Molecules* 28(16), 5979. 10.3390/molecules28165979

Dayrit, F. M., 2015. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92(1), 1–15. 10.1007/s11746-014-2562-7

De Boer, J., Meurs, H., Flendrig, L., Koopal, M., Zaagsma, J., 2001. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 133(8), 1235–1242. 10.1038/sj.bjp.0704191

Deveci, F., İlhan, N., Turgut, T., Akpolat, N., Kirkil, G., Muz, M.H., 2004. Glutathione and nitrite in induced sputum from patients with stable and acute asthma compared with controls. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 93(1), 91–97. 10.1016/S1081-1206(10)61452-4

Draper, H. H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421–431. 10.1016/0076-6879(90)86135-i

Dubo, A. B., Dawud, F. A., Umar, I. A., Alex, E. A., Baiyekusi, S., Farra'u, U. 2019. Lauric acid alleviates inflammation and structural changes in the lungs of type II diabetic male Wistar rats. *J. Afr. Assoc. Physiol. Sci.*, 7(2), 88-96. 2315-9987

Duguet, A., Iijima, H., Eum, S.Y., Hamid, Q., Eidelman, D.H., 2001. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164(7), 1119–1126. 10.1164/ajrccm.164.7.2010085

Dweik, R.A., Comhair, S.A., Gaston, B., Thunnissen, F.B., Farver, C., Thomassen, M.J., Kavuru, M., Hammel, J., Abu-Soud, H.M., Erzurum, S.C., 2001. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(5), 2622–2627. 10.1073/pnas.051629498

Ercan, H., Birben, E., Dizdar, E.A., Keskin, O., Karaaslan, C., Soyer, O.U., Dut, R., Sackesen, C., Besler, T., Kalayci, O., 2006. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118(5), 1097–1104. 10.1016/j.jaci.2006.08.012

DADOS NÃO PUBLICADOS

Eyres, L., Eyres, M. F., Chisholm, A., Brown, R. C., 2016. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. *Nutr. Rev.* 74(4), 267–280. 10.1093/nutrit/nuw002

Ferreira, S. R. D., Pessoa, R. F., Martins, A. M. O., Figueiredo, I. A. D., Barros, B. C., Alves, J. L. D. B., Alves, A. F., do Nascimento, Y. M., Vasconcelos, L. H. C., Cavalcante, F. A., 2025. Protective effects of *Hibiscus sabdariffa* L. on body composition and airway reactivity in obese asthmatic rats. *J. Funct. Foods*, submitted for publication.

Figueiredo, I. A. D., Martins, A. M. O., Cavalcanti, A. M. T., Fernandes, J. M., Gomes, L. E. D. S., Vieira, M. M., Oliveira, G. N. M. D., Felício, I. M., Oliveira, L. N., Ramalho, I. G. D. S., Sousa, N. F. D., Scotti, L., Scotti, M. T., Alves, J. L. D. B., Diniz, M. F. F. M., Ximenes, D. I. J., Vasconcelos, L. H. C., Cavalcante, F. A., 2025. Repeated-Dose Toxicity of Lauric Acid and Its Preventive Effect Against Tracheal Hyper-Responsiveness in Wistar Rats with Possible *In Silico* Molecular Targets. *Pharmaceuticals*, 18(2), 221. 10.3390/ph18020221

Fitzhugh, O. G., Schouboe, P. J., Nelson, A. A. 1960. Oral toxicities of lauric acid and certain lauric acid derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2(1), 59-67. 10.1016/0041-008x(60)90071-5

Formanek, W., Inci, D., Lauener, R.P., Wildhaber, J.H., Frey, U., Hall, G.L., 2002. Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. *Eur. Respir. J.* 19(3), 487–491. 10.1183/09031936.02.00101202

Galvão, J.G.F., Cavalcante-Silva, L.H.A., Carvalho, D.C.M., Ferreira, L.K.D., Monteiro, T.M., Alves, A.F., Ferreira, L.A.M.P., Gadelha, F.A.A.F., Piuvezam, M.R., Rodrigues-Mascarenhas, S., 2017. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. *Inflamm. Res.* 66(12), 1117–1130. 10.1007/s00011-017-1092-9

Ghosh, S., Erzurum, S.C., 2012. Modulation of asthma pathogenesis by nitric oxide pathways and therapeutic opportunities. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 9(3-4), e89–e94. 10.1016/j.ddmec.2012.10.004

Gina (Global Initiative for Asthma), 2024. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Available at: <www.ginasthma.org>. Accessed on: 27 Dec. 2024.

Green, L., Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212(4490), 56–58. 10.1126/science.6451927

Hammad, H., Lambrecht, B. N., 2021. The basic immunology of asthma. *Cell* 184(6), 1469–1485. 10.1016/j.cell.2021.02.016

Hanna, D.A., Khalaf, M.M., Abo-Saif, A.A., 2019. Polydatin protects against ovalbumin-induced bronchial asthma in rats; involvement of urocortin and surfactant-D expression. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 41(3), 403–412. 10.1080/08923973.2018.1536985

Henderson Jr, W.R., Chiang, G.K., Tien, Y.T., Chi, E.Y., 2006. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173(7), 718–728. 10.1164/rccm.200501-088OC

Henricks, P.A., Nijkamp, F.P., 2001. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 14(6), 409–420. 10.1006/pupt.2001.0319

DADOS NÃO PUBLICADOS

- Henry, G. E., Momin, R. A., Nair, M. G., DeWitt, D. L., 2002. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *J. Agric. Food Chem.* 50(8), 2231–2234. 10.1021/jf0114381
- Hua, X. Y., Back, S. M., Tam, E. K., 1996. Substance P enhances electrical field stimulation-induced mast cell degranulation in rat trachea. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 270(6), L985–L991. 10.1152/ajplung.1996.270.6.L985
- Hunt, J., Byrns, R., Ignarro, L., Gaston, B., 1995. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. *Lancet* 346(8984), 1235–1236. 10.1016/s0140-6736(95)92947-9
- Irvin, C.G., Tu, Y.P., Sheller, J.R., Funk, C.D., 1997. 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 272(6), L1053–L1058. 10.1152/ajplung.1997.272.6.L1053
- Jasemi, S.V., Khazaei, H., Fakhri, S., Mohammadi-Noori, E., Farzaei, M.H., 2022. Naringenin improves ovalbumin-induced allergic asthma in rats through antioxidant and anti-inflammatory effects. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2022, 9110798. 10.1155/2022/9110798
- Kazani, S., et al., 2013. Exhaled breath condensate eicosanoid levels associate with asthma and its severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132(3), 547–553. 10.1016/j.jaci.2013.01.058
- Khan, H.U., Aamir, K., Sisinthy, S.P., Nagojappa, N.B.S., Arya, A. 2020. Food additive “lauric acid” possess non-toxic profile on biochemical, haematological and histopathological studies in female Sprague Dawley (SD) rats. *PeerJ*, 8, e8805. <https://doi.org/10.7717/peerj.8805.eCollection2020>.
- Kim, D.C., Hsu, F.I., Barrett, N.A., Friend, D.S., Grenningloh, R., Ho, I., Al-Garawi, A., Lora, J.M., Lam, B.K., Austen, K.F., Kanaoka, Y., 2006. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 176(7), 4440–4448. 10.4049/jimmunol.176.7.4440
- Kobzik, L., Bredt, D. S., Lowenstein, C. J., Drazen, J., Gaston, B., Sugarbaker, D., Stamler, J. S., 1993. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9(4), 371–371. 10.1165/ajrcmb/9.4.371
- Koike, Y., Hisada, T., Utsugi, M., Ishizuka, T., Shimizu, Y., Ono, A., Murata, Y., Hamuro, J., Mori, M., Dobashi, K., 2007. Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37(3), 322–329. 10.1165/rcmb.2006-0423OC
- Kudo, M., Nishikawa, M., Ikeda, H., Okubo, T., 1996. Involvement of superoxide anions in ozone-induced airway hyperresponsiveness in unanesthetized guinea pigs. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2(1), 25–30. 10.1016/1382-6689(96)00024-5
- Lee, M., Boyce, J.A., Barrett, N.A., 2024. Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 20(1), 115-141. 10.1146/annurev-pathmechdis-111523-023509
- Liu, M. C., Bleecker, E. R., Lichtenstein, L. M., Kagey-Sobotka, A., Niv, Y., McLemore, T. L., Permutt, S., Proud, D., Hubbard, W. C., 1990. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the

DADOS NÃO PUBLICADOS

airways of subjects with mild asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142(1), 126–132. 10.1164/ajrccm/142.1.126

Luginina, A., Gusach, A., Lyapina, E., Khorn, P., Safronova, N., Shevtsov, M., Dmitrieva, D., Dashevskii, D., Kotova, T., Smirnova, E., Borshchevskiy, V., Cherezov, V., Mishin, A., 2023. Structural diversity of leukotriene G-protein coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 299(10), 105247. 10.1016/j.jbc.2023.105247

MacMillan-Crow, L.A., Thompson, J.A., 1999. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 366(1), 82–88. 10.1006/abbi.1999.1202

Malo, P.E., Bell, R.L., Shaughnessy, T.K., Summers, J.B., Brooks, D.W., Carter, G.W., 1994. The 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton in *in vitro* and *in vivo* models of antigen-induced airway anaphylaxis. *Pulm. Pharmacol.* 7(2), 73–79. 10.1006/pulp.1994.1008

Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 424(1-2), 83–95. 10.1016/S0027-5107(99)00010-X

Martin, S. A., Brash, A. R., Murphy, R. C., 2016. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J. Lipid Res.* 57(7), 1126–1132. 10.1194/jlr.R068072

Mehrotra, A.K., Henderson Jr, W.R., 2009. The role of leukotrienes in airway remodeling. *Curr. Mol. Med.* 9(3), 383–391. 10.2174/156652409787847209

Montuschi, P., 2010. Role of leukotrienes and leukotriene modifiers in asthma. *Pharmaceuticals* 3(6), 1792–1811. 10.3390/ph3061792

Namachivayam, A., Gopalakrishnan, A.V., 2023. Effect of lauric acid against ethanol-induced hepatotoxicity by modulating oxidative stress/apoptosis signalling and HNF4 α in Wistar albino rats. *Heliyon* 9(11), e21267. 10.1016/j.heliyon.2023.e21267

Nesi, R.T., Kennedy-Feitosa, E., Lanzetti, M., Ávila, M.B., Magalhães, C.B., Zin, W.A., Faffe, D.S., Porto, L.C., Valença, S.S., 2017. Inflammatory and oxidative stress markers in experimental allergic asthma. *Inflammation* 40(4), 1166–1176. 10.1007/s10753-017-0560-2

Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A., 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 55(4), 597–606. 10.1124/pr.55.4.4

Nishikawa, M., Kudo, M., Kakemizu, N., Ikeda, H., Okubo, T., 1996. Role of superoxide anions in airway hyperresponsiveness induced by cigarette smoke in conscious guinea pigs. *Lung* 174(5), 279–289. 10.1007/BF00176187

O'Hickey, S.R., Hawksworth, R.J., Fong, C.Y., Arm, J.P., Spur, B.W., Lee, T., 1991. Leukotrienes C4, D4, and E4 enhance histamine responsiveness in asthmatic airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144(5), 1053–1057. 10.1164/ajrccm/144.5.1053

Olubiyi, M. V., Kawu, M. U., Magaji, M. G., Salahdeen, H. M., Magaji, R. A. 2022. Influence of lauric acid on the relaxation of corpus cavernosum in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. *Futur. J. Pharm. Sci.*, 8(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s43094-022-00453-1>

DADOS NÃO PUBLICADOS

- Pietarinen-Runtti, P., Lakari, E., Raivio, K.O., Kinnula, V.L., 2000. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 278(1), C118–C125. 10.1152/ajpcell.2000.278.1.C118
- Radenovic, L., Selakovic, V., 2005. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. *Brain Res. Bull.* 67(1-2), 133–141. 10.1016/j.brainresbull.2005.06.019
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res. Int.* 2014(1), 761264. 10.1155/2014/761264
- Ramsay, R.G., Ciznadija, D., Vanevski, M., Mantamadiotis, T., 2003. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16(2), 59–67. 14552705
- Rhoden, K.J., Barnes, P.J., 1989. Effect of hydrogen peroxide on guinea-pig tracheal smooth muscle *in vitro*: role of cyclo-oxygenase and airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 98(1), 325. 10.1111/j.1476-5381.1989.tb16898.x
- Ricciardolo, F.L.M., Sterk, P.J., Gaston, B., Folkerts, G., 2004. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol. Rev.* 84(3), 731–765. 10.1152/physrev.00034.2003
- Ricciotti, E., Fitzgerald, G.A., 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31(5), 986–1000. 10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Rihák, V., Zatloukal, P., Chládková, J., Zimulová, A., Havlíková, Z., Chládek, J., 2010. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 24(5), 317–322. 10.1002/jcla.20408
- Sackesen, C., Ercan, H., Dizdar, E., Soyer, O., Gumus, P., Tosun, B.N., Büyüktuncer, Z., Karabulut, E., Besler, T., Kalayci, O., 2008. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122(1), 78–85. 10.1016/j.jaci.2008.03.035
- Sadeghi-Hashjin, G., Folkerts, G., Henricks, P.A.J., Muijsers, R.B.R., Nijkamp, F.P., 1998. Peroxynitrite in airway diseases. *Clin. Exp. Allergy* 28(12), 1464–1473. 10.1046/j.1365-2222.1998.00428.x
- Saeki, K., Yokomizo, T., 2017. Identification, signaling, and functions of LTB4 receptors. *Semin. Immunol.* 33, 30–36. 10.1016/j.smim.2017.07.010
- Sahiner, U.M., Birben, E., Erzurum, S., Sackesen, C., Kalayci, Ö., 2018. Oxidative stress in asthma: part of the puzzle. *Pediatr. Allergy Immunol.* 29(8), 789–800. 10.1111/pai.12965
- Salmon, M., Walsh, D.A., Huang, T.J., Barnes, P.J., Leonard, T.B., Hay, D.W., Chung, K.F., 1999. Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats. *Br. J. Pharmacol.* 127(5), 1151–1158. 10.1038/sj.bjp.0702669
- Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.Å., Rouzer, C.A., Serhan, C.N., 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237(4819), 1171–1176. 10.1126/science.2820055

DADOS NÃO PUBLICADOS

Schnackenberg, C.G., Wilcox, C.S., 2001. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney Int.* 59(5), 1859–1864. 10.1046/j.1523-1755.2001.0590051859.x

Sedik, A.A., Elgohary, R., Khalifa, E., Khalil, W.K.B., Shafey, H.I., Shalaby, M.B., Gouda, M.S.O., Tag, Y.M., 2024. Lauric acid attenuates hepato-metabolic complications and molecular alterations in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Toxicol. Mech. Methods* 34(4), 454–467. 10.1080/15376516.2023.2301344

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25 (1), 192–205. 10.1016/0003-2697(68)90092-4

Shabir, H., Kundu, S., Basir, S.F., Khan, L.A., 2014. Amelioration of lead-and cadmium-induced rat tracheal hypercontraction by linalool and eugenol. *Toxicol. Environ. Chem.* 96(2), 307–317. 10.1080/02772248.2014.931520

Shaheryar, Z.A., Khan, M.A., Hameed, H., Zaidi, S.A.A., Anjum, I., Rahman, M.S.U., 2023. Lauric acid provides neuroprotection against oxidative stress in mouse model of hyperglycaemic stroke. *Eur. J. Pharmacol.* 956, 175990. 10.1016/j.ejphar.2023.175990

Sherwin, C.M., Christiansen, S.B., Duncan, I.J., Erhard, H.W., Lay, D.C., Jr., Mench, J.A., O'Connor, C. E., Petherick, J. C., 2003. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 81, 291–305. S0168-1591(02)00288-5.

Sies, H., Belousov, V.V., Chandel, N.S., Davies, M.J., Jones, D.P., Mann, G.E., Murphy, M.P., Yamamoto, M., Winterbourn, C., 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23(7), 499–515. 10.1038/s41580-022-00456-z

Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. 10.1146/annurev-biochem-061516-045037

Sugiura, H.; Ichinose, M., 2008. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxid. Redox Signal.*, 10(4), 785-798. 10.1089/ars.2007.1937

Sousa, A.A.S., Soares, P.M.G., Almeida, A.N.S., Maia, A.R., Souza, E.P., Assreuy, A.M.S., 2010. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. *J. Ethnopharmacol.* 130(2), 433–436. 10.1016/j.jep.2010.05.012

Szarek, J.L., Schmidt, N.L., 1990. Hydrogen peroxide-induced potentiation of contractile responses in isolated rat airways. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 258(4), L232-L237. 10.1152/ajplung.1990.258.4.L232

Taylor, J.P., Hubert, M.T., 2021. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 48, 102159. 10.1016/j.redox.2021.102159

Uchida, Y., et al., 2019. Implications of prostaglandin D2 and leukotrienes in exhaled breath condensates of asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 123(1), 81–88.e1. 10.1016/j.anai.2019.04.008

Ueno, T., Kataoka, M., Hirano, A., Iio, K., Tanimoto, Y., Kanehiro, A., Okada, C., Soda, R., Takahashi, K., Tanimoto, M., 2008. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology* 13(5), 654–663. 10.1111/j.1440-1843.2008.01315.x

DADOS NÃO PUBLICADOS

Van Den Berg, M.P.M, Meurs, H., Gosens, R., 2018. Targeting arginase and nitric oxide metabolism in chronic airway diseases and their co-morbidities. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 40, 126-133. 10.1016/j.coph.2018.04.010.

Vasconcelos, L.H.C., Silva, M.C.C., Costa, A.C., Oliveira, G.A., Souza, I.L.L., Righetti, R.F., Queiroga, F.R., Cardoso, G.A., Silva, A.S., Silva, P.M., Vieira, G.C., Tibério, I.F.L.C., Madrugam, M.S., Cavalcante, F.A., Silva, B.A., 2020. Virgin coconut oil supplementation prevents airway hyperreactivity of guinea pigs with chronic allergic lung inflammation by antioxidant mechanism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020(1), 5148503. 10.1155/2020/5148503

Wang, B., Wang, Y., Zhang, J., Hu, C., Jiang, J., Li, Y., Peng, Z., 2023. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch. Toxicol.* 97(6), 1439–1451. 10.1007/s00204-023-03476-6

Yan, Z.Q., Hansson, G.K., Skoogh, B.E., Lötvall, J.O., 1995. Induction of nitric oxide synthase in a model of allergic occupational asthma. *Allergy* 50(9), 760–764. 10.1111/j.1398-9995.1995.tb01221.x

Yokomizo, T., Shimizu, T., 2023. The leukotriene B₄ receptors BLT₁ and BLT₂ as potential therapeutic targets. *Immunol. Rev.* 317(1), 30–41. 10.1111/imr.13196

Zaslona, Z., Peters-Golden, M., 2015. Prostanoids in asthma and COPD. *Chest* 148(5), 1300–1306. 10.1378/chest.15-1029

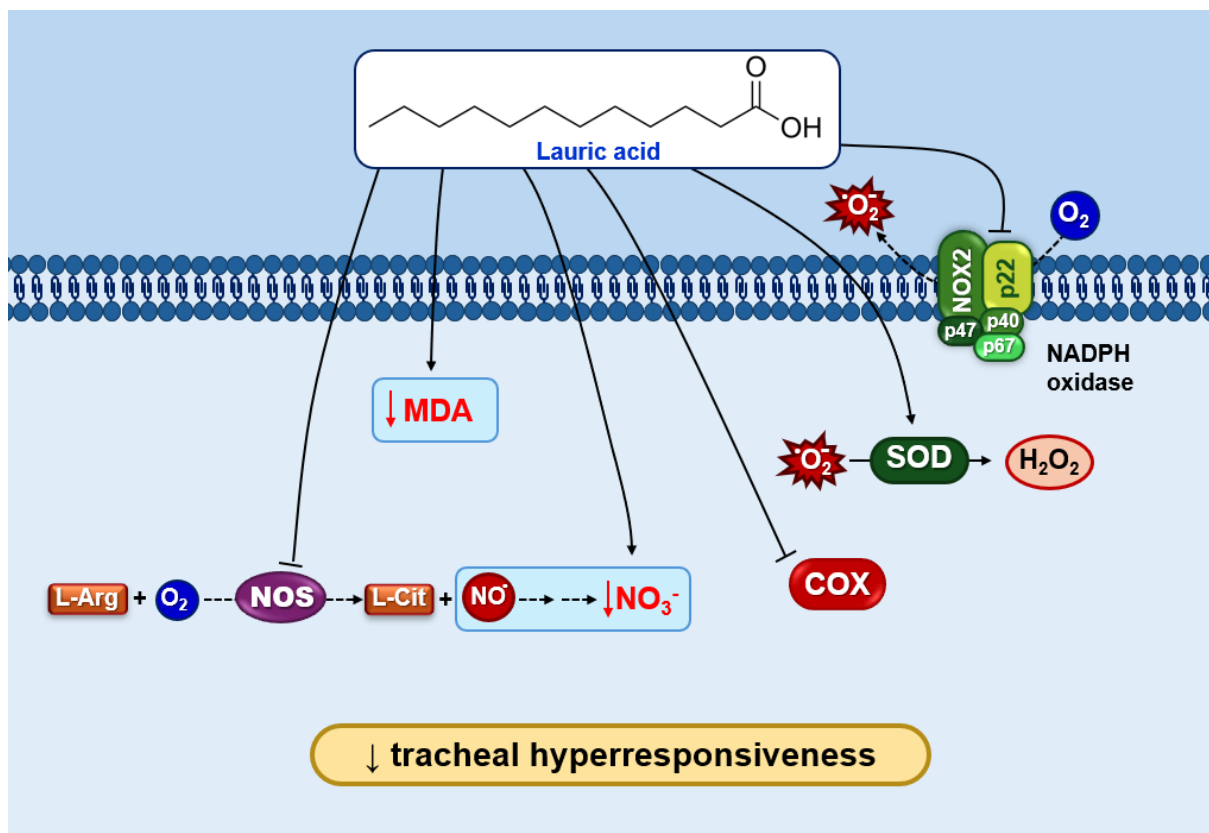
Zhang, Y., Liu, Y., Sun, J., Zhang, W., Guo, Z., Ma, Q., 2023. Arachidonic acid metabolism in health and disease. *MedComm* 4(5), e363. 10.1002/mco2.363

Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., Leung, S.W.S., 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129(2), 83–94. 10.1016/j.jphs.2015.09.002

Zuo, L., Koozechian, M.S., Chen, L.L., 2014. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 112(1), 18–22. 10.1016/j.anai.2013.10.007

DADOS NÃO PUBLICADOS

Graphical abstract



COX: cyclooxygenases; H₂O₂: hydrogen peroxide; L-Arg: L-arginine; L-Cit: L-citrulline; MDA: malondialdehyde; NO[•]: nitric oxide; NOS: nitric oxide synthase; NOX: NADPH oxidase; O₂^{•-}: superoxide anion; SOD: superoxide dismutase.

5.3 Artigo 3

DADOS NÃO PUBLICADOS**Lauric acid modulates the ROCK1 and TGF- β pathway to prevent tracheal hyperresponsiveness and lung parenchyma alterations in asthmatic Wistar rats**

Indyra Alencar Duarte Figueiredo^a, Alissa Maria de Oliveira Martins^a, Gabriel Nunes Machado de Oliveira^a, Adriano Francisco Alves^{a,b}, Luiz Henrique César Vasconcelos^{a,b*} and Fabiana de Andrade Cavalcante^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

^b Departamento de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil.

***CORRESPONDENTE**

Luiz Henrique César Vasconcelos

Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas

Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos

Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa/PB, Zip Code 58.051 970, Brazil.

E-mail: lhcv@academico.ufpb.br

Abstract

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, characterized by hyperresponsiveness, tissue remodeling, and airway lumen narrowing. As a potential adjuvant for asthma treatment, lauric acid (LA), or dodecanoic acid, has demonstrated a preventive effect on tracheal hyperresponsiveness in asthmatic rats by negatively modulating the cyclooxygenase pathway, nitric oxide signaling, and oxidative stress imbalance. Therefore, this study aimed to further characterize the mechanism of action of LA (25 mg/kg) and assess its effects on alterations in the lung parenchyma of asthmatic Wistar rats. Rats were randomly divided into the control group (CG), asthmatic group (AG), asthmatic groups treated with lauric acid at doses of 25, 50, or 100 mg/kg (ALA25G, ALA50G, and ALA100G, respectively), and the asthmatic group treated with dexamethasone at 5 mg/kg (ADEXAG). A reduction in tracheal contractility in response to CCh was observed in the ALA25G in the presence of Y-27632 and SB-431542, ROCK and type 1 TGF- β receptor inhibitors, respectively. Furthermore,

DADOS NÃO PUBLICADOS

treatment with LA at different doses reduced inflammatory infiltrate and excessive extracellular matrix deposition in the peribronchovascular space of the lung parenchyma. These findings suggest that LA may also negatively modulate the ROCK1 and TGF- β pathways, thereby exerting its preventive effect against tracheal hyperresponsiveness and preventing tissue remodeling in asthmatic rats.

Keywords: dodecanoic acid; pulmonary inflammation; remodeling; tracheal reactivity; ROCK1; TGF- β .

1. Introduction

In asthma, structural changes such as tissue remodeling occur, involving a complex reorganization of the cellular and molecular components of the airway walls. As part of the repair response to injury, inflammation triggers significant structural changes, including epithelial integrity loss, basal membrane thickening, subepithelial fibrosis, hyperplasia of mucous glands and goblet cells, hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle, and increased airway vascularization (Guida; Riccio, 2019).

The thickening of the reticular lamina is a hallmark of airway remodeling. This process involves the deposition of extracellular matrix proteins, primarily collagen types I, III, and V, fibronectin, and proteoglycans (Burgess, 2009; Busch; Lorenzana; Ryan, 2021). In particular, TGF- β , produced by epithelial cells, lymphocytes, macrophages, and eosinophils, is a key mediator responsible for airway remodeling (Hackett, 2012). TGF- β induces fibroblasts to express α -smooth muscle actin and adopt a myofibroblast phenotype, leading to increased deposition of extracellular matrix proteins in the lamina propria, reticular basement membrane, and submucosa (Batra et al., 2004; Kraik et al., 2024).

TGF- β can induce smooth muscle cell contraction through the activation of the RhoA/ROCK signaling pathways (Clements et al., 2005). Increased activation of RhoA/ROCK observed in asthmatic patients has been associated with airway hyperresponsiveness and remodeling (Zhang et al., 2020). RhoA is primarily activated by the α subunit of G_{12/13} proteins, which in turn triggers the activation of guanine nucleotide exchange factors (GEFs), leading to the activation of this monomeric protein (McDuffie; Panettieri; Scott, 2024). Once activated, RhoA stimulates its corresponding kinase, ROCK, a serine/threonine kinase (Leung et al., 1996; Matsui et al., 1996).

DADOS NÃO PUBLICADOS

Although ROCK directly phosphorylates myosin light chain (MLC) to sustain contraction (Totsukawa et al., 2000), its primary action appears to be the inhibition of myosin light chain phosphatase (MLCP). ROCK can also activate a Ca^{2+} -independent kinase, zipper-interacting protein kinase (ZIPK), which phosphorylates MLC and inhibits MLCP (Hagerty et al., 2007; McDuffie; Panettieri; Scott, 2024).

Thus, substances that inhibit the TGF- β and ROCK signaling pathways may represent potential therapeutic strategies for asthma management. In this context, lauric acid (LA), also known as dodecanoic acid, a medium-chain fatty acid, stands out. Previous studies by our research group have demonstrated that LA prevents tracheal hyperresponsiveness in an ovalbumin-induced asthma model in Wistar rats (Figueiredo et al., 2025) through mechanisms involving the inhibition of the cyclooxygenases and nitric oxide pathway, and a reduction in oxidative stress imbalance (Unpublished data). Based on this, this study aimed to evaluate the mechanism of action of lauric acid in modulating the TGF- β and ROCK pathways and its effect on pulmonary tissue remodeling.

2. Material and methods**2.1 Animals**

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 250 and 300 g, sourced from Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) and kept at the Animal Production Unit (UPA) of the Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) at the Universidade Federal da Paraíba (UFPB), were used. Animals were kept under controlled temperature conditions (22 ± 1 °C) and a 12 h light-dark cycle with free access to food and water. Experimental procedures were conducted following the principles of the guidelines for the ethical use of animals in applied etiology studies (Sherwin et al., 2003) and the Brazilian Guide for the Production, Maintenance, or Use of Animals in Educational or Scientific Research Activities by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) (Brasil, 2016). Experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of UFPB (n° 9310040522).

2.2 Chemicals

Sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), magnesium sulfate (MgSO_4), potassium phosphate (KH_2PO_4), calcium chloride (CaCl_2), glucose, sodium

DADOS NÃO PUBLICADOS

bicarbonate (NaHCO_3), hydrochloric acid (HCl), and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Êxodo Científica (Sumaré, Brazil).

Lauric acid, aluminum hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$), ovalbumin (OVA) (grade II and V), and carbamylcholine hydrochloride (CCh) were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo-SP, Brazil). The dihydrochloride of (R)-(+)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexane carboxamide (Y-27632) and hydrate of 4-(5-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)benzamide (SB-431542) were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, United States).

Anti- α -smooth muscle actin and anti-ROCK1 antibodies were purchased from Induslab Nordeste (Lauro de Freitas, BA, Brazil). Tween[®] 80 was obtained from Fischer BioReagents. Ketamine and xylazine were purchased from Syntec (Barueri, São Paulo, Brazil). The carbogenic mixture (95% O_2 and 5% CO_2) was purchased from White Martins (Brazil).

2.3 Equipment

To record isometric contractions, the organs were suspended in isolated organ baths (6 mL), model BOI-04, and connected to isometric force transducers, model TIM 05, coupled to an amplifier model AECAD04F. This, in turn, was connected to a digital acquisition system with AQCAD software version 2.5.0 for data acquisition and ANCAD for analysis. The system contained a thermostatic pump model BT 60 that controlled the temperature of the tanks. All equipment was purchased from AVS Projetos (São Paulo, Brazil).

For preparation of histological sections, the samples were processed using a tissue processor, model PT05 (LUPTEC, Brazil), sectioned with a rotary microtome, model RM 2125 RT (Leica, Germany), analyzed under an optical microscope (Motic BA 410), photographed using a Nikon Ds-Ri2 camera, and subsequently analyzed with image analysis software (KS 300 software).

2.4 Physiological solutions

For tracheal reactivity protocols, a Krebs nutrient solution was used in an organ bath, adjusted to pH 7.4 (with a solution of HCl or NaOH , 1 N), aerated with a carbogen mixture (95% O_2 and 5% CO_2) and maintained at 37 °C. It had the following composition in mM: NaCl (118.0), KCl (4.5), MgSO_4 (5.7), KH_2PO_4 (1.1), CaCl_2 (2.5), glucose (11.0), and NaHCO_3 (25.0).

DADOS NÃO PUBLICADOS**2.5 Experimental groups**

Rats were randomly divided into 5 experimental groups, with 5 male rats each: Control group (CG) = not sensitized and treated with NaCl 0,9% + Tween® 80; asthmatic group (AG) = sensitized with OVA and treated with NaCl 0,9% + Tween® 80; asthmatic lauric acid 25 (ALA25G), 50 (ALA50G), 100 (ALA100G) mg/kg group = sensitized with OVA and treated with 25, 50 or 100 mg/kg of lauric acid + Tween® 80; and asthmatic dexamethasone 5 mg/kg group (ADEXAG) = sensitized with OVA and treated with 5 mg/kg of dexamethasone.

Lauric acid was prepared as previously described by Figueiredo et al., 2025.

2.6 Asthma induction

For the sensitization protocol, on days 1–3 of the experiment, the animals received intraperitoneal (i.p.) injections of 1 mg/kg/day of ovalbumin (OVA) (grade V) solubilized in sterile NaCl 0.9% using 100 mg/mL of aluminum hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$) as an adjuvant. On days 6, 9, 12, 15, 18, and 21, the animals were individually placed in a closed polyacrylic chamber connected to an ultrasonic nebulizer. They were then challenged with 1% OVA (grade II) for up to 20 minutes daily. Non-sensitized animals underwent the same process but were administered only sterile NaCl 0.9% for both the i.p. injections and nebulizations.

All the animals were euthanized 24 hours after the last challenge with OVA or NaCl 0.9% (day 22). Throughout the asthma induction, the asthmatic group animals received daily doses of lauric acid intragastrically. The animals in the ADEXAG during the last 5 days of disease induction received 5 mg/kg/day of dexamethasone i.p., while the other groups received NaCl 0,9% via the same route (Salmon et al., 1999; adapted de Galvão et al., 2017; Figueiredo et al., 2025).

2.7 Obtaining trachea rings

Animals were euthanized with ketamine (180 mg/kg, i.p.) and xylazine (30 mg/kg, i.p.), followed by exsanguination. Trachea was then isolated, dissected, and cut into fragments containing 3 to 4 cartilaginous rings. These segments were individually suspended in an isolated organ bath (6 mL), containing Krebs nutrient solution. Preparations were kept at a temperature of 37 °C, gassed with carbogen, under tension of 1 g, and allowed to rest for 60 minutes, with the Krebs solution being

DADOS NÃO PUBLICADOS

changed every 15 minutes to avoid the influence of metabolites released by the organ into the medium.

2.8 Involvement of the ROCK and TGF- β pathways on the contractile mechanism of the changes induced by asthma and lauric acid of rat trachea

Trachea was set up as described previously. After the 60-minute stabilization period, when the baseline remained constant, a control cumulative concentration-response curve to CCh was obtained. After 30 minutes, the trachea was pre-incubated with Y-27632 (10^{-4} M), a ROCK inhibitor (Shibata et al., 2006); or SB-431542 (10^{-5} M), a type I TGF- β receptor inhibitor (Inman et al., 2002; adapted from Vasconcelos et al., 2024), for 30 minutes, followed by the induction of a new cumulative concentration-response curve to CCh.

Contractile response of the trachea in the presence of the inhibitors was calculated based on the average of the maximum amplitude of the CG. Contractile reactivity was assessed based on the $E_{\max}$ and EC_{50} values of CCh, and the effect of each inhibitor on the cumulative concentration-response curve to CCh was compared between CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of inhibitors.

2.9 Effect of the changes induced by asthma and lauric acid on lung morphology and immunohistochemistry

Lungs of the animals from the CG, AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG were collected and immediately fixed in 10% buffered formalin for 72 hours. Following fixation, standard histological processing was performed, including dehydration in ascending alcohol solutions (70 °GL to absolute alcohol) for 1 hour in each solution. Subsequently, samples were immersed twice in xylene baths for 1 hour each.

Tissues were embedded in paraffin and sectioned using a rotary microtome at a thickness of 4 μ m. Sections were mounted on histological slides, deparaffinized in xylene for 30 minutes, hydrated in descending alcohol concentrations (absolute, 90, 80, and 70 °GL) for 25 minutes, and washed in running water for 5 minutes, followed by distilled water. Samples were then stained with Harris hematoxylin for 1 minute, washed again in distilled water for 5 minutes, and counterstained with eosin for 3 minutes.

DADOS NÃO PUBLICADOS

Additionally, samples underwent staining with Masson's trichrome solution for 12 minutes, followed by a 30-second wash in running water. Slides were then dehydrated in ascending alcohol concentrations (70, 80, 90, and absolute°GL), cleared in xylene, and mounted with Entellan®. Prepared slides were analyzed using an optical microscope equipped with a Nikon Ds-Ri2 camera (Tokyo, Japan), and images were captured at a 40x objective magnification (Alves et al., 2019).

For immunohistochemical analysis, the samples were reactivated with a citrate retrieval solution at pH 6.0 (EasyPath Diagnósticos) in a Pascal pressurized chamber (Dako Cytomation, Denmark), and endogenous peroxidase was blocked for 30 minutes (EasyPath Diagnósticos). After this step, nonspecific protein blocking was performed, and the sections were incubated with a primary antibody against α -smooth muscle actin (Novus/NBP130894/Polyclonal Antibody; 1:100) and anti-ROCK1 (Novus/NBP182450/Polyclonal Antibody; 1:100). Subsequently, a biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit and anti-mouse biotinylated antibody at a 1:100 dilution, Link System-HRP-Dako 4061) was added. Reaction was visualized using a 0.024% diaminobenzidine (DAB-HRP) solution (EasyPath Diagnósticos) and counterstained with Harris hematoxylin.

2.10 Statistic analysis

Results were expressed as the percentage of the mean and the standard error of the mean (S.E.M.), and the E_{max} and EC_{50} were compared and analyzed statistically using Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test. The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$. All the data were analyzed using the GraphPad Prism® program 5.01 (Neubig et al., 2003).

3. Results

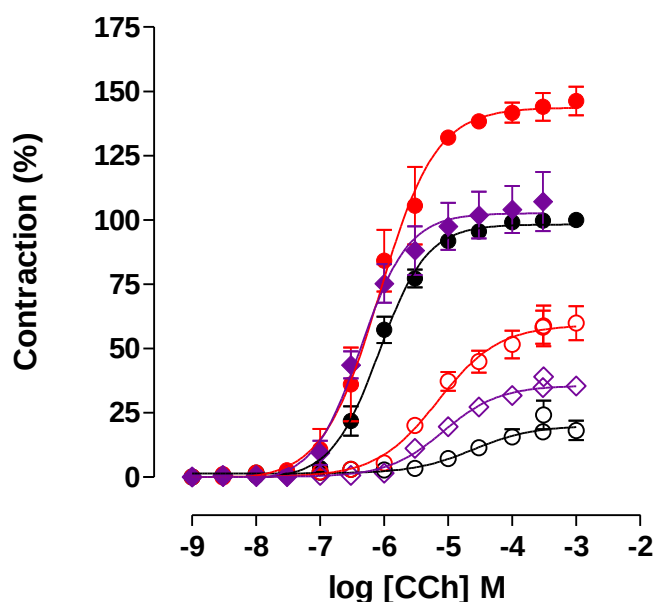
3.1 Participation of the RhoA-ROCK pathways on the contractile reactivity of rat trachea

In the CG, the cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) was altered in the presence of Y-27632, leading to a reduction in contractile efficacy and a rightward shift of the curve, with a decrease in potency by approximately 19-fold. In the AG, when comparing the cumulative concentration-response curve to CCh in the presence of the inhibitor, a reduction in efficacy was observed, along with a rightward shift of the curve and a decrease in potency by approximately 6-fold.

DADOS NÃO PUBLICADOS

Treatment with lauric acid at a dose of 25 mg/kg also induced changes in the cumulative concentration-response curve to CCh. In the presence of the inhibitor, there was a reduction in efficacy and a rightward shift of the curve, with a decrease in contractile potency by approximately 18-fold, preventing the reduction in inhibition observed in the AG (Figure 1, Table 1).

Figure 1 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of Y-27632, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 1 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of Y-27632.

Group	Y-27632	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	$22.7 \pm 4.0^*$	$1.8 \pm 0.3 \times 10^{-5*}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$59.9 \pm 6.6^{\#@}$	$7.2 \pm 0.9 \times 10^{-6\#}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	$35.8 \pm 1.2^{\&\$}$	$9.3 \pm 1.8 \times 10^{-6\&}$

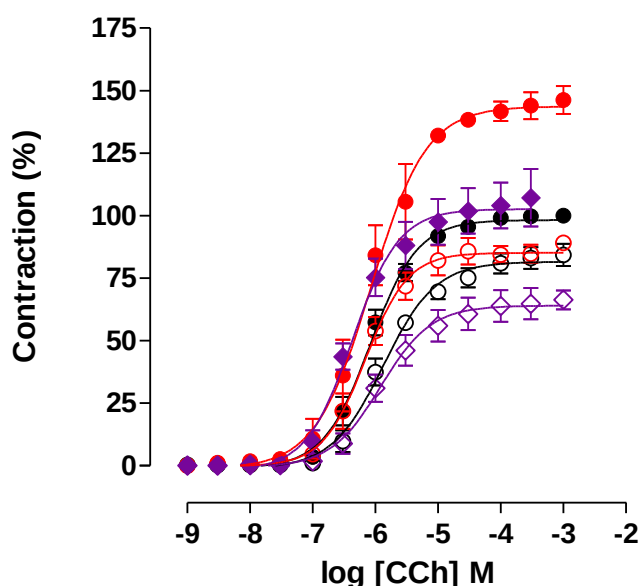
Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ and & $p < 0.05$ (absence vs. Y-27632) on CG, AG and ALA25G, respectively. @ $p < 0.05$ (CG presence vs. AG presence) and \$ $p < 0.05$ (AG presence vs. ALA25G presence).

DADOS NÃO PUBLICADOS

3.2 Involvement of the TGF- β pathways on the contractile reactivity of rat trachea

Cumulative concentration-response curve to CCh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the CG was reduced in the presence of SB-431542. Contractile reactivity of the trachea in AG animals was reduced in the presence of the inhibitor, showing lower efficacy but no change in potency. Similarly, in animals treated with lauric acid at a dose of 25 mg/kg, the cumulative concentration-response curve to CCh showed a reduction in contractile efficacy in the presence of SB-431542, with a decrease in contractile potency (Figure 2, Table 2).

Figure 2 – Cumulative concentration-response curves to CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence (●, ●, ◆) and presence (○, ○, ◇) of SB-431542, respectively.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively (n = 5).

Table 2 – $E_{\max}$ (%) and EC_{50} (M) values of CCh in rat trachea of CG, AG, and ALA25G in the absence and presence of SB-431542.

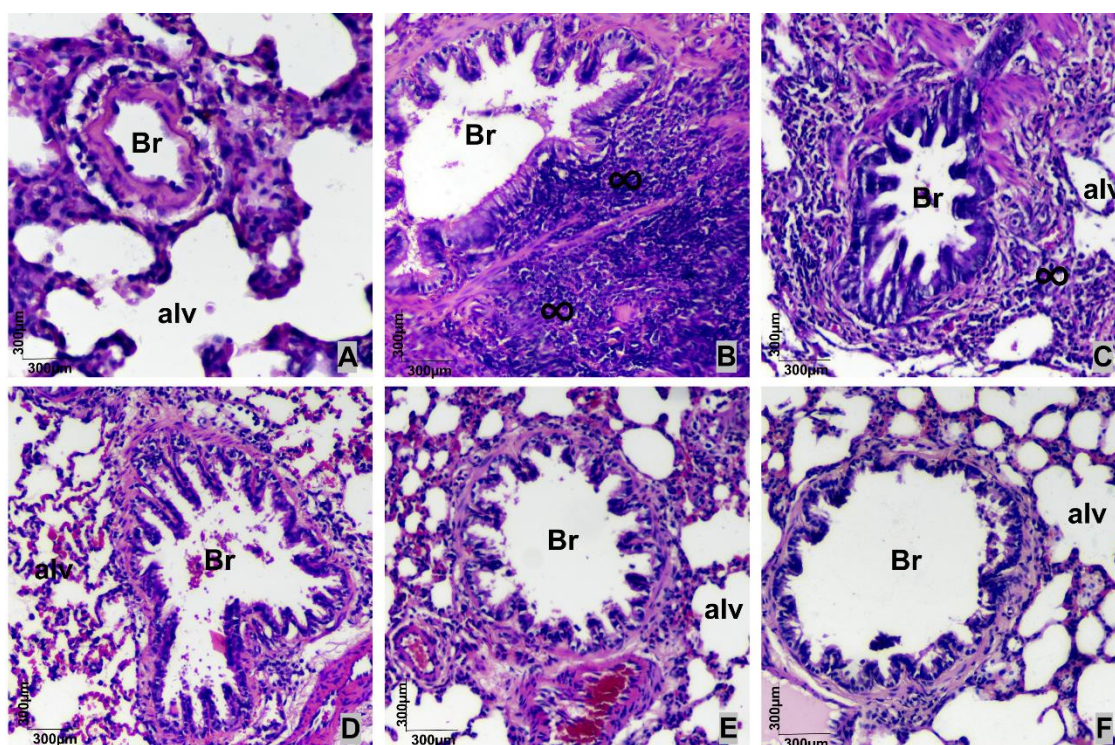
Group	SB-431542	$E_{\max}$ (%)	EC_{50} (M)
CG	Absence	100	$9.6 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
	Presence	84.2 ± 4.4	$1.7 \pm 0.5 \times 10^{-6}$
AG	Absence	146.3 ± 5.6	$1.3 \pm 0.6 \times 10^{-6}$
	Presence	$88.5 \pm 4.6^{\#}$	$8.2 \pm 1.5 \times 10^{-7}$
ALA25G	Absence	106.0 ± 9.0	$5.1 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
	Presence	$65.4 \pm 6.3^{\&}$	$1.4 \pm 2.3 \times 10^{-6\&}$

Data are expressed as the mean and S.E.M. ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 5). $^{\#}p < 0.05$ and $^{\&}p < 0.05$ (absence vs. SB-431542) on AG and ALA25G, respectively.

DADOS NÃO PUBLICADOS**3.3 Effect of lauric acid on anatomopathological changes in the lung parenchyma**

In the histological sections of pulmonary parenchyma stained with hematoxylin-eosin, the CG (Figure 3A) shows bronchioles with preserved epithelium, as well as alveoli with standard morphology. In the AG (Figure 3B), a marked peribronchiolar inflammatory infiltrate is observed, with an increased presence of mononuclear cells and a reduction in the lumen of bronchioles and alveoli. In the ALA25G (Figure 3C), peribronchiolar inflammatory infiltrate is still present, though less intense than in the AG. In contrast, the ALA50G (Figure 3D), ALA100G (Figure 3E), and ADEXAG (Figure 3F) exhibit air spaces with standard morphology, without alterations.

Figure 3 – Microphotography of the lung of rats of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) stained with hematoxylin-eosin.



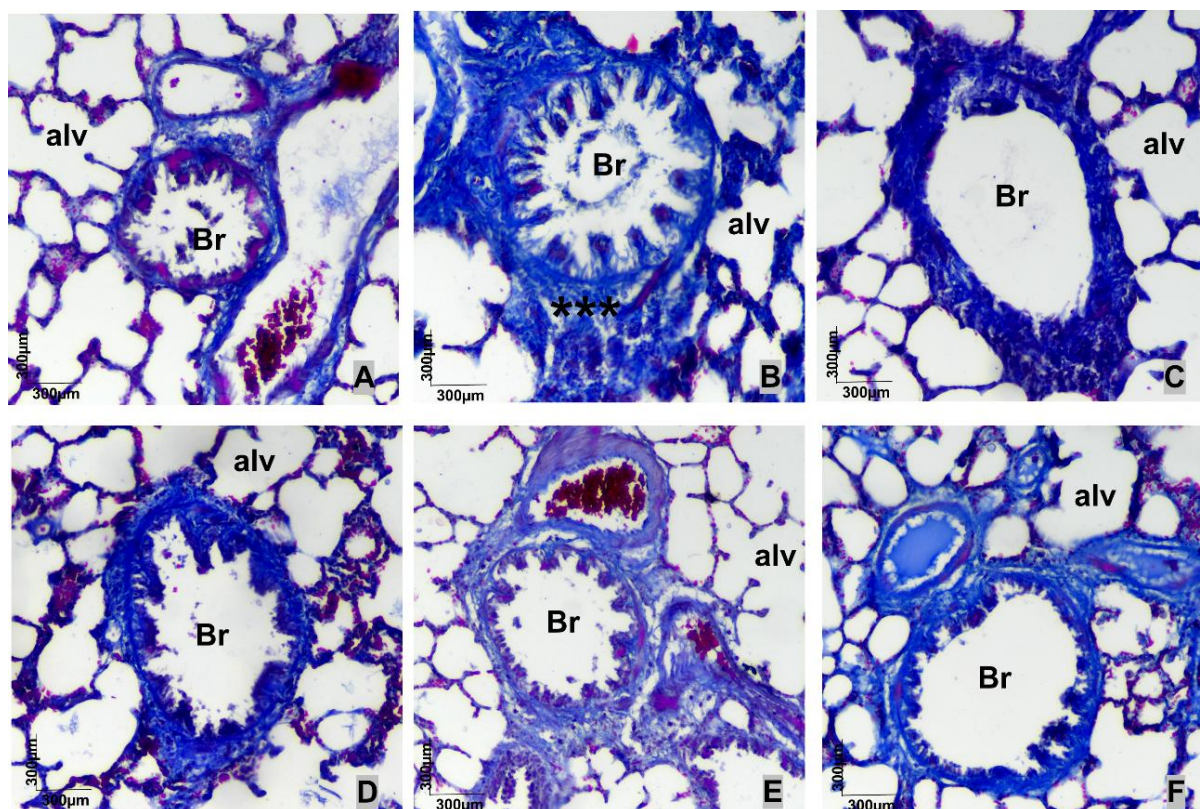
Alv: alveoli; Br: respiratory bronchioles; ∞: mononuclear inflammatory infiltrate.

In the histological sections of pulmonary parenchyma stained with Masson's trichrome, the extracellular matrix is visible in blue. In the CG (Figure 4A), the extracellular matrix displays a regular distribution, concentrating in areas such as the bronchioles, as well as the walls of blood vessels and interalveolar septa. In the AG (Figure 4B), there is intense matrix positivity, especially in peribronchovascular regions

DADOS NÃO PUBLICADOS

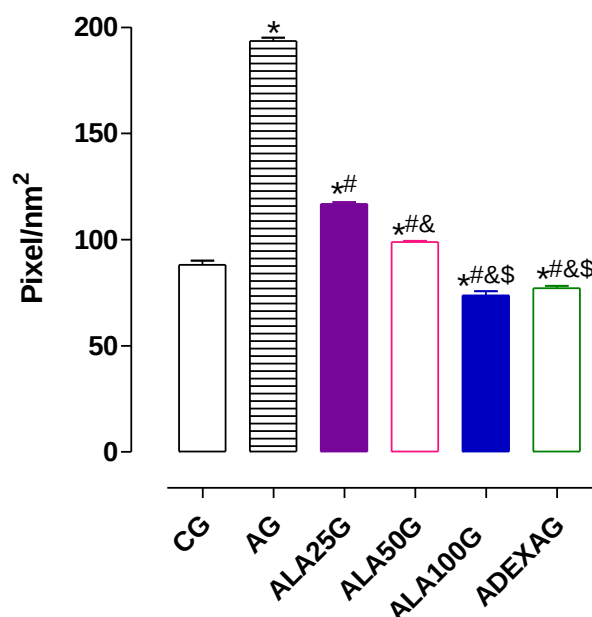
and areas of inflammatory infiltrate (***). However, treatment with AL at doses of 25 mg/kg (Figure 4C), 50 mg/kg (Figure 4D), and 100 mg/kg (Figure 4E) prevented these alterations, showing an extracellular matrix distribution similar to that observed in the CG, as well as in the ADEXAG (Figure 4F).

Figure 4 – Microphotography of the lung of rats of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F) stained with Masson's trichrome.



Alv: alveoli; Br: respiratory bronchioles; ***: extracellular matrix staining positivity.

Evaluating the remodeling area filled by the extracellular matrix (Figure 5), an increase is observed in the AG (193.5 ± 1.6 pixel/nm²) compared to the CG (88.2 ± 2.0 pixel/nm²). A reduction was observed in the ALA25G (116.8 ± 0.9 area/µm²), ALA50G (98.8 ± 0.5 pixel/nm²), ALA100G (73.8 ± 1.9 pixel/nm²), and ADEXAG (77.2 ± 1.1 pixel/nm²) when compared to the AG.

DADOS NÃO PUBLICADOS**Figure 5** – Morphometry of the lung of rats stained with Masson's trichrome.

Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 6). * $p < 0.05$ (CG vs. AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); & $p < 0.05$ (ALA25G vs. ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); \$ $p < 0.05$ (ALA50G vs. ALA100G and ADEXAG).

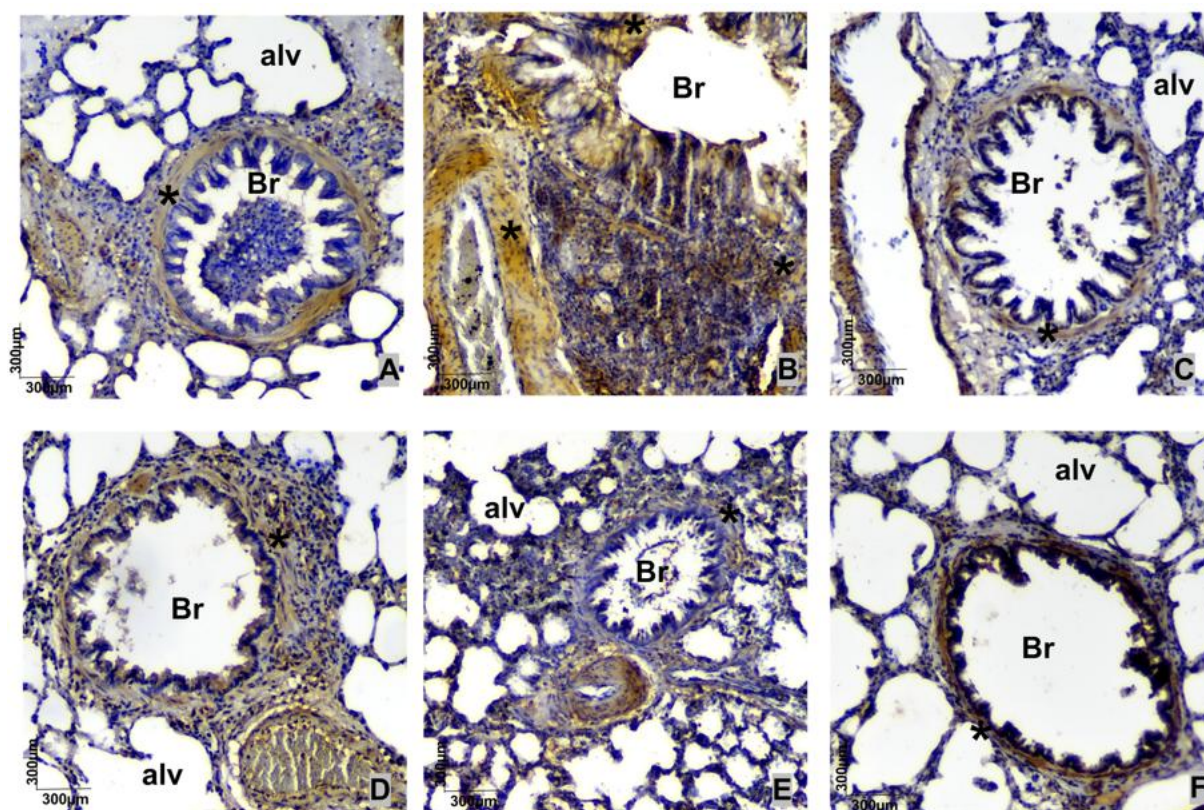
3.4 Effect of lauric acid on lung smooth muscle α -actin positivity

In the histological sections of the lung, using immunohistochemical staining for α -smooth muscle actin counterstained with hematoxylin, the CG (Figure 6A) showed brownish staining with a regular distribution, primarily concentrated in areas such as the bronchioles and the walls of blood vessels. In contrast, the AG (Figure 6B) exhibited intense staining positivity, especially in regions of inflammatory infiltrate (*). However, in the ALA25G (Figure 6C), ALA50G (Figure 6D), ALA100G (Figure 6E), and ADEXAG (Figure 6F), these alterations were prevented, with staining patterns similar to those observed in the CG (Figure 6A).

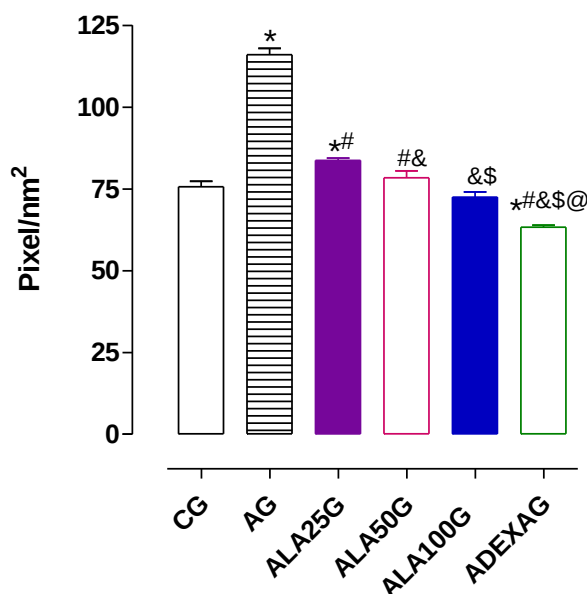
α -smooth muscle actin area (Figure 7) was increased in the AG (116.0 ± 1.9 pixel/nm²) compared to the CG (75.7 ± 1.6 pixel/nm²). In the ALA25G (83.7 ± 0.7 pixel/nm²), ALA50G (78.4 ± 2.2 pixel/nm²), ALA100G (72.5 ± 1.6 pixel/nm²), and ADEXAG (63.3 ± 0.6 pixel/nm²), this increase was prevented compared to the AG.

DADOS NÃO PUBLICADOS

Figure 6 – Immunohistochemistry images of the areas that tested positive for smooth muscle α -actin in the lungs of rats of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F).



Alv: alveoli; Br: respiratory bronchioles; *: inflammatory infiltrate.

DADOS NÃO PUBLICADOS**Figure 7** – Morphometry of immunohistochemistry of the areas that tested positive for α -smooth muscle actin in the lungs of rats.

Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test ($n = 6$). * $p < 0.05$ (CG vs. AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); & $p < 0.05$ (ALA25G vs. ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); \$ $p < 0.05$ (ALA50G vs. ALA100G and ADEXAG); @ $p < 0.05$ (ALA100G vs. ADEXAG).

3.5 Effect of lauric acid on lung ROCK1 positivity

In the histological sections of the lung, using immunohistochemical staining for ROCK1 counterstained with hematoxylin (Figure 8), the CG (A) showed a regular distribution marking, concentrating in areas such as bronchioles beyond the blood vessel wall. In contrast, the AG (B) exhibited intense positivity of marking observed, diffuse both in bronchioles and in the inflammatory infiltrate (*). However, the ALA25G (C) marking is also observed in bronchiolar regions. ALA50G (D), ALA100G (E), and ADEXAG (F), the changes observed in AG (B) were prevented, with staining patterns similar to those observed in the CG (A).

ROCK1 area (Figure 9) was increased in the AG (148.6 ± 4.2 pixel/nm²) compared to the CG (25.6 ± 2.2 pixel/nm²). In the ALA25G (62.2 ± 2.6 pixel/nm²), ALA50G (38.6 ± 1.4 pixel/nm²), ALA100G (39.4 ± 1.2 pixel/nm²), and ADEXAG (30.8 ± 1.3 pixel/nm²), this increase was prevented compared to the AG.

DADOS NÃO PUBLICADOS

Figure 8 – Immunohistochemistry images of the areas that tested positive for ROCK1 in the lungs of rats of CG (A), AG (B), ALA25G (C), ALA50G (D), ALA100G (E) and ADEXAG (F).

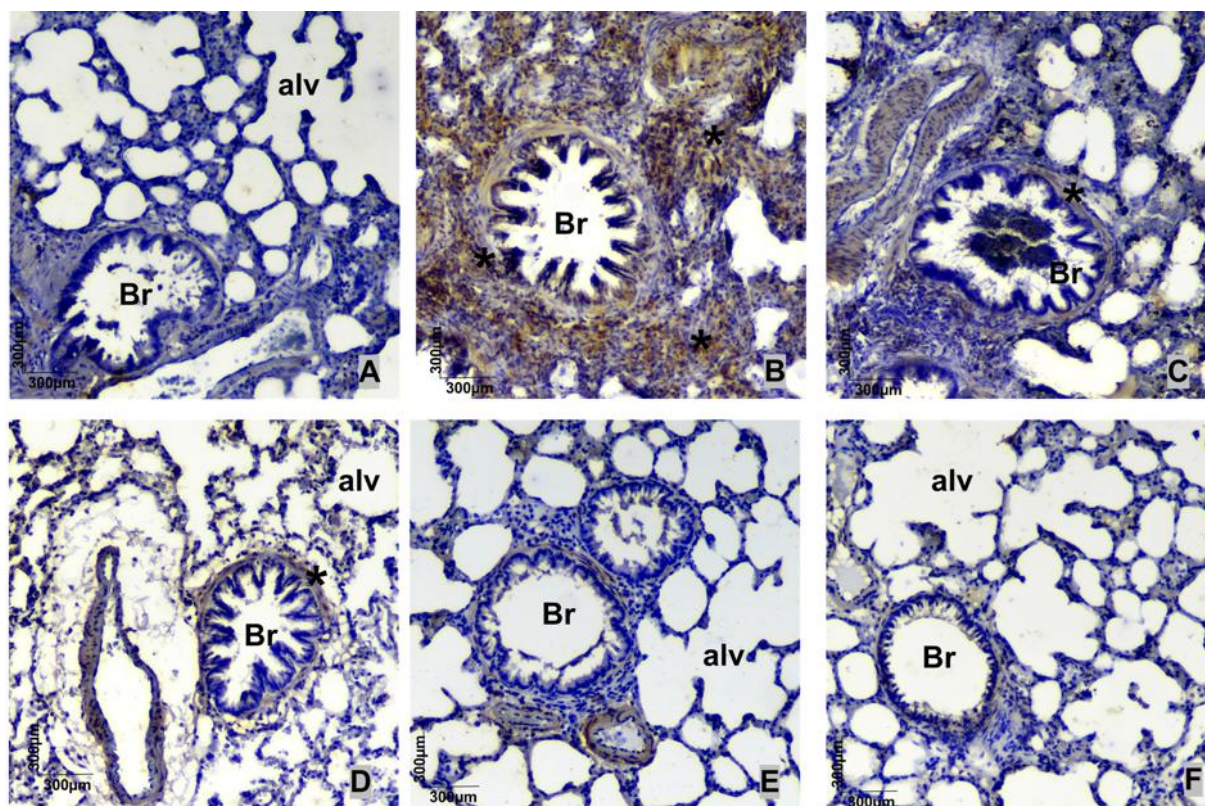
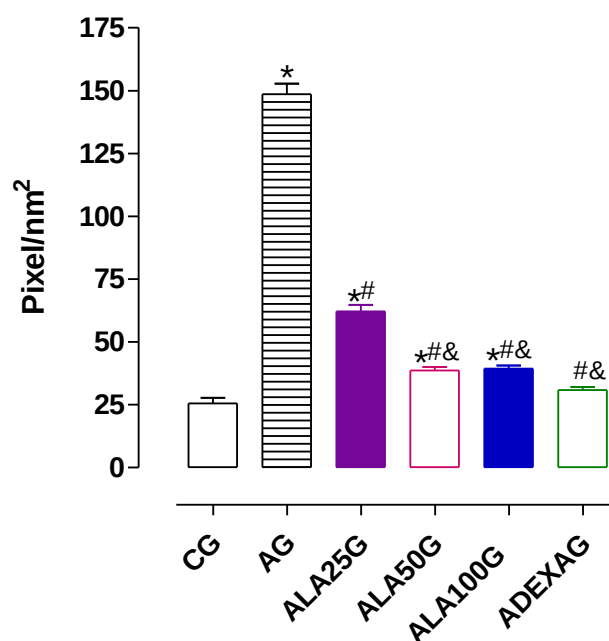


Figure 9 – Morphometry of immunohistochemistry of the areas that tested positive for ROCK1 in the lungs of rats.



Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M., respectively ANOVA one-way followed by Tukey's post hoc test (n = 6). * $p < 0.05$ (CG vs. AG, ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); # $p < 0.05$ (AG vs. ALA25G, ALA50G, ALA100G, and ADEXAG); & $p < 0.05$ (ALA25G vs. ALA50G, ALA100G, and ADEXAG).

DADOS NÃO PUBLICADOS**4. Discussion**

In this study, the characterization of the mechanism of action of lauric acid (LA) was further explored, highlighting the involvement of the ROCK1 and TGF- β pathways in the prevention of tracheal hyperresponsiveness in asthmatic Wistar rats. Additionally, the effects of different doses of LA on lung parenchymal remodeling were evaluated, demonstrating the prevention of increased inflammatory infiltration, extracellular matrix deposition, and smooth muscle layer thickening.

Data presented here complement previously published findings, which demonstrated the preventive effect of LA on pulmonary ventilation alterations and tracheal hyperresponsiveness to CCh (Figueiredo et al., 2025). These effects appear to occur through negative modulation of the cyclooxygenase (COX) and nitric oxide (NO) pathways, and oxidative stress imbalance (unpublished data). Moreover, *in silico* studies of LA were also performed previously, where an interaction between the compound and ROCK was observed, with binding energy values very similar to those obtained for Y-27632, a ROCK inhibitor, in its interaction with this protein (Figueiredo et al., 2025).

RhoA-ROCK pathway is considered one of the key contributors to airway hyperresponsiveness in asthma. In asthmatic individuals, it has been observed that the activation and expression of ROCK isoforms are increased, which is associated with airway hyperresponsiveness (Wang et al., 2020). Furthermore, studies suggest that the increased expression of this protein is also related to other features of asthma, such as remodeling, allergic inflammation, and dysfunction of the epithelial barrier in the airways (Chiba et al., 2005; Zhang et al., 2020).

In a murine model of asthma induced by OVA, it has been shown that inhibition of ROCK results in reduced pulmonary resistance and suppression of airway hyperresponsiveness (Witzenrath et al., 2008; Hashimoto et al., 2002; Possa et al., 2012). Similarly, in guinea pigs sensitized with OVA, ROCK inhibition reversed histamine- and PGF_{2 α} -induced airway hyperresponsiveness (Schaafsma et al., 2006). Additionally, in a chronic allergic airway inflammation model induced by OVA in guinea pig, ROCK inhibition led to a reduction in specific airway resistance, accompanied by a decrease in several inflammation and remodeling markers (Franova et al., 2023).

Building upon these premises, the involvement of the ROCK pathway in the mechanism of LA was evaluated using Y-27632, a ROCK inhibitor (Shibata et al., 2006), as a pharmacological tool. Upon analysis, it was observed that both the efficacy

DADOS NÃO PUBLICADOS

and contractile potency in the CG were reduced when the inhibitor was present, compared to the values obtained in its absence (Figure 1, Table 1). Interestingly, in the AG, a smaller reduction in efficacy was observed, with no change in contractile potency when compared to the CG in the presence of Y-27632. This led to the inference that, in this asthma model, there is an increase in the activity/expression of RhoA-ROCK, which interferes with the inhibition induced by the inhibitor.

Treatment with lauric acid at a dose of 25 mg/kg seems to prevent this increase in ROCK activity/expression, as evidenced by the reduction in both efficacy and potency of contractile reactivity to carbachol (CCh) in the presence of Y-27632, compared to the values obtained in the absence of the inhibitor, similar to what was observed in the CG (Figure 1, Table 1). These data suggest a likely negative modulation of the ROCK pathway in the preventive mechanism of lauric acid. These findings align with *in silico* studies of LA interacting with ROCK (Figueiredo et al., 2025).

ROCK activity and its effect on contraction in airway smooth muscle cells can be increased by TGF- β . Data suggest that TGF- β increases myosin light chain (MLC) phosphorylation and intracellular calcium levels through ROCK activation in airway smooth muscle cells stimulated with CCh (Ojiaku et al., 2018). Additionally, TGF- β increased bradykinin-induced contraction in rat bronchioles and phosphorylation of the myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) and MLC in airway smooth muscle cells (Shaifita et al., 2018). Together, these studies suggested a positive relationship between TGF- β signaling and RhoA-ROCK signaling that drives airway hyperresponsiveness in asthma.

Based on this, the involvement of the TGF- β pathway in the mechanism of lauric acid was evaluated. Pharmacological tool used was SB-431542, an inhibitor of TGF- β type I receptors (Inman et al., 2002). For the CG, no change in the efficacy or contractile potency of CCh was observed in the presence of the inhibitor (Figure 2, Table 2). However, in the AG, the contractile efficacy of CCh was reduced in the presence of SB-431542, compared to its absence. This indicates the increased tracheal hyperresponsiveness in this group may occur to the greater action of TGF- β , which in turn could stimulate activation of the RhoA-ROCK pathway.

In the ALA25G, a reduction in both efficacy and contractile potency in the presence of SB-431542 was also observed compared to its absence (Figure 2, Table 2). These data suggest that the negative modulation of the RhoA-ROCK pathway

DADOS NÃO PUBLICADOS

previously proposed for LA may also occur through a reduction in TGF- β action. These findings are in agreement with the *in silico* studies of LA, where an interaction between this compound and the TGF- β type 1 receptor was observed, with negative binding energy values, although higher when compared to those of SB-431542 (Figueiredo et al., 2025).

Studies have suggested that the RhoA-ROCK pathway may play a significant role in airway smooth muscle proliferation, and its inhibition has been considered a likely therapeutic approach for treating airway remodeling in asthma (Wei et al., 2014; Zhang et al., 2020). Additionally, TGF- β is one of the primary factors responsible for airway remodeling, inducing smooth muscle cell proliferation (Chen; Khalil, 2006; Goldsmith et al., 2006; Halwani et al., 2011) and increasing the expression of contractile proteins, such as calponin and α -smooth muscle actin (Goldsmith et al., 2006; Oenema et al., 2012).

Tissue remodeling process in this asthma model was confirmed through anatomopathological analysis of the lung parenchyma, where a pronounced inflammatory infiltrate was observed in histological sections stained with HE (Figure 3), in addition to intense deposition of extracellular matrix, as evidenced by Masson's trichrome (Figure 4 and 5) staining in the peribronchovascular regions in the AG compared to the CG. These alterations were prevented by treatment with LA at different doses and dexamethasone.

As previously reported, inflammation and the release of TGF- β induce airway remodeling, and this cytokine stimulates fibroblasts to express α -smooth muscle actin and adopt a myofibroblast phenotype, resulting in increased deposition of extracellular matrix proteins (Michalik et al., 2018). Furthermore, studies suggest that increased ROCK expression is also related to tissue remodeling in asthma (Chiba et al., 2005; Zhang et al., 2020).

Immunohistochemical staining of the lung for α -smooth muscle actin (Figures 6 and 7) reveals an increased number of myofibroblasts and thickening of the smooth muscle layer, suggesting hypertrophy in the AG compared to the CG, as evidenced by the intense brownish staining. These alterations were prevented by treatment with different doses of LA and dexamethasone. Furthermore, in the immunohistochemical staining of the lung for ROCK1 (Figures 8 and 9), an increase in the expression of this protein was observed in AG, which was prevented with treatment with LA at different doses, as well as with dexamethasone. These results corroborate what was previously

DADOS NÃO PUBLICADOS

observed, in which it was suggested that LA negatively modulates the ROCK pathway *in vitro*. Therefore, it is suggested that LA may prevent tissue remodeling alterations in Wistar rats with asthma.

5. Conclusions

The present study provides further insights into the mechanisms by which lauric acid exerts its protective effects against airway hyperresponsiveness and pulmonary remodeling in an experimental model of asthma in Wistar rats. Our findings corroborate previous evidence that LA modulates inflammatory and oxidative pathways, while also suggesting a potential role in the inhibition of the ROCK1 and TGF- β signaling pathways, which are known to play crucial roles in airway smooth muscle contraction and tissue remodeling.

6. Acknowledgment

The authors would like to thank Fapesq, Capes, and CNPq for their financial support and Pathology Laboratory/UFPB for their experimental support.

7. Funding

This research received specific funding from the Foundation for Research Support of the State of Paraíba - Fapesq (grant number 3158/2021) from Call for Proposals No. 09/2021.

8. Author contributions

Indyra Figueiredo: Investigation, Formal analysis, Data Curation, Writing - Original Draft. Alissa Martins and Gabriel Oliveira: Investigation. Adriano Alves: Investigation, Conceptualization and Resources. Luiz Henrique Vasconcelos and Fabiana Cavalcante: Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision and Project administration.

References

Alves, A. F., Pereira, R. A., Andrade, H. M., Mosser, D. M., Tafuri, W. L., 2019. Immunohistochemical study of renal fibropoiesis associated with dogs naturally and experimentally infected with two different strains of *Leishmania* (L.) *infantum*. *International Journal of Experimental Pathology*, 100(3), 222-233. <https://doi.org/10.1111/iep.12233>

DADOS NÃO PUBLICADOS

Batra, V., Musani, A. I., Hastie, A. T., Khurana, S., Carpenter, K. A., Zangrilli, J. G., Peters, S. P., 2004. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)- β 1, TGF- β 2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on α -smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(3), 437-444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01983.x>

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. 2016. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Disponível em: <www.antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/guia.html>. Accessed on: May 31, 2024.

Burgess, J. K., 2009. The role of the extracellular matrix and specific growth factors in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(1), 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.10.003>

Busch, S. M., Lorenzana, Z., Ryan, A. L., 2021. Implications for extracellular matrix interactions with human lung basal stem cells in lung development, disease, and airway modeling. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 645858. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.645858>

Chen, G., Khalil, N., 2006. TGF- β 1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respiratory Research*, 7(1), 1-10. 10.1186/1465-9921-7-2

Chiba, Y., Ueno, A., Shinozaki, K., Takeyama, H., Nakazawa, S., Sakai, H., Misawa, M., 2005. Involvement of RhoA-mediated Ca^{2+} sensitization in antigen-induced bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in mice. *Respiratory Research*, 6, 1-11. 10.1186/1465-9921-6-4

Clements, R. T., Minnear, F. L., Singer, H. A., Keller, R. S., Vincent, P. A., 2005. RhoA and Rho-kinase dependent and independent signals mediate TGF- β -induced pulmonary endothelial cytoskeletal reorganization and permeability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(2), L294-L306. 10.1152/ajplung.00334.2004

Figueiredo, J. A. D., Martins, A. M. O., Cavalcanti, A. M. T., Fernandes, J. M., Gomes, L. E. D. S., Vieira, M. M., Oliveira, G. N. M. D., Felício, I. M., Oliveira, L. N., Ramalho, I. G. D. S., Sousa, N. F. D., Scotti, L., Scotti, M. T., Alves, J. L. D. B., Diniz, M. F. F. M., Ximenes, D. I. J., Vasconcelos, L. H. C., Cavalcante, F. A., 2025. Repeated-Dose Toxicity of Lauric Acid and Its Preventive Effect Against Tracheal Hyper-Responsiveness in Wistar Rats with Possible *In Silico* Molecular Targets. *Pharmaceuticals*, 18(2), 221. 10.3390/ph18020221

Franova, S., Molitorisova, M., Kalmanova, L., Palencarova, J., Joskova, M., Smiesko, L., Mazerik, J., Sutovska, M., 2023. The anti-asthmatic potential of Rho-kinase inhibitor hydroxyfasudil in the model of experimentally induced allergic airway inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 938, 175450. 10.1016/j.ejphar.2022.175450

Galvão, J. G. F., Cavalcante-Silva, L. H. A., Carvalho, D. C. M., Ferreira, L. K. D., Monteiro, T. M., Alves, A. F., Ferreira, L. A. M. P., Gadelha, F. A. A. F., Piuvezam, M. R., Rodrigues-Mascarenhas, S., 2017. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. *Inflammation Research*, 66(12), 1117-1130. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1051-2>

DADOS NÃO PUBLICADOS

Goldsmith, A. M., Bentley, J. K., Zhou, L., Jia, Y., Bitar, K. N., Fingar, D. C., Hershenson, M. B., 2006. Transforming growth factor- β induces airway smooth muscle hypertrophy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 34(2), 247-254. 10.1165/rcmb.2005-0166OC

Guida, G., Riccio, A. M., 2019. Immune induction of airway remodeling. In: *Seminars in Immunology*, 46, 101346. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101346>

Hackett, T. L., 2012. Epithelial–mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(1), 53-59. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834a2e0d>

Hagerty, L., Weitzel, D. H., Chambers, J., Fortner, C. N., Brush, M. H., Loizelle, D., Haystead, T. A., 2007. ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4884-4893. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607676200>

Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., Hamid, Q., 2011. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 44(2), 127-133. 10.1165/rcmb.2010-0027TR

Hashimoto, K., Peebles, R. S. Jr., Sheller, J. R., Jarzecka, K., Furlong, J., Mitchell, D. B., Hartert, T. V., Graham, B. S., 2002. Suppression of airway hyperresponsiveness induced by ovalbumin sensitisation and RSV infection with Y-27632, a Rho kinase inhibitor. *Thorax*, 57(6), 524-527. 10.1136/thorax.57.6.524

Inman, G. J., Nicolas, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J., Hill, C. S. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular Pharmacology*, 62, 65-74. 10.1124/mol.62.1.65

Kraik, K., Tota, M., Laska, J., Łacwik, J., Paździerz, Ł., Sędek, Ł., Gomułka, K., 2024. The role of transforming growth factor- β (TGF- β) in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cells* 13, 1271. <https://doi.org/10.3390/cells13151271>

Leung, T., Chen, X. Q., Manser, E., Lim, L. 1996. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5313–5327. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5313>

Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Kaibuchi, K. 1996. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *The EMBO Journal*, 15(9), 2208–2216. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00574.x>

McDuffie, E. L., Panettieri Jr, R. A., Scott, C. P. 2024. G_{12/13} signaling in asthma. *Respiratory Research*, 25(1), 295. <https://doi.org/10.1186/s12931-024-02920-0>

Michalik, M., Wójcik-Pszczola, K., Paw, M., Wnuk, D., Koczurkiewicz, P., Sanak, M., Pękala, E., Madeja, Z., 2018. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(21), 3943-3961. 10.1007/s00018-018-2899-4

Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A. 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification.

DADOS NÃO PUBLICADOS

XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 55(4), 597-606. 10.1124/pr.55.4.4

Oenema, T. A., Smit, M., Smedinga, L., Racké, K., Halayko, A. J., Meurs, H., Gosens, R., 2012. Muscarinic receptor stimulation augments TGF- β 1-induced contractile protein expression by airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(7), L589-L597. 10.1152/ajplung.00400.2011

Ojiaku, C. A., Cao, G., Zhu, W., Yoo, E. J., Shumyatcher, M., Himes, B. E., An, S. S., Panettieri Jr, R. A., 2018. TGF- β 1 evokes human airway smooth muscle cell shortening and hyperresponsiveness via Smad3. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(5), 575-584. 10.1165/rcmb.2017-0247OC

Possa, S. S., Charafeddine, H. T., Righetti, R. F., da Silva, P. A., Almeida-Reis, R., Saraiva-Romanholo, B. M., Perini, A., Prado, C. M., Leick-Maldonado, E. A., Martins, M. A., et al., 2012. Rho-kinase inhibition attenuates airway responsiveness, inflammation, matrix remodeling, and oxidative stress activation induced by chronic inflammation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303, L939-L952. 10.1152/ajplung.00034.2012

Salmon, M., Walsh, D. A., Huang, T. J., Barnes, P. J., Leonard, T. B., Hay, D. W., Chung, K. F. 1999. Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats. *British Journal of Pharmacology*, 127(5), 1151-1158. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702669>

Schaafsma, D., Bos, I. S., Zuidhof, A. B., Zaagsma, J., Meurs, H., 2006. Inhalation of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 reverses allergen-induced airway hyperresponsiveness after the early and late asthmatic reaction. *Respiratory Research*, 7, 121. 10.1186/1465-9921-7-121

Shaifta, Y., MacKay, C. E., Irechukwu, N., O'Brien, K. A., Wright, D. B., Ward, J. P., Knock, G. A., 2018. Transforming growth factor- β enhances Rho-kinase activity and contraction in airway smooth muscle via the nucleotide exchange factor ARHGEF1. *The Journal of Physiology*, 596(1), 47-66. 10.1113/JP275033

Sherwin, C. M., Christiansen, S. B., Duncan, I. J.; Erhard, H. W.; Lay, D. C.; Mench, J. A., O'connor, C. E.; Petherick, J. C. 2003. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. *Applied Animal Behaviour Science*, 81 (3), 291-305. [https://doi.org/S0168-1591\(02\)00288-5](https://doi.org/S0168-1591(02)00288-5)

Shibata, O., Saito, M., Yoshimura, M., Yamaguchi, M., Nishioka, K., Makita, T., Sumikawa, K. 2006. Anticholinesterase drugs stimulate smooth muscle contraction of the rat trachea through the Rho-kinase pathway. *Anesthesia & Analgesia*, 102(4), 1121-1126. 10.1213/01.ane.0000198584.26710.68

Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D. J., Sasaki, Y., Matsumura, F. 2000. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 150(4), 797-806. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.4.797>

Vasconcelos, L. H. C., Silva, M. D. C. C., Costa, A. C., Oliveira, G. A., Souza, I. L. L., Silva Araújo, R., Alves, A. F., Cavalcante, F. A., Silva, B. A. 2024. Virgin coconut oil prevents airway remodeling and recovers tracheal relaxing reactivity by reducing

DADOS NÃO PUBLICADOS

transforming growth factor β expression on asthmatic guinea pig. *Journal of Functional Foods*, 122, 106544. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106544>

Wang, L., Chitano, P., Paré, P. D., Seow, C. Y., 2020. Upregulation of smooth muscle Rho-kinase protein expression in human asthma. *European Respiratory Journal*, 55(3), 1901785. 10.1183/13993003.01785-2019

Wei, B., Shang, Y. X., Li, M., Jiang, J., Zhang, H., 2014. Cytoskeleton changes of airway smooth muscle cells in juvenile rats with airway remodeling in asthma and the RhoA/ROCK signaling pathway mechanism. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 559-569. 10.4238/2014.January.22.2

Witzenrath, M., Ahrens, B., Schmeck, B., Kube, S. M., Hippenstiel, S., Rosseau, S., Hamelmann, E., Suttorp, N., Schütte, H., 2008. Rho-kinase and contractile apparatus proteins in murine airway hyperresponsiveness. *Experimental Toxicology and Pathology*, 60(1), 9-15. 10.1016/j.etp.2008.03.002

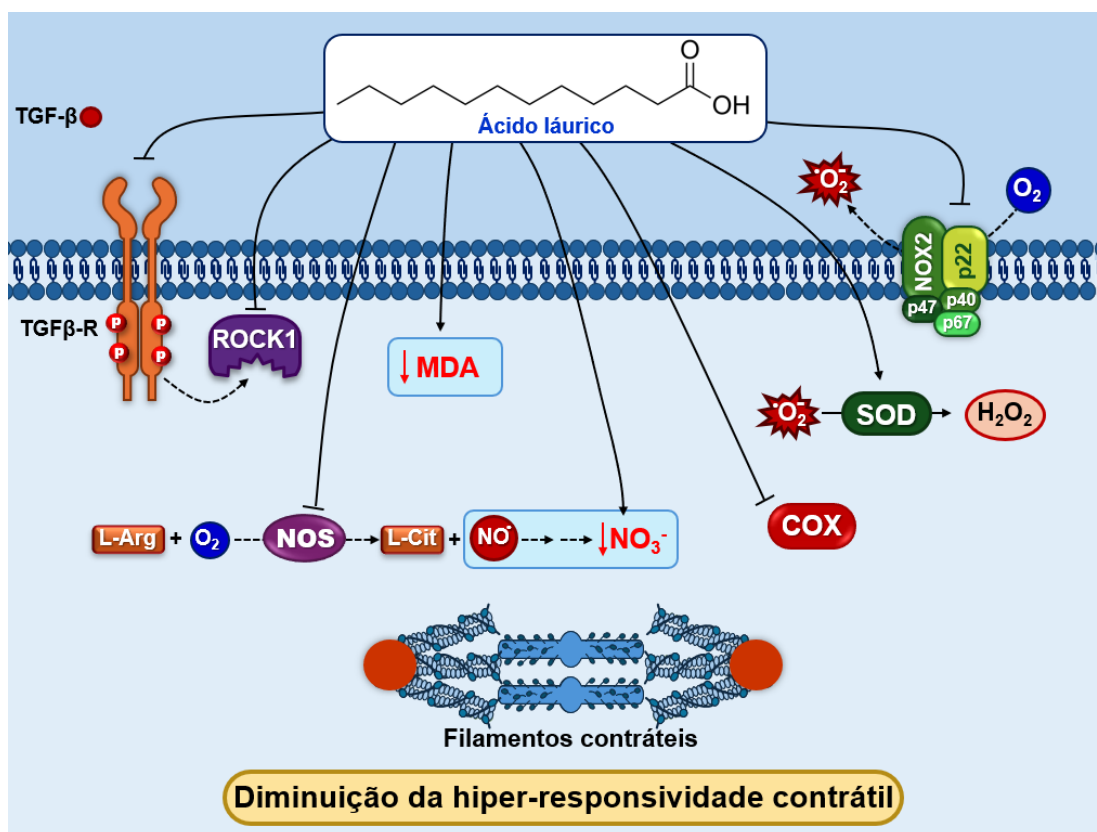
Zhang, Y., Saradna, A., Ratan, R., Ke, X., Tu, W., Do, D. C., Gao, P., 2020. RhoA/Rho-kinases in asthma: from pathogenesis to therapeutic targets. *Clinical & Translational Immunology*, 9(5), e1134. 10.1002/cti2.1134

6 Conclusões

Na avaliação sobre as alterações morfofuncionais das vias aéreas de ratos Wistar com asma alérgica, pode-se concluir que o ácido láurico (Figura 20):

- ✓ Apresenta baixa toxicidade na dose de 100 mg/kg, garantindo a segurança de utilização desta droga *in vivo*;
- ✓ Previne o aumento da hiper-responsividade das vias aéreas e as alterações anatomopatológicas pulmonares;
- ✓ Interage com diferentes alvos proteicos relacionados à inflamação e hiper-responsividade das vias aéreas *in silico*, como um composto *multitarget*;
- ✓ Exerce seu mecanismo de ação preventivo contra a hiper-responsividade e o remodelamento tecidual das vias aéreas por modular negativamente a via das cicloxigenases, do NO, da ROCK1 e do TGF- β , além do desbalanço do estresse oxidativo.

Figura 20 – Mapa conceitual dos principais mecanismos de ação do ácido láurico.



Referências

- ABDALA-VALENCIA, H.; EARWOOD, J.; BANSAL, S.; JANSEN, M.; BABCOCK, G.; GARVY, B.; COOK-MILLS, J. M. Nonhematopoietic NADPH oxidase regulation of lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness in experimentally induced asthma. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, n. 5, p. L1111-L1125, 2007.
- ABRAMOVITZ, M.; ADAM, M.; BOIE, Y.; CARRIÈRE, M. C.; DENIS, D.; GODBOUT, C.; LAMONTAGNE, S.; ROCHETTE, C.; SAWYER, N.; TREMBLAY, N. M.; BELLEY, M. The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1483, n. 2, p. 285-293, 2000.
- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; KIRKHAM, P. A. Strategies for improving the efficacy and therapeutic ratio of glucocorticoids. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 246-251, 2012.
- ADCOCK, I. M.; MUMBY, S. Glucocorticoids. In: Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds) **Encyclopedia of Molecular Pharmacology**. Springer, Cham, p. 704-714, 2022.
- AGACHE, I.; BELTRAN, J.; AKDIS, C.; AKDIS, M.; CANELO-AYBAR, C.; CANONICA, G. W.; CASALE, T.; CHIVATO, T.; CORREN, J.; DEL GIACCO, S.; EIWEGGER, T.; FIRINU, D.; GERN, J. E.; HAMELMANN, E.; HANANIA, N.; MÄKELÄ, M.; HERNÁNDEZ-MARTÍN, I.; NAIR, P.; O'MAHONY, L.; PAPADOPOULOS, N. G.; PAPI, A.; PARK, H.-S.; PÉREZ DE LLANO, L.; POSSO, M.; ROCHA, C.; QUIRCE, S.; SASTRE, J.; SHAMJI, M.; SONG, Y.; STEINER, C.; SCHWARZE, J.; ALONSO-COELLO, P.; PALOMARES, O.; JUTEL, M. Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab, mepolizumab, omalizumab and reslizumab) for severe eosinophilic asthma. A systematic review for the EAACI Guidelines-recommendations on the use of biologicals in severe asthma. **Allergy**, v. 75, n. 5, p. 1023-1042, 2020.
- ALBANO, G. D.; GAGLIARDO, R. P.; MONTALBANO, A. M.; PROFITA, M. Overview of the mechanisms of oxidative stress: impact in inflammation of the airway diseases. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2237, 2022.
- ALEX, E. A.; DUBO, A. B.; EJIOGU, D. C.; IYOMO, K. W.; JEROME, K. V.; AISHA, N. D.; DAIKWO, A. O.; YAHAYA, J.; OSIYEMI, R. O.; YARO, J. D. Evaluation of oral administration of lauric acid supplement on fasting blood glucose level and pancreatic histomorphological studies in high fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic male Wistar rats. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 11, n. 7, p. 1-7, 2020.
- ALEXANDER, S. P.; BENSON, H. E.; FACCENDA, E.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; SPEDDING, M.; PETERS, J. A.; HARMAR, A. J. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G protein-coupled receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 8, p. 1459-1581, 2013.
- ALMEIDA, R. N.; FACÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no SNC e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALVES, A. F.; PEREIRA, R. A.; ANDRADE, H. M.; MOSSER, D. M.; TAFURI, W. L. Immunohistochemical study of renal fibropoiesis associated with dogs naturally and

experimentally infected with two different strains of *Leishmania* (L.) *infantum*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 100, p. 222-233, 2019.

ALVES, N. F. B.; QUEIROZ, T. M.; TRAVASSOS, R. A.; MAGNANI, M.; BRAGA, V. A. Acute treatment with lauric acid reduces blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 4, p. 348-353, 2017.

AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; MORAND, S.; BOUCHER, J. L.; FRAPART, Y. M.; APOSTOLOU, D.; AGNANDJI, D.; GNIDEHOU, S.; OHAYON, R.; HUDSON, M. S. N.; FRANCON, J.; LALAOUI, K.; VIRION, A.; DUPUY, C. Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca^{2+} -dependent H_2O_2 -generating activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30046-30054, 2005.

ANDO, T.; KITAURA, J. Tuning IgE: IgE-associating molecules and their effects on IgE-dependent mast cell reactions. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1697, 2021.

ANDREADIS, A. A.; HAZEN, S. L.; COMHAIR, S. A.; ERZURUM, S. C. Oxidative and nitrosative events in asthma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 3, p. 213-225, 2003.

ANUAR, N. S.; SHAFIE, S. A.; MAZNAN, M. A. F.; ZIN, N. S. N. M.; AZMI, N. A. S.; RAOOF, R. A. Lauric acid improves hormonal profiles, antioxidant properties, sperm quality and histomorphometric changes in testis and epididymis of streptozotocin-induced diabetic infertility rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 470, p. 116558, 2023.

ARIMA, M.; FUKUDA, T. Prostaglandin D_2 receptors DP and CRTH2 in the pathogenesis of asthma. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 5, p. 365-375, 2008.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; SUPURAN, C. T. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

AUGUSTINE, B. D.; FARRAU, U.; OLUBIYI, M.; DANBOYI, T.; DAWUD, F. A.; UMAR, I. A. Lung oxidative and nitrosative changes in Type II diabetic male wistar rats treated with lauric acid. **Journal of Medical and Basic Scientific Research**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2022.

AUNG, H. H.; SIVAKUMAR, A.; GHOLAMI, S. K.; VENKATESWARAN, S. P.; GORAIN, B. An overview of the anatomy and physiology of the lung. **Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer**, p. 1-20, 2019.

AVERILL-BATES, D. A. The antioxidant glutathione. In: **Vitamins and Hormones**. Academic Press, v. 121, p. 109-141, 2023.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, n. 1, p. 360438, 2014.

BABU, S. V.; VEERESH, B.; PATIL, A. A.; WARKE, Y. B. Lauric acid and myristic acid prevent testosterone induced prostatic hyperplasia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, n. 2-3, p. 262-265, 2010.

BAENA-CAGNANI, C. E.; BADELLINO, H. A. Diagnosis of allergy and asthma in childhood. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 11, p. 71-77, 2011.

- BAI, Y.; EDELMANN, M.; SANDERSON, M. J. The contribution of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors to agonist-induced Ca^{2+} signaling of airway smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, n. 2, p. L347-L361, 2009.
- BANERJEE, E. R.; HENDERSON, W. R. Defining the molecular role of gp91phox in the immune manifestation of acute allergic asthma using a preclinical murine model. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 10, p. 1-14, 2012.
- BÁNFI, B.; TIRONE, F.; DURUSSEL, I.; KNISZ, J.; MOSKWA, P.; MOLNÁR, G. Z.; KRAUSE, K. H.; COX, J. A. Mechanism of Ca^{2+} activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18583-18591, 2004.
- BARLOW, J. L.; PEEL, S.; FOX, J.; PANOVA, V.; HARDMAN, C. S.; CAMELO, A.; BUCKS, C.; WU, X.; KANE, C. M.; NEILL, D. R.; FLYNN, R. J.; SAYERS, I.; HALL, I. P.; MCKENZIE, A. N. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 4, p. 933-941, 2013.
- BARNABAS, M.; AWAKAN, O. J.; ROTIMI, D. E.; AKANJI, M. A.; ADEYEMI, O. S. Exploring redox imbalance and inflammation for asthma therapy. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 9, p. 7851-7865, 2023.
- BARNES, P. J. Glucocorticoids. In: **History of allergy**. Karger Publishers, p. 311-316, 2014.
- BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DAGA, M.; DIANZANI, C.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G. P.; GIORDANO, J.; CUCCI, M. A.; GRAF, M.; GENTILE, F. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.
- BARRÍA, P.; HOLGUIN, F.; WENZEL, S. Asma severa en adultos: enfoque diagnóstico y tratamiento. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 26, n. 3, p. 267-275, 2015.
- BARTLETT JUNIOR, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, n. 3, p. 384-395, 1970.
- BATRA, V.; MUSANI, A. I.; HASTIE, A. T.; KHURANA, S.; CARPENTER, K. A.; ZANGRILLI, J. G.; PETERS, S. P. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)- β 1, TGF- β 2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on α -smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 34, n. 3, p. 437-444, 2004.
- BEASLEY, C. R.; ROBINSON, C.; FEATHERSTONE, R. L.; VARLEY, J. G.; HARDY, C. C.; CHURCH, M. K.; HOLGATE, S. T. 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F_2 , a novel metabolite of prostaglandin D_2 is a potent contractile agonist of human and guinea pig airways. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 3, p. 978-983, 1987.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

- BELLOU, V.; GOGALI, A.; KOSTIKAS, K. Asthma and tobacco smoking. **Journal of Personalized Medicine**, v. 12, n. 8, p. 1231, 2022.
- BELVISI, M. G. Overview of the innervation of the lung. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 211-215, 2002.
- BERGER, P.; MARTHAN, R.; TUNON DE LARA, J. M. The pathophysiological role of smooth muscle cells in bronchial inflammation. **Revue Des Maladies Respiratoires**, v. 19, n. 6, p. 778-794, 2002.
- BERNARD, K.; HECKER, L.; LUCKHARDT, T. R.; CHENG, G.; THANNICKAL, V. J. NADPH oxidases in lung health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2838-2853, 2014.
- BERNSTEIN, F.C.; KOETZLE, T.F.; WILLIAMS, G.J.B.; MEYER JR, E.F.; BRICE, M.D.; RODGERS, J.R.; KENNARD, O.; SHIMANOUCI, T.; TASUMI, M. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, n. 3, p. 535-542, 1977.
- BERRIDGE, M. J. Cell signalling pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, p. 1-130, 2012.
- BESNARD, A. G.; TOGBE, D.; GUILLOU, N.; ERARD, F.; QUESNIAUX, V.; RYFFEL, B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 6, p. 1675-1686, 2011.
- BIGATELLO, L.; PESENTI, A. Respiratory physiology for the anesthesiologist. **Anesthesiology**, v. 130, n. 6, p. 1064-1077, 2019.
- BILLINGTON, C. K.; OJO, O. O.; PENN, R. B.; ITO, S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 112-120, 2013.
- BLOM, L.; POULSEN, L. K. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4331-4337, 2012.
- BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.
- BOUCHERAT, O.; BOCZKOWSKI, J.; JEANNOTTE, L.; DELACOURT, C. Cellular and molecular mechanisms of goblet cell metaplasia in the respiratory airways. **Experimental Lung Research**, v. 39, n. 4-5, p. 207-216, 2013.
- BOURDIN, A.; BRUSSELLE, G.; COUILLARD, S.; FAJT, M. L.; HEANEY, L. G.; ISRAEL, E.; MCDOWELL, P. J.; MENZIES-GOW, A.; MARTIN, N.; MITCHELL, P. D.; PETOUSHI, N.; QUIRCE, S.; SCHLEICH, F.; PAVORD, I. D. Phenotyping of severe asthma in the era of broad-acting anti-asthma biologics. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, 2024.
- BRADDING, P.; PORSEBJERG, C.; CÔTÉ, A.; DAHLÉN, S. E.; HALLSTRAND, T. S.; BRIGHTLING, C. E. Airway hyperresponsiveness in asthma: the role of the epithelium. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 153, p. 1181-1193, 2024.
- BRAND, P. L.; BARALDI, E.; BISGAARD, H.; BONER, A. L.; CASTRO-RODRIGUEZ, J. A.; CUSTOVIC, A.; DE BLIC, J.; DE JONGSTE, J. C.; EBER, E.; EVERARD, M. L.; FREY, U.; GAPPA, M.; GARCIA-MARCOS, L.; GRIGG, J.; LENNEY, W.; LE SOUEF,

P. N.; MCKENZIE, S.; MERKUS, P. J. F. M.; MIDULLA, F.; POHUNEK, P.; ROSSI, G. A.; SAGLANI, S.; SEDDON, P.; SILVERMAN, M.; TEPPER, A.; TONIA, T.; VAN AALDEREN, W. M.; WILDHABER, J.; BUSH, A. Definition, assessment and treatment of wheezing disorders in preschool children: an evidence-based approach. **European Respiratory Journal**, v. 32, n. 4, p. 1096-1110, 2008.

BRAND-SABERI, B. E.; SCHÄFER, T. Trachea: anatomy and physiology. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2014.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica, 2016. Disponível em: <www.antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/guia.html>. Acesso em: 31 de maio de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Farmácia Popular. 2024a. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/farmacia-popular>>. Acesso em: 23 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) e de Mortalidade. 2024b. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/>>. Acesso em: 27 dez. 2024.

BREYER, R. M.; BAGDASSARIAN, C. K.; MYERS, S. A.; BREYER, M. D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 661-690, 2001.

BRIGHAM, E. P.; WEST, N. E. Diagnosis of asthma: diagnostic testing. In: **International Forum of Allergy & Rhinology**. 2015. p. S27-S30.

BURGESS, J. K. The role of the extracellular matrix and specific growth factors in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 122, n. 1, p. 19-29, 2009.

BUSCH, C. J.; BINDER, C. J. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 4, p. 398-406, 2017.

BUSCH, S. M.; LORENZANA, Z.; RYAN, A. L. Implications for extracellular matrix interactions with human lung basal stem cells in lung development, disease, and airway modeling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 645858, 2021.

BUTOLA, L. K.; DHOK, A.; AMBAD, R.; KANYAL, D.; JHA, R. K. Leukotrienes and inflammation—A review. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 295-301, 2021.

BUVA, K.; KUMBHAR, G. M.; DESHMUKH, A.; LADKE, V. S. The assessment of the mechanism of action of lauric acid in the context of oral cancer through integrative approach combining network pharmacology and molecular docking technology. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 21, n. 1, p. 101-112, 2024.

CAI, J.; ZHANG, Q. Y.; WEI, F. F.; HUANG, J. S.; FENG, Y. M.; MA, H. T. Preparation of copper (II) containing phosphomolybdic acid salt as catalyst for the synthesis of biodiesel by esterification. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 4, p. 427-432, 2018.

CALHOUN, W. J.; CHUPP, G. L. The new era of add-on asthma treatments: where do we stand?. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 18, n. 1, p. 42, 2022.

- CALVÉN, J.; AX, E.; RÅDINGER, M. The airway epithelium—A central player in asthma pathogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8907, 2020.
- CAMORETTI-MERCADO, B.; LOCKEY, R. F. Airway smooth muscle pathophysiology in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 6, p. 1983-1995, 2021.
- CANNING, B. J. Reflex regulation of airway smooth muscle tone. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 3, p. 971-985, 2006.
- CARAMORI, G.; NUCERA, F.; MUMBY, S.; BELLO, F. L.; ADCOCK, I. M. Corticosteroid resistance in asthma: Cellular and molecular mechanisms. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 85, p. 100969, 2022.
- CARROLL, O. R.; PILLAR, A. L.; BROWN, A. C.; FENG, M.; CHEN, H.; DONOVAN, C. Advances in respiratory physiology in mouse models of experimental asthma. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1099719, 2023.
- CARVALHO-PINTO, R. M.; CANÇADO, J. E. D.; PIZZICHINI, M. M. M.; FITERMAN, J.; RUBIN, A. S.; CERCI NETO, A.; CRUZ, A. A.; FERNANDES, A. L. G.; ARAUJO, A. M. S.; BLANCO, D. C.; CORDEIRO JUNIOR, G.; CAETANO, L. S. B.; RABAHI, M. F.; MENEZES, M. B.; OLIVEIRA, M. A.; LIMA, M. A.; PITREZ, P. M. Recomendações para o manejo da asma grave da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia-2021. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 47, p. e20210273, 2021.
- CHAND, N.; EYRE, P. The Schultz-Dale reaction. A review. **Agents & Actions**, v. 8, p. 171-184, 1978.
- CHATKIN, J.; CORREA, L.; SANTOS, U. External environmental pollution as a risk factor for asthma. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 62, n. 1, p. 72-89, 2022.
- CHEN, X. Q.; TAN, I.; NG, C. H.; HALL, C.; LIM, L.; LEUNG, T. 728 Characterization of RhoA-binding kinase ROKalpha implication of the pleckstrin 729 homology domain in ROKalpha function using region-specific antibodies. **Journal of Biology**, v. 730, p. 12680-12688, 2002.
- CHENG, J. B.; TOWNLEY, R. G. Pharmacological characterization of effects of nifedipine on isolated guinea-pig and rat tracheal smooth muscle. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 263, n. 2, p. 228-244, 1983.
- CHUNG, K. F.; CARAMORI, G.; ADCOCK, I. M. Inhaled corticosteroids as combination therapy with β -adrenergic agonists in airways disease: present and future. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, p. 853-871, 2009.
- CLAAR, D.; HARTERT, T. V.; PEEBLES JR, R. S. The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 9, n. 1, p. 55-72, 2015.
- CLAPP, L.; GIEMBYCZ, M.; HEINEMANN, A.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S.; NOREL, X.; SUGIMOTO, Y.; WOODWARD, D. F.; YAO, C. Prostanoid receptors in GtoPdb v.2023.1. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2023, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F58/2023.1>. Acesso em: 27 jan. 2025.
- COATES, A. L.; WANGER, J.; COCKCROFT, D. W.; CULVER, B. H.; CARLSEN, K.-H.; DIAMANT, Z.; GAUVREAU, G.; HALL, G. L.; HALLSTRAND, T. S.; HORVATH, I.;

DE JONGH, F. H. C.; JOOS, G.; KAMINSKY, D. A.; LAUBE, B. L.; LEUPPI, J. D.; STERK, P. J.; BUSH, A. ERS technical standard on bronchial challenge testing: general considerations and performance of methacholine challenge tests. **European Respiratory Journal**, v. 49, n. 5, 2017.

COCKCROFT, D. W.; MCPARLAND, C. P.; BRITTO, S. A.; SWYSTUN, V. A.; RUTHERFORD, B. C. Regular inhaled salbutamol and airway responsiveness to allergen. **The Lancet**, v. 342, n. 8875, p. 833-837, 1993.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Guidelines for Vitamin and Mineral Food Supplements (CAC/GL 55 - 2005)**, Food and Agricultural Organization of the United Nations and the World Health Organization: Rome, Italy, 2005.

COLEMAN, R. A.; SHELDRIK, R. L. G. Prostanoid-induced contraction of human bronchial smooth muscle is mediated by TP-receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 688-692, 1989.

COMHAIR, S. A.; BHATHENA, P. R.; DWEIK, R. A.; KAVURU, M.; ERZURUM, S. C. Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. **The Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 624, 2000.

CORDIANO, R.; DI GIOACCHINO, M.; MANGIFESTA, R.; PANZERA, C.; GANGEMI, S.; MINCIULLO, P. L. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy-oriented diseases: an update. **Molecules**, v. 28, n. 16, p. 5979, 2023.

COSTA, K. S.; TAVARES, N. U. L.; MENGUE, S. S.; PEREIRA, M. A.; MALTA, D. C.; SILVA JÚNIOR, J. B. D. Obtenção de medicamentos para hipertensão e diabetes no Programa Farmácia Popular do Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 1, p. 33-44, 2016.

CRAPO, R. O.; CASABURI, R.; COATES, A. L.; ENRIGHT, P. L.; HANSON, F. H.; IRVIN, C. G.; MACINTYRE, N. R.; MCFADDEN, E. R.; WAGNER, J. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 309-329, 2000.

DALEY-YATES, P. T. Inhaled corticosteroids: potency, dose equivalence and therapeutic index. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 3, p. 372-380, 2015.

DANVERS, L.; LO, D. K. H.; GAILLARD, E. A. The role of objective tests to support a diagnosis of asthma in children. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 33, p. 52-57, 2020.

DAYRIT, F. M. The properties of lauric acid and their significance in coconut oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 92, n. 1, p. 1-15, 2015.

DE BOER, J.; MEURS, H.; FLENDRIG, L.; KOOPAL, M.; ZAAGSMA, J. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 8, p. 1235-1242, 2001.

DE RAEVE, H. R.; THUNNISSEN, F. B.; KANEKO, F. T.; GUO, F. H.; LEWIS, M.; KAVURU, M. S.; SECIC, M.; THOMASSEN, M. J.; ERZURUM, S. C. Decreased Cu, Zn-SOD activity in asthmatic airway epithelium: correction by inhaled corticosteroid *in*

vivo. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 272, n. 1, p. L148-L154, 1997.

DEEN, A.; VISVANATHAN, R.; WICKRAMARACHCHI, D.; MARIKKAR, N.; NAMMI, S.; JAYAWARDANA, B. C.; LIYANAGE, R. Chemical composition and health benefits of coconut oil: an overview. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 6, p. 2182-2193, 2021.

DEVECI, F.; ILHAN, N.; TURGUT, T.; AKPOLAT, N.; KIRKIL, G.; MUZ, M. H. Glutathione and nitrite in induced sputum from patients with stable and acute asthma compared with controls. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, n. 1, p. 91-97, 2004.

DI MEO, S.; REED, T. T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V. M. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. **Oxidative medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, p. 1245049, 2016.

DOLGACHEV, V.; BERLIN, A. A.; LUKACS, N. W. Eosinophil activation of fibroblasts from chronic allergen-induced disease utilizes stem cell factor for phenotypic changes. **The American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 68-76, 2008.

DONG, F.; WANG, C.; DUAN, J.; ZHANG, W.; XIANG, D.; LI, M. PUERARIN attenuates ovalbumin-induced lung inflammation and hemostatic unbalance in rat asthma model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

DORAN, E.; CAI, F.; HOLWEG, C. T.; WONG, K.; BRUMM, J.; ARRON, J. R. Interleukin-13 in asthma and other eosinophilic disorders. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 139, 2017.

DORRIS, S. L.; PEEBLES JR, R. S. PGI₂ as a regulator of inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, n. 1, p. 926968, 2012.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G.; DOUGAN, S. K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 796-811, 2019.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DU, W.; MCMAHON, T. J.; ZHANG, Z. S.; STIBER, J. A.; MEISSNER, G.; EU, J. P. Excitation-contraction coupling in airway smooth muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30143-30151, 2006.

Du, X.; Zhi, J.; Yang, D.; Wang, Q.; Luo, X.; Deng, X. Research progress in the mechanism of calcium ion on contraction and relaxation of airway smooth muscle cells. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 41, n. 2, p. 117-122, 2021.

DU, X.; ZHI, J.; YANG, D.; WANG, Q.; LUO, X.; DENG, X. Research progress in the mechanism of calcium ion on contraction and relaxation of airway smooth muscle cells. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 41, n. 2, p. 117-122, 2021.

DUBO, A. B.; DAWUD, F. A.; UMAR, I. A.; ALEX, E. A.; BAIYEKUSI, S.; FARRA'U, U. Lauric acid alleviates inflammation and structural changes in the lungs of type II diabetic male Wistar rats. **Journal of African Association of Physiological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 88-96, 2019.

DUGUET, A.; IJIMA, H.; EUM, S. Y.; HAMID, Q.; EIDELMAN, D. H. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in

mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 7, p. 1119-1126, 2001.

DUNICAN, E. M.; ELICKER, B. M.; GIERADA, D. S.; NAGLE, S. K.; SCHIEBLER, M. L.; NEWELL, J. D.; RAYMOND, W. W.; LACHOWICZ-SCROGGINS, M. E.; DI MAIO, S.; HOFFMAN, E. A.; CASTRO, M.; FAIN, S. B.; JARJOUR, N. N.; ISRAEL, E.; LEVY, B. D.; ERZURUM, S. C.; WENZEL, S. E.; MEYERS, D. A.; BLEECKER, E. R.; PHILLIPS, B. R.; MAUGER, D. T.; GORDON, E. D.; WOODRUFF, P. G.; PETERS, M. C.; FAHY, J. V. Mucus plugs in patients with asthma linked to eosinophilia and airflow obstruction. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 3, p. 997-1009, 2018.

DWEIK, R. A.; COMHAIR, S. A.; GASTON, B.; THUNNISSEN, F. B.; FARVER, C.; THOMASSEN, M. J.; KAVURU, M.; HAMMEL, J.; ABU-SOUD, H. M.; ERZURUM, S. C. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2622-2627, 2001.

EBINA, M.; TAKAHASHI, T.; CHIBA, T.; MOTOMIYA, M. Cellular hypertrophy and hyperplasia of airway smooth muscle underlying bronchial asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 148, n. 720, p. 6, 1993.

ENGELBRECHT, A. M.; DU TOIT-KOHN, J. L.; ELLIS, B.; THOMAS, M.; NELL, T.; SMITH, R. Differential induction of apoptosis and inhibition of the PI3-kinase pathway by saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in a colon cancer cell model. **Apoptosis**, v. 13, n. 11, p. 1368-1377, 2008.

ERCAN, H.; BIRBEN, E.; DIZDAR, E. A.; KESKIN, O.; KARAASLAN, C.; SOYER, O. U.; DUT, R.; SACKESSEN, C.; BESLER, T.; KALAYCI, O. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 5, p. 1097-1104, 2006.

EYRES, L.; EYRES, M. F.; CHISHOLM, A.; BROWN, R. C. Coconut oil consumption and cardiovascular risk factors in humans. **Nutrition Reviews**, v. 74, n. 4, p. 267-280, 2016.

FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57-65, 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, 2015.

FEHRENBACH, H.; WAGNER, C.; WEGMANN, M. Airway remodeling in asthma: what really matters. **Cell and Tissue Research**, v. 367, p. 551-569, 2017.

FIGUEIREDO, I. A. D.; FERREIRA, S. R. D.; FERNANDES, J. M.; SILVA, B. A. D.; VASCONCELOS, L. H. C.; CAVALCANTE, F. D. A. A review of the pathophysiology and the role of ion channels on bronchial asthma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1236550, 2023.

FITZHUGH, O. G.; SCHOUBOE, P. J.; NELSON, A. A. Oral toxicities of lauric acid and certain lauric acid derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 59-67, 1960.

FITZPATRICK, A. M.; TEAGUE, W. G.; HOLGUIN, F.; YEH, M.; BROWN, L. A. S.; PROGRAM, S. A. R. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe

- asthma: evidence for oxidant stress. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 1, p. 146-152. e8, 2009.
- FORMANEK, W.; INCI, D.; LAUENER, R. P.; WILDHABER, J. H.; FREY, U.; HALL, G. L. Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease. **European Respiratory Journal**, v. 19, n. 3, p. 487-491, 2002.
- FORNO, E.; BRANDENBURG, D. D.; CASTRO-RODRIGUEZ, J. A.; CELIS-PRECIADO, C. A.; HOLGUIN, F.; LICSKAI, C.; LOVINSKY-DESIR, S.; PIZZICHINI, M.; TEPPER, A.; YANG, C.; CELEDÓN, J. C. Asthma in the Americas: an update: A joint perspective from the Brazilian Thoracic Society, Canadian Thoracic Society, Latin American Thoracic Society, and American Thoracic Society. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 19, n. 4, p. 525-535, 2022.
- FREY, A.; LUNDING, L. P.; EHLERS, J. C.; WECKMANN, M.; ZISSLER, U. M.; WEGMANN, M. More than just a barrier: the immune functions of the airway epithelium in asthma pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 761, 2020.
- FUKUMOTO, Y.; KAIBUCHI, K.; HORI, Y.; FUJIOKA, H.; ARAKI, S.; UEDA, T.; TAKAI, Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. **Oncogene**, v. 5, n. 9, p. 1321-1328, 1990.
- GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 693-704, 2012.
- GALVÃO, J. G. F.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CARVALHO, D. C. M.; FERREIRA, L. K. D.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; FERREIRA, L. A. M. P.; GADELHA, F. A. A. F.; PIUVEZAM, M. R.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 12, p. 1117-1130, 2017.
- GARN, H.; RENZ, H. GATA-3-specific DNase—A novel approach for stratified asthma therapy. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 1, p. 22-30, 2017.
- GAUVREAU, G. M.; BERGERON, C.; BOULET, L. P.; COCKCROFT, D. W.; CÔTÉ, A.; DAVIS, B. E.; LEIGH, R.; MYERS, I.; O'BYRNE, P. M.; SEHMI, R. Sounding the alarm—the role of alarmin cytokines in asthma. **Allergy**, v. 78, n. 2, p. 402-417, 2023.
- GAUVREAU, G. M.; WATSON, R. M.; O'BYRNE, P. M. Protective effects of inhaled PGE₂ on allergen-induced airway responses and airway inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 1, p. 31-36, 1999.
- GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51715-51718, 2004.
- GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Modulation of asthma pathogenesis by nitric oxide pathways and therapeutic opportunities. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 9, n. 3-4, p. e89-e94, 2012.
- GIL, L. M.; DE LA CRUZ, Ó. A.; BLASCO, J. L.; BARCELONA, S. Asma: aspectos clínicos y diagnósticos. **Protocolos Diagnósticos y Terapéuticos en Pediatría**, v. 2, p. 103-115, 2019.
- GINA (GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA). 2024. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Disponível em: <www.ginasthma.org>. Acesso em: 27 dez. 2024.

- GOHAL, G.; MONI, S. S.; BAKKARI, M. A.; ELMOBARK, M. E. A Review on Asthma and Allergy: Current Understanding on Molecular Perspectives. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 19, p. 5775, 2024.
- GOSENS, R.; GROSS, N. The mode of action of anticholinergics in asthma. **European Respiratory Journal**, v. 52, n. 4, 2018.
- GOUR, N.; WILLS-KARP, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 68-78, 2015.
- GOWTHAMAN, U.; CHEN, J. S.; ZHANG, B.; FLYNN, W.F.; LU, Y.; SONG, W.; JOSEPH, J.; GERTIE, J. A.; XU, L.; COLLET, M. A. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. **Science**, v. 365, n. 6456, p. eaaw6433, 2019.
- GREEN L, GOLDMAN P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56–58, 1981.
- GUIDA, G.; RICCIO, A. M. Immune induction of airway remodeling. In: **Seminars in Immunology**. Academic Press, v. 46, p. 101346, 2019.
- HACKETT, T. L. Epithelial–mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 12, n. 1, p. 53-59, 2012.
- HACKETT, T. L.; DE BRUIN, H. G.; SHAHEEN, F.; VAN DEN BERGE, M.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; POSTMA, D. S.; HEIJINK, I. H. Caveolin-1 controls airway epithelial barrier function. Implications for asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 4, p. 662-671, 2013.
- HADDAD, J. J. E.; OLVER, R. E.; LAND, S. C. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity: evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21130-21139, 2000.
- HAGERTY, L.; WEITZEL, D. H.; CHAMBERS, J.; FORTNER, C. N.; BRUSH, M. H.; LOISELLE, D.; HAYSTEAD, T. A. ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4884-4893, 2007.
- HALIM, T. Y. F.; KRAUß, R. H.; SUN, A. C.; TAKEI, F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 451-463, 2012.
- HALLSTRAND, T. S.; LEUPPI, J. D.; JOOS, G.; HALL, G. L.; CARLSEN, K.-H.; KAMINSKY, D. A.; COATES, A. L.; COCKCROFT, D. W.; CULVER, B. H.; DIAMANT, Z.; GAUVREAU, G. M.; HORVATH, I.; DE JONGH, F. H. C.; LAUBE, B. L.; STERK, P. J.; WANGER, J. ERS technical standard on bronchial challenge testing: pathophysiology and methodology of indirect airway challenge testing. **European Respiratory Journal**, v. 52, n. 5, 2018.
- HALWANI, R.; AL-MUHSEN, S.; AL-JAHDALI, H.; HAMID, Q. Role of transforming growth factor- β in airway remodeling in asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44, n. 2, p. 127-133, 2011.
- HAMELMANN, E.; BERNSTEIN, J. A.; VANDEWALKER, M.; MORONI-ZENTGRAF, P.; VERRI, D.; UNSELD, A.; ENGEL, M.; BONER, A. L. A randomised controlled trial

of tiotropium in adolescents with severe symptomatic asthma. **European Respiratory Journal**, v. 49, n. 1, 2017.

HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. The basic immunology of asthma. **Cell**, v. 184, n. 6, p. 1469-1485, 2021.

HANAZAWA, T.; KHARITONOV, S. A.; BARNES, P. J. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 4, p. 1273-1276, 2000.

HANCOCK, J. F.; HALL, A. A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 5, p. 1915-1921, 1993.

HANCOX, R. J.; COWAN, J. O.; FLANNERY, E. M.; HERBISON, G. P.; MCLACHLAN, C. R.; TAYLOR, D. R. Bronchodilator tolerance and rebound bronchoconstriction during regular inhaled β -agonist treatment. **Respiratory Medicine**, v. 94, n. 8, p. 767-771, 2000.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.

HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 103, n. 2, p. 147-166, 2004.

HENDERSON JR, W. R.; CHIANG, G. K.; TIEN, Y. T.; CHI, E. Y. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT₁ receptor blockade. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 7, p. 718-728, 2006.

HENDERSON, I.; CAIAZZO, E.; MCSHARRY, C.; GUZIK, T. J.; MAFFIA, P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy?. **Pharmacological Research**, v. 160, p. 105189, 2020.

HENKEL, F. D.; FRIEDL, A.; HAID, M.; THOMAS, D.; BOUCHERY, T.; HAIMERL, P.; DE LOS REYES JIMÉNEZ, M.; ALESSANDRINI, F.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; HARRIS, N. L.; ADAMSKI, J. House dust mite drives proinflammatory eicosanoid reprogramming and macrophage effector functions. **Allergy**, v. 74, n. 6, p. 1090-1101, 2019.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, S.; GONZÁLEZ-REYNOSO, L.; MORALES-MEDINA, M.; TORRES-MARTÍNEZ, A.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; GONZÁLEZ-ORTEGA, A.; GONZÁLEZ-REYNOSO, V.; GONZÁLEZ-REYNOSO, E.; GONZÁLEZ-REYNOSO, J.; GONZÁLEZ-REYNOSO, C. Beneficial effects of fructooligosaccharides esterified with lauric acid in a metabolic syndrome model induced by a high-fat and high-carbohydrate diet in Wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 25, n. 8, p. 828-835, 2022.

HIRAI, H.; TANAKA, K.; YOSHIE, O.; OGAWA, K.; KENMOTSU, K.; TAKAMORI, Y.; ICHIMASA, M.; SUGAMURA, K.; NAKAMURA, M.; TAKANO, S.; NAGATA, K. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 2, p. 255-262, 2001.

HIRATA, T.; USHIKUBI, F.; KAKIZUKA, A.; OKUMA, M.; NARUMIYA, S. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 4, p. 949-956, 1996.

- HOLGATE, S. T.; WALKER, S.; WEST, B.; BOYCOTT, K. The future of asthma care: Personalized asthma treatment. **Clinics in Chest Medicine**, v. 40, n. 1, p. 227-241, 2019.
- HON, K. L. E.; LEUNG, T. F.; LEUNG, A. K. C. Clinical effectiveness and safety of montelukast in asthma. What are the conclusions from clinical trials and meta-analyses?. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 839-850, 2014.
- HOOFF, I.; SCHULTEN, V.; LAYHADI, J. A.; STRANZL, T.; CHRISTENSEN, L. H.; DE LA MATA, S. H.; SEUMOIS, G.; VIJAYANAND, P.; LUNDEGAARD, C.; NISS, K.; LUND, A. Allergen-specific IgG⁺ memory B cells are temporally linked to IgE memory responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 180-191, 2020.
- HOSHINO, M.; NAKAMURA, Y. The effect of inhaled sodium cromoglycate on cellular infiltration into the bronchial mucosa and the expression of adhesion molecules in asthmatics. **European Respiratory Journal**, v. 10, n. 4, p. 858-865, 1997.
- HRISTOVA, M.; HABIBOVIC, A.; VEITH, C.; JANSSEN-HEININGER, Y. M.; DIXON, A. E.; GEISZT, M.; VAN DER VLIET, A. Airway epithelial dual oxidase 1 mediates allergen-induced IL-33 secretion and activation of type 2 immune responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1545-1556. e11, 2016.
- HUA, X. Y.; BACK, S. M.; TAM, E. K. Substance P enhances electrical field stimulation-induced mast cell degranulation in rat trachea. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 270, n. 6, p. L985-L991, 1996.
- HUANG, J.; PANSARE, M. New treatments for asthma. **Immunology and Allergy Clinics**, v. 41, n. 4, p. 555-569, 2021.
- HUNT, J.; BYRNS, R.; IGNARRO, L.; GASTON, B. Condensed expirate nitrite as a home marker for acute asthma. **The Lancet**, v. 8984, n. 346, p. 1235-1236, 1995.
- IDZKO, M.; HAMMAD, H.; VAN NIMWEGEN, M.; KOOL, M.; VOS, N.; HOOGSTEDEN, H. C.; LAMBRECHT, B. N. Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 2, p. 464-472, 2007.
- IHME, Global Burden of Disease. Prevalence of asthma. 2024. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/grapher/asthma-prevalence>>. Acesso em: 27 dez. 2024.
- IKEBE, M.; HARTSHORNE, D. J.; ELZINGA, M. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 20, p. 9569-9573, 1987.
- INMAN, G. J.; NICOLAS, F. J.; CALLAHAN, J. F.; HARLING, J. D.; GASTER, L. M.; REITH, A. D.; LAPING, N. J.; HILL, C. S. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. **Molecular Pharmacology**, v. 62, p. 65-74, 2002.
- INOUE, Y.; TOKUYAMA, K.; NISHIMURA, H.; ARAKAWA, H.; KATO, M.; MOCHIZUKI, H.; MORIKAWA, A. Effects of STA2, a thromboxane A₂ mimetic, in inducing airflow obstruction and airway microvascular leakage in guinea pigs. **Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 62-68, 2002.
- ITO, S. Stretch-activated calcium mobilization in airway smooth muscle and pathophysiology of asthma. **Current Opinion in Physiology**, v. 21, p. 65-70, 2021.

- ITO, T.; WANG, Y. H.; DURAMAD, O.; HORI, T.; DELESSESSE, G. J.; WATANABE, N.; QIN, F. X.F.; YAO, Z.; CAO, W.; LIU, Y. J. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 9, p. 1213-1223, 2005.
- JADHAV, H. B.; ANNAPURE, U. S. Triglycerides of medium-chain fatty acids: A concise review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 8, p. 2143-2152, 2023.
- JAFFAR, Z.; WAN, K. S.; ROBERTS, K. A key role for prostaglandin I₂ in limiting lung mucosal Th2, but not Th1, responses to inhaled allergen. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 10, p. 5997-6004, 2002.
- JENDZJOWSKY, N. G.; KELLY, Margaret M. The role of airway myofibroblasts in asthma. **Chest**, v. 156, n. 6, p. 1254-1267, 2019.
- JIANG, H.; GALTES, D.; WANG, J.; ROCKMAN, H. A. G protein-coupled receptor signaling: transducers and effectors. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 323, n. 3, p. C731-C748, 2022.
- JIN, X.; ZHOU, J.; RICHEY, G.; WANG, M.; HONG, S. M. C.; HONG, S. H. Undecanoic acid, lauric acid, and N-tridecanoic acid inhibit *Escherichia coli* persistence and biofilm formation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 130, 2021.
- JOHNSON, Z. L.; CHEN, J. Structural basis of substrate recognition by the multidrug resistance protein MRP1. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1075-1085. e9, 2017.
- JOHNSTONE, T. B.; SMITH, K. H.; KOZIOL-WHITE, C. J.; LI, F.; KAZARIAN, A. G.; CORPUZ, M. L.; SHUMYATCHER, M.; EHLERT, F. J.; HIMES, B. E.; PANETTIERI JR, R. A.; OSTROM, R. S. PDE8 is expressed in human airway smooth muscle and selectively regulates cAMP signaling by β_2 -adrenergic receptors and adenylyl cyclase 6. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 58, n. 4, p. 530-541, 2018.
- KAMALALDIN, N. A.; SULAIMAN, S. A.; YUSOP, M. R.; YAHAYA, B. Does Inhalation of Virgin Coconut Oil Accelerate Reversal of Airway Remodelling in an Allergic Model of Asthma?. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- KARDAS, G.; DASZYŃSKA-KARDAS, A.; MARYNOWSKI, M.; BRZĄKALSKA, O.; KUNA, P.; PANEK, M. Role of platelet-derived growth factor (PDGF) in asthma as an immunoregulatory factor mediating airway remodeling and possible pharmacological target. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 47, 2020.
- KATZ, L. E.; GLEICH, G. J.; HARTLEY, B. F.; YANCEY, S. W.; ORTEGA, H. G. Blood eosinophil count is a useful biomarker to identify patients with severe eosinophilic asthma. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 4, p. 531-536, 2014.
- KAWAMATAWONG, T. Phosphodiesterase-4 inhibitors for non-COPD respiratory diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 518345, 2021.
- KAY, A. B.; WALSH, G. M.; MOQBEL, R.; MACDONALD, A. J.; NAGAKURA, T.; CARROLL, M. P.; RICHERSON, H. B. Disodium cromoglycate inhibits activation of human inflammatory cells in vitro. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 80, n. 1, p. 1-8, 1987.
- KERSTJENS, H. A.; ENGEL, M.; DAHL, R.; PAGGIARO, P.; BECK, E.; VANDEWALKER, M.; SIGMUND, R.; SEIBOLD, W.; MORONI-ZENTGRAF, P.;

- BATEMAN, E. D. Tiotropium in asthma poorly controlled with standard combination therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 13, p. 1198-1207, 2012.
- KHAN, H. U.; AAMIR, K.; JUSUF, P. R.; SETHI, G.; SISINTHY, S. P.; GHILDYAL, R.; ARYA, A. Lauric acid ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced liver inflammation by mediating TLR4/MyD88 pathway in Sprague Dawley (SD) rats. **Life Sciences**, v. 265, p. 118750, 2021.
- KHAN, H. U.; AAMIR, K.; SISINTHY, S. P.; NAGOJAPPA, N. B. S.; ARYA, A. Food additive "lauric acid" possess non-toxic profile on biochemical, haematological and histopathological studies in female Sprague Dawley (SD) rats. **PeerJ**, v. 8, p. e8805, 2020.
- KHARITONOV, S. A.; O'CONNOR, B. J.; EVANS, D. J.; BARNES, P. J. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, n. 6, p. 1894-1899, 1995.
- KIM, D. C.; HSU, F. I.; BARRETT, N. A.; FRIEND, D. S.; GRENNINGLOH, R.; HO, I.; AL-GARAWI, A.; LORA, J. M.; LAM, B. K.; AUSTEN, K. F.; KANAOKA, Y. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 4440-4448, 2006.
- KIM, H.; ELLIS, A. K.; FISCHER, D.; NOSEWORTHY, M.; OLIVENSTEIN, R.; CHAPMAN, K. R.; LEE, J. Asthma biomarkers in the age of biologics. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 13, p. 1-17, 2017.
- KISHIMOTO, K.; MORIMOTO, M. Mammalian tracheal development and reconstruction: insights from in vivo and in vitro studies. **Development**, v. 148, n. 13, p. dev198192, 2021.
- KISTEMAKER, L. E. M.; GOSENS, R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 164-171, 2015.
- KISTEMAKER, L. E. M.; PRAKASH, Y. S. Airway innervation and plasticity in asthma. **Physiology**, v. 34, n. 4, p. 283-298, 2019.
- KISTEMAKER, L. E.; HIEMSTRA, P. S.; BOS, I. S. T.; BOUWMAN, S.; VAN DEN BERGE, M.; HYLKEMA, M. N.; MEURS, H.; KERSTJENS, H. A.; GOSENS, R. Tiotropium attenuates IL-13-induced goblet cell metaplasia of human airway epithelial cells. **Thorax**, v. 70, n. 7, p. 668-676, 2015.
- KLEINSTREUER, C.; ZHANG, Z. Airflow and particle transport in the human respiratory system. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 42, n. 1, p. 301-334, 2010.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In Bárány, M. (Ed.) **Biochemistry of Smooth Muscle Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 203-219, 1996.
- KOBAYASHI, T.; KIM, H.; LIU, X.; SUGIURA, H.; KOHYAMA, T.; FANG, Q.; WEN, F.Q.; ABE, S.; WANG, X.; ATKINSON, J. J.; SHIPLEY, J. M. Matrix metalloproteinase-9 activates TGF- β and stimulates fibroblast contraction of collagen gels. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 11, p. L1006-L1015, 2014.
- KOBZIK, L.; BREDT, D. S.; LOWENSTEIN, C. J.; DRAZEN, J.; GASTON, B.; SUGARBAKER, D.; STAMLER, J. S. Nitric oxide synthase in human and rat lung:

- immunocytochemical and histochemical localization. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 9, p. 371-371, 1993.
- KOIKE, Y.; HISADA, T.; UTSUGI, M.; ISHIZUKA, T.; SHIMIZU, Y.; ONO, A.; MURATA, Y.; HAMURO, J.; MORI, M. DOBASHI, K. Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 37, n. 3, p. 322-329, 2007.
- KOMOTO, J.; YAMADA, T.; WATANABE, K.; WOODWARD, D. F.; TAKUSAGAWA, F. Prostaglandin F_{2α} formation from prostaglandin H₂ by prostaglandin F synthase (PGFS): crystal structure of PGFS containing bimatoprost. **Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1987-1996, 2006.
- KOUZAKI, H.; O'GRADY, S. M.; LAWRENCE, C. B.; KITA, H. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1427-1434, 2009.
- KOUZAKI, H.; TOJIMA, I.; KITA, H.; SHIMIZU, T. Transcription of interleukin-25 and extracellular release of the protein is regulated by allergen proteases in airway epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 5, p. 741-750, 2013.
- KOYAMA, M.; ITO, M.; FENG, J.; SEKO, T.; SHIRAKI, K.; TAKASE, K.; HARTSHORNE, D. J.; NAKANO, T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase. **FEBS Letters**, v. 475, n. 3, p. 197-200, 2000.
- KRAIK, K.; TOTA, M.; LASKA, J.; ŁACWIK, J.; PAŹDZIERZ, Ł.; SEDEK, Ł.; GOMUŁKA, K. The role of transforming growth Factor-β (TGF-β) in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). **Cells**, v. 13, n. 15, p. 1271, 2024.
- KURUVILLA, M. E.; VANIJCHAROENKARN, K.; SHIH, J. A.; LEE, F. E. H. Epidemiology and risk factors for asthma. **Respiratory Medicine**, v. 149, p. 16-22, 2019.
- LA RUSSA, F.; DEHMEL, S.; BRAUN, A.; VERES, T. Z. Sensory modulation of airways immunity. **Neuroscience Letters**, v. 760, p. 136042, 2021.
- LAM, M.; LAMANNA, E.; BOURKE, J. E. Regulation of airway smooth muscle contraction in health and disease. **Smooth Muscle Spontaneous Activity: Physiological and Pathological Modulation**, p. 381-422, 2019.
- LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181-189, 2004.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. The cytokines of asthma. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 975-991, 2019.
- LAPPANO, R.; SEBASTIANI, A.; CIRILLO, F.; RIGIRACCILO, D. C.; GALLI, G. R.; CURCIO, R.; MAGGIOLINI, M. The lauric acid-activated signaling prompts apoptosis in cancer cells. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2017.
- LAYDEN, B. T.; ANGUEIRA, A. R.; BRODSKY, M.; DURAI, V.; LOWE JR., W. L. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. **Translational Research**, v. 161, n. 3, p. 131-140, 2013.

- LEE, I. T.; YANG, C. M. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 5, p. 581-590, 2012.
- LEE, K.; LEE, S. H.; KIM, T. H. The biology of prostaglandins and their role as a target for allergic airway disease therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1851, 2020.
- LEE, M.; BOYCE, J. A.; BARRETT, N. A. Cysteinyl Leukotrienes in Allergic Inflammation. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 20, 2024.
- LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 8, p. 1386-1402, 2015.
- LEUNG, K. B.; FLINT, K. C.; BROSTOFF, J.; HUDSPITH, B. N.; JOHNSON, N. M.; LAU, H. Y.; LIU, W. L.; PEARCE, F. L. Effects of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on histamine secretion from human lung mast cells. **Thorax**, v. 43, n. 10, p. 756-761, 1988.
- LEUNG, T.; CHEN, X. Q.; MANSER, E.; LIM, L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 10, p. 5313-5327, 1996.
- LIMA, W. T.; SILVA, Z. L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cells. **General Pharmacology: The Vascular System**, vol. 30, p. 689-695, 1998.
- LIU, G.; PHILP, A. M.; CORTE, T.; TRAVIS, M. A.; SCHILTER, H.; HANSBRO, N. G.; BURNS, C. J.; EAPEN, M. S.; SOHAL, S. S.; BURGESS, J. K.; HANSBRO, P. M. Therapeutic targets in lung tissue remodelling and fibrosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 225, p.107839, 2021.
- LIU, J.; JIANG, X.; LI, L.; LIU, H.; ZHANG, X.; LIU, K.; YANG, C. Iloprost inhibits acute allergic nasal inflammation by GATA3-ILC2 pathway in mice. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 276, p. 103364, 2020.
- LIU, Y. J.; WANG, H. Y.; WANG, R.; YU, J.; SHI, J. J.; CHEN, R. Y.; YANG, G. J.; CHEN, J. IgE-FcεRI protein–protein interaction as a therapeutic target against allergic asthma: An updated review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 138099, 2024.
- LIU, Y. J.; WANG, H. Y.; WANG, R.; YU, J.; SHI, J. J.; CHEN, R. Y.; YANG, G. J.; CHEN, J. IgE-FcεRI protein–protein interaction as a therapeutic target against allergic asthma: An updated review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 284, p. 138099, 2025.
- LUGININA, A.; GUSACH, A.; LYAPINA, E.; KHORN, P.; SAFRONOVA, N.; SHEVTSOV, M.; DMITIRIEVA, D.; DASHEVSKII, D.; KOTOVA, T.; SMIRNOVA, E.; BORSHCHEVSKIY, V.; CHEREZOV, V.; MISHIN, A. Structural diversity of leukotriene G-protein coupled receptors. **Journal of Biological Chemistry**, p. 105247, 2023.
- LUO, Y.; JIN, M.; LOU, L.; YANG, S.; LI, C.; LI, X.; ZHOU, M.; CAI, C. Role of arachidonic acid lipoxygenase pathway in Asthma. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 158, p. 106609, 2022.
- LUTZ, W.; SULKOWSKI, W. J. Vagus nerve participates in regulation of the airways: inflammatory response and hyperreactivity induced by occupational

asthmogens. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 17, n. 4, p. 417-431, 2004.

LYNCH, K. R.; O'NEILL, G. P.; LIU, Q.; IM, D.-S.; SAWYER, N.; METTERS, K. M.; COULOMBE, N.; ABRAMOVITZ, M.; FIGUEROA, D. J.; ZENG, Z.; CONNOLLY, B. M.; BAI, C.; AUSTIN, C. P.; CHATEAUNEUF, A.; STOCCO, R.; GREIG, G. M.; KARGMAN, S.; HOOKS, S. B.; HOSFIELD, E.; WILLIAMS, D. L. Jr.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; CASKEY, C. T.; EVANS, J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT₁ receptor. **Nature**, v. 399, n. 6738, p. 789-793, 1999.

MAK, J. C.; NISHIKAWA, M.; BARNES, P. J. Glucocorticosteroids increase beta 2-adrenergic receptor transcription in human lung. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 268, n. 1, p. L41-L46, 1995.

MALAN, A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respiration Physiology**, v. 17, n. 1, p. 32-44, 1973.

MALO, P. E.; BELL, R. L.; SHAUGHNESSY, T. K.; SUMMERS, J. B.; BROOKS, D. W.; CARTER, G. W. The 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton in *in vitro* and *in vivo* models of antigen-induced airway anaphylaxis. **Pulmonary Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 73-79, 1994.

MANSUR, A. H.; SRIVASTAVA, S.; SAHAL, A. Disconnect of type 2 biomarkers in severe asthma; dominated by FeNO as a predictor of exacerbations and periostin as predictor of reduced lung function. **Respiratory Medicine**, v. 143, p. 31-38, 2018.

MARIC, J.; RAVINDRAN, A.; MAZZURANA, L.; VAN ACKER, A.; RAO, A.; KOKKINO, E.; EKOFF, M.; THOMAS, D.; FAULAND, A.; NILSSON, G.; WHEELLOCK, C. E. Cytokine-induced endogenous production of prostaglandin D₂ is essential for human group 2 innate lymphoid cell activation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 6, p. 2202-2214, 2019.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999.

MARONE, G.; GRANATA, F.; PUCINO, V.; PECORARO, A.; HEFFLER, E.; LOFFREDO, S.; SCADDING, G. W.; VARRICCHI, G. The intriguing role of interleukin 13 in the pathophysiology of asthma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1387, 2019.

MARQUES, C. F.; MARQUES, M. M.; JUSTINO, G. C. Leukotrienes vs. Montelukast—activity, metabolism, and toxicity hints for repurposing. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1039, 2022.

MARSHALLRAJ, G.; PRIYADARSHINI, R. Phosphodiesterase: what is in an enzyme. **Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 5, p. 20-31, 2015.

MARTIN, J. G.; SUZUKI, M.; MAGHNI, K.; PANTANO, R.; RAMOS-BARBÓN, D.; IHAKU, D.; NANTEL, F.; DENIS, D.; HAMID, Q.; POWELL, W. S. The immunomodulatory actions of prostaglandin E₂ on allergic airway responses in the rat. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3963-3969, 2002.

MARTIN, S. A.; BRASH, A. R.; MURPHY, R. C. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 7, p. 1126-1132, 2016.

- MAS-BARGUES, C.; ESCRIVA, C.; DROMANT, M.; BORRAS, C.; VINA, J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 709, p. 108941, 2021.
- MASHIMA, R.; OKUYAMA, T. The role of lipoxygenases in pathophysiology; new insights and future perspectives. **Redox Biology**, v. 6, p. 297-310, 2015.
- MASOTTI, G.; POGGESI, L.; GALANTI, G.; ABBATE, R.; SERNERI, G. N. Differential inhibition of prostacyclin production and platelet aggregation by aspirin. **The Lancet**, v. 314, n. 8154, p. 1213-1216, 1979.
- MATERA, M. G.; ORA, J.; CAVALLI, F.; ROGLIANI, P.; CAZZOLA, M. New avenues for phosphodiesterase inhibitors in asthma. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 13, p. 291-302, 2021.
- MATERA, M. G.; PAGE, C. P.; CALZETTA, L.; ROGLIANI, P.; CAZZOLA, M. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators revisited. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 218-252, 2020.
- MATHÉ, A. A.; HEDQVIST, P.; HOLMGREN, A.; SVANBORG, N. Bronchial hyperreactivity to prostaglandin F_{2α} and histamine in patients with asthma. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5847, p. 193-196, 1973.
- MATSUDA, F.; SUGAHARA, K.; SUGITA, M.; SADOHARA, T.; KIYOTA, T.; TERASAKI, H. Comparative effect of amrinone, aminophylline and diltiazem on rat airway smooth muscle. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 44, n. 6, p. 763-766, 2000.
- MATSUI, T.; AMANO, M.; YAMAMOTO, T.; CHIHARA, K.; NAKAFUKU, M.; ITO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 9, p. 2208-2216, 1996.
- MAZZONE, S. B.; UNDEM, B. J. Vagal afferent innervation of the airways in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 3, p. 975-1024, 2016.
- MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. The biology of eosinophils and their role in asthma. **Frontiers in Medicine**, v. 4, p. 93, 2017.
- MCCRACKEN, J. L.; VEERANKI, S. P.; AMEREDES, B. T.; CALHOUN, W. J. Diagnosis and management of asthma in adults: a review. **JAMA**, v. 318, n. 3, p. 279, 2017.
- MCDONALD, D. M. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. **American Journal of respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 2, p. S39-S45, 2001.
- MCDUFFIE, E. L.; PANETTIERI JR, R. A.; SCOTT, C. P. G_{12/13} signaling in asthma. **Respiratory Research**, v. 25, n. 1, p. 295, 2024.
- MEHROTRA, A. K.; HENDERSON JR, W. R. The role of leukotrienes in airway remodeling. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 384-391, 2009.
- MELLOR, E. A.; FRANK, N.; SOLER, D.; HODGE, M. R.; LORA, J. M.; AUSTEN, K. F.; BOYCE, J. A. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT₂R) by human mast cells: functional distinction from CysLT₁R. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11589-11593, 2003.

- MENZIES-GOW, A.; MANSUR, A. H.; BRIGHTLING, C. E. Clinical utility of fractional exhaled nitric oxide in severe asthma management. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 3, 2020.
- MERCADO, N.; TO, Y.; KOBAYASHI, Y.; ADCOCK, I. M.; BARNES, P. J.; ITO, K. p38 mitogen-activated protein kinase- γ inhibition by long-acting β_2 adrenergic agonists reversed steroid insensitivity in severe asthma. **Molecular Pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 1128-1135, 2011.
- MICHAELOUDES, C.; ABUBAKAR-WAZIRI, H.; LAKHDAR, R.; RABY, K.; DIXEY, P.; ADCOCK, I. M.; MUMBY, S.; BHAVSAR, P. K.; CHUNG, K. F. Molecular mechanisms of oxidative stress in asthma. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 85, p. 101026, 2022.
- MICHALIK, M.; WÓJCIK-PSZCZOŁA, K.; PAW, M.; WNUK, D.; KOCZURKIEWICZ, P.; SANAK, M.; PEKALA, E.; MADEJA, Z. Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, p. 3943-3961, 2018.
- MISHRA, V.; BANGA, J.; SILVEYRA, P. Oxidative stress and cellular pathways of asthma and inflammation: Therapeutic strategies and pharmacological targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 181, p. 169-182, 2018.
- MOHAMMED, N. K.; SAMIR, Z. T.; JASSIM, M. A.; SAEED, S. K. Effect of different extraction methods on physicochemical properties, antioxidant activity, of virgin coconut oil. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 2000-2005, 2021.
- MONTUSCHI, P. Role of leukotrienes and leukotriene modifiers in asthma. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 6, p. 1792-1811, 2010.
- MURATA, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; HIRATA, M.; YAMASAKI, A.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; AZE, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; UENO, A. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. **Nature**, v. 388, n. 6643, p. 678-682, 1997.
- NAGARKAR, D. R.; POPOSKI, J. A.; COMEAU, M. R.; BIYASHEVA, A.; AVILA, P. C.; SCHLEIMER, R. P.; KATO, A. Airway epithelial cells activate TH2 cytokine production in mast cells through IL-1 and thymic stromal lymphopoietin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 225-232. e4, 2012.
- NAGATA, K.; HIRAI, H.; TANAKA, K.; OGAWA, K.; ASO, T.; SUGAMURA, K.; NAKAMURA, M.; TAKANO, S. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). **FEBS Letters**, v. 459, n. 2, p. 195-199, 1999.
- NAKAJIMA, S.; KUNUGI, H. Lauric acid promotes neuronal maturation mediated by astrocytes in primary cortical cultures. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. e03892, 2020.
- NARENDRA, D.; BLIXT, J.; HANANIA, N. A. Immunological biomarkers in severe asthma. In: **Seminars in Immunology**. Academic Press, v. 36, p. 101332, 2019.
- NETZER, N. C.; KÜPPER, T.; VOSS, H. W.; ELIASSON, A. H. The actual role of sodium cromoglycate in the treatment of asthma—a critical review. **Sleep and Breathing**, v. 16, n. 4, p. 1027-1032, 2012.
- NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.

NISHIMURA, Y.; MORIYAMA, M.; KAWABE, K.; SATOH, H.; TAKANO, K.; AZUMA, Y. T.; NAKAMURA, Y. Lauric acid alleviates Neuroinflammatory responses by activated microglia: involvement of the GPR40-dependent pathway. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 9, p. 1723-1735, 2018.

OECD. Chronic Toxicity Studies. **OECD guideline for testing of chemicals nº 407**, Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents, 2008.

OENEMA, T. A.; MENSINK, G.; SMEDINGA, L.; HALAYKO, A. J.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H.; GOSENS, R.; DEKKERS, B. G. Cross-talk between transforming growth factor- β 1 and muscarinic M2 receptors augments airway smooth muscle proliferation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 18-27, 2013.

O'HICKEY, S. R.; HAWKSWORTH, R. J.; FONG, C. Y.; ARM, J. P.; SPUR, B. W.; LEE, T. Leukotrienes C4, 04, and E4 Enhance Histamine Responsiveness in Asthmatic Airways1-3. **American Review of Respiratory Disease**, v. 144, p. 1053-1057, 1991.

OLUBIYI, M. V.; KAWU, M. U.; MAGAJI, M. G.; SALAHDEEN, H. M.; MAGAJI, R. A. Influence of lauric acid on the relaxation of corpus cavernosum in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 60, 2022.

OMORI, M.; ZIEGLER, S. Induction of IL-4 expression in CD4⁺ T cells by thymic stromal lymphopoietin. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 3, p. 1396-1404, 2007.

ONG, M. H. L.; WONG, H. K.; TENGKU-MUHAMMAD, T. S.; CHOO, Q. C.; CHEW, C. H. Pro-atherogenic proteoglycanase ADAMTS-1 is down-regulated by lauric acid through PI3K and JNK signaling pathways in THP-1 derived macrophages. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 3, p. 2631-2641, 2019.

ORA, J.; CALZETTA, L.; MATERA, M. G.; CAZZOLA, M.; ROGLIANI, P. Advances with glucocorticoids in the treatment of asthma: state of the art. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 21, n. 18, p. 2305-2316, 2020.

ORDOÑEZ, C. L.; KHASHAYAR, R.; WONG, H. H.; FERRANDO, R.; WU, R.; HYDE, D. M.; HOTCHKISS, J. A.; ZHANG, Y.; NOVIKOV, A.; DOLGANOV, G.; FAHY, J. V. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 163, n. 2, p. 517-523, 2001.

OUEDRAOGO, N.; ROUX, E. Physiology of airway smooth muscle contraction: an overview. **Journal of Pulmonary & Respiratory Medicine**, v. 4, n. 2, 2014.

OYESOLA, O. O.; TAIT WOJNO, E. D. Prostaglandin regulation of type 2 inflammation: From basic biology to therapeutic interventions. **European Journal of Immunology**, v. 51, n. 10, p. 2399-2416, 2021.

PAŁGAN, K.; BARTUZI, Z. Angiogenesis in bronchial asthma. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 415-420, 2015.

PALMER, G.; LIPSKY, B. P.; SMITHGALL, M. D.; MEININGER, D.; SIU, S.; TALABOT-AYER, D.; GABAY, C.; SMITH, D. E. The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33. **Cytokine**, v. 42, n. 3, p. 358-364, 2008.

- PANASENKO, O. M.; VLADIMIROV, Y. A.; SERGIENKO, V. I. Free Radical Lipid Peroxidation Induced by Reactive Halogen Species. **Biochemistry (Moscow)**, v. 89, n. Suppl 1, p. S148-S179, 2024.
- PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B.; OLIVEIRA, S. H. P.; CUNHA, F. Q. Interleukin 4 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in eosinophils. **Cytokine**, v. 30, n. 3, p. 116-124, 2005.
- PAVÓN-ROMERO, G. F.; SERRANO-PÉREZ, N. H.; GARCÍA-SÁNCHEZ, L.; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, F.; TERÁN, L. M. Neuroimmune pathophysiology in asthma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 663535, 2021.
- PEEBLES JR, R. S. Prostaglandins in asthma and allergic diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 193, p. 1-19, 2019.
- PELAIA, G.; VATRELLA, A.; BUSCETI, M. T.; FABIANO, F.; TERRACCIANO, R.; MATERA, M. G.; MASELLI, R. Molecular and cellular mechanisms underlying the therapeutic effects of budesonide in asthma. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, p. 15-21, 2016.
- PETTIPHER, R. The roles of the prostaglandin D₂ receptors DP₁ and CRTH2 in promoting allergic responses. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. S1, p. S191-S199, 2008.
- PHYU, S. L.; TURNBULL, C.; TALBOT, N. Basic respiratory physiology. **Medicine**, v. 51, n. 10, p. 679-683, 2023.
- PIETARINEN-RUNTTI, P.; LAKARI, E.; RAIVIO, K. O.; KINNULA, V. L. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 278, n. 1, p. C118-C125, 2000.
- PINHEIRO, D. H. A.; SOUZA, J. V. H.; JUSTO, A. F. O.; CARVALHO-PINTO, R. M.; LIMA, F. F.; CARVALHO, C. R. F. Asthma in the Brazilian Unified Health Care System: an epidemiological analysis from 2008 to 2021. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 50, n. 2, 2024.
- PIZZICHINI, M. M. M.; CARVALHO-PINTO, R. M.; CANÇADO, J. E. D.; RUBIN, A. S.; CERCINETO, A.; CARDOSO, A. P.; CRUZ, A. A.; FERNANDES, A. L. G.; BLANCO, D. C.; VIANA, E. O.; CORDEIRO JÚNIOR, G.; RIZZO, J. A.; FRITSCHER, L. G.; CAETANO, L. S. B.; PEREIRA, L. F. F.; RABAHI, M. F.; OLIVEIRA, M. A.; LIMA, M. A.; ALMEIDA, M. B.; STELMACH, R.; PITREZ, P. M.; CUKIER, A. Recomendações para o manejo da asma da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia-2020. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, p. e20190307, 2020.
- POPOVIĆ-GRLE, S.; ŠTAJDUHAR, A.; LAMPALO, M.; RNJAK, D. Biomarkers in Different Asthma Phenotypes. **Genes**, v. 12, n. 6, p. 801, 2021.
- POTTER, P. C. Current guidelines for the management of asthma in young children. **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2010.
- PRICE, D. B.; BOSNIC-ANTICEVIC, S.; BRUNTON, S. A.; CORREN, J.; DAL NEGRO, R. W.; FAJARDO, E.; MCKEVITT, P.; WOLF, S.; LEE, L. A.; CANESE, R.; RAFIQ, A. U. R. Association of elevated fractional exhaled nitric oxide concentration and blood eosinophil count with severe asthma exacerbations. **Clinical and Translational Allergy**, v. 9, n. 1, p. 41, 2019.

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. **Brain Res Bull**, v. 67 p. 133–141, 2005.

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

RAHMAN, I.; MULIER, B.; GILMOUR, P. S.; WATCHORN, T.; DONALDSON, K.; JEFFERY, P. K.; MACNEE, W. Oxidant-mediated lung epithelial cell tolerance: the role of intracellular glutathione and nuclear factor-kappaB. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 787-794, 2001.

RAMSAY, R. G.; CIZNADIJA, D.; VANEVSKI, M.; MANTAMADIOTIS, T. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. **International journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 59-67, 2003.

RANK, M. A.; KOBAYASHI, T.; KOZAKI, H.; BARTEMES, K. R.; SQUILLACE, D. L.; KITA, H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1047-1054, 2009.

READ, P. W.; LIU, X.; LONGENECKER, K.; DIPIERRO, C. G.; WALKER, L. A.; SOMLYO, A. V.; NAKAMOTO, R. K. Human RhoA/RhoGDI complex expressed in yeast: GTP exchange is sufficient for translocation of RhoA to liposomes. **Protein Science**, v. 9, n. 2, p. 376-386, 2000.

REDDEL, H. K.; FITZGERALD, J. M.; BATEMAN, E. D.; BUIST, S. A.; BUSELLI, R.; DAVIS, J.; DRAZEN, J. M.; FUKUTOMI, Y.; JUNG, K.; KOENIGSBERG, M.; KRISHNA, M. T.; KRUCHININ, I.; LANCARIN, I.; LEUNG, T. F.; LEVY, M. L.; O'BYRNE, P. M.; PARK, H. B.; RICCIARDI, M.; VALENTIN, S.; VEDANATHAN, R.; YORGOV, D.; ZHOU, X. H.; BOURDIN, A.; BOSNIC-ANTICEVIC, S.; CANDELARIA, L.; FARRAR, J. R.; JAN, H. L.; ZYSKOWSKI, W. M.; KHOO, S. S.; CHUNG, K. F. GINA 2019: a fundamental change in asthma management: treatment of asthma with short-acting bronchodilators alone is no longer recommended for adults and adolescents. **European Respiratory Journal**, v. 53, n. 6, 2019.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY, M. (ed.). **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

RICCIARDOLO, F. L. M.; NIJKAMP, F. P.; FOLKERTS, G. Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 6, p. 721-735, 2006.

RICCIARDOLO, F. L. Multiple roles of nitric oxide in the airways. **Thorax**, v. 58, p. 175-182, 2003.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RIENTO, K.; RIDLEY, A. J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 6, p. 446-456, 2003.

- RIHÁK, V.; ZATLOUKAL, P.; CHLÁDKOVÁ, J.; ZIMULOVÁ, A.; HAVLÍNOVÁ, Z.; CHLÁDEK, J. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, n. 5, p. 317-322, 2010.
- RITTCHEEN, S.; HEINEMANN, A. Therapeutic potential of hematopoietic prostaglandin D₂ synthase in allergic inflammation. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 619, 2019.
- RUAN, K. H. Advance in understanding the biosynthesis of prostacyclin and thromboxane A₂ in the endoplasmic reticulum membrane via the cyclooxygenase pathway. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 639-647, 2004.
- RUPANI, H.; FONG, W. C. G.; KYIALY, A.; KURUKULAARATCHY, R. J. Recent insights into the management of inflammation in asthma. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 4371, 2021.
- SACKESEN, C.; ERCAN, H.; DIZDAR, E.; SOYER, O.; GUMUS, P.; TOSUN, B. N.; BÜYÜKTUNCER, Z.; KARABULUT, E.; BESLER, T.; KALAYCI, O. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 1, p. 78-85, 2008.
- SADEGHI-HASHJIN, G.; FOLKERTS, G.; HENRICKS, P. A.; VERHEYEN, A. K.; VAN DER LINDE, H. J.; VAN ARK, I.; COENE, A.; NIJKAMP, F. P. Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs *in vitro* and *in vivo*. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 153, n. 5, p. 1697-1701, 1996.
- SAEKI, K.; YOKOMIZO, T. Identification, signaling, and functions of LTB₄ receptors. In: **Seminars in Immunology**. Academic Press, v. 33, p. 30-36, 2017.
- SAGLANI, S.; MENZIE-GOW, A. N. Approaches to asthma diagnosis in children and adults. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, p. 148, 2019.
- SAHINER, U. M.; BIRBEN, E.; ERZURUM, S.; SACKESEN, C.; KALAYCI, Ö. Oxidative stress in asthma: Part of the puzzle. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 29, n. 8, p. 789-800, 2018.
- SALMON, M.; WALSH, D. A.; HUANG, T. J.; BARNES, P. J.; LEONARD, T. B.; HAY, D. W.; CHUNG, K. F. Involvement of cysteinyl leukotrienes in airway smooth muscle cell DNA synthesis after repeated allergen exposure in sensitized Brown Norway rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 5, p. 1151-1158, 1999.
- SALTER, B.; LACY, P.; MUKHERJEE, M. Biologics in asthma: a molecular perspective to precision medicine. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 793409, 2022.
- SAMB, A.; PRETOLANI, M.; DINH-XUAN, A. T.; OUKSEL, H.; CALLEBERT, J.; LISDERO, C.; AUBIER, M.; BOCZKOWSKI, J. Decreased pulmonary and tracheal smooth muscle expression and activity of type 1 nitric oxide synthase (nNOS) after ovalbumin immunization and multiple aerosol challenge in guinea pigs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 1, p. 149-154, 2001.
- SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S. E.; LINDGREN, J. Å.; ROUZER, C. A.; SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1171-1176, 1987.
- SÁNCHEZ-RECILLAS, A.; ESTRADA-SOTO, S.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; MILLÁN-PACHECO, C.; ORTIZ-ANDRADE, R.; VILLALOBOS-MOLINA, R.; IBARRA-BARAJAS, M.; GALLARDO-ORTIZ, I. A. Functional relaxant effect of 6, 7-dipropoxy-2

H-chromen-2-one is mainly by calcium channel blockade in *ex vivo* assay of tracheal rings. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 8, p. 1197-1204, 2019.

SANDHYA; TALUKDAR; BHAISHYA. Chemical and biological properties of lauric acid: a review. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 7, p. 1123–1128, 2016.

SANDRINI, A.; TAYLOR, D. R.; THOMAS, P. S.; YATES, D. H. Fractional exhaled nitric oxide in asthma: an update. **Respirology**, v. 15, n. 1, p. 57-70, 2010.

SCHLEIMER, R. P. Glucocorticoides suprimem a inflamação, mas poupam respostas imunes inatas no epitélio das vias aéreas. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, n. 3, p. 222-230, 2004.

SCHNACKENBERG, C. G.; WILCOX, C. S. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. **Kidney International**, v. 59, n. 5, p. 1859-1864, 2001.

SEDIK, A. A.; ELGOHARY, R.; KHALIFA, E.; KHALIL, W. K. B.; SHAFEY, H. I.; SHALABY, M. B.; GOUIDA, M. S. O.; TAG, Y. M. Lauric acid attenuates hepato-metabolic complications and molecular alterations in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 34, n. 4, p. 454-467, 2024.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SHABIR, H.; KUNDU, S.; BASIR, S. F.; KHAN, L. A. Amelioration of lead-and cadmium-induced rat tracheal hypercontraction by linalool and eugenol. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 96, n. 2, p. 307-317, 2014.

SHAHERYAR, Z. A.; KHAN, M. A.; HAMEED, H.; ZAIDI, S. A. A.; ANJUM, I.; RAHMAN, M. S. U. Lauric acid provides neuroprotection against oxidative stress in mouse model of hyperglycaemic stroke. **European Journal of Pharmacology**, v. 956, p. 175990, 2023.

SHEELA, D. L.; NARAYANANKUTTY, A.; NAZEEM, P. A.; RAGHAVAMENON, A. C.; MUTHANGAPARAMBIL, S. R. Lauric acid induce cell death in colon cancer cells mediated by the epidermal growth factor receptor downregulation: An *in silico* and *in vitro* study. **Human & Experimental Toxicology**, v. 38, n. 7, p. 753-761, 2019.

SHEELA, D. L.; NAZEEM, P. A.; NARAYANANKUTTY, A.; SHYLAJA, R. M.; DAVIS, S. P.; JAMES, P.; VALSALAN, R.; BABU, T. D.; RAGHAVAMENON, A. C. Coconut phytocompounds inhibits polyol pathway enzymes: implication in prevention of microvascular diabetic complications. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 127, p. 20-24, 2017.

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, S. B.; DUNCAN, I. J.; ERHARD, H. W.; LAY, D. C.; MENCH, J. A.; O'CONNOR, C. E.; PETHERICK, J. C. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, n. 3, p. 291-305, 2003.

SHIBATA, O.; SAITO, M.; YOSHIMURA, M.; YAMAGUCHI, M.; NISHIOKA, K.; MAKITA, T.; SUMIKAWA, K. Anticholinesterase drugs stimulate smooth muscle contraction of the rat trachea through the Rho-kinase pathway. **Anesthesia & Analgesia**, v. 102, n. 4, p. 1121-1126, 2006.

- SIES, H.; BELOUSOV, V. V.; CHANDEL, N. S.; DAVIES, M. J.; JONES, D. P.; MANN, G. E.; MURPHY, M. P.; YAMAMOTO, M.; WINTERBOURN, C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 499-515, 2022.
- SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715-748, 2017.
- SMITH, A. P.; CUTHBERT, M. F.; DUNLOP, L. S. Effects of inhaled prostaglandins E₁, E₂ and F_{2α} on the airway resistance of healthy and asthmatic man. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 48, n. 5, p. 421-430, 1975.
- SMITH, W. L.; URADE, Y.; JAKOBSSON, P. J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5821-5865, 2011.
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Asma. 2024. Disponível em: <<https://sbpt.org.br/portal/>>. Acesso em: 27 dez. 2024.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of Physiology**, v. 522, n. 2, p. 177-185, 2000.
- SOUSA, A. A. S.; SOARES, P. M. G.; ALMEIDA, A. N. S.; MAIA, A. R.; SOUZA, E. P.; ASSREUY, A. M. S. Antispasmodic effect of *Mentha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 2, p. 433-436, 2010.
- SUGIMOTO, H.; SHICHIJO, M.; OKANO, M.; BACON, K. B. CRTH2-specific binding characteristics of [3H] ramatroban and its effects on PGD₂-, 15-deoxy-Δ¹², 14-PGJ₂- and indomethacin-induced agonist responses. **European Journal of Pharmacology**, v. 524, n. 1-3, p. 30-37, 2005.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11613-11617, 2007.
- SUGIURA, H.; ICHINOSE, M. Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 4, p. 785-798, 2008.
- SUGIURA, H.; ICHINOSE, M.; OYAKE, T.; MASHITO, Y.; OHUCHI, Y.; ENDOH, N.; MIURA, M.; YAMAGATA, S.; KOARAI, A.; AKAIKE, T.; MAEDA, H.; SHIRATO, K. Role of peroxynitrite in airway microvascular hyperpermeability during late allergic phase in guinea pigs. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 2, p. 663-671, 1999.
- SURYATI, T.; JULAEHA, E.; FARABI, K.; AMBARSARI, H.; HIDAYAT, A. T. Lauric acid from the black soldier fly (*Hermetia illucens*) and its potential applications. **Sustainability**, v. 15, n. 13, p. 10383–10383, 2023.
- SUTCLIFFE, A.; HOLLINS, F.; GOMEZ, E.; SAUNDERS, R.; DOE, C.; COOKE, M.; CHALISS, R. A. J.; BRIGHTLING, C. E. Increased nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 expression mediates intrinsic airway smooth muscle hypercontractility in asthma. **American journal of respiratory and Critical Care Medicine**, v. 185, n. 3, p. 267-274, 2012.

- SYABBALO, N. Role of IL-17 and IL-23 in the Pathogenesis of Neutrophilic Asthma. **International Journal of Immunology and Immunotherapy**, v. 7, p. 049, 2020.
- SZELFER, S. J.; MURPHY, K.; HARPER, T.; BONER, A.; LAKI, I.; ENGEL, M.; EL AZZI, G.; MORONI-ZENTGRAF, P.; FINNIGAN, H.; HAMELMANN, E. A phase III randomized controlled trial of tiotropium add-on therapy in children with severe symptomatic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 5, p. 1277-1287, 2017.
- TAYLOR, J. P.; HUBERT, M. T. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. **Redox Biology**, v. 48, p. 102159, 2021.
- TEIXEIRA, M. L. S.; FARIA, O. H. F.; CASTRO, T. L.; OLIVEIRA, S. S.; MOREIRA, G. F.; SOUZA, L. C. B. S.; CADORE, F. G.; GOMES, S. O.; LOPES, J. R. R.; MATSUNAGA, A. K. S.; BORGES, L. G. S.; MOTA, P. M. O.; SILVA, I. C. P.; SENN, P. B. Asma na saúde pública: impactos, desafios e estratégias de intervenção. **Contribuciones a las Ciencias Sociales**, v. 17, n. 4, p. e6571-e6571, 2024.
- TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, p. 4, p. 797-806, 2000.
- TRAN, T. Q. M.; HSIEH, M. F.; CHANG, K. L.; PHO, Q. H.; NGUYEN, V. C.; CHENG, C. Y.; HUANG, C. M. Bactericidal effect of lauric acid-loaded PCL-PEG-PCL nano-sized micelles on skin commensal *Propionibacterium acnes*. **Polymers**, v. 8, n. 9, p. 321, 2016.
- TURCOTTE, C.; CHOUINARD, F.; LEFEBVRE, J. S.; FLAMAND, N. Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 6, p. 1049-1070, 2015.
- TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. TGF- β Signaling. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 487, 2020.
- UENO, T.; KATAOKA, M.; HIRANO, A.; IIO, K.; TANIMOTO, Y.; KANEHIRO, A.; OKADA, C.; SODA, R.; TAKAHASHI, K.; TANIMOTO, M. Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. **Respirology**, v. 13, n. 5, p. 654-663, 2008.
- UGAJIN, T.; SATOH, T.; KANAMORI, T.; ARITAKE, K.; URADE, Y.; YOKOZEKI, H. Fc ϵ RI, but not Fc γ R, signals induce prostaglandin D₂ and E₂ production from basophils. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 2, p. 775-782, 2011.
- UMLAND, S. P.; SCHLEIMER, R. P.; JOHNSTON, S. L. Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, n. 1, p. 35-50, 2002.
- UNDEM, B. J.; CARR, M. J. Pharmacology of airway afferent nerve activity. **Respiratory Research**, v. 2, n. 4, p. 1-11, 2001.
- UNDEM, B. J.; CARR, M. J. The role of nerves in asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 2, n. 2, p. 159-165, 2002.

- UNDEM, B. J.; KOLLARIK, M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 4, p. 355-360, 2005.
- UNDEM, B. J.; TAYLOR-CLARK, T. Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 6, p. 1521-1534, 2014.
- VACCA, G.; RANDERATH, W. J.; GILLISSEN, A. Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. **Respiratory Research**, v. 12, p. 1-9, 2011.
- VAN DEN BERG, M. P. M; MEURS, H.; GOSENS, R. Targeting arginase and nitric oxide metabolism in chronic airway diseases and their co-morbidities. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 40, p. 126-133, 2018.
- VAN DER VLIET, A. Nox enzymes in allergic airway inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1810, n. 11, p. 1035-1044, 2011.
- VANCHERI, C.; MASTRUZZO, C.; SORTINO, M. A.; CRIMI, N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE₂. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 40-46, 2004.
- VARRICCHI, G.; FERRI, S.; PEPYS, J.; POTO, R.; SPADARO, G.; NAPPI, E.; PAOLETTI, G.; VIRCHOW, J.C.; HEFFLER, E.; CANONICA, W. G. Biologics and airway remodeling in severe asthma. **Allergy**, v. 77, n. 12, p. 3538-3552, 2022.
- VASCONCELOS, L. H. C.; FERREIRA, S. R. D.; SILVA, M. C. C.; FERREIRA, P. B.; SOUZA, I. L. L.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Uncovering the role of oxidative imbalance in the development and progression of bronchial asthma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 6692110, 2021.
- VASCONCELOS, L. H. C.; SILVA, M. D. C. C.; COSTA, A. C.; OLIVEIRA, G. A. D.; SOUZA, I. L. L.; RIGHETTI, R. F.; QUEIROGA, F. R.; CARDOSO, G. A.; SILVA, A. S.; SILVA, P. M.; VIEIRA, G. C.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; MADRUGA, M. S.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Virgin coconut oil supplementation prevents airway hyperreactivity of guinea pigs with chronic allergic lung inflammation by antioxidant mechanism. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, n. 1, p. 5148503, 2020.
- VASCONCELOS, L. H. C.; SILVA, M. D. C. C.; COSTA, A. C.; OLIVEIRA, G. A.; SOUZA, I. L. L.; SILVA ARAÚJO, R.; ALVES, A. F.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Virgin coconut oil prevents airway remodeling and recovers tracheal relaxing reactivity by reducing transforming growth factor β expression on asthmatic guinea pig. **Journal of Functional Foods**, v. 122, p. 106544, 2024.
- VERHEIN, K. C.; FRYER, A. D.; JACOBY, D. B. Neural control of airway inflammation. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 9, n. 6, p. 484-490, 2009.
- VERMOT, A.; PETIT-HÄRTLEIN, I.; SMITH, S. M.; FIESCHI, F. NADPH oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 890, 2021.
- VINALL, S. L.; TOWNSEND, E. R.; PETTIPHER, R. A paracrine role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 cells (CRTH2) in mediating chemotactic activation of CRTH2⁺ CD4⁺ T helper type 2 lymphocytes. **Immunology**, v. 121, n. 4, p. 577-584, 2007.

- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.
- VOGEL, M.; ENGEROFF, P. A Comparison of Natural and Therapeutic Anti-IgE Antibodies. **Antibodies**, v. 13, n. 3, p. 58, 2024.
- WAGENER, A. H.; DE NIJS, S. B.; LUTTER, R.; SOUSA, A. R.; WEERSINK, E. J.; BEL, E. H.; STERK, P. J. External validation of blood eosinophils, FENO and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. **Thorax**, v. 70, n. 2, p. 115–120, 2015.
- WANG, B.; WANG, Y.; ZHANG, J.; HU, C.; JIANG, J.; LI, Y.; PENG, Z. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. **Archives of Toxicology**, v. 97, n. 6, p. 1439–1451, 2023.
- WANG, Y.; BRANICKY, R.; NOË, A.; HEKIMI, S. Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, v. 217, n. 6, p. 1915–1928, 2018.
- WENDELL, S. G.; FAN, H.; ZHANG, C. G Protein–Coupled Receptors in Asthma Therapy: Pharmacology and Drug Action. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 1–49, 2019.
- WENZEL, S. E. Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 17, p. 3S–12S, 1997.
- WHETSTONE, C. E.; RANJBAR, M.; OMER, H.; CUSACK, R. P.; GAUVREAU, G. M. The role of airway epithelial cell alarmins in asthma. **Cells**, v. 11, n. 7, p. 1105, 2022.
- WHITTLE, B. J.; MONCADA, S. Pharmacological interactions between prostacyclin and thromboxanes. **British Medical Bulletin**, v. 39, p. 232–238, 1983.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Asthma. 2024. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/asthma>>. Acesso em: 27 dez. 2024.
- WONG, T. H.; GAU, R. J.; CHEN, Y. F.; SHEN, H. H.; LIN, C. T. Y.; CHEN, S. L.; SUEN, J. L. Dendritic cells treated with a prostaglandin I₂ analog, iloprost, promote antigen-specific regulatory T cell differentiation in mice. **International Immunopharmacology**, v. 79, p. 106106, 2020.
- WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1–2, p. 135–143, 2001.
- WOOLDRIDGE, A. A.; MACDONALD, J. A.; ERDODI, F.; MA, C.; BORMAN, M. A.; HARTSHORNE, D. J.; HAYSTEAD, T. A. J. Smooth muscle phosphatase is regulated *in vivo* by exclusion of phosphorylation of Threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34496–34504, 2004.
- WU, W.; BANG, S.; BLEECKER, E. R.; CASTRO, M.; DENLINGER, L.; ERZURUM, S. C.; FAHY, J. V.; FITZPATRICK, A. M.; GASTON, B. M.; HASTIE, A. T.; ISRAEL, E.; JARJOUR, N. N.; LEVY, B. D.; MAUGER, D. T.; MEYERS, D. A.; MOORE, W. C.; PETERS, M.; PHILLIPS, B. R.; PHIPATANAKUL, W.; SORKNESS, R. L.; WENZEL, S. E. Multiview cluster analysis identifies variable corticosteroid response phenotypes

in severe asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 199, n. 11, p. 1358-1367, 2019.

XAVIER, A. M.; ANUNCIATO, A. K. O.; ROSENSTOCK, T. R.; GLEZER, I. Gene expression control by glucocorticoid receptors during innate immune responses. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 31, 2016.

XIA, J.; YU, P.; ZENG, Z.; MA, M.; ZHANG, G.; WAN, D.; GONG, D.; DENG, S.; WANG, J. Lauric triglyceride ameliorates high-fat-diet-induced obesity in rats by reducing lipogenesis and increasing lipolysis and β -oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 32, p. 9157-9166, 2021.

XIAO, C.; PUDDICOMBE, S. M.; FIELD, S.; HAYWOOD, J.; BROUGHTON-HEAD, V.; PUXEDDU, I.; HAITCHI, H. M.; VERNON-WILSON, E.; SAMMUT, D.; BEDKE, N.; CREMIN, C. Defective epithelial barrier function in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 3, p. 549-556, 2011.

YAMABAYASHI, C., KOYA, T., KAGAMU, H., KAWAKAMI, H., KIMURA, Y., FURUKAWA, T.; SAKAGAMI, T.; HASEGAWA, T.; SAKAI, Y.; MATSUMOTO, K.; NAKAYAMA, M.; GELFAND, E. W.; SUZIKI, E.; NARITA, I. A novel prostacyclin agonist protects against airway hyperresponsiveness and remodeling in mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 47, n. 2, p. 170-177, 2012.

YAN, Z. Q.; HANSSON, G. K.; SKOOGH, B. E.; LOTVALL, J. O. Induction of nitric oxide synthase in a model of allergic occupational asthma. **Allergy**, v. 50, n. 9, p. 760-764, 1995.

YANG, D.; PORNPATTANANANGKUL, D.; NAKATSUJI, T.; CHAN, M.; CARSON, D.; HUANG, C. M.; ZHANG, L. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6035-6040, 2009.

YANG, H. T.; CHEN, J. W.; RATHOD, J.; JIANG, Y. Z.; TSAI, P. J.; HUNG, Y. P.; HUANG, I. Lauric acid is an inhibitor of *Clostridium difficile* growth *in vitro* and reduces inflammation in a mouse infection model. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2635, 2018.

YAO, H.; LIU, J.; XU, S.; ZHU, Z.; XU, J. The structural modification of natural products for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 2, p. 121-140, 2017.

YOKOMIZO, T.; NAKAMURA, M.; SHIMIZU, T. Leukotriene receptors as potential therapeutic targets. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 7, p. 2691-2701, 2018.

YOKOMIZO, T.; SHIMIZU, T. The leukotriene B₄ receptors BLT₁ and BLT₂ as potential therapeutic targets. **Immunological Reviews**, v. 317, n. 1, p. 30-41, 2023.

ZASLONA, Z.; PETERS-GOLDEN, M. Prostanoids in asthma and COPD. **Chest**, v. 148, n. 5, p. 1300-1306, 2015.

ZHANG, F.; SONG, M.; CHEN, L.; YANG, X.; LI, F.; YANG, Q.; WANG, S. Dietary Supplementation of lauric acid alleviates the irregular estrous cycle and the impaired metabolism and thermogenesis in female mice fed with high-fat diet (HFD). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 45, p. 12631-12640, 2020a.

ZHANG, Q.; YANG, T.; LEI, D.; WANG, J.; ZHANG, Y. Efficient production of biodiesel from esterification of lauric acid catalyzed by ammonium and silver co-doped

phosphotungstic acid embedded in a zirconium metal–organic framework nanocomposite. **ACS Omega**, v. 5, n. 22, p. 12760-12767, 2020b.

ZHANG, W. C.; PENG, Y. J.; ZHANG, G. S.; HE, W. Q.; QIAO, Y. N.; DONG, Y. Y.; ZHU, M. S. Myosin light chain kinase is necessary for tonic airway smooth muscle contraction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 8, p. 5522-5531, 2010.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; SUN, J.; ZHANG, W.; GUO, Z.; MA, Q. Arachidonic acid metabolism in health and disease. **MedComm**, v. 4, n. 5, p. e363, 2023.

ZHANG, Y.; ZHOU, B. Functions of thymic stromal lymphopoietin in immunity and disease. **Immunologic Research**, v. 52, p. 211-223, 2012.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZHOU, W.; HASHIMOTO, K.; GOLENIEWSKA, K.; O'NEAL, J. F.; JI, S.; BLACKWELL, T. S.; FITZGERALD, G. A.; EGAN, K. M.; GERACI, M. W.; PEEBLES, R. S. Prostaglandin I₂ analogs inhibit proinflammatory cytokine production and T cell stimulatory function of dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 2, p. 702-710, 2007.

ZHOU, W.; ZHANG, J.; TOKI, S.; GOLENIEWSKA, K.; JOHNSON, M. O.; BLOODWORTH, M. H.; NEWCOMB, D. C.; PEEBLES, R. S. The PGI₂ analog cicaprost inhibits IL-33–induced Th2 responses, IL-2 production, and CD25 expression in mouse CD4⁺ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 7, p. 1936-1945, 2018.

ZIEGLER, S. F.; ROAN, F.; BELL, B. D.; STOKLASEK, T. A.; KITAJIMA, M.; HAN, H. The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). **Advances in Pharmacology**, v. 66, p. 129-155, 2013.

ZUO, L.; KOOZECHIAN, M. S.; CHEN, L. L. Characterization of reactive nitrogen species in allergic asthma. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 112, n. 1, p. 18-22, 2014.

Apêndices

Apêndice A – Artigo publicado na *Scientific Reports* (FI: 3.8 e Qualis A1 para Farmácia).

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

 Check for updates

OPEN

Functional and morphologic dysfunctions in the airways of rats submitted to an experimental model of obesity-exacerbated asthma

Sarah Rebeca Dantas Ferreira^{1,2}, Rayane Fernandes Pessoa^{1,2},
Indyra Alencar Duarte Figueiredo^{1,2}, João Pedro Moura Lima¹,
Thayna Maria Costa Fernandes de Moura¹, Cleyton Oliveira Bezerra¹,
Alissa Maria de Oliveira Martins¹, Leila Moreira de Carvalho³, Marta Suely Madruga³,
Hassler Clementino Cavalcante⁴, Jailane de Souza Aquino^{4,5}, José Luiz de Brito Alves⁵,
Adriano Francisco Alves^{2,6}, Luiz Henrique César Vasconcelos^{1,2,6} &
Fabiana de Andrade Cavalcante^{1,2,6}

The obesity-exacerbated asthma phenotype is characterized by more severe asthma symptoms and glucocorticoid resistance. The aim of this study was to standardize an obesity-exacerbated asthma model by a high glycemic level index (HGLI) diet and ovalbumin (OVA) sensitization and challenges in Wistar rats. Animals were divided into groups: control (Ctrl), obese (Ob), asthmatic (Asth), obese asthmatic (Ob + Asth) and obese asthmatic treated with dexamethasone (Ob + Asth + Dexa), and in vivo and in vitro functional and morphological parameters were measured. After HGLI consumption, there was an increase in body weight, fasting blood glucose, abdominal circumferences, body mass index and adiposity index. Respiratory function showed a reduction in pulmonary tidal volume and ventilation. In isolated tracheas, carbachol showed an increase in contractile efficacy in the Ob, Ob + Asth and Ob + Asth + Dexa, but mostly on Ob + Asth. Histological analysis of lungs showed peribronchovascular inflammation and smooth muscle hypertrophy and extracellular remodeling on Ob + Asth and Ob + Asth + Dexa. An obesity-exacerbated asthma model was successfully established. Therefore, this model allows further molecular investigations and the search for new therapies for the treatment and relief of symptoms of patients with obesity-induced resistant asthma.

Apêndice B – Artigo publicado na *Frontiers in Pharmacology* (FI: 4.4 e Qualis A2 para Farmácia).



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Frederic Becq,
 University of Poitiers, France

REVIEWED BY
 Alexander V. Zholos,
 Taras Shevchenko National University of
 Kyiv, Ukraine
 Huanghe Yang,
 Duke University, United States

*CORRESPONDENCE
 Bagnólia Araújo da Silva,
 ✉ bagnolia@lft.ufpb.br
 Luiz Henrique César Vasconcelos,
 ✉ lhcv@academico.ufpb.br

RECEIVED 07 June 2023
 ACCEPTED 08 September 2023
 PUBLISHED 28 September 2023

CITATION
 Figueiredo IAD, Ferreira SRD,
 Fernandes JM, Silva BA, Vasconcelos LHC
 and Cavalcante FA (2023) A review of the
 pathophysiology and the role of ion
 channels on bronchial asthma.
Front. Pharmacol. 14:1236550.
 doi: 10.3389/fphar.2023.1236550

COPYRIGHT
 © 2023 Figueiredo, Ferreira, Fernandes,
 Silva, Vasconcelos and Cavalcante. This is
 an open-access article distributed under
 the terms of the Creative Commons
 Attribution License (CC BY). The use,
 distribution or reproduction in other
 forums is permitted, provided the original
 author(s) and the copyright owner(s) are
 credited and that the original publication
 in this journal is cited, in accordance with
 accepted academic practice. No use,
 distribution or reproduction is permitted
 which does not comply with these terms.

A review of the pathophysiology and the role of ion channels on bronchial asthma

Indyra Alencar Duarte Figueiredo¹, Sarah Rebeca Dantas Ferreira¹,
 Jayne Muniz Fernandes², Bagnólia Araújo da Silva^{1,3*},
 Luiz Henrique César Vasconcelos^{1,4*} and
 Fabiana de Andrade Cavalcante^{1,4}

¹Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, ²Graduação em Farmácia, Departamento de Ciências Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, ³Departamento de Ciências Farmacéuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, ⁴Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Asthma is one of the main non-communicable chronic diseases and affects a huge portion of the population. It is a multifactorial disease, classified into several phenotypes, being the allergic the most frequent. The pathophysiological mechanism of asthma involves a Th2-type immune response, with high concentrations of allergen-specific immunoglobulin E, eosinophilia, hyperreactivity and airway remodeling. These mechanisms are orchestrated by intracellular signaling from effector cells, such as lymphocytes and eosinophils. Ion channels play a fundamental role in maintaining the inflammatory response on asthma. In particular, transient receptor potential (TRP), store-operated Ca^{2+} channels (SOCs), Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca} and BK_{Ca}), calcium-activated chloride channel (TMEM16A), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (PIEZO1) and purinergic P2X receptor (P2X). The recognition of the participation of these channels in the pathological process of asthma is important, as they become pharmacological targets for the discovery of new drugs and/or pharmacological tools that effectively help the pharmacotherapeutic follow-up of this disease, as well as the more specific mechanisms involved in worsening asthma.

Apêndice C – Artigo publicado na *Pharmaceuticals* (FI: 4.3 e Qualis A1 para Farmácia).



pharmaceuticals



Article

Repeated-Dose Toxicity of Lauric Acid and Its Preventive Effect Against Tracheal Hyper-Responsiveness in Wistar Rats with Possible *In Silico* Molecular Targets

Indyra Alencar Duarte Figueiredo ^{1,2,*}, Alissa Maria de Oliveira Martins ^{1,2}, Alexya Mikelle Teixeira Cavalcanti ¹, Jayne Muniz Fernandes ¹, Ludmila Emily da Silva Gomes ¹, Mateus Mendes Vieira ¹, Gabriel Nunes Machado de Oliveira ¹, Isabela Motta Felício ^{1,2}, Lucas Nóbrega de Oliveira ^{1,2}, Igor Gabriel da Silva Ramalho ^{1,2}, Natália Ferreira de Sousa ^{1,2}, Luciana Scotti ^{2,3}, José Luiz de Brito Alves ⁴, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz ^{2,5}, Daniele Idalino Janebro Ximenes ⁵, Luiz Henrique César Vasconcelos ^{1,2,6,*} and Fabiana de Andrade Cavalcante ^{1,2,6}

- ¹ Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; alissaoiveira@lff.ufpb.br (A.M.d.O.M.); alexyacavalcanti08@gmail.com (A.M.T.C.); jaynemunizf@gmail.com (J.M.F.); ludmilasgomes@gmail.com (L.E.d.S.G.); mateusmvd89@gmail.com (M.M.V.); gabrielsoad619@gmail.com (G.N.M.d.O.); isabela_motta@lff.ufpb.br (I.M.F.); lucasnobrega@lff.ufpb.br (L.N.d.O.); igorgabriel0809@gmail.com (I.G.d.S.R.); nataliafsousa@lff.ufpb.br (N.F.d.S.); fabianacavalcante@lff.ufpb.br (F.d.A.C.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; luciana.scotti@gmail.com (L.S.); mtscootti@gmail.com (M.T.S.); margarethdiniz.ufpb@gmail.com (M.d.F.F.M.D.)
- ³ Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- ⁴ Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; jose.lui@academico.ufpb.br
- ⁵ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; djanebro@yahoo.com.br
- ⁶ Departamento de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil
- * Correspondence: indyrafigueiredo@hotmail.com (I.A.D.F.); lhcv@academico.ufpb.br (L.H.C.V.)



Academic Editor: Domenico Iacopetta

Received: 3 December 2024

Revised: 16 December 2024

Accepted: 19 December 2024

Published: 6 February 2025

Citation: Figueiredo, I.A.D.; Martins, A.M.d.O.; Cavalcanti, A.M.Y.; Fernandes, J.M.; Gomes, L.E.d.S.; Vieira, M.M.; Oliveira, G.N.M.d.; Felício, I.M.; Oliveira, L.N.d.; Ramalho, I.G.d.S.; et al. Repeated-Dose Toxicity of Lauric Acid and Its Preventive Effect Against Tracheal Hyper-Responsiveness in Wistar Rats with Possible *In Silico* Molecular Targets. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 221. <https://doi.org/10.3390/ph18020221>

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and

Abstract: Background/Objectives: Lauric acid (LA), a medium-chain fatty acid, is a promising drug for asthma treatment. This study evaluated the toxicity of repeated doses and the effect of LA on pulmonary ventilation and tracheal reactivity in asthmatic Wistar rats and identified possible molecular targets of LA action *in silico*. Methods: The rats were divided into control (CG) and LA-treated groups at 100 mg/kg (AAL100G) for toxicity analysis. Pulmonary ventilation and tracheal reactivity were assessed in the control (CG), asthmatic (AG), asthmatic treated with LA at 25, 50, or 100 mg/kg (AAL25G, AAL50G, and AAL100G), and dexamethasone-treated groups (ADEXAG). Results: The results showed that LA at a dose of 100 mg/kg did not cause death or toxicity. A pulmonary ventilation analysis indicated that AG had reduced minute volume, which was prevented in AAL25G. LA at all doses prevented carbachol-induced tracheal hyper-responsiveness and reduced the relaxing effect of aminophylline, as observed in AG. An *in silico* analysis revealed that LA had a good affinity for nine proteins (β_2 -adrenergic receptor, Cav, BK_{Ca}, K_{ATP}, adenylyl cyclase, PKG, eNOS, iNOS, and COX-2). Conclusions: LA at 100 mg/kg has low toxicity, prevents hyper-responsiveness in an asthma model in rats, and acts as a multitarget compound with a good affinity for proteins related to airway hyper-responsiveness.

Anexos

Anexo 1 – Certificado de aprovação do projeto junto à CEUA.

**Universidade
Federal da
Paraíba**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Reitoria

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do tratamento com o ácido láurico e seus possíveis mecanismos de ação sobre a reatividade traqueal de ratos asmáticos", protocolada sob o CEUA nº 9310040522 (ID 001692), sob a responsabilidade de **Fabiana de Andrade Cavalcante** - 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 22/06/2022.

We certify that the proposal "Investigation of lauric acid treatment and its possible mechanisms of action on tracheal reactivity in asthmatic rats", utilizing 312 Heterogenics rats (292 males and 20 females), protocol number CEUA 9310040522 (ID 001692), under the responsibility of **Fabiana de Andrade Cavalcante** - 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 06/22/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2022** a **07/2026**

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **50 a 60 dias**

N: **20**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **160 a 180 g**

Origem: **Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **50 a 60 dias**

N: **292**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 350 g**

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas/PgPNSB/CCS/UFPB e Unidade de Produção Animal (UPA-IPEFarM)..

João Pessoa, 29 de agosto 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. Ivã Carmem Talleri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba