

André Felipe Vilvert

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *EX VIVO* E *IN VIVO* DE
DERIVADOS DO P-AMINOFENOL E SALICILATOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia
Orientador: Prof. Dr. Eduardo
Monguilhott Dalmarco

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vilvert, André Felipe

Atividade anti-inflamatória ex vivo e in vivo de derivados do p-aminofenol e salicilatos / André Felipe Vilvert ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2018.

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Inflamação. 3. Salicilatos. 4. Paracetamol. 5. Atividade anti-inflamatória. I. Monguilhott Dalmarco, Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

“ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA ex-vivo E in-vivo DE DERIVADOS DO P-AMINOFENOL E SALICILATOS”

POR

André Felipe Vilvert

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Alexandre Onofre (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Beatriz Garcia Mendes (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC – Orientador(a))



Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 29 de março de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, José e Vera, que nunca deixaram que nada me faltasse e que sempre estiveram ao meu lado apoiando todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Grande Arquiteto do Universo, criador de todas as coisas, fonte de amor e inspiração. Sou eternamente grato por ter colocado em meu caminho pessoas tão dedicadas e comprometidas em busca da realização de um sonho.

Agradeço aos meus pais e à minha irmã que não mediram esforços para me dar uma boa educação e para me guiar no caminho certo. O amor incondicional de vocês três é o que me dá forças para continuar sempre. Eu não tenho palavras que aqui caibam que possam descrever o quanto eu sou grato e feliz por ter vocês por perto e por sempre me apoiarem, mesmo que as decisões tomadas não sejam aquelas que vocês trilharam pra mim. Vocês são tudo pra mim.

A Carolina Marian Pedrini, meu amor, que diariamente me apoia e me dá forças para não desistir. Minha companheira, que alegre e encanta os meus dias com seu sorriso e o melhor abraço do mundo. Obrigado por ser quem você é e por me tornar uma pessoa melhor todos os dias. Eu te amo incondicionalmente.

Ao meu orientador, amigo e mentor, prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pelas horas de conversa, puxões de orelha e dedicação para que eu pudesse terminar esse trabalho em tempo hábil. Meu eterno agradecimento.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI), por serem extremamente amigáveis e por terem me recebido tão bem. Sentirei falta dos nossos cafés e das inúmeras conversas filosóficas. Meu agradecimento especial ao Marcus, que sempre se prontificou em ajudar e sempre estava disposto a dar um empurrão para que as coisas saíssem do lugar. Esse trabalho também é seu, meu amigo.

Aos grandes amigos que a vida foi capaz de me proporcionar. Obrigado por entenderem as minhas escolhas e por terem colocado fé em mim e no meu trabalho. Obrigado pela parceria, pelos momentos de descontração e pelos conselhos. Amo demais todos vocês.

Ao prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, por ter gentilmente cedido as moléculas utilizadas neste estudo.

Meu agradecimento a todos os que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse finalizar este trabalho.

“Eu sei que essa situação pode ser intimidadora. Você olha ao redor e é tudo assustador e diferente, mas sabe... encará-la, avançar contra ela como um touro – é assim que crescemos como pessoas”.

Rick Sanchez (*Rick and Morty*)

RESUMO

Salicilatos e paracetamol (p-aminofenol) são anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e seu uso é amplamente difundido na população em geral. Os efeitos adversos de ambos levam a indústria farmacêutica a buscar novas moléculas a fim de se obter maior segurança, com o menor custo possível. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito anti-inflamatório de nove compostos derivados de paracetamol e salicilatos em modelos experimentais *ex vivo* e *in vivo*. Para os ensaios *ex vivo* foram utilizados neutrófilos peritoneais de camundongos estimulados com LPS (5 µg/mL) na presença ou ausência dos compostos estudados. Assim avaliamos viabilidade celular após contato dos neutrófilos com os compostos em teste, e na sequência triamos os não tóxicos, quanto sua atividade anti-inflamatória avaliando-se sua ação sobre a produção de NOx e IL-6. Nos ensaios *in vivo*, utilizou-se o modelo da lesão aguda pulmonar induzida pelo LPS, onde os camundongos foram inflamados com LPS (5 mg/kg) isoladamente, ou após o tratamento com os compostos em estudo. Após a coleta do lavado broncoalveolar, foram realizadas as quantificações de leucócitos totais e exsudato, bem como as determinações das concentrações das citocinas pró-inflamatórias fator necrose tumoral alpha (TNF-α), interferon gama (IFN-γ) e interleucina-6 (IL-6) e da citocina anti-inflamatória IL-10 (IL-10). Para análise estatística dos resultados dos experimentos *ex vivo* utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA, complementados pelos pós testes de Tukey ou Dunnet. Para os resultados *in vivo* utilizou-se o teste de análise de variância ANOVA, complementados pelos pós testes de Tukey ou Neuman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Analisando o efeito dos derivados do p-aminofenol e salicilatos sobre a viabilidade celular dos neutrófilos (*ex vivo*) verificamos que nenhum dos nove compostos demonstrou toxicidade celular significativa. Por este motivo, todos foram submetidos à avaliação de sua capacidade em inibir a produção de metabólitos do NOx e concentrações de IL-6. Nesta fase dos experimentos, verificamos que todos os compostos foram eficazes em reduzir a produção de NOx, mas apenas quatro deles (1a1, 2a2, 2a4 e 5a1) foram capazes de reduzir significativamente as concentrações de IL-6. Desta forma, estes compostos foram selecionados para seguir os estudos *in vivo*. Nesta etapa experimental (*in vivo*), os quatro compostos apresentaram atividade significativa sobre a migração leucocitária e exsudação, no lavado broncoalveolar. Em relação ao efeito destes compostos sobre as citocinas, verificamos que os compostos 2a2, 2a4 e

5a1 inibiram as concentrações de TNF- α , e apenas o composto 2a2 inibiu o INF- γ . Nenhum dos compostos foi eficaz em modificar as concentrações de IL-6 e IL-10. Desta forma, os resultados deste estudo demonstraram que os compostos 2a2, 2a4 e 5a1 possuem atividade anti-inflamatória, no entanto o composto 2a2 pode ser considerado o composto mais ativo devido ao seu efeito estar relacionado à inibição celular, vascular e também sobre duas citocinas pró-inflamatórias chaves na perpetuação do processo inflamatório.

Palavras-chave: inflamação, salicilatos, paracetamol, citotoxicidade, atividade anti-inflamatória

ABSTRACT

Salicylates and paracetamol (p-aminofenol) are nonsteroidal anti-inflammatories and its use widely diffused in general population. The adverse effects of both lead the pharmaceutical industry to seek new molecules in order to obtain greater security, with the lowest possible cost. The objective of the present study was to investigate the anti-inflammatory effect of nine compounds derived from paracetamol and salicylates in experimental models *ex vivo* and *in vivo*. For the *ex vivo* assays, peritoneal neutrophils of LPS-stimulated mice (5 μg / ml) were used in the presence or absence of the compounds studied. Thus, we assessed cell viability after neutrophil contact with the test compounds and in the sequence, we evaluated the non-toxic as well as its anti-inflammatory activity, evaluating its action on NO_x and IL-6 production. In the *in vivo* assays, the LPS-induced acute lung injury model was used in which the mice were either challenged with LPS (5 mg / kg) alone or after treatment with the test compounds. After collection of bronchoalveolar lavage, total leukocyte and exudate measurements were performed, as well as the determinations of the concentrations of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-6 (IL-6) and the anti-inflammatory cytokine IL-10 (IL-10). For the statistical analysis of the results of *ex vivo* experiments, the ANOVA variance analysis test was used, complemented by the Tukey or Dunnett tests. For the *in vivo* results the ANOVA variance analysis test was used, complemented by the Tukey or Neuman-Keuls tests. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Analyzing the effect of p-aminophenol derivatives and salicylates on neutrophil cell viability (*ex vivo*), we found that none of the nine compounds demonstrated significant cellular toxicity. For this reason, all were submitted to the evaluation of their ability to inhibit the production of NO_x metabolites and IL-6 concentrations. At this stage of the experiments, we found that all compounds were effective in reducing NO_x production, but only four of them (1a1, 2a2, 2a4 and 5a1) were able to significantly reduce IL-6 concentrations. In this way, these compounds were selected to follow *in vivo* studies. In this experimental batch (*in vivo*), the four compounds presented significant activity on leukocyte migration and exudation in bronchoalveolar lavage. Concerning the effect of these compounds on cytokines, we found that compounds 2a2, 2a4 and 5a1 inhibited TNF- α concentration, and only compound 2a2 inhibited INF- γ . None of the compounds was effective at modifying IL-6 and IL-10 concentrations. Thus, the results of this study

demonstrated that the compounds 2a2, 2a4 and 5a1 have anti-inflammatory activity, however the compound 2a2 can be considered the most active compound due to its effect is related to cellular inhibition, vascular and to two cytokines proinflammatory properties in the perpetuation of the inflammatory process.

Keywords: inflammation, salicylates, paracetamol, cytotoxicity, anti-inflammatory effect

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Ácido Salicílico.....	29
Figura 2. Estrutura química do Paracetamol (p-aminofenol).....	30
Figura 3. Formação e efeitos do óxido nítrico na inflamação.....	35
Figura 4. Estruturas químicas dos padrões e dos compostos.....	44
Figura 5. Viabilidade celular.....	47
Figura 6. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos padrões (paracetamol, ácido salicílico e ácido genticílico).....	51
Figura 7. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 1a1, 1b1 e 1c1.....	52
Figura 8. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 2a1, 2a2 e 2a3.....	52.
Figura 9. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 2a4, 4a1 e 5a1.....	53
Figura 10. Inibição da produção de NO _x de neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 1a1, 1b1 e 1c1.....	54
Figura 11. Inibição da secreção de NO _x de neutrófilos de camundongos, após exposição aos compostos 2a1, 2a2, 2a3 e 2a4.....	55
Figura 12. Inibição da secreção de NO _x de neutrófilos de camundongos, após exposição aos compostos 4a1 e 5a1.....	56
Figura 13. Inibição da secreção de NO _x de neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos padrões.....	57

Figura 14. Efeito dos compostos sobre a produção de IL-6.....	58
Figura 15. Efeito dos compostos selecionados sobre a migração de leucócitos para a o lavado broncoalveolar.....	59
Figura 16. Efeito dos compostos selecionados sobre as concentrações de proteínas totais no lavado broncoalveolar.....	61
Figura 17. Resumo gráfico do estudo.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito dos compostos selecionados sobre as concentrações das citocinas no lavado broncoalveolar.....	62
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALRs	Receptores do tipo AIM2-Like
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Células apresentadoras de antígeno
ARDS	Síndrome da desordem respiratória aguda
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD4+	Linfócito T auxiliador
CD80	Molécula co-estimuladora cluster of differentiation 80
CD86	Molécula co-estimuladora cluster of differentiation 86
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
CO ₂	Dióxido de carbono
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DAMPs	Padrões moleculares associados a dano
DC	Células dendríticas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzimaimunoensaio
ERK	Quinase reguladora extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GTA	Ácido gentísico

i.p.	Via intraperitoneal
i.v.	Via intravenosa
IBD	Doença inflamatória intestinal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-8	Interleucina-8
IL-21	Interleucina-21
IRF3	Fator regulador de interferon do tipo 3
JAK	Janus quinase
JNK	Quinases c-Jun N-terminal
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LAP	Lesão aguda pulmonar
LPS	Lipopolissacarídeos
K	Potássio molecular
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade tipo II
MTT	3-(4,5-dimethiazol-Zyl) -2-5-brometo de difeniltetrazólio
Na	Sódio molecular

NaOH	Hidróxido de sódio
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula Natural Killer
NLR	Receptor do tipo NOD-like
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization-domain protein</i>
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS _e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS _i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS _n	Óxido nítrico sintase neuronal
NO _x	Metabólitos do óxido nítrico (nitrito/nitrato)
O ₂	Oxigênio molecular
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAR	Paracetamol
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C reativa
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RLR	Receptor RIG-I-Like
s.c.	Via subcutânea
SAC	Ácido salicílico
SDS	Docecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Sinal transdutor e ativador de transcrição
Th1	Linfócito T helper 1
Th17	Linfócito T helper 17

Th2	Linfócito T helper 2
TLR4	Receptor tipo toll 4
TLRs	Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral tipo 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral tipo 2
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
VCl ₃	Cloreto de vanádio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS	27
1.2 SALICILATOS	28
1.3 PARACETAMOL (P-AMINOFENOL)	29
1.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO	31
1.5 RESPOSTA IMUNE INATA	32
1.6 MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO	35
1.6.1 Óxido nítrico	35
1.6.2 Citocinas envolvidas na resposta imune inata	36
1.7 MODELOS DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
2.2.1 <i>Ex vivo</i>	43
2.2.2 <i>In vivo</i>	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS	44
3.2 REAGENTES UTILIZADOS	45
3.3 <i>EX VIVO</i>	45
3.3.1 Animais	45
3.3.2 Protocolo Experimental	45
3.3.3 Viabilidade celular	46
3.3.4 Triagem de atividade anti-inflamatória	47
3.3.5 Dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NO_x)	48
3.3.6 Dosagem de IL-6	48
3.4 <i>IN VIVO</i>	49
3.4.1 Coleta de material broncoalveolar	49
3.4.2 Determinação de leucócitos	49

3.4.3 Determinação de proteína	49
3.4.4 Determinação das concentrações das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10.....	50
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1 <i>EX VIVO</i>	51
4.1.1 Viabilidade celular	51
4.1.2 Eficácia dos compostos sobre a produção de NO_x em neutrófilos de camundongos estimulados com LPS	53
4.1.3 Eficácia dos compostos sobre as concentrações de IL-6	57
4.2 <i>IN VIVO</i>	58
4.2.1 Efeito dos compostos selecionados sobre a migração de leucócitos no lavado broncoalveolar.....	59
4.2.2 Efeito dos compostos selecionados sobre as concentrações de proteínas totais no lavado broncoalveolar	60
4.2.3 Efeito dos compostos sobre a produção das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10.....	61
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS

Na antiguidade os povos procuravam e utilizavam substâncias naturais para o alívio das enfermidades as quais os acometia. Atualmente, a sociedade científica é constantemente incentivada a buscar novos tratamentos e a cura para diversas doenças através da implementação de novas e avançadas tecnologias para se chegar a novos fármacos (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

O principal foco das indústrias farmacêuticas, atualmente, está voltado à descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos que possam satisfazer as necessidades da população, tanto na oferta de novas terapias para doenças sem tratamento, quanto para a melhoria das opções de tratamentos já existentes, contudo mais eficazes, mais seguros e mais baratos (MIGNANI et al., 2016a). Além disso, as empresas farmacêuticas devem buscar novas abordagens de desenvolvimento, visando a melhoria da produtividade, garantia das demandas do setor de saúde e da sobrevivência em termos de retorno do investimento (MIGNANI et al., 2016b).

A pesquisa com compostos sintéticos e semissintéticos tem sido considerada uma abordagem frutífera para a procura de novos fármacos pela indústria farmacêutica, uma vez que muitos dos medicamentos utilizados no cotidiano são derivados deste tipo de estratégia (HANKE, MERK, et al., 2016).

A área de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de uma indústria farmacêutica requer altos investimentos, mostrando um contraste em relação aos medicamentos incluídos no mercado nos últimos anos. Durante várias décadas, o setor encarou grandes questões não técnicas, como a redução do número de medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), reduções nos orçamentos e aumentos nos custos globais de P&D (MIGNANI et al., 2016a). Estima-se que a cada 9 anos, desde a década de 1950, o número de aprovações de novos medicamentos tenha reduzido pela metade (BAYLISS et al., 2016).

Segundo Lima (2007), a descoberta de novos fármacos ao longo dos últimos anos, tem se tornado uma atividade complexa, custosa, demorada e a produtividade da indústria farmacêutica vem sendo questionada, uma vez que, tecnologias novas surgem, o que teoricamente, levaria a uma redução de custos e aumento da produtividade e descoberta de substâncias inovadoras; o que se tem na

realidade é um declínio na produção dessas novas moléculas. Segundo dados de Bayliss e colaboradores (2016) apenas 4,3% dos projetos de P&D prosseguem com fármacos promissores desde a fase clínica até estudos de fase III.

É um desafio para a indústria e para os pesquisadores em geral a descoberta de novos fármacos, principalmente em relação à sua eficácia, potência e seletividade, bem como suas características farmacocinéticas, envolvendo aí absorção, distribuição, metabolização e excreção.

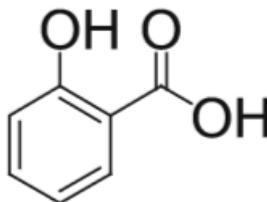
Devido à demanda elevada na busca por novas substâncias que sejam inovadoras, estabelecem-se novos arquétipos na identificação de substâncias bioativas e ao desenvolvimento de novos compostos que possuam propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas otimizadas, com o objetivo de se obter conhecimentos mais detalhados sobre os mecanismos complexos de doenças.

1.2 SALICILATOS

Em algumas tábuas sumérias que datam do período de 3000 anos a.C., foi relatada a utilização de extrato de folhas de salgueiro (*Salix alba*) para aliviar dores musculoesqueléticas, bem como há relatos de que os egípcios usavam uma decocção de folhas de murta e salgueiro com a mesma finalidade (JACK, 1997).

Em 1828 alguns pacientes receberam tanto a salicina quanto o ácido salicílico. Eles tiveram seus sintomas observados e sua urina foi analisada. Assim eles descobriram que ambos os compostos reduziam a febre reumática. Com base nas observações, o ácido salicílico (**Figura 1**) foi identificado como o composto ativo responsável pela eficácia da casca de salgueiro em aliviar a dor e febre (AUYANG, 2007).

Figura 1. Estrutura química do Ácido Salicílico (Borges et al, 2015).



Em fevereiro de 1899, a Bayer registrou a marca Aspirina®, cujo princípio ativo é o mais importante derivado do ácido salicílico, o ácido acetilsalicílico (AAS). Após seu lançamento no mercado, o sucesso foi imediato e desde então, a medicina passou a tê-la como uma das mais potentes armas de seu arsenal terapêutico e ainda hoje continua sendo uma das drogas mais largamente utilizadas no mundo inteiro (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

De acordo com Borges e colaboradores (2012), salicilatos são compostos utilizados como anti-inflamatórios, para tratamento de dores em geral, com antiplaquetário na prevenção de infartos e acidentes vasculares cerebrais, principalmente em idosos.

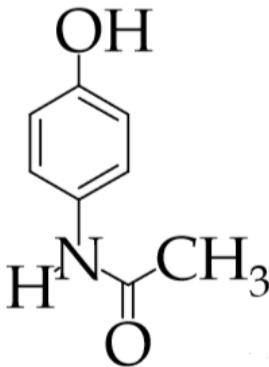
Os principais efeitos adversos dos salicilatos resumem-se em sangramento gástrico (dependendo da dose), tontura, zumbido no ouvido, surdez e acidose metabólica. Em crianças, pode desencadear um distúrbio raro, porém grave, denominado Síndrome de Reye (RANG, et al 2016).

1.3 PARACETAMOL (P-AMINOFENOL)

O paracetamol (**Figura 2**) é um derivado acetilado da anilina e um metabólito ativo de duas outras amidas, a acetanilida e fenacetina. Seus efeitos analgésicos foram reconhecidos por volta de 1900, passando assim a ser utilizado como analgésico para dores leves e

moderadas, juntamente com seus efeitos antitérmicos (PRESCOTT, 2000).

Figura 2. Estrutura química do Paracetamol (p-aminofenol) (Borges et al, 2015).



Foi introduzido nos Estados Unidos em 1955 com o nome de marca Tylenol® e um ano após foi introduzido na Grã-Bretanha sob o nome de Panadol®, tendo forte presença na classe médica como um analgésico eficaz e livre dos efeitos colaterais associados à aspirina, como sangramento gastrointestinal, de forma que esta abordagem colaborou de forma significativa para que o fármaco se tornasse acessível (BEBENISTA; NOWAK, 2014).

Com o uso cada vez mais popular, este medicamento acabou se tornando a primeira escolha entre analgésicos e antitérmicos, depois que o AAS foi associado com a Síndrome de Reye em crianças com infecção viral, sendo o medicamento mais utilizado tanto para crianças quanto para adultos e incluído nos guias clínicos para tratamento de dores múltiplas (PRESCOTT, 2000).

O paracetamol é indicado para o tratamento de febre e para o alívio de dores de intensidade leve a moderada, tais como cefaléia, mialgias, dismenorréia e dor dental. Para produzir analgesia leve, o paracetamol é o fármaco preferido quando os pacientes são hipersensíveis ao AAS ou toleram mal os salicilatos (MEOTTI; ROSA; BAGIO, 2006; STEINER; VOELKER, 2009).

Possui efeitos anti-inflamatórios discretos em relação a outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), assim como na dor intensa.

Apresenta baixo potencial tóxico ao trato gastrointestinal, não produz efeitos cardiovasculares e renais indesejáveis (BERTOLINI; FERRARI; OTTANI et al., 2006). Apresenta alguns efeitos adversos como sonolência leve, relaxamento, sensação de tranquilidade ou euforia, além de leves reações alérgicas. A ingestão regular de grandes doses por um longo período pode levar a lesões renais (BERTOLINI; FERRARI; OTTANI et al., 2006; RANG; DALE; RITTER, 2016).

Doses tóxicas podem levar a quadros de náuseas e vômitos. Lesões hepáticas potencialmente fatais ocorrem dentro de 24-48h após a intoxicação, devido à saturação das enzimas de conjugação. O quadro pode ser revertido se for administrado de forma precoce agentes que aumentem a glutathione, como acetilcisteína, podendo impedir a lesão hepática (RANG; DALE; RITTER, 2016).

Levando-se em consideração o mecanismo molecular da atividade analgésica do paracetamol, bem como a sua hepatotoxicidade, diversas modificações na estrutura molecular deste fármaco têm sido realizadas como tentativa para minimizar ou evitar sua toxicidade e melhorar a atuação analgésica (DINIZ; BORGES; ALVES, 2004).

Os efeitos adversos dos sacililatos e a toxidade do paracetamol motiva a pesquisa e o desenvolvimento de derivados análogos mais seguros, sendo que muitos desses derivados já foram desenvolvidos na tentativa de diminuir sua toxidade, porém mantendo suas propriedades terapêuticas. Entretanto, estes esforços não vêm resultando em novos compostos mais seguros, de forma que possam ser introduzidos no mercado farmacêutico. De certa forma, os estudos contribuíram para a obtenção de dados da relação entre a estrutura química e a atividade biológica do paracetamol e seus análogos e de seus prováveis mecanismos de ação biológica e toxicidade.

1.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO

Inflamação é uma forma de defesa do organismo, também definida como uma resposta não específica ao mal funcionamento tecidual, sendo incorporada pelo sistema imune inato e adaptativo no combate a patógenos invasores (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). É um processo estritamente regulado e tem início após lesão tecidual ou infecção e envolve uma distribuição coordenada de componentes sanguíneos, como plasma e leucócitos, ao local da infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008).

É uma adaptação fundamental à perda da homeostase celular e tecidual com diversos papéis fisiológicos importantes que incluem, defesa do hospedeiro, remodelação e reparo tecidual e a regulação do metabolismo. Os diversos e complexos mecanismos operam em diferentes níveis e incluem alterações na composição de células do sistema imune nos tecidos, alterações na resposta celular em frente a estímulos inflamatórios, regulação das vias de sinalização e o controle a nível de expressão gênica (MEDZHITOV; HORNG, 2009).

A principal função da inflamação é eliminar um patógeno agressor e remover o dano tecidual, com o objetivo de restaurar a homeostase tecidual. A ação de fagócitos profissionais, como neutrófilos, monócitos e macrófagos é crucial para a efetiva eliminação de agentes intrusos e debris celulares (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

A resposta inflamatória é mais evidenciada em resposta a infecções bacterianas, em que há ativação de receptores do sistema imune inato, como os receptores do tipo toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (nucleotide-binding oligomerization-domain protein). Esse reconhecimento inicial é mediado por macrófagos e mastócitos teciduais, levando à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos da cascata proteolítica (MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório possui como algumas características fisiológicas vasodilatação, aumento do fluxo e permeabilidade vascular, formação de exsudato, migração de leucócitos para o local lesionado, formação de espécies reativas de oxigênio, liberação de fatores de crescimento e a geração de um novo tecido funcional (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Diversas células e mediadores estão envolvidos na resposta inflamatória e o recrutamento destes para o local da inflamação tem como objetivo reconhecer e eliminar microrganismos e restos celulares.

1.5 RESPOSTA IMUNE INATA

A resposta imune inata e adaptativa são necessárias para se eliminar patógenos que ocasionalmente podem ser inalados e vão parar nos pulmões. No caso de infecções pulmonares agudas, a resposta inflamatória do hospedeiro precisa ser bem regulada para uma eliminação eficiente dos patógenos e para prevenir uma imunopatologia (WONNENBERG; JUNGnickel; HONECKER et al., 2016).

A resposta imune inata refere-se a uma variedade de mecanismos de defesa que podem responder rapidamente, imediatamente ou dentro de poucas horas, a alguma perturbação na homeostase, como por exemplo dano tecidual ou a resposta à presença de um patógeno durante uma infecção (PILLON; KROOK, 2017).

Podemos citar que a imunidade inata é não específica a um antígeno, é uma resposta imediata e não resulta em memória imunológica, ao contrário da resposta adaptativa. Desta forma, durante as primeiras horas e dias de exposição a um novo patógeno dependemos da resposta imune inata para proteger o organismo de uma infecção. Além disso, a resposta imune adaptativa é dependente de uma ativação prévia da resposta imune inata (PARKIN; COHEN, 2001; ALBERTS et al., 2007).

Durante infecções, a ativação da resposta imune inata é importante para impedir que o patógeno se espalhe e para ativação da resposta imune adaptativa. As células da resposta imune inata reconhecem constituintes moleculares associados a patógenos, (Pathogen-Associated Molecular Pattern – PAMPs), como peptídeos e ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias, que geram e perpetuam uma resposta inflamatória diante de uma infecção e constituintes moleculares associados a dano (Damage-Associated Molecular Pattern – DAMPs) que geram e perpetuam respostas inflamatórias não relacionadas a processos infecciosos. Havendo sensibilização pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), induzindo a produção de Intéferon (IFN) tipo 1 e diversas citocinas pró-inflamatórias como (fator de necrose tumoral) TNF, interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) e interleucina-1 β (IL-1 β) via sinalização de fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) (FOELL; WITTKOWSKI; ROTH, 2007; TRIANTAFILOU; TRIANTAFILOU, 2012; NGUYEN; PANG; MASTERS, 2017).

Dentre os PRRs mais conhecidos atualmente podemos citar: *Toll Like-Receptors* (TLRs), *RIG-I-Like Receptors* (RLRs), *NOD-Like Receptors* (NLRs) e os *AIM2-Like Receptors* (ALRs). Estes receptores podem ser encontrados tanto na membrana quanto no citosol da célula e tem a capacidade de ativar vias de sinalização responsáveis por expressar mediadores inflamatórios (HAYASHI; NAKAMURA; TAKAOKA, 2011).

Os PRRs, em especial os TLRs, vêm recebendo grande atenção nos últimos anos por serem alvos terapêuticos em potencial para modulação do processo inflamatório. Como exemplo, temos os TLR-4, que são responsáveis por ativar fatores de transcrição importantes como

o NF- κ B e fator regulador de interferon (IRF3), além das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) p38, quinase reguladora extracelular (ERK) e quinases c-Jun N-terminal (JNK) (DONG et al., 2006; HANCOCK; NIJNIK; PHILPOTT, 2012).

De todas as células envolvidas na imunidade inata podemos citar as células mononucleares, como monócitos/macrófagos, mastócitos, células natural killer (NK) e células dendríticas e as células polimorfonucleares, com destaque para os neutrófilos. Os neutrófilos são gerados na medula óssea a partir de células precursoras mielóides. Sua produção pode alcançar contagens acima de 2×10^{11} na corrente sanguínea e, durante a inflamação, o número de neutrófilos é consideravelmente aumentado nos tecidos lesionados, o que comprova sua migração a partir dos vasos em direção ao estímulo lesivo. Em condições fisiológicas estas células entram em apoptose após a manutenção do tecido e são removidas por macrófagos e células dendríticas. Estas células são reconhecidas como a linha de frente no que diz respeito à defesa do organismo, sendo consideradas células potentes do sistema imune e frequentemente são associadas a danos teciduais causados por respostas exageradas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local da lesão para contenção e remoção de partículas infecciosas, além disso, também são responsáveis por enviar sinais para outras células do sistema imune inato diante de uma ameaça. Além do ataque direto a patógenos através da fagocitose, liberação de enzimas e formação de espécies reativas de oxigênio, estas células ainda são capazes de formar armadilhas extracelulares compostas de ácido desoxirribonucleico (DNA) nuclear, proteínas e enzimas que imobilizam o patógeno facilitam sua fagocitose (MANTOVANI et al., 2011).

Com a chegada de neutrófilos ao local da inflamação e o reconhecimento do estímulo lesivo acontece o recrutamento de monócitos. Estas células se diferenciam em macrófagos no tecido e são as principais células do sistema fagocítico mononuclear. Os macrófagos têm três principais funções no processo inflamatório: apresentação de antígeno, fagocitose e imunomodulação através da produção de citocinas e fatores de crescimento, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) além de sua atividade catabólica e proteolítica. Estes mononucleares são tanto ativados quanto desativados na inflamação. Sinais de ativação incluem citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeo (LPS), proteínas da matriz extracelular de bactérias e outros mediadores químicos. Após a remoção do agente causador da

inflamação, estas mesmas células podem ser desativadas através de citocinas anti-inflamatórias e citocinas antagonistas que são normalmente produzidas pelo próprio macrófago ou por células também envolvidos no processo (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; POLLARD, 2009; GALLI; BORREGAARD; WYNN, 2011).

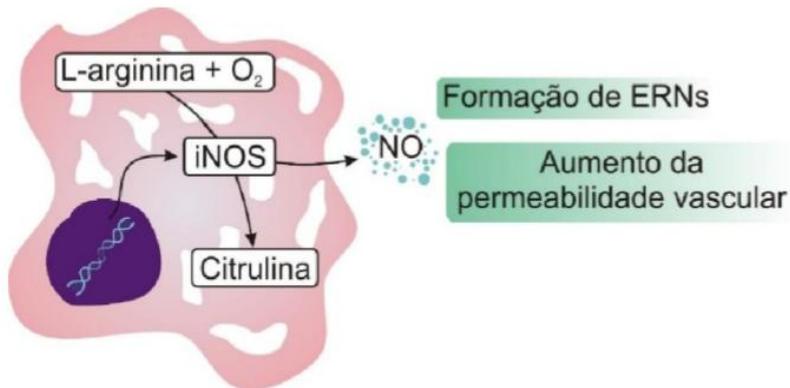
1.6 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

1.6.1 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador da resposta inflamatória, que é liberado principalmente por células endoteliais e por macrófagos e participa de diversos processos fisiológicos de suma importância para a homeostase do organismo como a regulação do tônus muscular, do processo inflamatório, da neurotransmissão e da apoptose (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007).

É um gás por natureza e, para que este seja formado, o aminoácido essencial L-arginina é oxidado formando L-citrulina e óxido nítrico. Esta reação química é catalisada por um grupo de enzimas chamadas de óxido nítrico sintase (NOS) e a ajuda de alguns cofatores. Existem três isoformas destas enzimas, sendo elas a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS1), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS3) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2), sendo que as três podem ser encontradas no tecido pulmonar (GHOSH; ERZURUM, 2011) (**Figura 3**).

Figura 3. Formação e efeitos do óxido nítrico na inflamação



O aminoácido essencial L-arginina é oxidado pela enzima iNOS durante o processo inflamatório para formar L-citrulina e óxido nítrico. O NO favorece a migração leucocitária para o local da inflamação, formação de edema e gera ERNs. ERNs: espécies reativas de nitrogênio; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; NO: óxido nítrico; O₂: oxigênio molecular. Fonte: adaptado de GHOSH e ERZURUM (2011).

A iNOS, diferente das outras duas isoformas da enzima que são constitutivas, pode ser produzida através de estímulo inflamatório como a presença de TNF- α ou IL-1 β no local em que ocorre a lesão. A indução desta enzima leva a um aumento da permeabilidade vascular devido ao aumento de NO, a formação de edema e a infiltração de células inflamatórias também são resultado desta indução (POBER; SESSA, 2007).

Além disso, a iNOS é indiretamente responsável por catalisar a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) através do aumento de NO no local do processo inflamatório. Estes metabólitos são capazes de causar lesão ao DNA, lipídeos microbianos e células saudáveis, sendo este mecanismo presente na inflamação em doenças autoimunes (RICCIARDOLO et al., 2004; MENEGAZZI et al., 2006). O envolvimento desta enzima no processo inflamatório já é bem descrito e hoje a sua inibição está sendo também alvo para o desenvolvimento de novos fármacos com objetivo de reduzir a produção de óxido nítrico durante o processo inflamatório (BOTTA et al., 2008).

1.6.2 CITOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNE INATA

Assim como o óxido nítrico, outros mediadores são liberados durante o processo inflamatório, entre eles podem-se destacar as citocinas e as quimiocinas. As citocinas atuam como mediadores e moduladores da resposta imunológica, participando no desenvolvimento hematopoiético e atuando na comunicação celular. Estas citocinas também participam de respostas do hospedeiro frente a agentes infecciosos e estímulos inflamatórios interagindo sinergicamente ou de forma antagônica (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

As citocinas desempenham seu papel através da ativação de receptores específicos nas células alvo, entre os exemplos temos os receptores do tipo Toll-like (TLRs) localizados na membrana de diversas células. Elas também podem desempenhar seu papel ao se ligar a receptores localizados no interior das células, mais especificadamente no citoplasma celular (TURNER et al., 2014). As citocinas podem ser consideradas moléculas pleiotrópicas no que se refere aos seus efeitos fisiológicos. Assim os efeitos frequentemente dependem das concentrações relativas de várias citocinas e isso ilustra a importância em reconhecer a fisiologia através de redes conexas devendo ser necessário mensurar múltiplas citocinas numa única amostra para reconhecer a fisiopatologia de determinada doença (BALKWILL; BURKE, 1989; PARK et al., 2001).

A produção de citocinas é muitas vezes transitória e rigorosamente regulada, devido à alta atividade da maioria delas e à sua concentração homeostática, que geralmente é baixa nos fluidos corporais (picomolar). No entanto, quando se faz necessário, a concentração pode aumentar até mil vezes em resposta a um agente infeccioso ou lesivo. Em concentrações elevadas as citocinas e as quimiocinas levam a ativação da transcrição de fatores nucleares como o NF- κ B que está associado à inflamação e a progressão da doença. Por este motivo, as citocinas são importantes proteínas amplamente utilizadas como biomarcadores para compreender a progressão da doença e a resposta a determinado tratamento (CHUNG, 2015; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015). Dentre todas as citocinas já conhecidas e vastamente descritas na literatura, cabe dar atenção e discutir a respeito de algumas delas.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina fortemente associada a reações agudas de estresse, doenças cardiovasculares, depressão, doenças osteomusculares, neoplasias e doença de Alzheimer (LUTGENDORF et al., 2004).

Ela é sintetizada e secretada por diferentes tipos celulares como monócitos, células endoteliais, fibroblastos e células T e também sofre estímulo através de outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α (SOUZA et al., 2008; SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). É conhecida como uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imunes antigênicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação. Estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação nos hepatócitos, aumenta a concentração de zinco intracelular nestas células e possui ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). Adicionalmente, ela exerce efeitos na formação óssea, metabolismo geral e funções endócrinas, tendo a habilidade de afetar diversos tecidos e órgãos (ERSHLER, 1993; WOLVEKAMP; MARQUET, 1990).

Este mediador apresenta diferentes funções biológicas, dentre as quais se destacam: a proliferação e a diferenciação celular, especialmente de linfócitos Th17 e monócitos em macrófagos (DITTRICH et al., 2015, SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Esta citocina também estimula a produção de imunoglobulinas (Ig) do tipo IgG, IgM e IgA por células B e de citocinas como a interleucina 21 (IL-21) por células T CD4⁺ virgem e de memória, além de induzir a produção de proteínas de fase aguda, tais como proteína C reativa (PCR), haptoglobina e α 1-antitripsina pelos hepatócitos (RATH et al., 2015).

O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é um membro da superfamília do TNF com diversas funções na diferenciação celular, inflamação, imunidade e apoptose. Esta também é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos, sendo considerada um dos principais mediadores da inflamação aguda (WALLACH, 2016). Mesmo em baixas concentrações, o TNF- α tem a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas (ZELOVA; HOSEK, 2013).

O papel principal da família do TNF ocorre através da interação e da ativação de receptores do TNF (TNFR) associado a ativação de vias de sinalização como a via do NF- κ B, das MAPKs e diversas outras vias de sinalização como a das caspases, promovendo nesses casos a produção de espécies reativas de oxigênio (ERRO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Esta função de produção de ROS foi ignorada no passado, no entanto, agora está claro que o TNF e as ERO/ERN são parte integrante da via de sinalização dos receptores da família do TNF e

estão envolvidos em numerosos ciclos de retroalimentação da inflamação (BLASER et al., 2016).

O TNF- α é secretado por diferentes tipos celulares no local onde ocorre a inflamação e promove a ativação de várias células além de ser responsável pela liberação de várias outras citocinas e mediadores químicos. Por consequência, ocorre maior expressão de moléculas de adesão no endotélio e nos leucócitos o que denota a quimiotaxia celular do vaso para o tecido lesado (SEELY; PASCUAL; CRISTOU, 2003).

A participação do TNF- α no desenvolvimento de diversas patologias e condições também é bem relatada, como nos casos de: câncer, sepse, artrite reumatóide, diabetes e doença inflamatória intestinal (SABIO; DAVIS, 2014). As interações dos TNFs com seus receptores, TNFR1 ou TNFR2, tendem a resultar na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de genes para citocinas inflamatórias diversas. Além de estimularem a produção de vários mediadores inflamatórios, os TNFs podem induzir apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio e necrose celular (CHU, 2013).

Outra citocina importante é o interferon gama (IFN- γ), citocina essa que é secretada principalmente por células Th1 e células natural killer (NK) (LARKIN III et al., 2013). O IFN- γ tem como função principal a ativação de macrófagos e de neutrófilos em resposta a diferentes estímulos, como: LPS e DNA bacteriano que interagem com o receptor TLR ou mesmo em reconhecimento a alguma injúria tecidual. Esta citocina também tem a função de estimular a expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) nas células apresentadoras de antígenos (APC) e também moléculas coestimulatórias como, por exemplo: os clusters de diferenciação CD80 e CD86 promovendo a estimulação do processamento e a apresentação de antígenos por APCs (SCHURGERS et al., 2011). Do mesmo modo, esta citocina é capaz de induzir a expressão de MHC-II em células que normalmente não expressariam esta molécula, o que associa o IFN- γ ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (SCHURGERS et al., 2011, LARKIN III et al., 2013). Além de atuar sinergicamente com o TNF- α estimulando a secreção de quimiocinas em monócitos e linfócitos, o IFN- γ também atua estimulando a diferenciação de células T virgem em células Th1, quando na presença de IL-12, secretado via APCs (SCHURGERS et al., 2011). Além disso, o IFN- γ tem a função de induzir a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) promovendo, no endotélio, uma melhor aderência

dos leucócitos para realizarem a diapedese para o local da inflamação (SCHURGERS et al., 2011, LARKIN III et al., 2013).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que inicialmente foi descrita como uma citocina liberada em resposta a estímulos de células TH2 ou Treg, porém sabe-se que atualmente é expressa tanto em células do sistema imune inato, incluindo as células dendríticas (DC), macrófagos, mastócitos, natural killer (NK), eosinófilos e neutrófilos quanto células do sistema imunitário adaptativo, tais como células TH1, TH2 e TH17, células Treg, CD8 + e células B (SARAIVA; O'GARRA, 2010; OUYANG; RUTZ; CRELLIN et al., 2011). A IL-10 pode se ligar a dois tipos de receptores: IL10R1 e IL-10R2 e, juntamente com complexos proteicos, janus quinase (JAK) e sinal transdutor e ativador de transcrição (STAT), ativar as vias de sinalização para promover seus efeitos biológicos. Esta modulação está relacionada à diminuição dos linfócitos T, principalmente pela inibição de células apresentadoras de antígeno (APC). Assim, há uma redução na expressão do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC classe II), bem como de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86). Ainda, a IL-10 reduz a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como a IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e interleucina-12 (IL-12) e, desta forma, mediando também efeitos indiretos sobre o desenvolvimento e a diferenciação de linfócitos T. Esta citocina também está relacionada à inibição da diferenciação e maturação de células dendríticas (DCs) de origem monocitária. Pode ainda induzir a diferenciação e a proliferação de linfócitos B, granulócitos e, queratinócitos, bem como, ativar as células natural killer (NK) e linfócitos citotóxicos T CD8+ (MOSSER; ZHANG, 2008; HOFMANN; RÖSEN-WOLFF; TSOKOS et al., 2012).

Uma de suas principais funções biológicas é a inibição da resposta pró-inflamatória que ocorre na imunidade inata e adaptativa, e assim, prevenir as lesões nos tecidos. Desta forma, a concentração da IL-10 está diminuída em doenças inflamatórias e auto-imunes tais como, psoríase, doença intestinal inflamatória grave (IBD), artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e inflamação hepática (OUYANG; RUTZ; CRELLIN et al., 2011; HOFMANN; RÖSEN-WOLFF; TSOKOS et al., 2012).

1.7 MODELOS DE INFLAMAÇÃO DAS VIAS AÉREAS

Com o intuito de simular doenças inflamatórias humanas, diversos modelos *in vivo* foram desenvolvidos nos últimos 80 anos. No decorrer deste tempo ficou claro que, embora alguns modelos muitas vezes apresentem perfis biológicos semelhantes com aspectos de certas doenças, eles não representam as doenças em si e sim reações causadas por estas. Ainda assim, modelos animais de artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais e esclerose múltipla, por exemplo, têm sido de extrema utilidade para o desenvolvimento de novas terapias para estas doenças, além de ajudar no entendimento do próprio sistema imunológico humano (WEBB, 2014).

Diferentes modelos podem ser empregados para mimetizar condições patológicas estabelecidas na asma, uma doença de cunho inflamatório que ainda oferece grandes desafios para a medicina moderna. Estes modelos oferecem informações importantes em aspectos chaves da asma como sua patogênese e tratamento. O uso de camundongos para modelos inflamatórios das vias aéreas é comum pelo fato de que esta espécie oferece facilidades no que diz respeito ao emprego de ferramentas imunológicas, como por exemplo a deleção de genes, além da facilidade de seu manuseio. Apesar disso, assim como em outros modelos animais, camundongos também possuem certas limitações. Nenhum camundongo desenvolve asma espontaneamente e nenhum modelo é capaz de simular todo o fenótipo da asma. Estes modelos são então focados nas mudanças das funções pulmonares características da asma (KIPS et al., 2003)

Dentre os modelos experimentais para indução de inflamação pulmonar *in vivo*, pode-se destacar o modelo de inflamação neutrofilica. E, nesta condição clínica, a resposta inflamatória pulmonar apresenta predomínio do influxo de neutrófilos (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Para isto, nos modelos utilizados, destacam-se a indução de infecção pulmonar com *Pseudomonas aeruginosa* e o uso de lipopolissacarídeos (LPS) para estimular a resposta imune inata (HOFFMANN et al., 2005; DONG et al., 2009).

Lesão aguda pulmonar (LAP) e síndrome da desordem respiratória aguda (ARDS) são desordens clínicas causadas por diversas injúrias ou até mesmo por predisposição a lesões pulmonares (FU et al., 2016) e são caracterizadas pelo aumento da permeabilidade na barreira alvéolo-capilar resultando em edema pulmonar com fluido rico em proteínas, o que resulta no impedimento da oxigenação arterial (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; FAVARIN et al., 2013).

Apesar de todas as inovações em tratamentos, são doenças que possuem uma alta mortalidade (>40%). Pneumonia e sepse são as

principais causas de LAP e Síndrome da Desordem Respiratória Aguda (ARDS), porém outras condições severas e não infecciosas, como por exemplo, traumas (físicos ou químicos) e lesões teciduais podem desencadeá-las (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

As causas de LAP podem ser diretas, como pneumonia, lesão inalatória, aspiração de conteúdo gástrico, trauma torácico, ou então indiretos, como sepse, queimadura, embolismo, hipovolemia, entre outros (FAVARIN et al., 2013). Ocorre frequentemente após sepse, principalmente em pacientes criticamente doentes e acredita-se que o lipopolissacarídeo (LPS) é o principal agente que leva ao desenvolvimento de LAP durante a sepse (FU et al., 2016).

LAP é o resultado de uma cascata celular causada por agentes infecciosos ou inflamações não infecciosas, por exemplo trauma e choque. Infecções causadas por bactérias gram-negativas são a causa mais comum de LAP e o LPS, componente principal da parede celular de bacilos gram-negativos, é o principal agente antigênico dessas bactérias. O LPS pode direta ou indiretamente causar danos no epitélio alveolar e nas células endoteliais pulmonares. Estes danos podem desencadear uma reação em cascata, incluindo aumento da permeabilidade capilar, infiltração neutrofílica e o acúmulo de mediadores inflamatórios nos pulmões, o que pode levar a uma deficiência respiratória ou até mesmo outras condições patológicas (TANG; FANG; SHI, 2017).

Em humanos, LAP é caracterizada pelo aumento da permeabilidade epitelial, liberação de citocinas e agentes oxidantes, infiltração neutrofílica nos pulmões e severa hipoxemia (NADEEM; SIDDIQUI; AL-HARBI et al., 2017). No entanto, o processo patológico induzido por LPS na lesão aguda pulmonar, vem sendo largamente utilizado como modelo experimental (TANG; FANG; SHI, 2017). Modelos experimentais de LAP em ratos, camundongos, coelhos e porcos da Índia, têm sido utilizados e reportados na literatura usando-se diferentes gatilhos, como LPS, bactérias, entre outros (FAVARIN et al., 2013).

A LAP induzida por LPS em camundongos mimetiza algumas características desta condição em humanos, como por exemplo o aumento da permeabilidade epitelial/endotelial, infiltração neutrofílica nos pulmões e a produção de mediadores pró-inflamatórios como quimiocinas e citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) (NADEEM; SIDDIQUI AL-HARBI et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito anti-inflamatório *ex vivo* e *in vivo* dos compostos derivados do p-aminofenol e salicilatos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 EX VIVO

- I. Avaliar a citotoxicidade dos compostos derivados do p-aminofenol e salicilatos;
- II. Avaliar o efeito dos compostos sobre a produção de metabólitos do óxido nítrico (NOx) e de interleucina 6 (IL-6).

2.2.2 IN VIVO

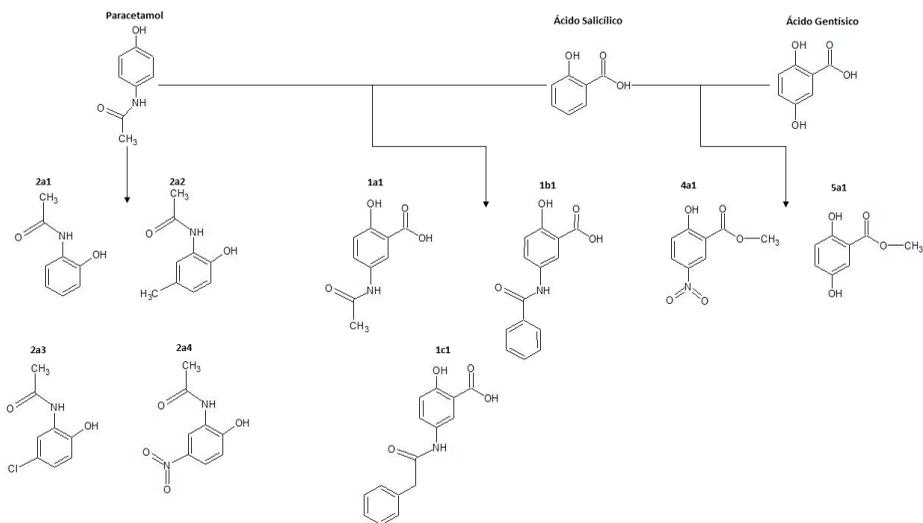
- III. Avaliar o efeito dos compostos sobre a migração de leucócitos e a exsudação no lavado broncoalveolar;
- IV. Investigar o efeito dos compostos sobre a produção de metabólitos do óxido nítrico (NOx) no lavado broncoalveolar;
- V. Investigar o efeito dos compostos sobre as concentrações de interleucina-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), no lavado broncoalveolar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS

As substâncias sintéticas analisadas neste trabalho foram sintetizadas e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rosivaldo Borges, do Departamento de Química da Universidade Federal do Pará – UFPA (BORGES, 2007; MACIEL, 2013). Esses compostos sintéticos são modificações estruturais químicas de substâncias já conhecidas previamente e que foram utilizadas como padrões (Paracetamol, Ácido Salicílico e Ácido Gentsílico). Os compostos analisados, foram denominados com siglas para melhor entendimento (1a1, 1b1, 1c1, 2a1, 2a2, 2a3, 2a4, 4a1 e 5a1) (**Figura 4**).

Figura 4 – Estruturas químicas dos padrões e dos compostos utilizados.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2 REAGENTES UTILIZADOS

Neste estudo, foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de vanádio (VCl_3), sulfanilamida ($C_6H_8N_2O_2S$), glicogênio de ostra (Sigma-Aldrich Co®, St. Louis, Missouri, USA); etanol, ácido clorídrico (HCl) (Synth®, Diadema, São Paulo, Brazil); sulfato de zinco (Vetec®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil); hidróxido de sódio (NaOH) (Reagen®, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil); kit de ELISA para quantificação de IL-6 (PeproTech®, Rocky Hill, New Jersey, USA); kit para determinação das citocinas TNF, IL-6, INF, IL-10 (BD®, San Jose, California, EUA); Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina (10,000 U/mL) (Gibco®, Grand Island, New York, USA); Solução de Türk; xilasina e cetamina (Cristália®, São Paulo, SP, Brasil). Outros sais e reagentes, de grau de pureza analítica, foram obtidos de diferentes fontes comerciais.

3.3 EX VIVO

3.3.1 ANIMAIS

Para se obter neutrófilos de cultura primária, foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (com 4 semanas de idade, pesando entre 18-25 g), que foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC (Protocolo CEUA sob nº 6118110417). Foram acomodados em ciclos claro/escuro de 12h, tiveram acesso livre à água e comida e ficaram em condições de temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ C$). Todos os experimentos estão de acordo com as políticas éticas do Comitê de Ética e Guias de Cuidados Animais da UFSC (CEUA).

3.3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para se obter neutrófilos em número significativo na cavidade peritoneal de camundongos, e posteriormente coletá-los para a cultura primária, utilizou-se glicogênio de ostra na concentração de 1%, conforme descrito por Silva e colaboradores (2015) com modificações. Os animais (n= 10 por experimento *ex vivo*) selecionados aleatoriamente receberam, por via intraperitoneal (i.p.), 3 mL de uma solução de

glicogênio de ostra a 1% em PBS estéril. Após administração do agente quimiotático o tempo de 4 horas foi aguardado para que os neutrófilos fossem recrutados para o peritônio. Passado este período, os animais sofreram morte indolor assistida através de uma overdose de xilazina e cetamina administrada por via subcutânea (s.c) para contenção química e, na sequência, intravenosa (i.v. – veia submandibular) para eutanásia em si, uma vez que a cavidade peritoneal não pode receber o anestésico.

Após confirmada a eutanásia dos animais, foi injetado na cavidade peritoneal destes 3 mL de PBS estéril e a cavidade foi massageada por 10 segundos para que os neutrófilos presentes ficassem suspensos no PBS. Foi feita uma incisão na cavidade peritoneal utilizando-se material cirúrgico e, a seguir, com auxílio de uma pipeta *pasteur*, o PBS outrora administrado na cavidade, foi retirado e armazenado em tubos *falcon* sempre em banho de gelo. Um *pool* foi feito com as amostras coletadas da cavidade peritoneal com intuito de se alcançar as concentrações de neutrófilos desejadas para cultura no dia dos experimentos (geralmente 1×10^6 células/poço) e as amostras foram então centrifugadas, por duas vezes, a 600G, 4°C por 10 minutos.

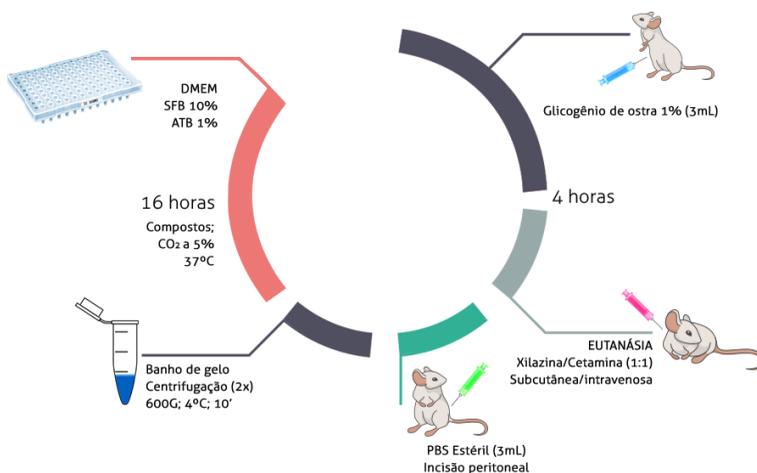
Após, os neutrófilos foram plaqueados em placa de 96 poços em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com soro fetal bovino a 10% e penicilina/estreptomicina 1%, estes foram estimulados com LPS (5 µg/mL) na presença ou ausência dos compostos estudados e incubados por 16 horas em estufa de CO₂ a 5% a 37° C.

3.3.3 VIABILIDADE CELULAR

Com o objetivo de selecionar compostos que possuam alta segurança em relação a sua toxicidade, compostos que apresentem toxicidade significativa em doses abaixo de 100 µM, seriam automaticamente descartados.

Após a coleta dos neutrófilos peritoneais e seu devido acondicionamento em banho de gelo, procedeu-se a contagem para que se obtivesse 1×10^6 neutrófilos em 30 µL de material. Para a execução dos testes em cultura, toda a manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar. Os neutrófilos foram plaqueados em placa de 96 poços em meio de cultura DMEM enriquecido com 10 % de soro fetal bovino e 1% de uma solução de penicilina/estreptomicina na presença ou ausência dos compostos estudados. Em seguida, incubados por 16 horas em estufa de CO₂ (5%) a 37°C (**Figura 5**).

Figura 5. Coleta de neutrófilos de camundongos para determinação da viabilidade celular



Fonte: elaborado pelo autor.

A viabilidade dos neutrófilos em presença dos compostos testados foi avaliada utilizando o ensaio de (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio]) MTT colorimétrico. Brevemente, após incubação durante as 16 h o sobrenadante foi descartado, e a solução de MTT adicionada a cada poço, seguindo-se a incubação durante mais 3 h a 37°C. O meio foi novamente descartado, e o dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado para dissolver o corante de formazan. A densidade óptica foi verificada a 450 nm utilizando para isso um leitor de ELISA.

3.3.4 TRIAGEM DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para induzir os neutrófilos de camundongos (n= 10 por experimento) a uma condição inflamatória, foram feitas culturas

celulares, que foram divididas em 3 grupos: (a) controle branco (B), células não inflamadas), células pré-tratadas apenas com veículo (PBS); (b) controle negativo (LPS, células inflamadas), células também pré-tratadas com veículo e estimuladas com LPS após 0,5h; e (c) grupos experimentais (tratamento), células pré-tratadas com os compostos (1 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM). Após 0,5h as células foram estimuladas com LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) por 16h em placa de 96 poços (1×10^6 células/poço) à 37°C, CO_2 a 5%. O sobrenadante foi então coletado e armazenado a -20°C para análises posteriores das concentrações de metabólitos nitrito/nitrato (NO_x) e da citocina pró-inflamatória IL-6.

3.3.5 DOSAGEM DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO_x)

A produção de metabólitos do NO pelos neutrófilos de camundongos ($n= 10$ por experimento) foi determinada utilizando o reagente de Griess. De forma resumida, 100 μL de reagente de Griess foram misturados a 50 μL de sobrenadante celular o qual foi obtido após 16 h de estímulo com LPS, e incubados durante 40 min., a 37°C. Utilizando espectrofotômetro (densidade óptica a 540 nm) foi determinada a concentração de nitrito, calculada de acordo com a curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas de nitrito (NO_2).

3.3.6 DOSAGEM DE IL-6

Os níveis de IL-6 foram quantificados como descrito. A determinação da concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 (Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, USA) foi realizada usando-se um kit comercial de imuno-enzima ensaio (ELISA) seguindo instruções do fabricante. Os níveis de citocina no sobrenadante foram estimados através da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL .

3.4 IN VIVO

3.4.1 COLETA DE MATERIAL BRONCOALVEOLAR

Para reproduzir uma condição inflamatória nos animais ($n= 5$ por grupo), os mesmos foram divididos em três grupos: (a) controle branco (S, animais não inflamados), condição em que os animais foram pré-tratados apenas com PBS (salina); (b) controle negativo (LPS, animais inflamados), condição em que os animais foram pré-tratadas apenas com LPS (5 mg/kg); e (c) grupos experimentais (tratamento), condição em que os animais foram pré-tratados com os compostos em doses pré determinadas (30 mg/kg; 10 mg/kg e 3 mg/kg).

Após anestesia e eutanásia dos animais com Cetamina/Xilazina (1:1), os animais tiveram a cavidade peritoneal aberta e a traquéia exposta. Com o auxílio de uma cânula, foi feito o acesso na traquéia e através de uma seringa foi feita lavagem broncoalveolar com citrato a 1% (p/v) por três vezes. O material coletado (entre 500 e 1000 μL) por sua vez foi reservado em banho de gelo durante a coleta e posteriormente acondicionado a -80°C para a máxima conservação das amostras.

3.4.2 DETERMINAÇÃO DE LEUCÓCITOS

Com o material broncoalveolar coletado, 20 μL de amostra foram retirados do lavado e em seguida foram adicionados 60 μL de solução de Turk para degradação de hemácias. A contagem total de leucócitos realizou-se através de microscopia ótica comum ($\times 1000$) em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos em número total de leucócitos ($\times 10^5/\text{mL}$).

3.4.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com Lowry et al. (1951) em espectrofotômetro. A técnica resume-se a utilizarmos 5 μL de amostra, onde foi adicionado 95 μL de água destilada e então adicionou-se 100 μL de reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na_2CO_3 - 10%, sulfato de cobre: CuSO_4 0,1%, tartarato duplo

Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada). Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos adicionou-se 50 μL de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água destilada), em seguida as amostras foram incubadas por 30 minutos e, após este período, pipetadas em placas de 96 poços, que foram lidos em leitora de microplacas em comprimento de onda de 620 nm (Organon, Tcknica, Roseland, New Jersey, EUA). Paralelamente utilizou-se diferentes concentrações de albumina para obter-se uma curva-padrão (0-40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

3.4.4 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ , IL-6 E IL-10

Para a determinação das concentrações de TNF α , IFN- γ , IL-6 e IL-10, alíquotas do lavado broncoalveolar foram coletadas e processadas para a quantificação das citocinas. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando-se kit comercial para citometria de fluxo CBA (CBA- cytometric beads array) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. As dosagens foram realizadas em citômetro de fluxo FASCSVerse (BD FACSVerse™, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados no software FCAP Array versão 3.0, fornecido pelo mesmo fabricante. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estudados incluindo viabilidade celular e concentrações dos metabólitos de NOx foram expressos através da média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controle e os grupos tratados foram realizados por meio do teste de variância ANOVA (teste paramétrico bicaudal de uma via), complementado pelos pós-testes de Tukey (Viabilidade, $p > 0,05$) e Dunnet (NOx, $p < 0,05$) para análises *ex vivo* através do programa de estatística GraphPadPrism® Versão 5.02 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Para as análises *in vivo* os parâmetros analisados entre os grupos controle e grupos tratados foram realizados por meio de teste de variância ANOVA (teste paramétrico

bicaudal de uma via), complementado pelo pós teste de Tukey ou Neuman-Keuls. Para todas as análises estatísticas, valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

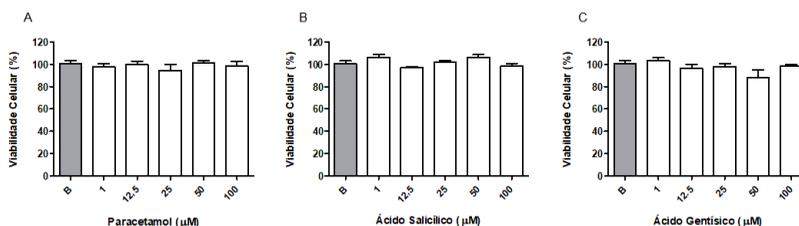
4 RESULTADOS

4.1 EX VIVO

4.1.1 VIABILIDADE CELULAR

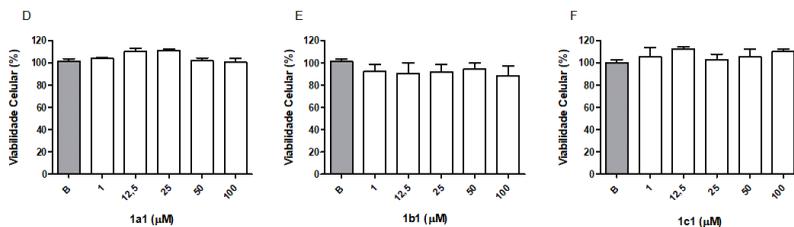
O efeito citotóxico dos padrões e dos compostos derivados do p-aminofenol e salicilatos foi determinado em neutrófilos de camundongos (cultura primária). Para determinação foi utilizando o ensaio colorimétrico MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio)]. A viabilidade dos neutrófilos incubados com diferentes concentrações de todos os compostos testados (1–100 μM) não foi afetada em nenhum dos experimentos ($P > 0,05$) (**Figuras 6, 7, 8 e 9**).

Figura 6. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos após exposição a diferentes doses dos padrões (paracetamol, ácido salicílico e ácido gentísico)



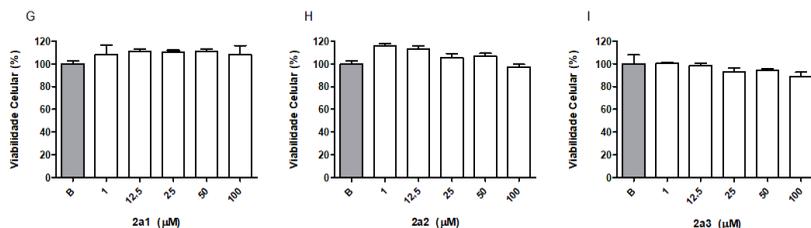
Resultado da avaliação da viabilidade celular dos padrões (Paracetamol, Ácido salicílico e Ácido gentísico) nas doses de 1 a 100 μM frente a neutrófilos de camundongos, através do ensaio colorimétrico do MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência dos neutrófilos em experimentos independentes \pm erro padrão da média ($n=4$) ($P > 0.05$).

Figura 7. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos após exposição a diferentes doses dos compostos 1a1, 1b1 e 1c1.



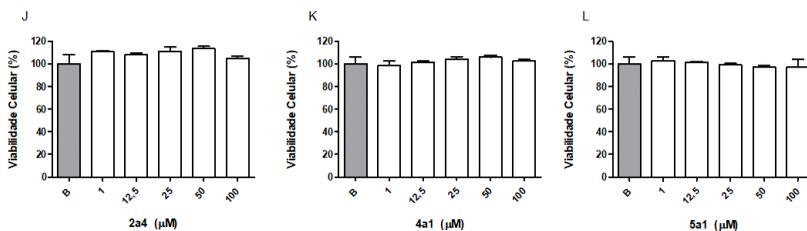
Resultado da avaliação da viabilidade celular dos compostos 1a1, 1b1 e 1c1 nas doses de 1 a 100 µM frente a neutrófilos de camundongos, através do ensaio colorimétrico do MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência dos neutrófilos em experimentos independentes \pm erro padrão da média (n=4) ($P > 0.05$).

Figura 8. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos após exposição a diferentes doses dos compostos 2a1, 2a2 e 2a3.



Resultado da avaliação da viabilidade celular dos compostos 2a1, 2a2 e 2a3 nas doses de 1 a 100 µM frente a neutrófilos de camundongos, através do ensaio colorimétrico do MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência dos neutrófilos em experimentos independentes \pm erro padrão da média (n=4) ($P > 0.05$).

Figura 9. Viabilidade celular em neutrófilos de camundongos após exposição a diferentes doses dos compostos 2a4, 4a1 e 5a1.

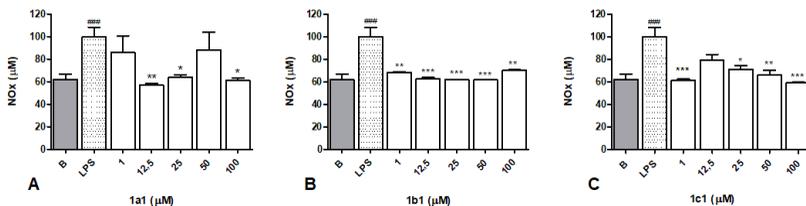


Resultado da avaliação da viabilidade celular dos compostos 2a4, 4a1 e 5a1 nas doses de 1 a 100 μM frente a neutrófilos de camundongos, através do ensaio colorimétrico do MTT. Cada barra representa a média de sobrevivência dos neutrófilos em experimentos independentes \pm erro padrão da média (n=4) ($P > 0.05$).

4.1.2 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A PRODUÇÃO DE NO_x EM NEUTRÓFILOS DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS COM LPS

A secreção de metabólitos do NO_x pelos neutrófilos tratados com LPS foi significativamente inibida pelo tratamento com os derivados híbridos de p-aminofenol e salicilatos. O primeiro testado, o 1a1, foi efetivo nas doses de 12,5; 25 e 100 μM (% inibição: $43,14 \pm 1,50$; $36,04 \pm 2,47$ e $38,65 \pm 2,17$ respectivamente) ($P < 0,05$) (**Figura 10A**). Da mesma forma, outro derivado, 1b1, estudado também inibiu de forma significativa as concentrações de NO_x quando testado nas doses de 1; 12,5; 25; 50 e 100 μM (% inibição: $31,65 \pm 0,42$; $37,39 \pm 1,37$; $38,33 \pm 0,66$; $38,33 \pm 0,54$ e $29,87 \pm 0,72$ respectivamente). ($P < 0,01$) (**Figura 10B**). O efeito inibitório do composto 1c1 nas doses de: 1; 25; 50 e 100 μM (% inibição: $38,96 \pm 1,50$; $28,62 \pm 3,49$; $33,84 \pm 4,22$ e $40,74 \pm 0,72$ respectivamente) ($P < 0,05$) (**Figura 10C**).

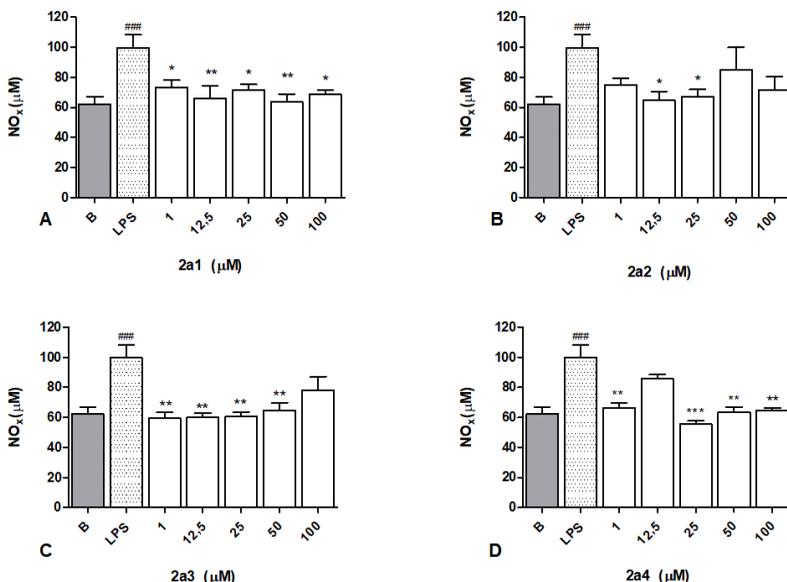
Figura 10. Inibição da produção de NOx de neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 1a1, 1b1 e 1c1



Efeito dos compostos 1a1, 1b1 e 1c1 sobre os níveis de metabólitos de NOx. B: células tratadas somente com PBS estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (5µg/mL) e DMSO a 0,3%; Células pré-tratadas (0,5h) com os respectivos compostos nas doses de 1, 12,5, 25, 50 e 100 µM antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n = 4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$

Já os derivados do p-aminofenol mostraram-se também eficazes em inibir a produção de NOx, o 2a1 nas doses de 1; 12,5; 25; 50 e 100 µM também inibiu os níveis de NOx (% inibição: $26,43 \pm 4,76$; $33,74 \pm 8,26$; $28,52 \pm 3,92$; $36,24 \pm 5,36$ e $31,23 \pm 2,95$ respectivamente) ($P < 0,05$) (**Figura 11A**), o 2a2 nas doses de 12,5 e 25 µM (% inibição: $35,20 \pm 5,72$ e $32,48 \pm 4,64$ respectivamente) ($P < 0,05$) (**Figura 11B**), o 2a3 nas doses de 1; 12,5; 25 e 50 µM (% inibição: $40,21 \pm 3,67$; $39,90 \pm 3,01$; $39,06 \pm 2,89$ e $35,10 \pm 5,06$ respectivamente) ($P < 0,01$) (**Figura 11C**), e finalmente o 2a4 nas doses de 1; 25; 50 e 100 µM (% inibição: $33,53 \pm 3,55$; $44,18 \pm 2,11$; $36,45 \pm 3,43$ e $35,10 \pm 1,68$ respectivamente) ($P < 0,01$) (**Figura 11D**).

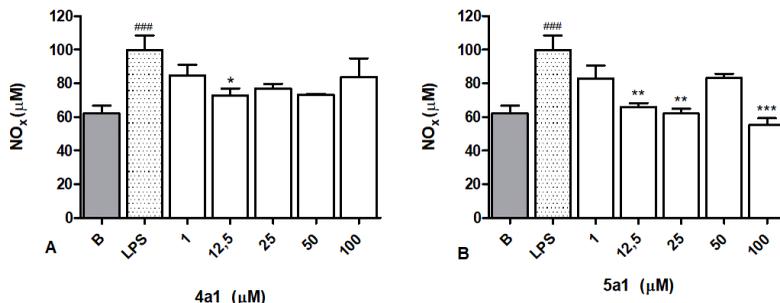
Figura 11. Inibição da secreção de NOx de neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 2a1, 2a2, 2a3 e 2a4.



Efeito dos compostos 2a1, 2a2, 2a3 e 2a4 sobre os níveis de metabólitos de NOx. B: células tratadas somente com PBS estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (5µg/mL) e DMSO a 0,3%; Células pré-tratadas (0,5h) com os respectivos compostos nas doses de 1, 12,5, 25, 50 e 100 µM antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n = 4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$

Por último, os derivados de salicilato, nomeados de 4a1 quando testado na dose de 12,5 µM (% inibição: $26,95 \pm 4,101$) ($P < 0,05$) (Figura 12A), e 5a1 nas doses de 12,5; 25 e 100 µM, também se mostraram efetivos em inibir este parâmetro inflamatório (% inibição: $33,74 \pm 2,23$; $37,92 \pm 3,07$ e $44,50 \pm 3,98$ respectivamente) ($P < 0,01$) (Figura 12B).

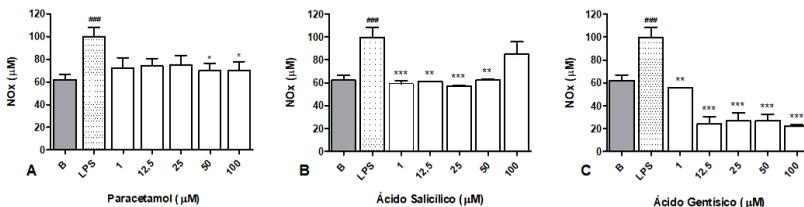
Figura 12. Inibição da secreção de NOx de neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos compostos 4a1 e 5a1.



Efeito dos compostos 4a1 e 5a1 sobre os níveis de metabólitos de NOx. B: células tratadas somente com PBS estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (5µg/mL) e DMSO a 0,3%; Células pré-tratadas (0,5h) com os respectivos compostos nas doses de 1, 12,5, 25, 50 e 100 µM antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n = 4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

Como esperado, os padrões utilizados para comparação p-aminofenol, ácido salicílico e ácido gentsílico, também se mostraram efetivos em inibir a produção de NOx. O Paracetamol nas doses de 50 e 100 µM (% inibição: $29,95 \pm 6,700$; $19,36 \pm 8,677$ respectivamente) ($P < 0,05$) (**Figura 13A**); Ácido salicílico nas doses de 1; 12,5; 25 e 50 µM (% inibição: $40,74 \pm 2,53$; $38,86 \pm 0,24$; $42,62 \pm 0,72$ e $37,39 \pm 0,96$ respectivamente) ($P < 0,01$) (**Figura 13B**); Ácido gentsílico nas doses de 1; 12,5; 25; 50 e 100 µM (% inibição: $44,08 \pm 0,00$; $75,94 \pm 6,81$; $73,22 \pm 7,05$; $72,84 \pm 5,69$ e $77,50 \pm 0,96$ respectivamente) ($P < 0,01$) (**Figura 13C**).

Figura 13. Inibição da secreção de NOx de neutrófilos de camundongos, após exposição a diferentes doses dos padrões.



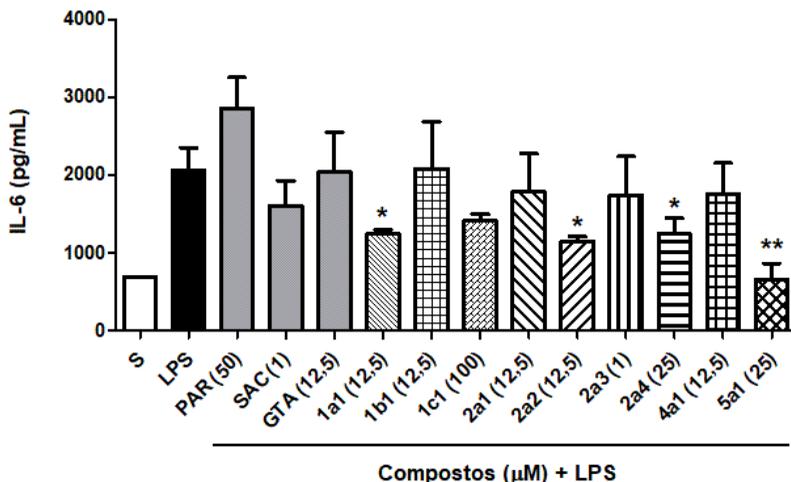
Efeito dos padrões Paracetamol, Ácido Salicílico e Ácido Gentísico sobre os níveis de metabólitos de NOx. B: células tratadas somente com PBS estéril; LPS: células tratadas somente com lipopolissacarídeo (5µg/mL) e DMSO a 0,3%; Células pré-tratadas (0,5h) com os respectivos compostos nas doses de 1, 12,5, 25, 50 e 100 µM antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão; n = 4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$

4.1.3 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE IL-6

Para a avaliação da atividade dos compostos sobre a produção de IL-6, utilizamos as menores doses de cada composto capaz de inibir a produção de NOx, nos experimentos anteriores.

Dessa forma, apresentam-se os resultados: Composto 1a1 na dose de 12,5 µg/mL (% de inibição: $39,61 \pm 2,73$) ($p < 0,05$); composto 2a2 na dose de 12,5 µg/mL (% de inibição: $44,14 \pm 2,75$) ($p < 0,05$); composto 2a4 na dose de 25 µg/mL (% de inibição: $39,61 \pm 9,81$) ($p < 0,05$) e o composto 5a1 na dose de 25 µg/mL (% de inibição: $67,96 \pm 9,98$) ($p < 0,01$) (**Figura 14**). Os demais compostos não apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo, sendo então eliminados da próxima etapa (análise *in vivo*).

Figura 14. Efeito dos compostos analisados sobre a produção de IL-6



Efeito dos compostos sobre os níveis de IL-6: (S): células tratadas somente com PBS estéril; (LPS): células tratadas somente com lipopolissacarídeo (5µg/mL) e DMSO a 0,3%; células pré-tratadas (0,5h) com os respectivos compostos nas melhores doses de acordo com os resultados prévios da análise de NOx: PAR (50 µM), SAC (1 µM), GTA (12,5 µM), 1a1 (12,5 µM), 1b1 (12,5 µM), 1c1 (100 µM), 2a1 (12,5 µM), 2a2 (12,5 µM), 2a3 (1 µM), 2a4 (25 µM), 4a1 (12,5 µM) e 5a1 (25 µM) antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

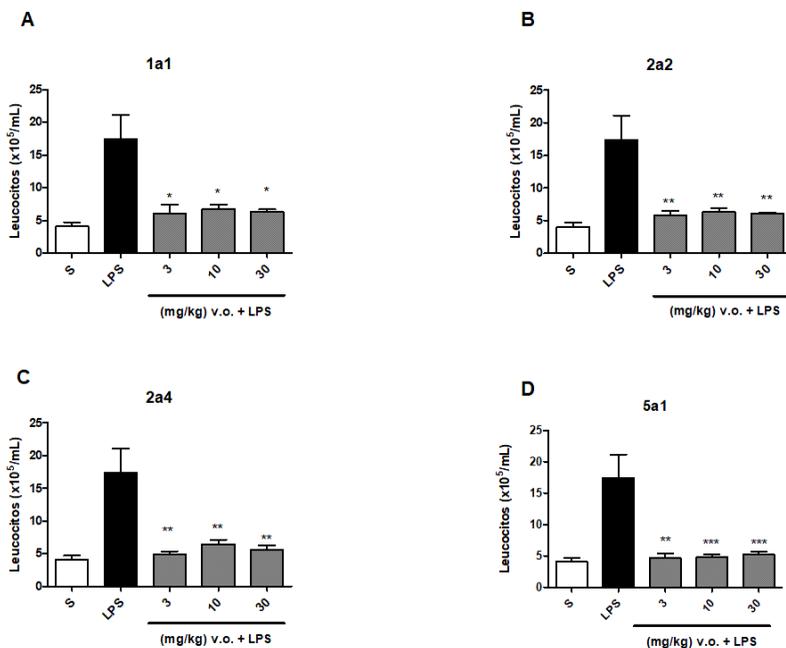
4.2 IN VIVO

De acordo com os resultados da triagem anti-inflamatória em modelo *ex vivo*, foram selecionados os melhores compostos para a etapa *in vivo*, sendo eles: 1a1, 2a2, 2a4 e 5a1.

4.2.1 EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR

Todos os compostos avaliados (1a1, 2a2, 2a4 e 5a1) foram capazes de reduzir significativamente a migração leucocitária pulmonar nas três doses avaliadas. Composto 1a1 (% de inibição 3 mg/kg 64,80 ± 7,20; 10 mg/kg 60,97 ± 3,65; 30 mg/kg 63,52 ± 2,05) ($P < 0,05$) (**Figura 15A**); composto 2a2 (% de inibição 3 mg/kg 66,43 ± 3,65; 10 mg/kg 63,74 ± 3,37; 30 mg/kg 65,31 ± 0,78) ($P < 0,01$) (**Figura 15B**); composto 2a4 (% de inibição 3mg/kg 71,94 ± 2,73; 10 mg/kg 63,01 ± 4,16; 30 mg/kg 67,87 ± 4,01) ($P < 0,01$) (**Figura 15C**); e o composto 5a1 (% de inibição 3 mg/kg 73,17 ± 4,02 ($P < 0,01$); 10 mg/kg 72,69 ± 2,65; 30 mg/kg 69,87 ± 2,29 ($P < 0,001$)) (**Figura 15D**).

Figura 15. Efeito dos compostos selecionados sobre a migração de leucócitos para o lavado broncoalveolar

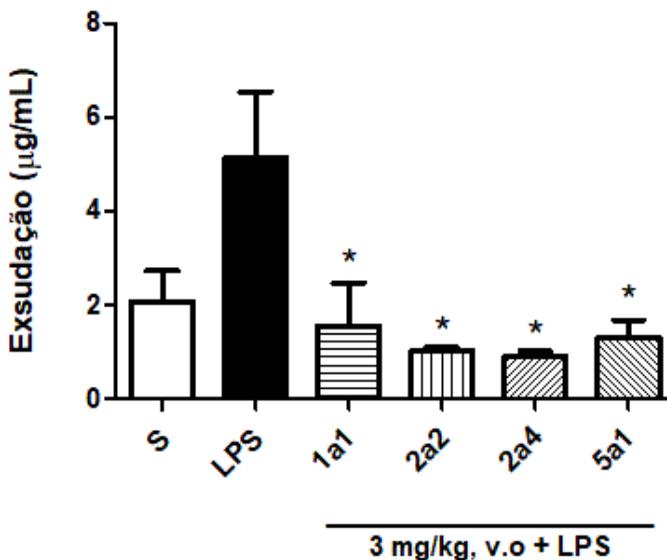


Efeito dos compostos na migração de leucócitos administrados 0,5 h antes da indução de lesão aguda pulmonar estimulada por LPS em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (v.o.), LPS = animais tratados somente com LPS 5 mg/kg (v.o.); As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (LPS), n = 4 animais. *P<0,05, ** P<0,01 ***P<0,001.

4.2.2 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR

A partir da determinação da migração leucocitária, determinou-se a menor dose capaz de produzir um possível efeito anti-inflamatório neste modelo experimental, que para todos os compostos foi de 3 mg/kg. O Composto 1a1 foi capaz de reduzir as concentrações de proteínas no lavado broncoalveolar de forma significativa (% de inibição 3 mg/kg $69,73 \pm 17,83$; 1) (P < 0,05) assim como o composto 2a2 (% de inibição 3 mg/kg $80,18 \pm 1,46$) (P < 0,05) o composto 2a4 (% de inibição 3mg/kg $82,20 \pm 1,95$) (P < 0,05); e finalmente o composto 5a1 (% de inibição 3 mg/kg $74,73 \pm 7,50$) (P < 0,05) (**Figura 16**).

Figura 16. Efeito dos compostos selecionados sobre as concentrações de proteínas totais no lavado broncoalveolar



Efeito dos compostos na exsudação administrados 0,5 h antes da indução de lesão aguda pulmonar estimulada por LPS em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (v.o.), LPS = animais tratados somente com LPS 5 mg/kg (v.o.); As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (LPS), n = 4 animais. *P<0,05.

4.2.3 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE A PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ , IL-6 E IL-10

A determinação do efeito dos compostos sobre a produção das citocinas deu-se através de análise do lavado broncoalveolar utilizando-se kit específico de citocinas para citometria de fluxo. Nestes experimentos, o composto 2a2 inibiu as concentrações de TNF- α e INF- γ (% de inibição: TNF- α 36,67 \pm 5,15; INF- γ : 62,60 \pm 0,99) (P < 0,05). Já os compostos 2a4 e 5a1 inibiram apenas as concentrações de TNF- α .

(% de inibição: TNF- α 40,88 \pm 9,95 e 58,19 \pm 2,96, respectivamente) ($P < 0,05$). O composto 1a1 não foi capaz de inibir nenhuma das citocinas analisadas ($P > 0,05$) (**Tabela 1**).

Embora nenhum dos compostos tenha se mostrado eficaz em modificar de maneira significativa as concentrações de IL-10 em nossos experimentos, o composto 2a4 mostrou tendência em aumentar suas concentrações desta citocina, a qual possui perfil anti-inflamatório ($P = 0,07$) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Efeito dos compostos selecionados sobre as concentrações das citocinas no lavado broncoalveolar

Grupos	IL-10	TNF- α	IFN- γ	IL-6
S	23,23 \pm 7,51	380 \pm 276,8	0,7867 \pm 0,11	32,51 \pm 8,3
LPS	10,69 \pm 1,11	6694 \pm 1389	68,32 \pm 32	2543 \pm 639,4
1a1	14,11 \pm 4,82	7941 \pm 596,7	87,84 \pm 40,20	2236 \pm 250,7
2a2	11,69 \pm 1,94	4239 \pm 345 (*)	25,55 \pm 1,17	2348 \pm 320,7
2a4	19,03 \pm 4,52	3957 \pm 666,1 (*)	111 \pm 1,00	4064 \pm 818,7
5a1	10,27 \pm 0,81	2798 \pm 198,2	109,30 \pm 28,69	1592 \pm 310,0

Efeito dos compostos na inibição de citocinas administrados 0,5 h antes da indução de lesão aguda pulmonar estimulada por LPS em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (v.o.), LPS = animais tratados somente com LPS 5 mg/kg (v.o.); As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle inflamado (LPS), n = 4 animais. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

A combinação de diferentes moléculas ou até fármacos já existentes é mais uma estratégia para tentar alcançar um ou vários objetivos terapêuticos, tais como a facilitar a adesão do paciente a terapia, simplificar a prescrição, melhorar a eficácia, sem aumentar os efeitos adversos, ou diminuindo os efeitos colaterais, sem perda de eficácia (BORGES; BARROS et al., 2015). Neste sentido, o desenvolvimento de novas estratégias para alívio da inflamação, também envolve a combinação de classes químicas com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, com objetivo inicial de que esta combinação produza moléculas com atividade mais pronunciada do que os fármacos de origem, fazendo com que sejam utilizadas doses reduzidas e mais toleráveis ao paciente (QIU et al. 2007).

O processo inflamatório como um todo possui como algumas características fisiológicas a vasodilatação, o aumento do fluxo e permeabilidade vascular, formação de exsudato, migração de leucócitos para o local lesionado, formação de espécies reativas de oxigênio, liberação de fatores de crescimento e a geração de um novo tecido funcional (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Diversas células e mediadores estão diretamente envolvidos nas respostas inflamatórias. Essas células e mediadores são recrutados para o local da inflamação e tem como objetivo final o reconhecimento e a eliminação de microrganismos e restos celulares responsáveis pela inflamação. Como parte da resposta inflamatória, podemos destacar a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. Neste trabalho nos atentamos em estudar as células e os mediadores envolvidos com a resposta imune inata, que se refere a uma variedade de mecanismos de defesa, que tendem a responder de forma rápida, imediata ou, em alguns casos, dentro de poucas horas, a alguma perturbação da homeostase, como dano tecidual ou respondendo algum estímulo devido à presença de patógenos durante uma infecção (PILLON; KROOK, 2017). Em um processo inflamatório agudo, inicialmente ocorre a ativação de células envolvidas na resposta de fase aguda, dentre as quais podemos destacar os neutrófilos. A ativação dos neutrófilos, bem como de células residentes nos tecidos afetados promove a produção e liberação de diversos mediadores inflamatórios, sendo alguns deles já pré-formados, tais como: aminas vasoativas (histamina e serotonina), mediadores derivados de lipídeos (prostanoides e leucotrienos), mediadores peptídicos (bradicinina, taquicininas e endotelinas), proteases, entre outros, além de mediadores

que têm sua produção estimulada, tais como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, quimiocinas, NO, espécies reativas do oxigênio, entre outros (BARNES; CHUNG; PAGE, 1998; ANTONIOLI et al., 2012; OLZA et al., 2012). Sabe-se que a produção em excesso desses mediadores exerce papel importante em diversos processos inflamatórios, sejam eles agudos ou crônicos. Como exemplo, temos as pneumonias e a asma brônquica, onde se observa aumento significativo na produção de mediadores inflamatórios como o NO, IL-1 β e o TNF- α (ASHUTOSH, 2000; HANSBRO; KAIKO; FOSTER, 2011). Além disso, em outras doenças de caráter inflamatório, como o diabetes tipo 1, a aterosclerose e as doenças neurodegenerativas, também observa-se o descontrole na produção e liberação desses mediadores, promovendo ativação de células presentes no local da inflamação além de causar a quimiotaxia de outras células presentes na corrente sanguínea (KING, 2008; PACKARD; LIBBY, 2008; AMOR et al., 2014). Por este motivo, o controle na produção e liberação de mediadores inflamatórios tem surgido como opção terapêutica para que haja diminuição na severidade da lesão tecidual.

Destaca-se que dentre os diversos mediadores envolvidos na inflamação, o óxido nítrico é um dos mais importantes mediadores da resposta inflamatória, sendo liberado principalmente por células endoteliais e macrófagos e tem participação decisiva em inúmeros processos fisiológicos, sendo um importante mediador da homeostase, atuando através da regulação do tônus muscular, do processo inflamatório, da neurotransmissão e da apoptose (NAGY et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007).

No presente estudo, após analisar de forma a reduzir a utilização de animais em pesquisa refinando e avaliado de forma racional os compostos derivados do *p*-aminofenol e salicilatos, verificamos que dentre todos, o composto 2a2 foi o que demonstrou o efeito anti-inflamatório mais significativo, apresentando efeito nos experimentos *ex vivo* e *in vivo*. Esta afirmativa deve-se à capacidade que o composto 2a2 demonstrou em inibir, de forma significativa, a produção de NOx e de IL-6 *ex vivo*, bem como a migração de leucócitos e a exsudação em lavado broncoalveolar nos experimentos *in vivo*. Embora, os compostos 2a4 e 5a1 também tenham inibido de forma significativa a migração de leucócitos e a exsudação *in vivo*, consideramos o composto 2a2 o mais promissor de todos os quatro compostos, devido à sua capacidade em também inibir de forma significativa a secreção de citocinas pró-inflamatórias importantes, como o TNF- α e o INF- γ nos experimentos *in vivo*.

Inicialmente os compostos analisados nesse estudo, foram divididos em três grupos distintos. Os derivados apenas do paracetamol (p-aminofenol), os derivados de salicilatos (ácido salicílico e ácido gentísico) e os derivados híbridos, os quais as moléculas trazem partes de ambos os padrões (p-aminofenol e salicilatos). A título de comparação dos resultados obtidos nesta pesquisa, com os resultados encontrados na literatura consideramos o paracetamol como um AINE, pela sua semelhança no que diz respeito à sua ação no organismo. Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que o paracetamol tem atividade analgésica, antipirética e muito pouca atividade anti-inflamatória (BORGES; PEREIRA; VALE et al., 2013).

No intuito de selecionar compostos que possuam alta segurança em relação a sua toxicidade, os compostos que apresentassem toxicidade significativa em doses abaixo de 100 μ M, seriam automaticamente descartados do estudo. Como não houve nenhum composto com esse perfil, todos os compostos seguiram para as análises de mediadores e citocinas. Neste contexto, nossos experimentos apresentaram resultados positivos em relação à atividade anti-inflamatória dos compostos estudados, uma vez que na fase *ex vivo*, em uma condição em que os neutrófilos obtidos de camundongos foram estimulados com LPS, tanto os compostos derivados do p-aminofenol, quanto os derivados de salicilatos demonstraram atividade na inibição da produção de metabólitos do óxido nítrico. Sabe-se que o NO tem efeito inibitório sobre a migração de leucócitos através do endotélio, bem como regula o tônus vascular. Nesta mesma direção, Toner, McAuley e Shyamsundar (2015) demonstraram que baixas doses de aspirina (principal representante da classe dos salicilatos e também dos anti-inflamatórios não esteroidais) tem a capacidade de reduzir a inflamação no endotélio vascular através da ação sobre a produção de NO (TONER; MCAULEY; SHYAMSUNDAR, 2015).

A IL-6 é uma citocina chave no desenvolvimento e perpetuação dos processos inflamatórios. Em nossos experimentos, as concentrações desta citocina foram significativamente reduzidas por quatro compostos estudados: 1a1 (derivado híbrido de p-aminofenol e salicilato), 2a2, 2a4 (derivados do p-aminofenol) e 5a1 (derivado de salicilato). A síntese e liberação desta citocina deve-se principalmente a presença de leucócitos ativados, sejam polimorfonucleares ou mononucleares, no local da inflamação (KIS-TOTH; TSOKOS, 2010; SCHETT, 2007; NEGRETE-GARCÍA et al., 2010). Neste contexto e corroborando com nossa estratégia, outros pesquisadores têm investido no intuito de modificar a

apresentação dos salicilatos, com objetivo de aumentar sua ação e facilitar sua absorção pelo organismo. É o caso do estudo conduzido por Abbas et al. (2017) que conjugou salicilatos e hidroximetilcelulose, fazendo com que os compostos apresentassem efeito anti-inflamatórios significativo, inibindo dentre vários mediadores a IL-6.

Após a análise inicial de toxicidade e atividade *ex vivo*, verificamos que quatro compostos (1a1, 2a2, 2a4 e 5a1) apresentaram características que os credenciava para a avaliação *in vivo*, com a finalidade de comprovação de sua eficácia anti-inflamatória. Desta forma, seguiram-se os experimentos utilizando-se o modelo da lesão aguda pulmonar induzida por LPS em camundongos.

Nesta fase dos experimentos, os camundongos foram expostos ao LPS, situação que produz aumento significativo na migração leucocitária para o tecido pulmonar, com aumento da exsudação e produção de citocinas pró-inflamatórias e redução na síntese de citocinas anti-inflamatórias. Nesse contexto, os resultados obtidos em nossos experimentos demonstraram que os quatro compostos analisados nesta etapa (1a1, 2a2, 2a4 e 5a1), possuem realmente um perfil anti-inflamatório importante, já foram capazes de inibir de forma significativa a migração de leucócitos para os pulmões, bem como reduzir a exsudação quando testados na menor dose efetiva. Os leucócitos são as primeiras células ativadas na defesa imune do hospedeiro contra infecção e as primeiras células a chegarem ao local da lesão tecidual, quando do estabelecimento do processo inflamatório (GÓRSKA et al., 2010; MONTESEIRIN, 2009). Junto a este fenômeno migratório, existe concomitantemente a formação de exsudato, outro importante sinal do estabelecimento do processo inflamatório (LECHNER; LIRK; RIEDER, 2005; LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010). Semelhante aos resultados obtidos neste estudo, outros pesquisadores já demonstraram que a utilização de anti-inflamatórios, sejam eles AINEs ou não, faz com que haja reversão no quadro de migração leucocitária e exsudação no lavado broncoalveolar, diminuindo a resposta inflamatória nesse mesmo modelo induzido pelo LPS (LI et al, 2013; GONG et al, 2014).

Quando a inflamação se estabelece as células inflamatórias envolvidas neste processo são capazes de produzir e liberar no meio extracelular proteínas sinalizadoras conhecidas como citocinas. Em situações de inflamação, na grande maioria das vezes, as citocinas secretadas tem como função recrutar mais células para o local onde ocorre o processo inflamatório (ZHANG; AN, 2007; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Dentre as citocinas pró-inflamatórias,

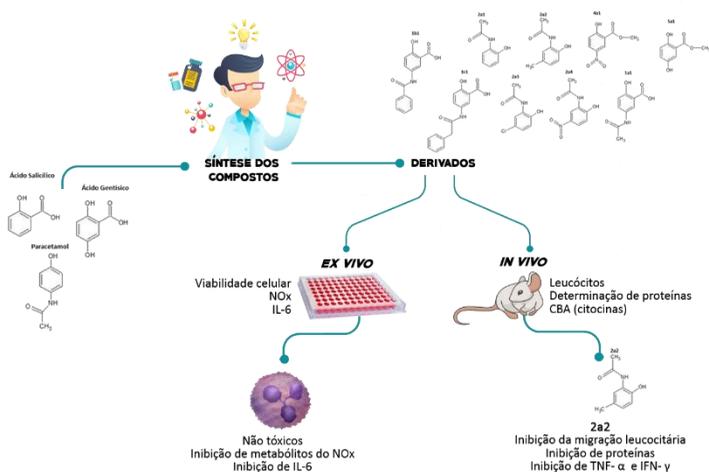
podemos destacar três: TNF- α , INF- γ e IL-6. O TNF- α tem diversas funções na diferenciação celular, inflamação, imunidade e apoptose, sendo produzida e liberada principalmente por macrófagos, sendo considerada um dos principais mediadores da inflamação aguda, tendo a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas (WALLACH, 2016; ZELOVA; HOSEK, 2013). Sugere-se que a redução nas concentrações de TNF- α seja muito importante para a diminuição da progressão da resposta inflamatória principalmente aquela que ocorre nas vias aéreas em modelos de lesão pulmonar, bem como em pacientes asmáticos (STRIZ et al., 2014). Outra citocina importante é o IFN- γ . Essa citocina é secretada principalmente por células Th1 e células NK, tendo como principal função a ativação de macrófagos e neutrófilos em resposta a diferentes estímulos, como LPS e DNA bacterianos, que interagem com o receptor TLR ou mesmo em reconhecimento a alguma injúria tecidual (LARKIN III et al., 2013; SCHURGERS et al., 2011). A IL-6 é outra citocina pró-inflamatória que foi analisada neste trabalho. É uma citocina associada a reações agudas de estresse, doenças cardiovasculares, depressão, entre outras, sendo sintetizada e secretada também por diversos tipos celulares como monócitos, células endoteliais, fibroblastos e células T e também sofrem estímulos através de outras citocinas, principalmente IL-1 e TNF- α (LUTGENDORF et al., 2004; SOUZA et al., 2008; SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015). Já a IL-10 é uma citocina com perfil anti-inflamatório, e é produzida tanto por células do sistema imune inato, incluindo as células dendríticas (DC), macrófagos, mastócitos, natural killer (NK), eosinófilos e neutrófilos quanto por células do sistema imunitário adaptativo, tais como células Th1, Th2 e Th17, células Treg, CD8 + e células B (SARAIVA; O'GARRA, 2010; OUYANG; RUTZ; CRELLIN et al., 2011). Uma de suas principais funções biológicas é a inibição da resposta pró-inflamatória que ocorre na imunidade inata e adaptativa, e assim, prevenir as lesões nos tecidos. Modelos de lesão aguda pulmonar induzida por LPS são vastos na literatura e na sua grande maioria esses estudos demonstram que há significativa diminuição da expressão e secreção de IL-10 e aumento da expressão de IFN- γ em resposta ao estímulo com o LPS. Demonstram também que a utilização de anti-inflamatórios nesse modelo é eficaz na inversão da expressão dessas citocinas, ou seja, há um aumento na expressão e secreção de IL-10 e há diminuição na expressão e secreção de IFN- γ em resposta ao agente anti-inflamatório (NIE et al., 2015; TANG; FANG; SHI, 2017; ZENG et al., 2017).

Nesta direção, verificamos em nossos experimentos que três dos quatro compostos selecionados (2a2, 2a4 e 5a1), utilizados na menor dose efetiva capaz de reduzir a migração leucocitária para a cavidade pleural, foram efetivos em reduzir a síntese de TNF- α no sítio inflamatório, e apenas o composto 2a2 foi capaz de reduzir a síntese de INF- γ . As concentrações de IL-6 e IL-10 não foram significativamente alteradas quando os compostos foram testados na dose de 3 mg/kg. É sabido que derivados salicílicos, inclusive o ácido acetilsalicílico, possuem efeito inibitório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimuladores da síntese de citocinas anti-inflamatórias, reduzindo as concentrações de IL-1 β e TNF- α , e aumentando concentrações de IL-10 (KATA et al., 2017). Estudos demonstrando este mesmo efeito em modelo inflamatório induzido pelo LPS também são vastos na literatura. Um exemplo é o estudo desenvolvido por QU e colaboradores (2017), onde ficou comprovado o efeito do ácido aminosalicílico, derivado salicílico amplamente utilizado no tratamento de colite ulcerativa, reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e de mediadores como o NO, ao mesmo tempo promovendo aumento das concentrações de IL-10 em macrófagos murinos estimulados por LPS. Embora em nossos experimentos não tenhamos verificado efeito significativo dos compostos sobre a IL-6 e IL-10, acreditamos que este resultados seja reflexo da baixa dose escolhida para o estudo *in vivo* (3 mg/kg), uma vez que o efeito inibitório sobre a IL-6 havia sido obtido nos experimentos *ex vivo*. Finalmente analisando criticamente os resultados obtidos, podemos verificar que o composto 2a2 foi o que melhor apresentou efeitos anti-inflamatórios, o que justificaria a continuação destes estudos.

6 CONCLUSÃO

Podemos afirmar que de todos os nove compostos analisados neste estudo, quatro se destacaram: 1a1, 2a2, 2a4 e 5a1. Desses quatro compostos, cabe dar o papel principal dessas análises para o composto 2a2. Esse composto é um derivado do paracetamol e os resultados o apontam como a molécula promissora a realmente possuir efeito anti-inflamatório. O credenciando, como um possível protótipo para futuras modificações e estudos mais aprofundados a fim de se comprovar a sua eficácia, potência e segurança.

Figura 17. Resumo gráfico do estudo.



REFERÊNCIAS

ABBAS, K. et al. Designing novel bioconjugates of hydroxyethyl cellulose and salicylates for potential pharmaceutical and pharmacological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 441-450, 2017.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5. New York: Garland Science, 2007.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. **Immunology**, v. 142, n. 2, p. 151-66, 2014.

ANTONIOLI, L. et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 6, p. 842-62, 2012.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs and Natural Variation. **The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 43, p. 385-406, Agosto 2012.

ASHUTOSH, K. Nitric oxide and asthma: a review. **Curr Opin Pulm Med**, v. 6, n. 1, p. 21-5, 2000.

AUYANG S.Y. From experience to design - the science behind aspirin. Disponível em: <<http://www.creatingtechnology.org/biomed/aspirin.htm>> Acesso em: 18 jan. 2012.

BALKWILL, F. R.; BURKE, F.. The cytokine network. **Immunology Today**, v. 10, n. 9, p. 299-304, 1989.

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 4, p. 515-96, 1998.

BAYLISS, M. K.; BUTLER, J.; FELDMAN, P. L.; GREEN, D. V. S.; LEESON, P. D.; PALOVICH, M. R.; TAYLOR, A. J. Quality guidelines for oral drug candidates: dose, solubility and lipophilicity. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 10, p. 1719-1727, 2016.

BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI S.; TACCHI R.; LEONE S.; Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. **CNS Drug Reviews**, v. 12, p.250-275, 2006.

BLASER, H. et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 2016.

BORGES, R. S.; BARROS, T. G. et al. A computational study for the antioxidant capacity increases in hydroxy-derivatives of paracetamol and salicylic acid. **Med Chem Res** n. 24, p.3453–3459, 2015

BORGES, R. S.; PEREIRA, G. A. N.; VALE, J. K. L. et al. Design and Evaluation of 4-Aminophenol and Salicylate Derivatives as Free-Radical Scavenger. **Chem Biol Drug Des**; n. 81, p. 414–419, 2013.

BORGES, R. S. Planejamento, síntese e avaliação antioxidante de inibidores fenólicos da PGES derivados da associação p-aminofenol e salicilatos. 2003. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém.

BOTTA, M. et al. Anti-inflammatory activity of a new class of nitric oxide synthase inhibitors that release nitric oxide. **ChemMedChem**, v. 3, n. 10, p. 1580-8, 2008.

BRUNTON, L.L., CHABNER, B.A., KNOLLMAN, B.C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman. 12^a ed, Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222-225, Jan 2013.

CHUNG, K. F.. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. **The Lancet**, v. 386, n. 9998, p. 1086–1096, 2015.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S53-72, 2010.

DINIZ J.E.M., BORGES R.S. , ALVES C.N. A DFT study for paracetamol and 3,5-disubstituted analogues. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v.673, p. 93–97, 2004.

DITTRICH, A. et al. Systems biology of IL-6, IL-12 family cytokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, p. 595–602, 2015.

DONG, L. et al. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. **The Journal of Asthma**, v. 46, n. 3, p. 229-233, 2009.

DONG, W. et al. The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26029-40, 2006.

ERSHLER, W. B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 41, p. 176–181, 1993.

FAVARIN, D. C. et al. Potential effects of medicinal plants and secondary metabolites on acute lung injury. **BioMed Research International**, p. 12 páginas, Agosto 2013.

FOELL, D.; WITTKOWSKI, H.; ROTH, J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 3, n. 7, p. 382-90, 2007.

FU, C. et al. Dexmedetomidine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 2017, p. 131-138, Novembro 2016.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-6, 2005.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1035-44, 2011.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 11, p. 1008-16, 2011.

GONG, J. et al. Maresin 1 mitigates LPS-induced acute lung injury in mice. **British Journal of Pharmacology**. n. 171, p. 3539-3550, 2014.
GÓRSKA, K.; MARKEY-WARZECZOWSKA, M.; KRENKE, R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Curr Opin Pulm Med**, v. 16, n. 2, p. 89-96, 2010.

HANCOCK, R. E.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 243-54, 2012.

HANKE, T. et al. Small molecules with anti-inflammatory properties in clinical development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 157, p. 163-187, Janeiro 2016.

HANSBRO, P. M.; KAIKO, G. E.; FOSTER, P. S. Cytokine/anticytokine therapy - novel treatments for asthma? **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 1, p. 81-95, 2011.

HAYASHI, T.; NAKAMURA, T.; TAKAOKA, A. [Pattern recognition receptors]. **Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi**, v. 34, n. 5, p. 329-45, 2011.

HEINRICH, P. C., CASTELL, J. V., ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, p. 621-36, 1990.

HOFFMANN, N. et al. Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2504 - 2514, 2005.

HOFMANN, S.R.; RÖSEN-WOLFF, A.; TSOKOS, G.C.; HEDRICH, C.M. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. **Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 116-127, 2012.

JACK D.B. One hundred years of aspirin. **The Lancet**, v.350, p. 437-9, 1997.

JOZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J.Z.. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Pol Pharm**, v. 71, n. 1, p. 11-23, 2014.

KATA, D. et al. A novel pleiotropic effect of aspirin: Beneficial regulation of pro and anti-inflammatory mechanisms in microglial cells. **Brain Research Bulletin**, v. 132, p. 61-74, 2017.

KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **J Periodontol**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1527-34, 2008.

KIPS, J. C. et al. Murine models of asthma. **Eur Respir J**, v. 22, n. 2, p. 374-82, 2003.

KIS-TOTH, K.; TSOKOS, G.C. Dendritic cell function in lupus: Independent contributors or victims of aberrant immune regulation. **Autoimmunity**, v.43, n.2, p.121-30, 2010.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-75, 2013.

LARKIN III, J. et al. Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 18, n. 4, p. 1-8, 2013.

LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. **Semin Cancer Biol**, v. 15, n. 4, p. 277-89, 2005.

LI, H. et al. Repair of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice by Endothelial Progenitor Cells, Alone and in Combination With Simvastatin. **Critical Care**, v. 3, n. 144, p. 876-886, 2013.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LUIKING, Y. C.; ENGELEN, M. P.; DEUTZ, N. E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 1, p. 97-104, 2010.

LUTGENDORF, S. K. et al. Religious participation, interleukin-6, and mortality in older adults. **Health Psychology**, v. 23, n. 25, p. 465-475, 2004.

MACIEL, K. M. Salicitamol, um derivado da associação molecular do paracetamol e ácido salicílico: estudo das atividades antinociceptiva e anti-inflamatórias. 2013. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, 2011.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature Insight Review**, v. 454, n. 24, p. 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nature Reviews Inflammation**, v. 9, 2009.

MENEGAZZI, M. et al. Hypericum perforatum attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 5, p. 740-53, 2006.

MEOTTI, F. C.; ROSA, J. M.; BAGIO, A. Protective effect crude extract from *Wedelia paludosa* (Asteraceae) on the hepatotoxicity induced by paracetamol in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.58, p.137–42, 2006.

MIGNANI, S.; HUBER, S.; TOMA'S, H.; RODRIGUES, J.; MAJORAL, J. P. Compound high-quality criteria: a new vision to guide the development of drugs, current situation. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 4, p. 573-584, 2016a.

MIGNANI, S.; HUBER, S.; TOMA'S, H.; RODRIGUES, J.; MAJORAL, J. P. Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 239-249, 2016b.

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and Asthma. **Journal Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 19, n. 5, p. 340-354, 2009.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 205–218, 2008.

NADEEM, A.; SIDDIQUI, N.; AL-HARBI, N.O.; ATTIA, S. M.; ALSHARARI, S.D.; AHMAD, S.F. Acute lung injury leads to depression-like symptoms through upregulation of neutrophilic and neuronal NADPH oxidase signaling in a murine model. **International Immunopharmacology**, v. 47, n. 2017, p. 218-226, 2017.

NAGY, G. et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunol Lett**, v. 111, n. 1, p. 1-5, 2007.

NEGRETE-GARCÍA, M.C.; VELAZQUEZ, J.R.; POPOCA-COYOTL, A.; MONTES-VIZUET, A.R.; JUÁREZ-CARVAJAL, E.; TERAN, L.M. Chemokine (C-X-C motif) ligand 12/stromal cell-derived factor-1 is associated with leukocyte recruitment in asthma. **Chest**, v.138, n.1, p.100-106, 2010.

NGUYEN, T. A.; PANG, K. C.; MASTERS, S. L. Interellular communication fo innate immunity. **Molecular Immunology**, v. 86, p. 16-22, 2017.

NIE, L. et al. CXCR3 may help regulate the inflammatory response in acute lung injury via a pathway modulated by IL-10 secreted by CD8+CD122+ regulatory T cells. **Inflammation**, v. 39, n. 2 p. 526-533, 2015.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 3, p. 227-240, 2009.

OLZA, J. et al. Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. **Diabetes Care**, v. 35, n. 11, p. 2373-6, 2012.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N.K.; VALDEZ, P.A.; HYMOWITZ, S.G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

PACKARD, R. R.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clin Chem**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2008.

PARK, J. et al. New bisabolane sesquiterpenes from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* ROXB. and their inhibitory effects on UVB-induced MMP-1 expression in human keratinocytes. **Helv Chim Acta**, v. 97, p.438-446, 2014.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-89, 2001.

PILLON, N. J.; KROOK, A. Innate immune receptors in skeletal muscle metabolism. **Experimental Cell Research**, Fevereiro 2017.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 4, p. 259-70, 2009.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol: past, present, and future. **American Journal of Therapeutics**. v.7, p.143–147, 2000.

QIU H., LIU J., KONG H., LIU Y., MEI X. Isobolographic analysis of the antinociceptive interactions between ketoprofen and paracetamol. **European Journal of Pharmacology**, v.557, p. 141–146, 2007.

QU, et al. 5-aminosalicylic acid inhibits inflammatory responses by suppressing JNK and p38 activity in murine macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.39, n. 1, p. 45-53, 2017.

RANG H.P., DALE M.M., RITTER J.M. *Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

RATH, T. et al. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation associated carcinogenesis. **Arch Toxicol**, v. 89, p. 541–554, 2015.

RICCIARDOLO, F. L. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 731-65, 2004.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 3, p. 237-245, junho 2014.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 3, p. 811-9, 1996.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 170–181, 2010.
SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S.. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, p. 475–487, 2015.

SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S.. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 26, p. 475–487, 2015.

SCHETT, G. Joint remodelling in inflammatory disease. **Ann Rheum Dis**, v.66, n.3, p.42-44, 2007.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHURGERS, E. et al. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . **Journal Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 12, p. 917-926, 2011.

SEELY, A. J. E.; PASCUAL, J. L.; CRISTOU, N. V. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. **Critical Care**, v. 7, p. 291-307, 2003.

SILVA, A. M. O. et al. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* L. inhibits neutrophil influx and cytokine secretion. **Phytother Res**, v. 29, n. 1, p. 125-133, 2015.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Inflammation**, v. 10, Junho 2010.

SOUZA, J. R. M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 9499, 2008.

STEINER, T. J.; M. VOELKER. Gastrointestinal tolerability of aspirin and the choice of over-the-counter analgesia for short-lasting acute pain. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**. v. 34, p. 177–186, 2009.

STENKEN, J. A.; POSCHENRIEDER, A. J.. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. **Analytica chimica acta**, v. 853, p. 95–115, 2015.

STRIZ, I. et al. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clinical science** (London, England : 1979), v. 126, n. 9, p. 593–612, 2014.

TANG, Q. F.; FANG, Y. Z.; SHI, C. H. The protective effect and mechanism of sevoflurane on LPS-induced acute lung injury in mice. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n. 4, p. 1732-1742, Abril 2017.

TONER, P.; MACAULEY, D., F.; SHYAMSUNDAR, M. Aspirin as a potential treatment in sepsis or acute respiratory distress syndrome. **Critical Care**, v.19, n. 374, p. 1-9, 2015.

TRIANTAFILOU, K.; TRIANTAFILOU, M. Visualising PAMP-PRR interactions using nanoscale imaging. **Methods Mol Biol**, v. 799, p. 25366, 2012.

TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 443-52, 2007.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

WALLACH, D.. The cybernetics of TNF: Old views and newer ones. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 50, p. 105–114, 2016.

WEBB, D. R. Animal models of human disease: inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 121-30, 2014.

WOLVEKAMP, M. C.; MARQUET, R. L. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. **Immunology Letters**, v. 24, p. 1-9, 1990.

WONNENBERG, B.; JUNGNICHEL, C.; HONECKER, A.; WOLF L.; VOSS, M.; BISCHOFF, M.; TSCHERNIG, T.; HERR, C.; BALS, R.; BEISSWENGER, C. IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with *P. aeruginosa*. **Innate Immunity**, v. 22, n. 8, p. 620-625, Agosto 2016.

ZELOVA, H.; HOSEK, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflamm Res**, v. 62, p.641–651, 2013.

ZENG, S. et al. High-dose dexamethasone induced LPS-stimulated rat alveolar macrophages apoptosis. **Drug Design, Development and Therapy**, n. 11, p. 3097-3104, 2017.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ANEXO I

Protocolo de aprovação na comissão de ética no uso de animais
(CEUA/UFSC)

Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo para obtenção de neutrófilos peritoneais para cultura primária", protocolada sob o CEUA nº 8665141117, sob a responsabilidade de **Eduardo Monguilhott Dalmarco** e equipe: **Eduardo Talita Bramorski Mohr**; **Lais Cristina Theindl**; **Marcus Vinícius Pereira dos Santos Nascimento**; **Yeo Jim Kinoshita Moon** - 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 de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 12/03/2018.

We certify that the proposal "In vivo model of neutrophils obtention for cell culture", utilizing 240 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 8665141117, under the responsibility of **Eduardo Monguilhott Dalmarco** and team, **Eduardo Talita Bramorski Mohr**; **Lais Cristina Theindl**; **Marcus Vinícius Pereira dos Santos Nascimento**; **Yeo Jim Kinoshita Moon** - 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 Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 03/12/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **01/2022**

Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 3 meses**

N: **240**

Linhagem: **mus musculus**

Peso: **25 a 35 g**

Resumo: A inflamação é uma resposta do organismo frente a algum estímulo lesivo que busca a destruição de agentes estranhos para posterior reparação do tecido acometido. Recentemente a ciência tem se voltado para este fenômeno com mais atenção uma vez que diversas doenças já conhecidas parecem estar relacionadas com este fenômeno, tais como síndromes metabólicas, doenças neurodegenerativas e até o câncer. Além disso, uma série de doenças inflamatórias refratárias a seus tratamentos necessitam de novos medicamentos eficazes e seguros. Moléculas sintéticas e semi-sintéticas, além de derivados naturais são conhecidas por possuírem algumas ações biológicas relatadas na literatura, dentre elas atividades antibacteriana e antifúngica, anticâncer e anti-inflamatória. Objetivos: O presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito antiinflamatório destes compostos inéditos, avaliando suas eficiências em modelo inflamatório da neutrófilos isolados de peritônio (ex vivo) e, elucidar/sugerir o mecanismo de ação utilizando este mesmo modelo. Material e métodos: Os compostos analisados neste estudo são inéditos e serão cedidos pelo professor Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina [UFSC e pelo Professor Rosivaldo Borges (UFSC) do Departamento de Química da Universidade Federal do Pará [UFPA. Para as análises ex vivo serão utilizados camundongos albinos Suíços de ambos os sexos (25-35 g). Para dosagem de MPO, ADA e NO serão utilizadas metodologias descritas por RAO et al. (1993) (MPO), GIUSTI e GALANTI (1984) (ADA) e GREEN et al. (1982) (NO). Para análise das citocinas será utilizada metodologia de enzaimunoensaio (ELISA) e citometria de fluxo através de Cytometric Bead Array (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , INF- γ , IL-12p70, KC, IL-1 β e IL-17A). Para as análises de mecanismo de ação dos compostos será analisada a ação dos compostos sobre a produção de NO (Griess) e sobre as citocinas TNF- α e IL-6 (ELISA). Finalmente, para analisar o efeito dos compostos sobre a expressão as proteínas, iNOS, COX-2 e MAPKs, PI3K e os fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1 e STAT3) será utilizada a metodologia de western blot.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Imunologia - CCS - Bloco H, 4o. andar BIO0014

Florianópolis, 12 de março de 2018



Universidade Federal
de Santa Catarina

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Tonussi'.

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Castro'.

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

ANEXO II

Protocolo de aprovação na comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFSC)



Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo instilação intranasal de LPS em camundongos", protocolada sob o CEUA nº 6118110417, sob a responsabilidade de **Eduardo Monguilhott Dalmarco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilio 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 de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 04/08/2017.

We certify that the proposal "Intranasal LPS instillation in mice", utilizing 534 Heterogenics mice (534 males), protocol number CEUA 6118110417, under the responsibility of **Eduardo Monguilhott Dalmarco** - 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 Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 08/04/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2017** a **08/2021**

Área: **Ciências da Saúde**

Origem:	Biotério Central		
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos
		idade:	30 a 45 dias
		N:	534
Linhagem:	mus musculus	Peso:	18 a 25 g

Resumo: A inflamação é uma resposta do organismo frente a algum estímulo lesivo que busca a destruição de agentes estranhos para posterior reparação do tecido acometido. Recentemente a ciência tem se voltado para este fenômeno com mais atenção uma vez que diversas doenças já conhecidas parecem estar relacionadas com este fenômeno, tais como síndromes metabólicas, doenças neurodegenerativas e até o câncer. Além disso, uma série de doenças inflamatórias refratárias a seus tratamentos necessitam de novos medicamentos eficazes e seguros. Moléculas sintéticas e semi-sintéticas, além de derivados naturais são conhecidas por possuírem algumas ações biológicas relatadas na literatura, dentre elas atividades antibacteriana e antifúngica, anticâncer e anti-inflamatória. Objetivos: O presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório destes compostos inéditos, avaliando suas eficiências em modelo inflamatório da instilação de LPS intranasal em camundongos (in vivo), e, elucidar/sugerir o mecanismo de ação utilizando macrófagos e células epiteliais pulmonares murinas estimuladas com LPS (in vitro). Material e métodos: Os compostos analisados neste estudo são inéditos e serão cedidos pelo professor Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da Universidade Federal do Pará UFPA. Para as análises in vivo serão utilizados camundongos albinos Suíços (18-25g) e o modelo da instilação de LPS, será utilizado nesta etapa. Para dosagem de MPO, ADA e NO serão utilizadas metodologias descritas por RAO et al. (1993) (MPO), GIUSTI e GALANTI (1984) (ADA) e GREEN et al. (1982) (NO). Para análise das citocinas será utilizada metodologia de enzimmunoensaio (ELISA) e citometria de fluxo através de Cytometric Bead Array (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- γ , INF- γ , IL-12p70, KC, IL-17 e IL-17A). Para as análises de mecanismo de ação dos compostos serão utilizadas células murinas RAW 264.7 e LA-4 (in vitro). Onde será analisada a ação dos compostos sobre a produção de NO (Griess) e sobre as citocinas TNF- γ e IL-6 (ELISA). Finalmente, para analisar o efeito dos compostos sobre a expressão as proteínas, iNOS, COX-2 e MAPKs, PI3K e os fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1 e STAT3) será utilizada a metodologia de western blot.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Imunologia - CCS - Bloco H, 4o. andar.

Florianópolis, 12 de março de 2018



Universidade Federal
de Santa Catarina

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Tonussi'.

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Castro'.

Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina