



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

LAIS CRISTINA THEINDL

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DE DIENOS INÉDITOS (derivados
CINAMATOS)**

FLORIANÓPOLIS

2021

Lais Cristina Theindl

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO ANTI-
INFLAMATÓRIO DE DIENOS INÉDITOS (derivados
CINAMATOS)**

Dissertação submetido (a) ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestrado em 2021.
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis

2021

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

Theindl, Lais Cristina

Avaliação pré-clínica do efeito anti-inflamatório de
dienos inéditos (derivados cinamatos) / Lais Cristina
Theindl ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2021.
70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Inflamação. 3. Imunomodulador. 4.
Cinamatos . 5. Citocinas. I. Monguilhott Dalmarco, Eduardo
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Lais Cristina Theindl

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE
DIENOS INÉDITOS (derivados CINAMATOS)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Beatriz Garcia Mendes Borba, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Roberto Santin, Dr.
Universidade do Vale do Itajaí

Prof.(a) Ziliani da Silva Buss, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que
foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Prof^ª. Dr^ª. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Orientador

Florianópolis, 10 de dezembro de 2021.

Dedico este trabalho aos meus avós Hans Theindl e Olga Eltermann, por sempre acreditarem em mim e agora estarem me guiando do céu.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGFAR) pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela orientação.

Ao Professor Dr. Marcus Mandolesi de Sá e sua aluna Lidiane Meier por sintetizarem e cederem os compostos que possibilitaram a realização desta defesa.

Aos colegas de laboratório, que além de acompanhar os experimentos de bancada, muitas vezes ajudaram.

À colega de laboratório Eduarda Fratoni, com quem dividi muitos experimentos, momentos de alegrias e tristeza ao longo destes 2 anos de mestrado.

Ao meu amigo Filipe Rodrigues de Oliveira Silva, a pessoa que mais ouviu as minhas lamúrias e não me deixou desistir em nenhum momento, estando sempre ao meu lado desde a época da graduação.

À minha mãe Magali Cristina Theindl, que foi tão guerreira quanto eu durante este período, mas sempre esteve ao meu lado, sendo mais forte do que eu e me incentivando em busca dos meus objetivos.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.” Isaac Newton

RESUMO

O processo inflamatório é uma reação fisiológica dos mamíferos contra agentes infecciosos ou lesões. Dentre as células envolvidas, os macrófagos têm papel de destaque nesse processo. Dependendo do contexto inflamatório, podem se polarizar em perfis pró ou anti-inflamatórios (M1 e M2). Nesse contexto, compostos derivados do ácido cinâmico têm demonstrado evidências de atividade anti-inflamatória; no entanto, o mecanismo responsável por esse efeito permanece obscuro. Neste estudo, investigamos a atividade anti-inflamatória de cinco dienos derivados de cinamatos de origem sintética. Os compostos que não demonstraram citotoxicidade significativa, foram testados para se triar a possível atividade anti-inflamatória o (NOx) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. Em seguida, o composto selecionado (dieno 1) foi avaliado quanto à sua capacidade em inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1 e IL-6) e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-13, IL-4 e IL-10). Por fim, após demonstrar efeitos anti-inflamatórios significativos, o dieno 1, foi capaz de reduzir a expressão de TLR4 e aumentar a atividade fagocítica dos macrófagos. Com estes resultados, concluímos que o dieno 1 apresentou um importante efeito anti-inflamatório, e esse efeito está ligado à sua característica imunomoduladora, já que o composto foi capaz de reduzir marcadores característicos de macrófagos M1 e ao mesmo tempo aumentar marcadores característicos de macrófagos M2.

Palavras-chave: Inflamação. Imunomodulador. Cinamatos (dienes). LPS. RAW264.7. *in vitro*. Citocinas

ABSTRACT

The inflammatory process is a mammalian physiological reaction against infectious agents or injuries. Among the cells involved, the macrophages have a highlighted role during this process. Depending on the inflammatory context, they can polarize into pro- or anti-inflammatory profiles (M1 and M2). In this context, compounds derived from cinnamic acid have demonstrated strong evidence of anti-inflammatory activity; however, the mechanism responsible for this effect remains unclear. In this study, we investigated the anti-inflammatory activity of five cinnamate-derived dienes of synthetic origin. The compounds that did not demonstrate significant cytotoxicity were tested to assess anti-inflammatory activity (NO_x) in RAW 264.7 cells stimulated with LPS. Then, the selected compound (diene 1) was evaluated as to its ability to inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1, and IL-6) and increase the production of anti-inflammatory cytokines (IL-13, IL-4, and IL-10). Finally, diene **1** was able to reduce the expression of TLR4 and increase the phagocytic activity of the macrophages. Gathering these results together, we conclude that diene **1** showed an important anti-inflammatory effect, and this effect is linked to its immunomodulatory characteristic. Since the M1 markers were reduced at the same time, M2 markers were increased by the treatment of the macrophages with diene **1**.

Keywords: Inflammation. Immunomodulatory. Cinnamates. LPS. RAW264.7. *in vitro*. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de sinalização intracelular do TLR4	23
Figura 2 Esquema demonstrando a polarização dos macrófagos.....	31
Figura 3 <i>Cinnamomun cassia</i> e o composto natural mais abundante	34
Figura 4 Estrutura química básica dos Dienos	37
Figura 5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos Dienos em macrófagos RAW 264.7.....	44
Figura 6 Efeitos dos dienos sobre os níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS	45
Figura 7 Efeitos dos dienos 1, 2 e 3 sobre os níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.	47
Figura 8 Efeito do dieno 1 sobre a secreção das citocinas IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1 e IL-6 em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	50
Figura 9 Efeito do dieno 1 sobre a secreção das citocinas imunomoduladoras IL-13, IL-4 e IL-10.	52
Figura 10 Efeito do dieno 1 sobre a atividade fagocítica de macrófagos estimulados com LPS.	53
Figura 11 Efeito do composto dieno 1 sobre a expressão de receptores de manose (CD206) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	54
Figura 12 Efeito do composto dieno 1 sobre a expressão de TLR4 (CD284) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS	55
Figura 13 Possível mecanismo de ação do dieno 1.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dienos com estrutura, dados químicos e quantidade sintetizada.....	38
Tabela 2 Efeito inibitório dos dienos 1, 2 e 3 estimulados com LPS na produção de NO em células RAW 264.7 (CI50, μM).	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AD-MSCs – Células tronco mesenquimais apoptóticas derivadas de tecido adiposo
- AINEs – Anti-inflamatórios Não-Esteroidais
- ANOVA – Análise de variância
- B – Branco
- CBA – *Cytometric Bead Array*
- CC₁₀ – Concentração citotóxica capaz de alterar a viabilidade de 10% ou mais de células
- COX-2 – Ciclooxigenase-2
- CR3 – Receptor 3 do sistema Complemento
- DAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Dano
- Dex – Dexametasona
- DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- ELISA – Ensaio de Imuno-absorção Enzimática
- eNOS - Óxido Nítrico sintase endotelial
- EPM – Erro Padrão da Média
- ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- CI₅₀ – Concentração Inibitória capaz de reduzir a produção de 50% de NO
- IFN-I – Interferon do tipo I
- IFN- γ – Interferon-gama
- IL – Interleucina
- IL-1 – Interleucina-1
- IL-10 – Interleucina-10

IL-13 – Interleucina-13

IL-1F – Interleucinas da Família-1

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

iNOS – Óxido Nítrico sintase induzida

IRF-4 – Fator Regulador de Interferon-4

LPS – Lipopolissacarídeo

LRR – Repetições Ricas em Leucina

M1 – Macrófago pró-inflamatório

M2 – Macrófago anti-inflamatório

MAPK – Proteína cinases ativadas por mitógeno

MCP-1 – Proteína Quimiotáticas de Monócito -1

MD2 – Fator de Diferenciação Mielóide 2

MHC II –Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

MyD88 – Fator de resposta primária de diferenciação mielóide 88

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa B

NK – Células *Natural Killers*

NLRP - Domínio de Pirina da Família de Receptor Semelhante a NOD

NLRs – Receptores Semelhantes a NOD

nNOS – Óxido Nítrico sintase neuronal

NO – Óxido Nítrico

NO₂⁻ – Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

NOD - Proteína de Domínio Oligomérico de Ligação de Nucleotídeo

NOS – Óxido Nítrico Sintase

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PAMPs - Padrões Moleculares Associadas ao Patógenos

PM – Peso Molecular

PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão

RAW 264.7 – Linhagem celular murina

RLRs - Receptores Semelhantes a RIG

SR – Receptor Eliminador

TGF- β – Fator Transformador de Crescimento- β

Th1 – Células THelper-1

Th17 – Células THelper-17

Th2 – Células THelper-2

TIR – Domínios de receptor Toll-Interleucina-1

TIRAP – Domínio TIR contendo Proteína Adaptadora

TLR – Receptores tipo Toll

TLR-4 – Receptores tipo Toll-4

TLRs – Receptores do Tipo Toll

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRAM – Molécula Adaptadora Relacionada ao TRIF

TRIF – Receptor TIR induzido por Interferon-Beta

VEGF – Fator Vascular Endotelial de Crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	20
1.2	RECEPTORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	21
1.3	CITOCINAS.....	24
1.3.1	INTERLEUCINAS (IL).....	24
1.3.2	FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF).....	26
1.3.3	INTERFERON-GAMA (IFN- γ).....	27
1.3.4	PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITO-1 (MCP-1).....	28
1.4	MACRÓFAGOS E A ATIVIDADE IMUNOMODULADORA.....	28
1.5	CINAMATOS.....	32
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	36
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	CULTURA CELULAR.....	39
3.2	VIABILIDADE CELULAR.....	39
3.3	INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO.....	40
3.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO _x).....	40
3.5	DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS PRÓ E ANTI- INFLAMATÓRIAS.....	41
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	42
3.7	AVALIAÇÃO NO EFEITO DA EXPRESSÃO DE TLR- (CD-284) E RECEPTORES DE MANOSE (CD- 206).....	42
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43

4	RESULTADOS.....	43
4.1	TRIAGEM DOS COMPOSTOS DE DIENOS DERIVADOS DE CINAMATOS INÉDITOS.....	43
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO DIENO 1 EM RELAÇÃO A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1, IL-6.....	49
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO DIENO 1 EM RELAÇÃO A PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS IL-13, IL4, IL10.....	51
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	53
4.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MANOSE (CD206) E TLR-4 (CD284) EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM DIENO 1 E ESTIMULADAS COM LPS.....	53
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÃO.....	61
7	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa natural do organismo para remover estímulos prejudiciais, como agentes patogênicos, irritantes e células danificadas, com o intuito de manter a homeostase do organismo. O processo inflamatório é um complexo mecanismo que apresenta uma série de respostas e eventos celulares e vasculares com secreções humorais específicas, envolvendo dilatação de arteríolas e vênulas. Além disso, ocorre aumento da permeabilidade dos vasos e fluxo sanguíneo, ocorre infiltração de leucócitos nos tecidos, extravasamento de plasma para o tecido, formação de radicais livres, necrose e apoptose, remoção por células fagocíticas, geração de novos mediadores humorais para o crescimento celular e regeneração de novo tecido conjuntivo e funcional. De uma maneira geral, a inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica. (ABDULKHALEQ *et al.*, 2018, AGHASAFARI *et al.*, 2018; SCHMID-SCHÖNBEIN *et al.*, 2006).

Neste contexto, o sistema imunológico inato detecta a presença de substâncias que possam desencadear uma injúria tecidual e os mecanismos de defesa reconhecem especificamente o causador da infecção. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo, reconhecendo estes estímulos prejudiciais imediatamente ou poucas horas após o início do estímulo. O sistema imunológico inato é a defesa primária do organismo e, além disso, a ativação de sua cascata de reações resulta na ativação do sistema imunológico adaptativo. (SCHMID-SCHÖNBEIN *et al.*, 2006; BRUBAKER *et al.*, 2015, NOWARSKI *et al.*, 2013, WARRINGTON *et al.*, 2011).

Em contraste com o sistema imunológico inato, o sistema imunológico adaptativo é altamente específico e capaz de criar “memória” e montar respostas efetivas em relação a ameaças já encontradas. A especificidade do sistema imunológico ocorre devido à capacidade dos linfócitos T e B, em reorganizar seus genomas e criar receptores específicos para antígenos únicos. Estas células apresentam a capacidade de detecção de um pequeno subconjunto de agentes patogênicos, que são responsivos a células T e B e se diferenciam em uma população de longa vida que pode responder

rapidamente a reexposição ao patógeno inicial, desta forma as células criam um processo de “memória” (SCHONHOFF *et al.*, 2020).

Durante o processo inflamatório, células endoteliais e células envolvidas com o processo inflamatório, como macrófagos e neutrófilos, liberam o Óxido Nítrico (NO). No sistema imunológico, quando os macrófagos são estimulados e ativados, uma grande quantidade de NO é liberada, que pode matar microrganismos, parasitas e células tumorais; além disso, pode induzir reações inflamatórias e proteger o organismo de fatores adversos externos (YIN *et al.*, 2019).

O NO é um membro das entidades radicais lábeis conhecido como espécies reativas de oxigênio (EROs). O NO é formado a partir da metabolização do aminoácido L-arginina e citrulina, em uma reação catalisada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas três isoformas da enzima NOS, duas delas são produzidas de forma constitutiva: a neuronal (nNOS, NOS1) e a endotelial (eNOS, NOS3) e uma terceira isoforma é sintetizada durante o processo inflamatório, sendo a isoforma induzida (iNOS, NOS2) (LO FARO, *et al.*, 2014). O NO está envolvido com a vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular, possui ação anti-proliferativa, anti-plaquetária e efeitos antioxidantes. Entretanto os altos níveis produzidos por macrófagos ativados e outras células envolvidas no processo inflamatório, podem ser tóxicos também para células saudáveis, pois o NO tende a reagir com O_2^- ou O_2 podendo formar nitrito (NO_2^-) ou nitrato (NO_3^-), além de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como peroxinitrito ($ONOO^-$) (GUZIK *et al.*, 2003; FORSTERMANN *et al.*, 2011)

1.2 RECEPTORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Para reconhecer o agente lesivo, o sistema imunológico inato apresenta na superfície de suas células, receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Esses PRRs medeiam uma resposta adequada para neutralizar e eliminar esses invasores. Eles reconhecem assinaturas moleculares específicas de microrganismos conhecidos como Padrões Moleculares Associadas aos Patógenos (PAMPs) e/ou reconhecem moléculas derivadas de células danificadas, referidos como Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs). Os PRRs consistem em quatro famílias de receptores: os receptores

semelhantes à RIG (RLRs), os receptores semelhantes à NOD (NLRs), os receptores de lecitina tipo C e os receptores do tipo Toll (TLRs). (TARTEY *et al.*, 2017; MCKERNAN *et al.*, 2020).

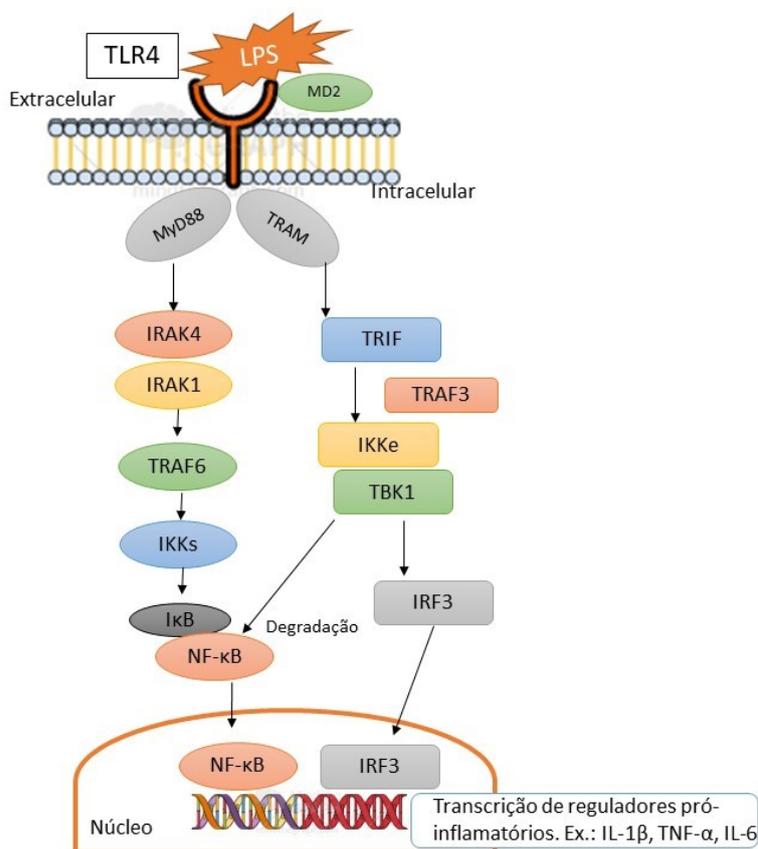
Os receptores RLRs estão localizados no citoplasma da célula e reconhece RNA exógeno e ácido nucleico viral. Os RLRs contêm três domínios, a gene-1 indutível por ácido retinóico (RIG-1), proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5) e gene de laboratório de genética e fisiologia 2 (LGP2), que tem a função de ativar vias de sinalização, levando a transcrição do Interferon tipo 1, culminando na transcrição de fatores nucleares tal como IRF-3 e Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) importantes na regulação gênica de mediadores pró-inflamatórios. O NLR outro tipo de RRP, reconhece moléculas de flagelina presente em patógenos, além disso, o NLR está envolvido na estimulação das funções imunológicas levando a uma resposta inflamatória intensa. Foram identificados receptores de NLR em monócitos, macrófagos, células T e B. Os receptores de lectina tipo C, reconhecem estruturas complexas de carboidratos presentes nas paredes das células bacterianas, fúngicas e superfícies virais. Os receptores TLRs reconhecem PAMPs e ativam uma cascata de sinalização, levando a expressão do (NF- κ B) e consequentemente a sínteses de citocinas pró-inflamatórias dependentes de INF-I. (ZHU *et al.*, 2018).

Os TLR foram a primeira família de proteínas com características definidas por Janeway *et al.* 1989. Os primeiros estudos dos mecanismos usados por insetos para reconhecer e combater infecções foram fundamentais para a descoberta das funções imunológicas dos TLRs, estes receptores transmembranares regulam a reposta imune inata e adaptativa, cujas principais funções são ligar-se especificamente ao ligante e transmitir sinais intracelularmente. Foram identificados em humanos dez diferentes TLRs, os quais apresentam importante papel na regulação fisiopatológicas das células. Apesar destes receptores serem de suma importância para a defesa do organismo, a desregulação desta cascata de sinalização pode culminar no desenvolvimento de diversas condições inflamatórias como sepse, câncer, asma, dor neuropática e doenças auto-imunes como lúpus, esclerodermia e artrite reumatoide (WANG *et al.*, 2020).

O TLR-4 é o receptor do tipo Toll mais estudado no processo inflamatório. É encontrado na membrana plasmática de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e endoteliais, seletivamente reconhecem e respondem ao principal componente químico

da membrana externa das bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS). Uma porção mínima do LPS é necessária para desencadear a atividade imunológica. O TLR4 reconhece o LPS junto com o fator de diferenciação mielóide 2 (MD2) na superfície celular. Desta forma, o TLR4 sofre uma oligomerização e recruta seus adaptadores por meio de interações com os domínios de receptor Toll-Interleucina-1 (TIR). Esta interação entre o TLR e seus ligantes, por meio do domínio TIR, ativam várias cascatas através de mediadores como por exemplo, a proteína de diferenciação mielóide primária 88 (MyD88), domínio TIR contendo proteína adaptadora (TIRAP), receptor TIR induzido por Interferon-Beta (TRIF), molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM) e muitas tirosinas cinases. Como resultado da ativação destas cascatas de sinalização, fatores de transcrição como NF- κ B induz a geração de citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferon-gama (IFN- γ), Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) que serão produzidas e liberadas para o sítio da inflamação a fim de eliminar o causador do desequilíbrio da homeostase (**Figura 1**) (ROMERIO *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020; CHOUSTERMAN *et al.*, 2017).

Figura 1. Esquema de sinalização intracelular do TLR4



Esquema de sinalização intracelular do receptor TLR4. O LPS se liga ao TLR4 e seu co-receptor MD2. Desta maneira ocorre uma sinalização intracelular em que a proteína MyD88 é ativada e uma cascata de sinalização em proteínas cinases ocorre, culminando na translocação para o núcleo do fator NF- κ B culminando na transcrição de reguladores pró-inflamatórios. Além disso, o LPS ao ligar-se ao TLR4 ativa a proteína adaptadora TRIF e transduz o sinal através de TRAF3, TBK1 e IKK ϵ , que fosforila o fator regulador de interferon 3 (IRF3). Este fator é translocado para o núcleo da célula e promove a transcrição de fatores pró-inflamatórios. Fonte: Elaborado pela autora. Adaptado de WU, LI 2020.

1.3 CITOCINAS

As citocinas são uma ampla categoria de pequenas proteínas que são produzidas e lançadas com objetivo final de sinalização celular. Estas proteínas podem apresentar atividades autócrinas (atua sobre a mesma célula), parácrinas (atua em células próximas) e endócrinas (atua em células distantes) e, além disso, podem desempenhar uma função imunomoduladora. Após se ligarem aos receptores específicos em vários tipos de células, as citocinas podem induzir a ativação, proliferação ou migração das células alvo (CHOUSTERMAN *et al.*, 2017).

As citocinas desempenham um papel fundamental na coordenação de células efetoras antimicrobianas e no fornecimento de sinais regulatórios que direcionam, amplificam e resolvem a resposta imune. As citocinas têm meias-vidas curtas, o que normalmente as impede de ter efeitos fora dos locais de inflamação. Embora seja considerado tipicamente patológico, a produção sustentada de citocinas que a levam a níveis circulantes elevados pode ser necessário para controlar apropriadamente algumas infecções disseminadas. Em níveis elevados, as citocinas podem ter efeitos sistêmicos e causar danos aos sistemas e órgãos (FAJGENBAUM *et al.*, 2020). A taxonomia das citocinas é altamente complexa e é baseada no momento da descoberta e na associação por estrutura, alvo ou função. As citocinas podem ser divididas em várias categorias: interleucinas, quimiocinas, interferons, fator de necrose tumoral e fatores de crescimento (CHOUSTERMAN *et al.*, 2017).

1.3.1 INTERLEUCINAS (IL)

As interleucinas são o grupo mais importante de citocinas liberadas durante o processo inflamatório. As interleucinas abrangem uma grande variedade de proteínas

secretadas por leucócitos e células endoteliais e que contribuem para a sinalização celular e promove a ativação, proliferação, morte e/ou motilidade do sistema imunológico. Elas podem ser divididas entre interleucinas pró e anti-inflamatórias. As interleucinas pró-inflamatórias são supostamente responsáveis pela ativação celular, dano ao tecido e necrose, enquanto as interleucinas anti-inflamatórias visam reverter o processo inflamatório (CHOUSTERMAN *et al.*, 2017).

A Interleucina-1 β (IL-1 β) é uma citocina que pertence às citocinas da família IL-1. As Interleucinas da família IL-1 (IL-1F) abrange onze proteínas, com estrutura, modo de secreção e modo de ligação ao receptor semelhante. A IL-1 β é uma citocina inflamatória sintetizada principalmente por monócitos e os macrófagos. A atividade inflamatória e imune estimulante da citocina IL-1 β são exercidas por seu produto de clivagem C-terminal, a IL-1 β madura gerada após proteólise dependente de caspase-1 e liberada extracelularmente por mecanismos de secreção não convencionais. As formas menos ativas da IL-1 β podem ser geradas extracelularmente por outras proteases durante uma reação inflamatória, na qual as células de produção de IL-1 β sofrem necrose e liberam pró- IL-1 β (MIGLIORINI *et al.*, 2020).

Outra interleucina muito envolvida com o processo inflamatório, é a IL-6, uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células epiteliais. Além disso, a IL-6 pode ser induzida por fibroblastos, mastócitos, células T e B. A IL-6 regula funções fisiológicas de múltiplos tipos de células imunes e não-imunes e representa uma interfase entre os sistemas imunológico, endócrino e neural. Além da diferenciação de células mieloides e ativação das células *Natural Killers (NK)*, a IL-6 afeta as respostas imunes adaptativas quando estimula a diferenciação de células T e B e promove a produção de imunoglobulinas (STRIZ *et al.*, 2014).

A expressão rigidamente regulada de IL-6 é um importante fator na defesa do organismo contra uma infinidade de estímulos infecciosos. Entretanto a síntese desregulada de IL-6 está relacionado com o desequilíbrio do sistema imunológico e pode desencadear doenças autoimunes como artrite reumatoide ou doenças neurodegenerativas como Alzheimer (JORDAN *et al.*, 2017).

As citocinas pró-inflamatórias tem a função de iniciar a defesa do organismo contra a invasão de agentes lesivos. No entanto essa resposta inflamatória exacerbada pode desenvolver distúrbios prejudiciais ao organismo. A Interleucina-10 (IL-10) é uma

citocina imunomoduladora, pois tem papel fundamental na limitação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção, inflamação, autoimunidade, transplante e tumorigênese. Além disso, durante a fase da resolução da infecção a IL-10 auxilia na eliminação de células apoptóticas por macrófagos. Para inibir patologias inflamatórias, a IL-10 funciona em diferentes estágios de uma resposta imune e possivelmente em diferentes localizações anatômicas. IL-10 é expressa por muitas células do sistema imune adaptativo, incluindo as células T Helper-1,2 e 17 (Th1, Th2 e Th17) polarizadas, células TReg, células T CD8⁺ e células B. É expressa também por células do sistema imunológico inato, incluindo as células Dendríticas, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos e neutrófilos (IYER *et al.*, 2012; SARAIVA *et al.*, 2010).

As Interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13) são citocinas anti-inflamatórias importantes na diferenciação e proliferação celular, câncer e promovendo inflamação alérgica e anti-helmíntica. Estas citocinas induzem respostas de defesa do hospedeiro contra infecções e auxiliam no reparo tecidual em macrófagos, possuem a capacidade de inibir a produção de citocinas inflamatórias IFN- γ , IL-12 e inibir o mediador inflamatório NO. Além dos efeitos no processo inflamatório, a IL-4 e IL-13 estão envolvidas na gravidez, desenvolvimento fetal, durante a lactação, as citocinas estão envolvidas em funções cerebrais relacionadas ao aprendizado e memória. As citocinas desencadeiam a diferenciação de células Th2 e polarização de macrófagos M2, expressão de Moléculas Clássicas de Histocompatibilidade classe II (MHC II), diferenciação de células B e células plasmáticas e troca de isotipo de anticorpo, entre outros. (MCCORMICK *et al.*, 2015).

Ainda não é muito bem elucidado como as citocinas IL-4 e IL-13 coordenam as funções nos macrófagos e no reparo tecidual ao local danificado. A eliminação das células apoptóticas também é associado à resolução da inflamação. Então, existe uma forte hipótese em que IL-4 e IL-13 detectam essas células apoptóticas e induz o reparo tecidual (BOSURGI *et al.*, 2017).

1.3.2 FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina pleiotrópica e inflamatória que contribui para a regulação da resposta imune e morte celular, mas que também pode

desencadear doenças inflamatórias. Os macrófagos são as principais células que sintetizam TNF, mas ele pode ser sintetizado também por linfócitos T e B, neutrófilos e fibroblastos. Os PPRs desencadeiam a produção do TNF que é sintetizado como uma proteína transmembrana. O TNF afeta quase todas as células do organismo, incluindo o macrófago que o sintetizou. O TNF promove a atividade inflamatória dos macrófagos, mas também estimula a proliferação e diferenciação celular e a ativação de programas de apoptose e necrose celular. Desencadeia respostas celulares como a indução da expressão de genes inflamatórios como NF- κ B e a proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), estes fatores nucleares irão sintetizar outras proteínas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento. Além do seu local de efeito, o TNF está diretamente ligado à indução de caquexia, está associado a doenças crônicas e pode afetar a termorregulação, metabolismo lipídico, fluxo sanguíneo, coagulação e resistência à insulina. A desregulação na sinalização do TNF leva a uma produção anormal de receptores da citocina, esta desregulação está associada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, entre outras. (PINCI *et al.*, 2020; WAJANT *et al.*, 2019; STRIZ *et al.*, 2014).

1.3.3 INTERFERON-GAMA (IFN- γ)

O Interferon gama (IFN- γ) é uma citocina com potentes efeitos imunoestimuladores, que está envolvida na morte celular e na resposta inflamatória. Os IFNs são produzidos por quase todos os tipos de células, mas em especial são produzidos por macrófagos e células epiteliais, em resposta à sinalização aos PPRs. Essas citocinas promovem a ativação de células Dendríticas, ativam células T contribuindo para a diferenciação Th1, ativam as funções efetoras de células CD8+ em células T citotóxicas, regulam o recrutamento de células imunes pela indução de quimiocinas e estimula a produção de NO e radicais de oxigênio. Além disso, o IFN- γ é um potente ativador das funções efetoras em células fagocíticas, aumentando sua atividade enzimática lisossomal e oxidativa. O IFN- γ também desempenha um importante papel na indução de respostas adaptativas promovendo o processamento de apresentação de antígenos em células dendríticas, parcialmente por uma regulação

positiva das moléculas MHC. O IFN- γ melhora as doenças autoimunes ao suprimir as respostas inflamatórias. Além disso, atenua a diferenciação das células Th17 e os osteoclastos, apresentando efeito protetor na artrite induzida por colágeno. O IFN- γ aumenta a expressão de mediadores apoptóticos (LEE *et al.*, 2017; STRIZ *et al.*, 2014).

1.3.4 PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITO -1 (MCP-1)

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular que regulam o recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão. As quimiocinas são secretadas em resposta a citocinas pró-inflamatórias e recrutam de maneira seletiva monócitos, neutrófilos e linfócitos. Uma vez induzida, a migração direcionada de células que expressam os receptores apropriados de quimiocinas, ocorrem ao longo de um gradiente de ligante químico, conhecido como gradiente de quimiocina (DESHMANE *et al.*, 2009).

A Proteína Quimiotática de Monócito-1 (MCP-1) também chamado de quimiocinas ligante-2 (CCL2) é um membro da família das quimiocinas C-C e um potente fator quimiotático de monócitos. É produzida por uma variedade de células, tanto constitutivamente quanto após indução por estresse oxidativo, citocinas, ou fatores de crescimento. Pode ser produzida por células endoteliais, epiteliais, fibroblastos, monócitos. A MCP-1 regula a migração e infiltração de monócitos, linfócitos T de memória e células NK, regula a expressão inflamatória de células T em células T-helper 17 durante a inflamação. Por se tratar de uma quimiocina envolvida no processo inflamatório, a MCP-1 está sendo amplamente estudada como um potente intervensor no tratamento de diversas doenças como artrite reumatoide, esclerose múltipla, aterosclerose e diabetes insulina-dependente (DESHMANE *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2021).

1.4 MACRÓFAGOS E A ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

Os monócitos são leucócitos originalmente sintetizados na medula óssea e em seguida, entram na circulação sanguínea. Durante o processo inflamatório, os monócitos deixam a circulação sanguínea e migram para o tecido, diferenciando-se em macrófagos

com o intuito de reparar o tecido danificado. Este processo de migração celular é iniciado principalmente por PAMPs que são liberados dos patógenos ou DAMPs que são liberados de células danificadas ou mortas, em resposta a infecção e danos. Além disso, a ativação de células T de memória tecido-residente pode recrutar macrófagos via secreção de várias citocinas e quimiocinas, como por exemplo, a quimiocinas MCP-1 (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018).

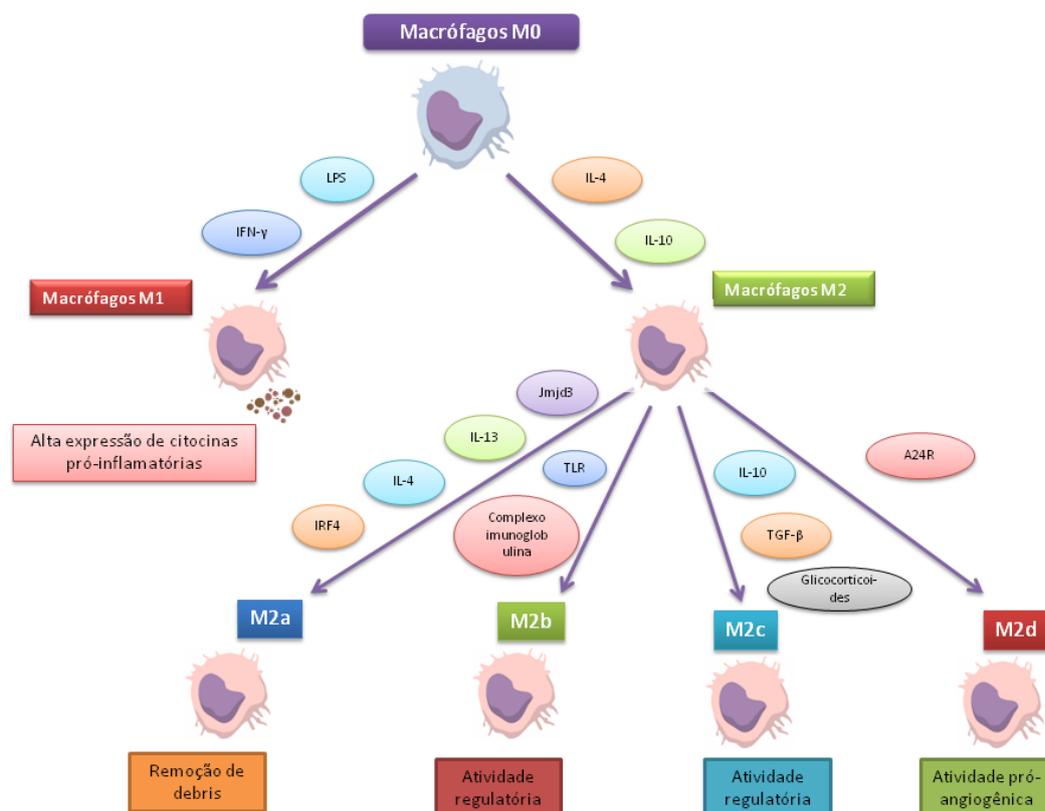
No processo inflamatório, os macrófagos têm papel importante durante o início da inflamação e no processo de resolução da inflamação. Os macrófagos têm múltiplas funções: são células fagocíticas que eliminam diversas substâncias como patógenos, células infectadas, debris e células mortas; são células apresentadoras de antígenos exibindo antígenos processados para MHC; são células que sintetizam várias citocinas, como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-13, IL-10. Além disso, os macrófagos estão envolvidos na progressão de doenças inflamatória como diabetes, aterosclerose, artrite reumatoide (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018; FUNES *et al.*, 2018).

Os macrófagos são células heterogêneas e podem ser polarizadas de acordo com o microambiente em que estão inseridas. Esta plasticidade permite a resposta apropriada a patógenos ou a moléculas de sinalização que são comumente liberadas por linfócitos ativados ou por tecidos danificados. Esta heterogeneidade fenotípica dos macrófagos é comumente referida como polarização. Esta polarização pode ser dividida em macrófagos M1 (pró-inflamatório) e macrófagos M2 (pró-resolutório). Em tecidos infectados, os macrófagos são polarizados primeiramente em macrófagos M1 para eliminar o patógeno. Posteriormente os macrófagos são polarizados em macrófagos M2 para reparar o tecido danificado (WANG *et al.*, 2019; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Os macrófagos M1, são também conhecidos como macrófagos ativados classicamente, são induzidos por células Th1 e citocinas como IFN- γ , TNF- α ou por ligantes de TLR como LPS. Os macrófagos M1 são caracterizados pela alta apresentação de antígenos e pela alta expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e ciclooxigenase-2 (COX-2) e pela baixa expressão de IL-10. Funcionalmente, os macrófagos M1 participam da remoção de patógenos durante a infecção, por meio da ativação do Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (NADPH) e na subsequente geração de EROs. Portanto, o macrófago M1 tem atividade antimicrobiana e antitumoral robusta e medeia danos teciduais induzidos por EROs que

prejudicam a regeneração tecidual e a cicatrização de feridas. (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019) **(Figura 2)**.

Os macrófagos M2 podem ser chamados de macrófagos ativados alternativamente e podem ser divididos nas subcategorias: M2a, M2b, M2c e M2d. Os macrófagos M2a são induzidos por meio dos estímulos das citocinas IL-4, IL-13 e o Fator Regulador de Interferon-4 (IRF-4). Os macrófagos M2b são induzidos por complexos de imunoglobulinas em combinação com agonistas de TLR, e os macrófagos M2c são induzidos pela IL-10, Fator Transformador de Crescimento β (TGF- β) ou por glicocorticoides. O fenótipo M2d, que é descrito apenas em camundongos, pode ser induzido por adenosina em macrófagos M1 via ativação do receptor de adenosina 2A. O macrófago M2d é caracterizado pelo aumento da produção de IL-10 e pelo Fator Vascular Endotelial de Crescimento (VEGF) e baixa expressão de TNF- α e IL-12. Os macrófagos M2 apresentam alta capacidade de proliferação, eferocitose e remodelação tecidual promovendo uma melhor cicatrização de lesões devido aos metabolismo da arginase, que desencadeia a produção de poliaminas e prolinas que atuam nesse contexto. O esquema de polarização de macrófagos pode ser visualizado na figura 2 (WANG *et al.*, 2019; HESSE *et al.*, 2001) **(Figura 2)**.

Figura 2 Esquema demonstrando a polarização dos macrófagos



Esquema de polarização dos macrófagos para macrófago pró (M1) e anti-inflamatório (M2). Macrófagos M1 podem ser ativados através da ligação de LPS ou IFN- γ . Os macrófagos são caracterizados pela alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β . Os macrófagos M2 podem ser ativados pelas citocinas IL-4 ou IL-10. Os macrófagos M2 podem ser subdivididos em macrófagos M2a, M2b, M2c e M2d. Fonte: elaborado pela autora, adaptado de WANG *et al.*, 2019.

A fagocitose é um processo de defesa e remodelação dos tecidos. Os macrófagos são células fagocíticas especializadas em engolfar células mortas e debris com a finalidade de manter a homeostase do tecido. Os macrófagos M2 geralmente exibem alta atividade fagocítica. Células apoptóticas podem regularizar o fenótipo do macrófago e, assim, aumentar a função anti-inflamatória dos macrófagos M2 através da fagocitose. Por exemplo, células tronco mesenquimais apoptóticas derivadas de tecido adiposo (AD-MSCs) reduzem a produção de TNF- α e NO e aumentam a produção de IL-10 para promover a polarização dos macrófagos M2 (YUNNA *et al.*, 2020).

A eferocitose é um processo de depuração de células apoptóticas responsável por manter a homeostase do tecido. As células apoptóticas podem sofrer necrose secundária

e desencadear respostas imunes, desta forma, estas células devem ser removidas rapidamente de forma não inflamatória. A eferocitose suprime a inflamação, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, ao mesmo tempo em que reprime as citocinas pró-inflamatórias e promove a resolução da inflamação. Além de prevenir a necrose secundária, a eferocitose tem três resultados gerais: término das respostas inflamatórias, promoção da autotolerância e ativação de vias de pró-resolução. Quando a eferocitose é prejudicada, essas funções ficam comprometidas, levando ao aumento da inflamação, resolução prejudicada e desenvolvimento de doença (DORAN *et al.*, 2020).

Os macrófagos possuem uma ampla gama de receptores de membrana que reconhecem derivados do hospedeiro e ligantes estranhos. A ativação desses receptores pode resultar na polarização dos macrófagos. Estas células podem ligar-se a polissacarídeos e/ou glicoproteínas através de TLR4, receptor 3 do complemento (CR3), receptor eliminador (SR), receptor de manose e Dectina-1. A ativação de receptores de macrófagos pode iniciar uma série de cascatas de sinalização intracelular levando à ativação transicional e produção de citocinas relacionadas à inflamação (YIN *et al.*, 2019; NIELSEN *et al.*, 2020).

1.5 CINAMATOS

A terapia anti-inflamatória atual surge da necessidade de controlar os sinais cardeais da inflamação (dor, calor, rubor, edema e perda da função). A maioria dos fármacos anti-inflamatórios estudados bloqueia ou antagonizam as principais vias do mediador pró-inflamatório que são desencadeadas no início de uma resposta inflamatória aguda. Entretanto, recentemente foi reconhecido que as estratégias baseadas em pró-resolução têm potencial para o tratamento de várias condições inflamatórias. A resolução da inflamação é um processo que envolve mediadores bioquímicos e vias de sinalização que controlam o fim da resposta inflamatória, culminando na diminuição do recrutamento de leucócitos, conseqüentemente são gerados mediadores pró-resolutórios e as cascatas de sinalização que sintetizam citocinas pró-inflamatórias são inibidas, além disso, são recrutadas células apoptóticas, em seguida ocorre a depuração de fagócitos de células apoptóticas e por fim, as células

tornam seus fenótipos em células pró-resolutórias. Então, as estratégias baseadas em pró-resolução buscam aumentar ou promover os fatores essenciais para remover o estímulo iniciante, bem como atenuar a sinalização pró-inflamatória, seguida da depuração de leucócitos, visando assim acelerar a resolução do processo inflamatório (SERHAN *et al.*, 2007; ALESSANDRI *et al.*, 2013).

Atualmente existe um amplo espectro de fármacos anti-inflamatórios, que agem na fisiopatologia da inflamação, com o intuito de minimizar a injúria tecidual e promover conforto ao paciente. Os fármacos anti-inflamatórios podem ser divididos de acordo com a sua estrutura, incluindo moléculas com atividade biológica e pequenas moléculas. As maiores classes de drogas anti-inflamatórias são glicocorticoides e drogas anti-inflamatórias não-Esteroidais (AINEs). Os glicocorticoides agem inibindo funções específicas dos leucócitos, causando diminuição da liberação de fatores vasoativos e quimiotáticos; secreção de enzimas lipolíticas e proteolíticas; migração de leucócitos e fibrose e regulação dos genes de citocinas pró-inflamatórias; inibem a expressão de genes da collagenase, elastase, ativador de plasminogênio, óxido nítrico sintase e ciclooxigenase tipo II. Enquanto os AINEs atuam inibindo a oxidação do ácido araquidônico e consequentemente ocorre a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), por meio desta enzima ocorre a síntese de prostaglandinas e tromboxanos, importantes mediadores inflamatório. (NUNES *et al.*, 2020; TLIBA *et al.*, 2008; BARNES, 2010).

Atualmente, a busca por novos fármacos anti-inflamatórios continua em destaque na indústria farmacêutica, com o intuito de diminuir os efeitos adversos causados por esta classe, como por exemplo, toxicidades gastritestinais, riscos cardiovasculares, lesões renais e hepatotoxicidade são observados com o uso prolongado destes medicamentos. Portanto, a busca pelo desenvolvimento de novos fármacos com baixa toxicidade e boa eficácia. Produtos naturais são uma grande fonte de compostos bioativos, a maioria dos medicamentos usados hoje é obtida de produtos naturais com modificações químicas. Neste contexto, o grupo de compostos de cinamatos, que ocorre naturalmente em plantas está associado com o tratamento de doenças inflamatórias, dispneia, desordens circulatórias e gastrites (CHAO *et al.*, 2008; ABDULKHALEQ *et al.*, 2018; HOŁEK *et al.*, 2019). O termo “cinâmico” deriva da espécie da canela, gênero *Cinnamomum* que pertence à família das *Lauraceae*. O gênero *Cinnamomum* abrange cerca de 250 espécies de plantas distribuídas em áreas tropicais e

subtropicais. Muitas espécies apresentam alto valor econômico. Entre as espécies mais conhecidas estão *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia* cuja casca, folhas e óleos essenciais são amplamente usados como especiarias e condimentos em comida. Além disso, a canela tem sido utilizada como estimulante, antissépticos, para distúrbios gastrointestinais e apresentam propriedades inseticidas. (GUZMAN *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2020). Os compostos cinâmicos e seus derivados como o ácido cinâmico são considerados um atrativo para a indústria farmacêutica, pois são compostos com potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória. Além disso, existem evidências de possível atividade antitumoral e cardiovascular (PONTIKI *et al.*, 2018).

O cinamaldeído é o óleo essencial em maior concentração em espécies da canela e apresenta atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. Os ácidos cinâmicos ocorrem também em grãos de café, chá, cacau, frutas cítricas, vegetais e cereais. Os ácidos cinâmicos frequentemente aparecem como conjugados de éster com ácido quínico, conhecido como ácidos clorogênicos, mas também podem formar ésteres com outros ácidos, açúcares ou lipídios, ou pode formar amidas com aminas aromáticas alifáticas. O composto químico ácido cinâmico pode ser visualizado na figura 3 (GUZMAN *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

Figura 3 *Cinnamomun cassia* e o composto natural mais abundante



Esquema da planta *Cinnamomun cassia* e ácido cinâmico, o composto mais abundante da planta. Fonte: elaborada pela autora.

Na química biológica, o ácido cinâmico é um precursor de flavonoides e um componente de lignina na estrutura da planta. Devido à sua ocorrência nas plantas e sua baixa toxicidade, o ácido cinâmico e seus derivados foram avaliados como compostos

ativos farmacologicamente. Eles mostram uma variedade notável de atividades e são frequentemente usados promissor para o desenvolvimento de novos compostos eficazes (SOVA, 2012).

A presença de um grupo de ácido acrílico substituído no anel fenil dá para a molécula uma configuração *cis* ou *trans*. A configuração *trans* é a mais comum de ocorrer. Diversos estudos têm relatado que compostos de ácido cinâmicos apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumoral, neuroprotetoras, possuem propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas. Também é usado como ingrediente de perfume, produtos de higiene, aromatizantes, cosméticos e detergentes. O ácido cinâmico termina as reações em cadeia de radicais doando elétrons que reagem com radicais formando produtos estáveis. Pode ser preparado por desaminação enzimática de fenilalanina. Além dos derivados do ácido cinâmico que ocorrem naturalmente nas plantas, a presença de um anel benzeno e o grupo de ácido acrílico torna possível modificá-lo resultando em ácido cinâmico sintético (RUWIZHI *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o perfil anti-inflamatório de dienos inéditos (derivados de cinamatos), em experimentos *in vitro*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

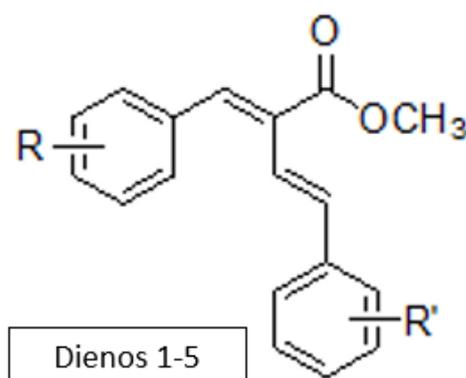
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7;
- Investigar a ação dos compostos não citotóxicos sobre a produção de Óxido Nítrico (NOx);
- Avaliar e quantificar a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IL-6, nas células tratadas com o (s) composto (s) selecionado (s);
- Avaliar e quantificar a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-13, IL-4 e IL-10, nas células tratadas com o (s) composto (s) selecionado (s);
- Avaliar a capacidade fagocítica de células RAW 264.7 estimulados com LPS e tratadas com o (s) composto (s) selecionado (s);
- Avaliar a expressão proteica do TLR-4 (CD284) e do receptor de manose (CD206) nos macrófagos estimulados por LPS tratadas com o (s) composto (s) selecionado (s);

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os compostos Dienos derivados de cinamatos utilizados neste trabalho, são compostos inéditos, foram sintetizados e fornecidos em parceria com o Professor Dr. Marcus César Mandolesi Sá e a sua aluna de doutorado Lidiane Meier, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Os Dienos (**Figura 4**) foram prontamente sintetizados a partir de sais de aldeídos de fosfônio alélico por meio da reação de Wittig sob condições alcalinas moderadas, conforme relatado anteriormente por Sá e colaboradores (Sá e Meier 2013; Oliveira et al. 2019). Eles foram purificados por cristalização simples com 2-propanol ou alternativamente, por cromatografia em coluna sobre gel de sílica para dar produtos únicos como sólidos cristalinos estáveis com ponto de fusão homogêneo. Os sais foram dissolvidos em uma solução de Dimetilsulfóxido 1% (DMSO) para uma concentração de 1 mg/mL como uma solução de estoque. Estas soluções foram aliqüotadas e armazenadas em freezer -20 °C até o momento dos experimentos, quando foram dissolvidas em meio de cultura para os experimentos *in vitro*.

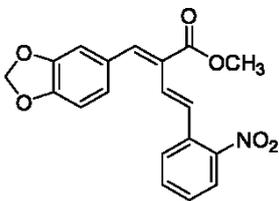
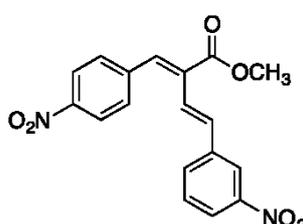
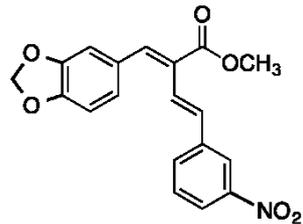
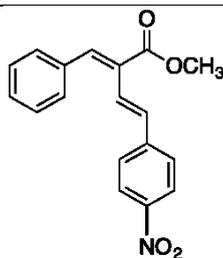
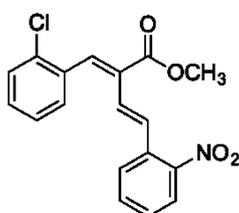
Figura 4 Estrutura química básica dos Dienos



Estrutura química básica de todos dieno utilizados, com a representação dos locais de modificação estrutural. Fonte: Sá e Meier 2013.

Para o desenvolvimento desta dissertação, foram entregues (05) cinco compostos, com características e estrutura química (**Tabela 1**).

Tabela 1 Dienos com estrutura, dados químicos e quantidade sintetizada

Composto	Estrutura	Dados
(1E,3E) -2-metoxicarbonil-1-(3,4-metilenodioxifenil) -4-(2-nitrofenil)1,3-butadieno (DIENO 1)		$C_{19}H_{15}NO_6$ PM:353,33 g/mol Solubilidade: CH_2Cl_2 e DMSO
(1E, 3E) -2-metoxicarbonil-1-(4-nitrofenil) -4-(3-nitrofenil) -1,3-butadieno (DIENO 2)		$C_{18}H_{14}N_2O_6$ PM:354,32 g/mol Solubilidade: CH_2Cl_2 e DMSO
(1E, 3E) -2-metoxicarbonil-1-(3,4-metilenodioxifenil) -4-(3-nitrofenil) -1,3-butadieno (DIENO 3)		$C_{19}H_{15}NO_6$ PM:353,33 g/mol Solubilidade: CH_2Cl_2 e DMSO
(1E, 3E) -2-metoxicarbonil-4-(4-nitrofenil) -1-fenil-1,3-butadieno (DIENO 4)		$C_{18}H_{15}NO_4$ PM:309,32 g/mol Solubilidade: CH_2Cl_2 e DMSO
(1E, 3E) -1-(2-clorofenil) -2-metoxicarbonil-4-(2-nitrofenil) -1,3-butadieno (DIENO 5)		$C_{18}H_{14}ClNO_4$ PM:343,76 g/mol Solubilidade: CH_2Cl_2 e DMSO

PM: Peso Molecular; DMSO: Dimeltisufóxido.

Fonte: O autor.

3.1 CULTURA CELULAR

As células utilizadas para os experimentos foram células da linhagem de origem de macrófagos de murinos RAW 264.7, mantidas em soro fetal bovino e 10 % de DMSO a -80 °C, até o momento de sua utilização. As células foram reconstituídas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com soro fetal bovino 10 % e 1 % de penicilina/estreptomicina, as células foram mantidas em garrafas de 75 cm² de área a 37 °C em atmosfera umidificada em estufa de CO₂. A cada 2 dias, o processo de passagem era aplicado nas células e o meio de cultura trocado. Antes dos experimentos, o ensaio de exclusão com azul de Tripán foi conduzido para verificar a viabilidade celular. Os experimentos foram conduzidos entre a quinta e a décima quinta passagem desta linhagem.

3.2 VIABILIDADE CELULAR

Com o intuito de selecionar os compostos que apresentam maior segurança em relação a sua toxicidade, foi feito o teste de viabilidade celular. Os compostos que apresentaram concentração citotóxica (CC₁₀) abaixo de 50 µM foram descartados. Inicialmente as células RAW 264.7 foram plaqueadas e cultivadas em meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino 10% e 1 % de penicilina/estreptomicina. Após apresentarem confluência adequada de mais de 80 %, as células foram transferidas para placas de 96 poços em que cada poço continha uma concentração de 5 x 10⁴ células. As células foram incubadas com e sem os cinco compostos de Dienes inéditos, nas seguintes concentrações: 0,3; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 µM. A viabilidade das células na presença dos compostos foi avaliada utilizando o ensaio de (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) MTT colorimétrico. Após 16 horas de incubação, o sobrenadante das células foi descartado, e a solução de MTT foi adicionada em cada poço, em seguida, a placa foi incubada por mais 3 horas a 37 °C. Após esta incubação, o sobrenadante foi novamente descartado, e foi adicionado DMSO

para dissolver o corante de formazan. O resultado obtido foi revelado por leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm.

3.3 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO CELULAR

Para induzir os macrófagos RAW 264.7 a uma condição inflamatória, as células foram inicialmente cultivadas em garrafas de 75 cm² até atingirem a confluência adequada, em seguida foram transferidas para placas de 96 poços a concentração de 5 x 10⁴ células/poço. Após isso, as células foram divididas em 4 grupos (n=4): grupo controle branco (B) células não inflamadas que receberam apenas DMSO; grupo de tratamento experimental, células tratadas com os Dienos inéditos que tiveram concentrações definidas e não citotóxicas (CC₁₀); grupo controle negativo (LPS), células tratadas apenas com LPS; grupo controle positivo (DEX), células tratadas com Dexametasona (10 µM). Inicialmente, o grupo tratamento, que receberia os compostos de cinamatos e o grupo positivo, que receberia Dexametasona (10 µM) foram incubados com LPS. Após uma hora de incubação, as células foram tratadas com LPS 1 µg/mL. Em seguida, a placa foi incubada por 24 horas. O sobrenadante foi coletado para investigação da produção de nitrito/nitrato (NO_x) e citocinas.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO_x)

A produção de Óxido Nítrico foi determinada indiretamente pela formação de seus metabólitos nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻). Para tal, foi utilizado a reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Em resumo, as células foram pré-tratadas com diferentes concentrações dos Dienos inéditos durante 1 hora e estimulada com LPS durante 24 horas. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado e foi adicionado 100 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico 5% e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1%), seguido de 15 minutos de incubação. Nesta reação o cloreto de vanádio converte o NO₃⁻ em NO₂⁻ e com a adição do reagente de Griess se produz coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. Curvas-padrão com concentrações

previamente conhecidas de NO_2^- (0 - 150 μM) também tiveram suas densidades óticas determinada, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato no sobrenadante das células. A produção de nitrito foi determinada e os resultados expressos em μM .

3.5 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Para a análise das concentrações das citocinas IL-1 β , IL-4 e IL-13, inicialmente, foram coletados o sobrenadante das células tratadas com o composto de Dieno que apresentou a melhor atividade anti-inflamatória na determinação da concentração de NO_x , em seguida as células foram incubadas com LPS por 24 horas como descrito anteriormente. Para estas análises foi utilizado o método de ELISA, cujos kits comerciais disponíveis utilizavam anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. As concentrações das citocinas foram mensuradas utilizando-se a técnica tipo sanduíche, realizados de acordo com as instruções de cada fabricante (IL-1 β , sigma; IL-4 e IL-13, Peprotech, USA). Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina IL-1 β (0,8 – 1000 pg/mL), IL-4 (0-1000 pg/mL) e IL-13 (0-1000 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As leituras de todas as citocinas e suas respectivas curvas-padrão foram estimadas por meio da medida colorimétrica em 450 nm, realizada em leitor de ELISA. Os valores foram expressos em pg/mL.

Para análise das concentrações das citocinas (TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-10 e IL-6), foi coletado o sobrenadante das células após serem tratadas com o Dieno e incubadas por 24 horas com LPS como descrito anteriormente. Neste protocolo, as concentrações de citocinas foram mensuradas utilizando o kit comercial para citometria de fluxo CBA (CBA – cytometric beads array) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina TNF (0 – 5000 pg/mL), IFN- γ (0 – 5000 pg/mL), MCP-1 (0 – 5000 pg/mL) e IL-6 (0 – 5000 pg/mL) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo desta forma a quantificação dos valores desconhecidos com o auxílio da equação da reta. As dosagens foram realizadas em citômetro de fluxo FACSVerse (BD FACSCSVerseTM, 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.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Para o teste de fagocitose com vermelho neutro (LIU *et al.*, 2017), placas com 96 poços foram utilizadas em concentração de células 1×10^4 células/poço e incubadas por 24 horas confluência celular adequada. Posteriormente, os macrófagos foram pré-tratados com a melhor dose escolhida do dieno **1** e após 30 minutos, todos os grupos (exceto branco) foram estimulados com LPS (1µg/mL) por um período de 24 horas em estufa (5% CO₂ e temperatura 37°C), foram adicionados 100 µL/poço de solução corante de vermelho neutro (0,075%) e a placa incubada por mais uma hora (37°C). As células foram lavadas com solução PBS. Em seguida, foi adicionado 100µL/poço de tampão de lise celular (1% ácido acético glacial: etanol; 1:1) e foram incubadas por mais 1 hora (temperatura ambiente). A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de ELISA a 540 nm. Os resultados foram expressos como a alteração relativa do composto em comparação com o grupo branco, que representou o nível basal da fagocitose.

3.7 AVALIAÇÃO NO EFEITO DA EXPRESSÃO DE TLR-4 (CD-284) E RECEPTORES DE MANOSE (CD-206)

Para avaliar a expressão do receptor Toll (TLR-4) e o receptor de manose, foi utilizada a técnica em citometria de fluxo, (Citômetro de Fluxo BD FACSVerse™) utilizando-se anticorpo anti-CD284/MD2 de camundongo conjugado com fluoróforo PE (Ficoeritrina), para o TLR-4 e anticorpo anti-CD206 de rato conjugado a FITC (Isotiocianato de Fluresceína) para o receptor de manose (BD Bioscience, São José, CA, EUA). Estas determinações foram realizadas com as células após o tratamento com o dieno **1** e posterior indução com LPS, e as incubações realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram quantificados em porcentagens de

expressão do receptor por meio do software da Becton Dickinson (FACSuite, BD Bioscience, São José, CA, EUA).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

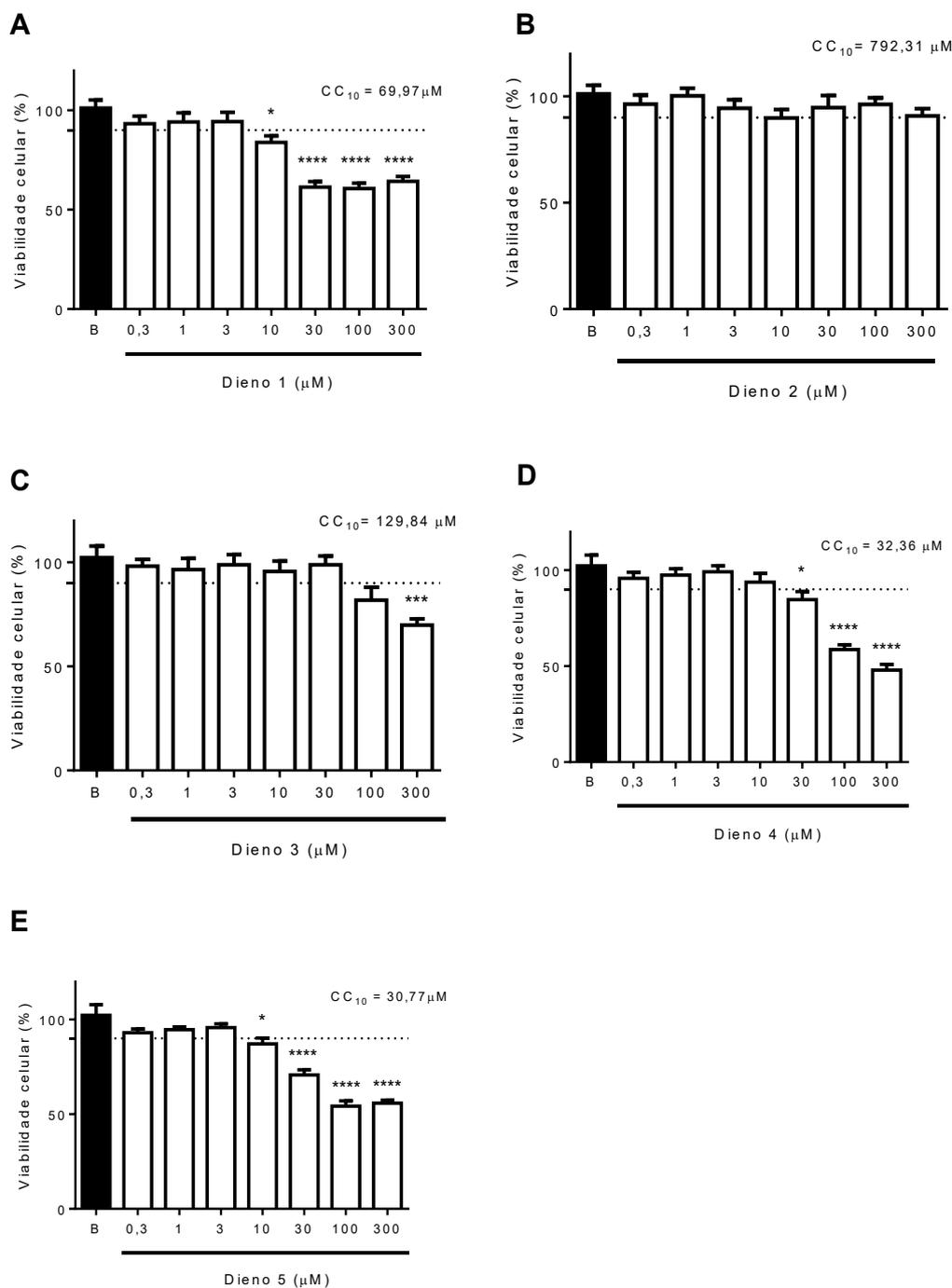
Para as análises dos dados os softwares Excel 2013 e GraphPad Prism 6.0 foram utilizados. Resultados experimentais foram expressos em média \pm erro padrão da média. Utilizou-se ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Tukey. Resultados com valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 TRIAGEM DOS COMPOSTOS DE DIENOS DERIVADOS DE CINAMATOS INÉDITOS

Inicialmente buscou-se avaliar a citotoxicidade dos compostos em macrófagos RAW 264.7. Para isso, os macrófagos foram incubados com os cinco compostos de Dienos em concentrações crescentes (0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μ M) e foi avaliada a viabilidade das células após período de incubação. Os compostos que em uma concentração menor ou igual a 50 μ M matassem de alguma forma 10% (CC_{10}) das células seriam excluídos dos demais experimentos.

Figura 5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos Dienos em macrófagos RAW 264.7.



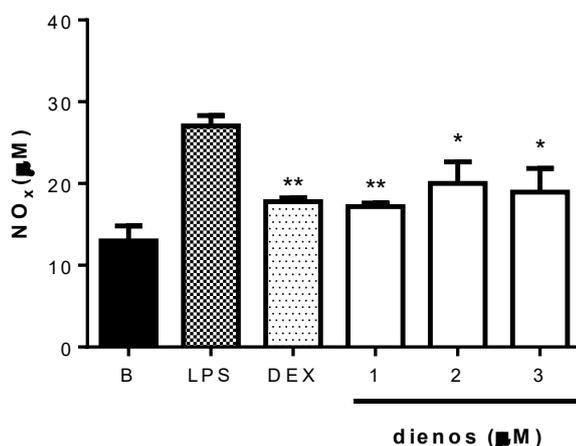
Efeito da citotoxicidade dos dienos em macrófagos RAW 264.7. dieno 1 (A); dieno 2 (B); dieno 3 (C); dieno 4 (D) e dieno 5 (E); B: células tratadas com 1% de dimetilsulfóxido estéril (DMSO); CC_{10} : concentração de composto que foi capaz de matar 10% das células.

Células tratadas nas concentrações 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μM . Os valores foram expressos como média \pm DP em quintuplicata. * $P < 0,1$, *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$.

Desta forma, foi possível verificar que os compostos dienos **4** e **5** mataram 10% das células nas concentrações de 32,66 μM e 30,77 μM , respectivamente (**Figura 5 D e E**). Enquanto os compostos dienos **1** (CC_{10} : 69,97 μM), **2** (CC_{10} : 792,31 μM) e **3** (CC_{10} : 129,84 μM) (**Figura 5 A, B e C**) necessitaram de concentrações mais elevadas para matarem 10% ou mais das células. O teste de citotoxicidade celular serve como triagem inicial de compostos. Por esta razão, os dienos **4** e **5** foram excluídos dos demais experimentos.

O experimento seguinte avaliou o potencial anti-inflamatório dos dienos **1**, **2** e **3** nas concentrações de CC_{10} pré-determinadas. Para isso cada composto foi adicionado aos macrófagos Raw 264.7 e 30 min após estimulados com LPS, e foi analisado a quantidade de metabólitos de óxido nítrico (NO_x) produzidos pelas células, em comparação ao grupo controle inflamado (**Figura 6**).

Figura 6 Efeitos dos dienos sobre os níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS

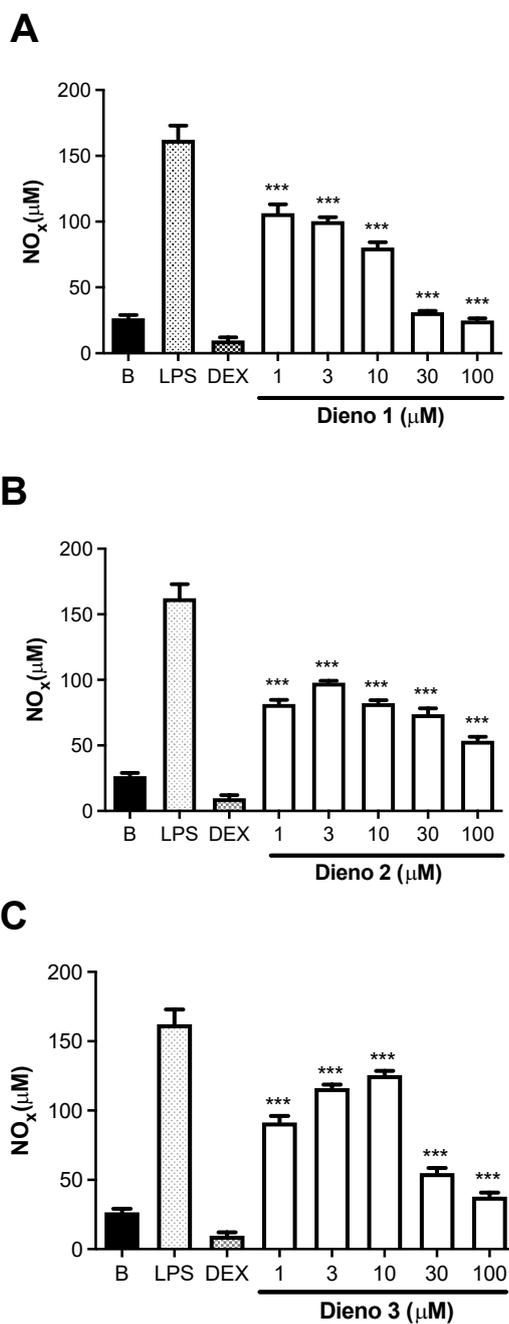


Efeito dos dienos nas concentrações da CC_{10} em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. B: células sem nenhum tratamento; LPS: células tratadas apenas com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10 μM); **dieno 1**: células pré-tratadas na concentração da CC_{10} pré-determinada (70 μM); **dieno 2**: células pré-tratadas na concentração da CC_{10} pré-determinada (793 μM); **dieno 3**: células pré-tratadas na concentração da CC_{10} pré-determinada (130 μM). Os resultados foram expressos em média \pm EPM; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs grupo LPS.

Desta forma, é possível verificar que todos os compostos reduziram de maneira significativa a produção de NOx pelas células em relação ao grupo controle LPS (% de inibição da produção de NOx: dieno 1: $63,6 \pm 2,6 \mu\text{M}$; dieno 2: $74 \pm 9,8 \mu\text{M}$; dieno 3: $70,1 \pm 10,8 \mu\text{M}$) ($P < 0,05$) (**Figura 6**). O grupo controle dexametasona também apresentou diferença estatística em relação ao grupo LPS ($P < 0,001$) (**Figura 6**).

Como todos os compostos selecionados reduziram a produção de NOx na concentração da CC_{10} pré-determinada, o próximo experimento, buscou avaliar o composto com a melhor atividade anti-inflamatória e qual seria a melhor/menor concentração de composto necessário. Para isso, foi realizada uma curva dose-resposta em que as células foram tratadas com as concentrações de 1, 3, 10 30 e 100 μM dos 3 compostos, e em seguida dosada a quantidade de metabólitos de NOx produzida e liberada por macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

Figura 7 Efeitos dos dienos 1, 2 e 3 sobre os níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.



Efeito dos compostos dienos 1, 2 e 3 uma hora antes do estímulo dos macrófagos RAW 264.7 com LPS (1 µg/mL) sobre a secreção dos metabólitos do NOx. B: células sem nenhum tratamento; LPS: células tratadas apenas com LPS (1 µg/ml); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10 µM). **dieno 1** nas concentrações 1, 3, 10, 30 e 100 µM (A), **dieno 2** nas concentrações 1, 3, 10, 30 e 100 µM (B), **dieno 3** nas concentrações 1, 3, 10, 30 e 100 µM (C); resultados foram expressos em média ± EPM; *** P < 0,001 vs grupo LPS.

Todos os compostos foram capazes de reduzir a produção de NO_x de maneira significativa em todas as concentrações testadas, em relação ao grupo controle LPS (% de inibição: dieno **1**: concentração 1 μM: 47,5 ± 8,1; concentração 3 μM: 50,5 ± 3,6; concentração 10 μM: 70,3 ± 4,2; concentração 30 μM: 84,6 ± 4,2; concentração 100 μM: 90,8 ± 1,4) (**Figura 7A**) (P<0,001), (% de inibição: dieno **2**: concentração 1 μM: 49,7 ± 3,8; concentração 3 μM: 39,6 ± 1,6; concentração 10 μM: 49,4 ± 2,6; concentração 30 μM: 54,5 ± 4,8; concentração 100 μM: 67 ± 3,8) (**Figura 7B**) (P<0,001), (% de inibição: dieno **3**: concentração 1 μM: 43,7 ± 5,6; concentração 3 μM: 28,3 ± 3; concentração 10 μM: 22,6 ± 3,6; concentração 30 μM: 66,1 ± 3,9; concentração 100 μM: 76,7 ± 1,8) (**Figura 7C**) (P<0,001).

Visto que os três compostos dienos apresentaram atividade significativa na redução da produção dos metabólitos do NO_x em todas as concentrações testadas, foi necessário avaliar qual dos compostos foi o mais efetivo em reduzir a produção de NO_x. Com este fim, foi determinado a (CI₅₀) concentração inibitória 50%, o que possibilitou determinarmos qual dos compostos era o mais potente neste quesito. Para isso, definimos que compostos que apresentassem CI₅₀ maior que 50 μM seriam descartados dos demais experimentos, por apresentar baixa potência em inibir este mediador inflamatório (**Tabela 2**).

Tabela 2 Efeito inibitório dos dienos **1**, **2** e **3** estimulados com LPS na produção de NO em células RAW 264.7 (CI₅₀, μM).

Dienos	CI ₅₀
1	14,72 ± 0,1 μM
2	>50 μM
3	>50 μM
Dexametasona	0,6 ± 1,8 μM

Dexametasona foi usada como controle positivo. O teste foi feito em quadruplicata (média ± EPM). CI₅₀: inibição de 50% da concentração de NO_x em relação grupo LPS.

O único compostos capaz de inibir 50% da produção de NO_x em uma concentração inferior a 50 μM foi o dieno **1** (CI₅₀: 14,7 ± 0,1), enquanto que o dieno **2** inibiu em 50% a produção de NO_x na concentração de 133,6 μM e o dieno **3** inibiu a

50% da produção de NO_x na concentração de 95,7 μM . Desta forma, os compostos **2** e **3** foram excluídos dos demais experimentos a seguir (**Tabela 2**).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO DIENO **1** EM RELAÇÃO A PRODUÇÃO DE CITOCINAS IL-1B, TNF, INF- γ , MCP-1, IL-6

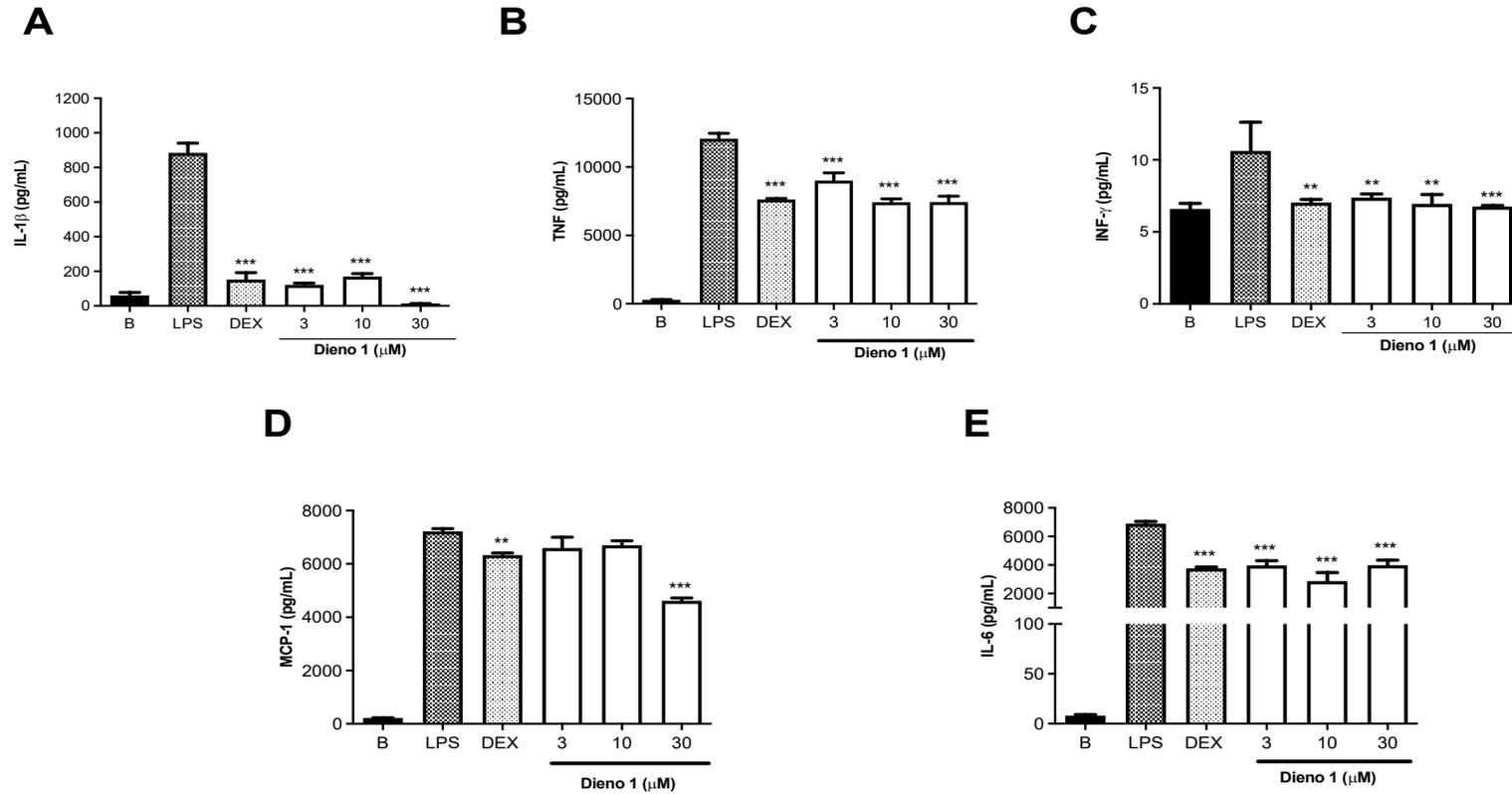
Os próximos experimentos conduzidos buscaram comprovar a atividade anti-inflamatória do dieno **1**. Para este fim, avaliou-se o potencial do composto em inibir ou estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Os macrófagos RAW 264.7 foram estimuladas com LPS e em seguida incubadas com o dieno **1** para avaliar a produção de substâncias pró e anti-inflamatórias. Após incubação de 24 horas o sobrenadante foi coletado e mensurado a produção das citocinas. Inicialmente, foi avaliada a capacidade do composto em inibir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1, IL-6.

O dieno **1** foi capaz de inibir a secreção de IL-1 β em todas as doses testadas (3, 10 e 30 μM), comparado com o grupo controle LPS (% de inibição: 3 μM : 85,1 \pm 1,1; 10 μM : 80,8 \pm 1,9 e 30 μM : 98,7 \pm 0,3) ($P < 0,0001$) (**Figura 8A**). Da mesma forma, o composto reduziu de maneira significativamente a secreção de TNF em todas as doses testadas em comparação com o grupo controle LPS (% de inibição: 3 μM : 25,4 \pm 2,4; 10 μM : 38,2 \pm 0,8 e 30 μM : 38,2 \pm 2,0) ($P < 0,0001$) (**Figura 8B**). Em relação a citocina INF- γ , o dieno **1** foi capaz de reduzir a secreção em todas as doses testadas (% de inibição: 3 μM : 30,4 \pm 2,3; 10 μM : 34,4 \pm 3,0 e 30 μM : 36,4 \pm 0,3) de maneira significativa em relação ao grupo controle LPS ($P < 0,01$) (**Figura 8C**). Em relação a produção da quimiocinas MCP-1 o dieno **1** reduziu a produção e secreção desta quimiocina de maneira significativa apenas na concentração de 30 μM (% de inibição 30 μM : 36,1 \pm 1,0) ($P < 0,0001$) em relação ao grupo controle LPS (**Figura 8D**). Finalmente, o dieno **1** foi testado para sua atividade inibitória sobre a secreção da citocina IL-6. O dieno **1** inibiu a secreção desta citocina em todas as concentrações testadas (3, 10 e 30 μM) em relação ao grupo controle LPS (% de inibição: 3 μM : 42,4 \pm 8,3; 10 μM : 62,8 \pm 0,7 e 30 μM : 42,3 \pm 5,1) ($P < 0,05$) (**Figura 8E**).

Como esperado, o grupo controle positivo dexametasona inibiu de forma significativa a secreção das citocinas IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1, IL-6 testadas, quando utilizada na concentração de 10 μ M ($P < 0,01$) (**Figura 8A, B, C, D e E**).

Figura 8 Efeito do dieno 1 sobre a secreção das citocinas IL-1 β , TNF, INF- γ , MCP-1 e IL-6 em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.



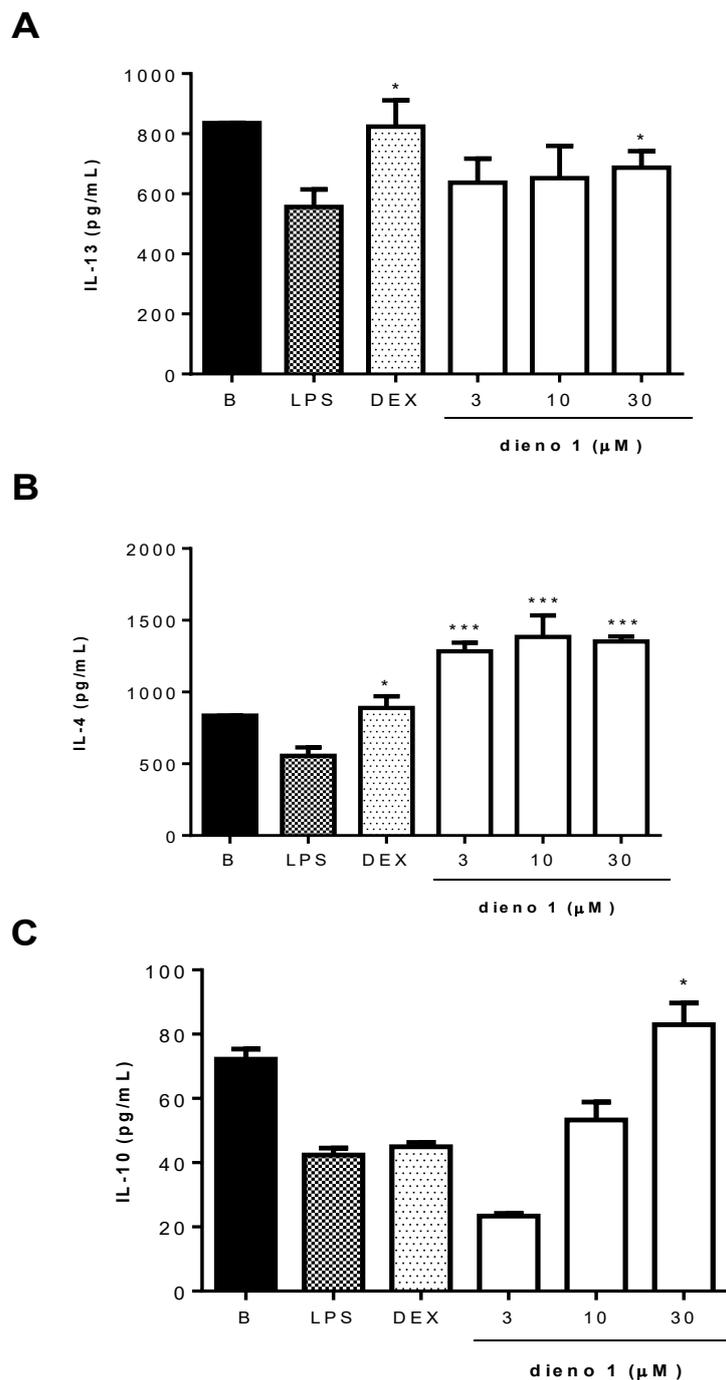
Efeito do dieno 1 administrado 1 hora antes do estímulo dos macrófagos RAW 264.7 com LPS (1 μ g/mL) sobre a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (A); TNF (B); IFN- γ (C); MCP-1 (D); IL-6 (E). **B**: células sem nenhum tratamento; LPS: células tratadas apenas com LPS (1 μ g/mL); **DEX**: células pré-tratadas com dexametasona (10 μ M); **dieno 1**: células pré-tratadas com composto nas concentrações de 3, 10, 30 μ M; resultados foram expressos em média \pm EPM; ** P < 0,01, *** P < 0,001 vs grupo LPS

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO DIENO 1 EM RELAÇÃO À PRODUÇÃO DE CITOCINAS IMUNOMODULADORAS IL-13, IL-4 E IL-10

Os resultados demonstram que o composto dieno 1 foi capaz de estimular a secreção de citocinas imunomoduladoras em células RAW 264.7 estimuladas com LPS como mostra a **Figura 9**. Na citocina IL-13 essa estimulação foi observada na dose de 30 μ M quando comparado com o grupo controle LPS (% de estimulação: 30 μ M: $23,5 \pm 9,9$) ($P < 0,05$) (**Figura 9A**). Em relação a citocina IL-4, dieno 1 estimulou a produção em todas as doses testadas (% de estimulação: 3 μ M: $131,0 \pm 10,8$; 10 μ M: $149,0 \pm 26,8$ and 30 μ M: $137,8 \pm 7,1$) ($P < 0,01$) (**Figura 9B**). Em relação a citocina IL-10, Dieno 1 estimulou a produção na concentração de 30 μ M (% de estimulação: $95,5 \pm 16,0$) ($P < 0,0001$) (**Figura 9C**).

O controle positivo, dexametasona na concentração de 10 μ M também estimulou a produção das citocinas IL-13 e IL-4 quando comparado com o grupo controle LPS ($P < 0,05$) (**Figuras 9A e B**), entretanto, em relação a citocina IL-10, não houve diferença estatística em relação ao grupo LPS ($P > 0,05$) (**Figura 9C**).

Figura 9 Efeito do dieno **1** sobre a secreção das citocinas imunomoduladoras IL-13, IL-4 e IL-10.

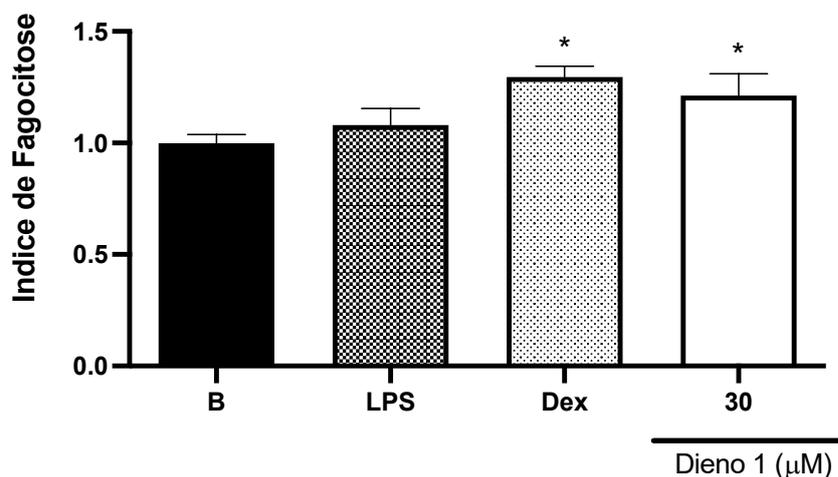


Efeito do composto dieno **1** administrado 1 hora antes do estímulo dos macrófagos RAW 264.7 com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a estimulação da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-13 (A), IL-4 (B) e IL-10 (C). **B**: células sem nenhum tratamento; LPS: células tratadas apenas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10 μM); dieno **1**: células pré-tratadas com composto nas concentrações de 3, 10, 30 μM ; resultados foram expressos em média \pm EPM; ns: sem diferença estatística; * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, vs grupo LPS.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Em relação à atividade fagocítica os macrófagos RAW 264.7 foram incubadas com 30 μM do dieno 1 e após 1 hora foram estimulados com LPS. Após 24 horas de incubação foi avaliada a atividade fagocítica (**Figura 10**). O dieno 1 foi capaz de aumentar a atividade fagocítica em relação ao grupo LPS de maneira significativa (% de estimulação 30 μM : $37,0 \pm 4,9$) ($P < 0,01$). O grupo controle positivo dexametasona apresentou perfil similar ao dieno 1 ($P < 0,001$) (**Figura 10**).

Figura 10 Efeito do dieno 1 sobre a atividade fagocítica de macrófagos estimulados com LPS.



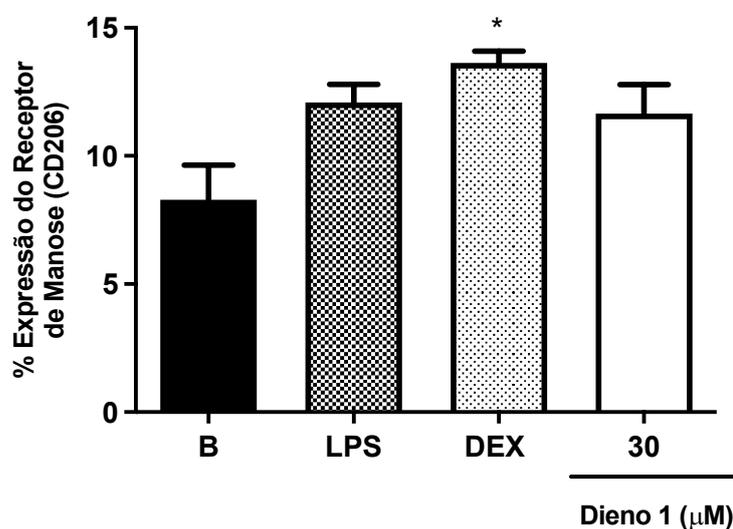
Efeito da atividade fagocítica em RAW 264.7 pré-tratadas com composto dieno 1 e estimuladas com LPS. **B**: células sem nenhum tratamento; **LPS**: células tratadas apenas com **LPS** (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$); **DEX**: células pré-tratadas com dexametasona (10 μM); **dieno 1**: células pré-tratadas com composto na concentração de 30 μM ; resultados foram expressos em média \pm EPM; * $P < 0,05$ vs grupo LPS.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MANOSE (CD206) E TLR4 (CD284) EM CÉLULAS RAW 264.7 TRATADAS COM DIENO 1 E ESTIMULADAS COM LPS

Para a avaliação da expressão dos receptores de manose e TLR4 as células foram incubadas com dieno **1** na concentração de 30 μM , como descrito anteriormente e, após 24 horas de incubação com LPS foi avaliada a expressão dos receptores

O dieno **1** na concentração de 30 μM não modificou de forma significativa a expressão do receptor de manose, em relação ao grupo controle LPS ($P > 0,05$). O grupo controle dexametasona apresentou diferença na expressão do receptor em relação ao grupo LPS ($P > 0,05$).

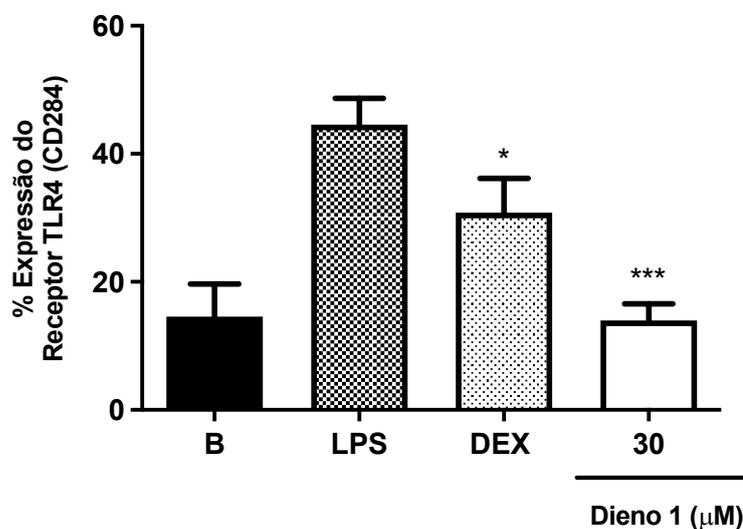
Figura 11 Efeito do composto dieno **1** sobre a expressão de receptores de manose (CD206) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS



Efeito do dieno **1** sobre a expressão de receptores de manose (CD206) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. **B**: células sem nenhum tratamento; **LPS**: células tratadas apenas com **LPS** (1 $\mu\text{g/mL}$); **DEX**: células pré-tratadas com dexametasona (10 μM); **dieno 1**: células pré-tratadas com composto na concentração de 30 μM ; os resultados foram expressos em média \pm EPM; * $P < 0,05$ vs grupo LPS.

Em relação à expressão de TLR4, o dieno **1** foi capaz de inibir a expressão deste receptor de maneira significativa, em relação ao grupo controle LPS (% de expressão: 30 μM : $68,7 \pm 3,4$) ($P < 0,01$) (**Figura 12**). O grupo controle dexametasona também apresentou o mesmo comportamento em relação ao grupo controle LPS ($P < 0,001$).

Figura 12 Efeito do composto dieno 1 sobre a expressão de TLR4 (CD284) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS



Efeito do composto dieno 1 sobre a expressão do TLR4 (CD284) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. **B**: células sem nenhum tratamento; **LPS**: células tratadas apenas com **LPS** (1 µg/mL); **DEX**: células pré-tratadas com dexametasona (10 µM); **dieno 1**: células pré-tratadas com composto na concentração de 30 µM; os resultados foram expressos em média ± EPM; * P < 0,05, *** P < 0,001 vs grupo LPS.

5 DISCUSSÃO

A inflamação é um processo que envolve diferentes fases, células e mediadores inflamatórios, com o intuito de eliminar patógenos ou agentes nocivos do organismo para manter a homeostase. Este complexo processo fisiológico é regulado por diversas vias de sinalização e ativação de células. Entretanto, o descontrole desse processo e a não-resolução da inflamação pode levar ao dano tecidual, dando origem a doenças inflamatórias e autoimunes, desordens metabólicas e outras patologias com eventual perda de função (DAI *et al.*, 2018; SUGIMOTO *et al.*, 2016). Neste contexto, os macrófagos são células importantes envolvidas no início e na resolução do processo inflamatório. Estas células são as primeiras a detectar injúria tecidual e outros tipos de condições nocivas, desencadeando resposta imune por meio da produção de mediadores pró-inflamatórios. Durante o processo inflamatório, os macrófagos apresentam basicamente três funções: fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas (GERMIC *et al.*, 2019). Os macrófagos são células heterogêneas e seu fenótipo e

funções são reguladas pelos estímulos recebidos no microambiente em que estão. Estas células podem se diferenciar em macrófagos classicamente ativos ou macrófagos M1, que são células com perfil pró-inflamatório e podem ser polarizadas por LPS ou em associação com células Th1 e citocinas como IFN- γ . Os macrófagos M1 podem produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF. Além disso, os macrófagos podem se diferenciar em macrófagos ativados alternativamente, ou macrófagos M2, que são células com perfil anti-inflamatório e imuno-reguladoras e podem ser polarizados por células Th2 e citocinas, como IL-4 e IL-13. Os macrófagos M2 podem produzir citocinas como IL-10 e TGF- β envolvidos com a resolução da inflamação (FUNES *et al.*, 2018; SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018).

Modular e conduzir a resposta inflamatória são grandes desafios atualmente para a medicina e a indústria farmacêutica. As grandes classes de medicamentos anti-inflamatórios disponíveis hoje no mercado são fármacos que apresentam diversos efeitos adversos, como sangramentos gastrintestinais. Neste contexto, a busca por compostos bioativos e compostos análogos sintéticos têm se tornado um atrativo para o desenvolvimento de novas drogas com potencial anti-inflamatório, a fim de minimizar os efeitos adversos (HOLEK *et al.*, 2019). Neste contexto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar se os compostos de cinamatos inéditos sintetizados pelo laboratório MESOlab do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina possuem alguma atividade anti-inflamatória, a exemplo de outros compostos de cinamatos que já apresentam atividade anti-inflamatória (LIAO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2014). Com este objetivo, utilizou-se como triagem um modelo inflamatório com macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS. A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi isolada em 1978, sendo estabelecida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson em camundongos da espécie BALB/c. Esta linhagem tem sido utilizada frequentemente para avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos tanto naturais como sintéticos, devido a sua boa reprodutibilidade e aplicação neste tipo de modelo (TACIAK *et al.*, 2018).

Em estudos onde o objetivo é verificar a possível atividade anti-inflamatória de algum composto ou extrato, é imperativo a triagem da citotoxicidade nas células onde se quer verificar o efeito. Desta forma, é possível verificar se os compostos em estudos irão causar dano e/ou morte celular. Inicialmente, avaliou-se a citotoxicidade dos dienos derivados de cinamatos inéditos. Os cinco compostos foram testados nas concentrações

de 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μM em macrófagos RAW 264.7. Os compostos que apresentaram capacidade de alterar a viabilidade ou matar 10% ou mais de células em uma concentração igual ou maior que 50 μM (CC_{10}) foram descartados dos experimentos. Os dienos **4** e **5** apresentaram CC_{10} de 32,36 μM e 30,77 μM , respectivamente, sendo considerados compostos citotóxicos, por esta razão, estes compostos foram excluídos dos demais experimentos. Os dienos **1**, **2** e **3** apresentaram CC_{10} maior que 50 μM , sendo considerados compostos não-citotóxicos. Os resultados encontrados sobre a citotoxicidade dos compostos corroboram com os achados de Pannee *et al.* (2014) em que foram avaliadas a citotoxicidade de óleos essenciais derivados de cinamaldeídos em células de macrófagos J774 em que os compostos não alteraram a viabilidade das células (PANNEE *et al.*, 2014). No estudo realizado por Fakurazi *et al.* (2015) foi avaliado a citotoxicidade de compostos dienos derivados do ácido cinâmico em células RAW 264.7, de acordo com os resultados apresentados os compostos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (0,3125 – 40 μM) (FAKURAZI *et al.*, 2015). Após determinar a citotoxicidade dos compostos dienos, o experimento seguinte investigou a atividade anti-inflamatória dos dienos em relação a atividade do NO.

O NO é uma pequena molécula bioativa distribuída em várias espécies, incluindo mamíferos, invertebrados, em organismos eucarióticos e plantas. Nos mamíferos o NO se difunde por entre as membranas das células para exercer suas funções. O NO é produzido a partir do metabolismo da L-arginina e a atividade da enzima NO sintase (NOS). A NO indutível (iNOS) é uma isoforma da enzima NOS e só é induzida ou estimulada na presença de citocinas pró-inflamatórias ou LPS (SONAR *et al.*, 2019; CINELLI *et al.*, 2019). Na indução, a iNOS gera quantidades significativas de NO, que dura até que a enzima seja degradada, às vezes por horas. A quantidade considerável de NO produzida, ajuda na defesa contra patógenos invasores e, portanto, é crítica para a resposta inflamatória e o sistema imunológico inato. Entretanto a produção excessiva de NO é relatada em várias condições inflamatórias. Em muitos estudos a comprovação da atividade anti-inflamatória inicia-se na avaliação da capacidade de compostos naturais ou sintéticos em inibir a produção deste mediador inflamatório (CINELLI *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2018).

Neste contexto, foi avaliada a produção dos metabólitos do NO em células RAW 264.7 tratadas com os compostos de dienos, que não apresentaram citotoxicidade nas

células (dienos **1**, **2** e **3**) e estimuladas com LPS. Inicialmente foram avaliadas as concentrações da CC_{10} e em seguida, foi feita uma curva dose-resposta nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 μM . Em todos os experimentos, todos os compostos em todas as concentrações inibiram a produção de NO em relação ao grupo controle LPS. Com a curva dose-resposta foi possível realizar uma regressão logarítmica e avaliar o composto que inibiria 50% de NO na concentração de 50 μM (CI_{50}), com o intuito de selecionar o Dieno que seria capaz de inibir a produção de NO na menor concentração. O único composto que apresentou CI_{50} foi o dieno **1**. Desta forma, este composto foi selecionado para avaliar o perfil anti-inflamatório. No estudo de Kumar *et al.* (2014) em que foram testados compostos de Bornil cinamatos em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, foram encontrados resultados similares ao obtido com Dienos, em que os compostos derivados de Bornil não apresentaram toxicidade nas células e foram capazes de inibir a produção de NO (KUMAR *et al.* 2014). Além disso, nos ensaios realizados por Liao e colaboradores (2012) foram avaliados compostos (Dienos) derivados cinamaldeídos, ácidos cinâmicos e álcool cinâmico em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. E foi verificado que os compostos eram capazes de inibir a produção de NO de forma significativa (LIAO *et al.*, 2012).

Para o processo inflamatório produzir uma resposta eficiente e precisa, as células imunológicas devem coordenar sua ativação de formas globais, em nível de tecido, desta forma, a comunicação entre as células é crucial para que esta resposta ocorra. Esta comunicação entre as células é feita pelas citocinas. Estas pequenas proteínas ligam-se fortemente em receptores específicos de células-alvo e ativam uma cascata de sinalização que culminam na expressão de um conjunto de genes necessários para realizar uma tarefa especializada (ALTAN-BONNET *et al.*, 2019). As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF, IL-6, IFN- γ e a quimiocinas MCP-1 são produzidas principalmente por macrófagos ativados M1. As citocinas são responsáveis pela regulação e manutenção do processo inflamatório, sendo um dos precursores do início do processo inflamatório. Neste contexto, para assegurar uma possível atividade anti-inflamatória, o composto testado deve apresentar a capacidade de reduzir a produção destas citocinas.

De acordo com os resultados mostrados, dieno **1** foi capaz de reduzir a produção das citocinas IL-1 β , TNF e IL-6 nas concentrações testadas. De forma semelhante, no estudo desenvolvido por Pannee e colaboradores (2014) foi investigada a atividade anti-

inflamatória do óleo essencial de folhas de canela em células J774.1 ativadas por LPS. O cinamaldeído neste caso (isolado) foi capaz de inibir de maneira significativa a expressão das citocinas IL-1 β , TNF, IL-6 e MCP-1 o que corrobora com os achados do presente estudo (PANNEE et al., 2014). Outro exemplo foi o estudo de Fakurazi e colaboradores (2015) que avaliaram compostos de ácido cinâmico e compostos (cinamatos) em modelo *in vitro* com células RAW 264.7 estimulada com LPS. Nos resultados apresentados, tanto o tratamento com ácido cinâmico como o tratamento com derivados cinâmicos, inibiram significativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF e IL-6 (FAKURAZI et al., 2015).

Além das citocinas pró-inflamatórias, foi investigado o efeito do dieno **1** sobre a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-13, IL-4 e IL-10. Estas citocinas estão relacionadas com as vias de sinalização para a ativação de macrófagos M2. Os macrófagos M2 apresentam atividade imunomoduladora, pois após serem ativados, regulam negativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias e induzem a produção de mediadores anti-inflamatórios como as citocinas IL-4 e IL-10. São células altamente endocíticas e parcialmente fagocíticas e estão envolvidas em uma variedade de funções, incluindo mecanismos de reparo e homeostase (ATRI *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que o composto dieno **1** aumentou de maneira significativa a produção das citocinas IL-4 e IL-10. Corroborando os achados, em experimentos conduzidos por Lin e colaboradores (2011), onde foi demonstrado que compostos derivados cinamaldeídos extraídos do óleo essencial de *Cinnamomum osmophloeum* testados no modelo de inflamação alérgica induzida pela ovalbumina em camundongos BALB/c, também aumentaram de maneira significativa as concentrações séricas de IL-4 e IL-10 (LIN et al., 2011).

Levando-se em conta os resultados até então mostrados, é muito provável que o composto dieno **1** apresenta potencial atividade imunomoduladora. Visto que foi capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, relacionadas com a ação de macrófagos M1 e ao mesmo tempo aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias, relacionada a ação de macrófagos M2. Para comprovar tal comportamento, foi avaliada a atividade fagocítica uma característica pronunciada em macrófagos M2 (DUQUE *et al.*, 2014). Observando os resultados obtidos, verificamos que o dieno **1** foi capaz de aumentar a atividade fagocítica em células RAW 264.7 induzidas por LPS, que é um ativador clássico de macrófagos M1. A fagocitose é uma função importante dos

macrófagos, e o aumento da fagocitose indica ativação dos macrófagos e o primeiro mecanismo de defesa na resposta imune. O aumento da atividade fagocítica encontrada na presença do dieno **1**, corrobora com os resultados apresentados por Zhang e colaboradores (2020) em que foi avaliado o perfil imunomodulador de um polissacarídeo com estrutura semelhante aos derivados aqui estudados isolado de *Anemarrhena asphodeloides* e também testada em células RAW 264.7. O composto em questão também aumentou de maneira significativa a atividade fagocítica dos macrófagos no teste utilizando a técnica com vermelho neutro (ZHANG et al., 2020).

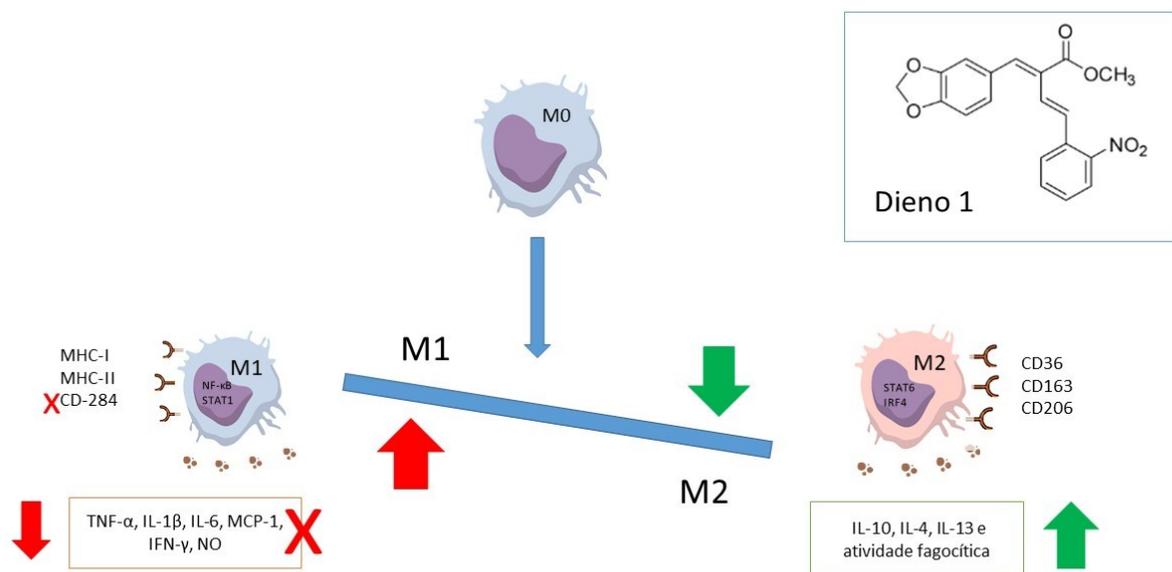
Os macrófagos ativados alternativamente, ou macrófagos M2 expressam em sua superfície o receptor de manose CD206 que atua como um receptor de reconhecimento padrão (PPRs) para vários patógenos incluindo vírus, fungos e bactérias. Além disso, este receptor está envolvido com a eliminação de moléculas endógenas, na apresentação de antígenos e modulação da ativação e tráfego celular (MARTINEZ-POMARES *et al.*, 2012; TSUCHIYA *et al.*, 2019). Os macrófagos classicamente ativados, ou macrófagos M1 expressam em sua superfície principalmente TLR4, o qual interage com LPS. Além disso, IFN- γ aumenta a expressão de TLR4, receptor chave para via de sinalização via MyD88 e produzir citocinas pró-inflamatórias, em células, enquanto inibe a citocina IL-10 (A MANTOVANI *et al.*, 2004). Neste contexto, avaliamos a ação do dieno **1** sobre a expressão de receptores típicos de macrófagos M1 (TLR4 –CD284) e macrófagos M2 (manose – CD206) em células RAW 264.7. Nossos resultados demonstraram que o composto testado (dieno **1**) reduziu de maneira significativa a expressão do TLR4 na superfície de macrófagos, indicando uma redução do fenótipo M1 na cultura celular, o que corrobora com os resultados previamente demonstrados sobre a inibição das citocinas pró-inflamatórias, visto que o TLR4 está relacionado com a cascata de sinalização que culmina na síntese das citocinas pró-inflamatórias. Em relação a expressão de receptores de manose (M2), não foi verificado aumento deste marcador, pelo menos na concentração do composto testada. Neste sentido, Conti e colaboradores (2013) demonstraram que o tratamento com ácido cinâmico em monócitos humanos, outro importante derivado cinâmico, reduziu de maneira significativa a expressão de TLR4 na superfície das células e da mesma forma, aumentou a atividade fagocítica dessas células, o que levou o autor a caracterizar tal atividade como uma forte indicação de ação imunomoduladora do composto (CONTI *et al.*, 2013).

Os macrófagos M2 são caracterizados pela expressão de marcadores de superfície como CD163, receptor de manose CD206, CD 209, FIZZ1 e Ym1/2 (MANTOVANI *et al.*, 2013). Sendo assim, o fato de não haver diferença significativa na expressão do receptor de manose CD206 nos resultados encontrados, não sugere que os macrófagos não estejam sendo polarizados em macrófagos M2. Sugere-se então avaliar a expressão de outro marcador de superfície de macrófagos, como por exemplo, o marcador CD163. De acordo com o estudo de Zhuang *et al.*, 2021 em um estudo em que investigaram os subtipos de macrófagos presentes na córnea humana e observaram que células polarizadas com IL-4 expressa receptores CD206 e células polarizadas com IL-10 expressam receptores CD163 (ZHUANG *et al.*, 2021). Além disso, o dieno 1 estimulou a atividade fagocítica de macrófagos o que é um importante indicio de atividade pró-resolutiva de macrófagos M2.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados é possível concluir que o composto dieno derivado cinâmico (dieno 1) testado, apresenta atividade anti-inflamatória e, seu efeito está intimamente relacionado com características imunomoduladora. O dieno 1 apresentou capacidade em reduzir marcadores inflamatórios relacionados aos macrófagos M1 e aumentar os níveis de marcadores anti-inflamatórios relacionados aos macrófagos M2. Além disso, é possível observar que o dieno 1 apresenta um possível perfil de composto pró-resolutivo por aumentar os marcadores relacionados aos macrófagos M2. Entretanto experimentos complementares são necessários para comprovar o perfil do composto, como por exemplo, avaliar a expressão gênica de receptores relacionados aos macrófagos M1 e M2 através de PCR, além disso, avaliar a atividade da citocina TGF- β , que está relacionada com a ativação de macrófagos M2 e avaliar a ação do composto sobre o fator nuclear NF-KB, relacionado com macrófagos M1 e, desta forma determinar o possível mecanismo de ação do composto. Além disso, investigar a ação do composto em modelos *in vivo*. Figura 13. Possível mecanismo de ação do dieno 1.

Figura 13 Possível mecanismo de ação do dieno 1.



Efeito do dieno 1 sobre macrófagos RAW 264.7. O composto inibe citocinas pró-inflamatórias e NOx e reduz a expressão do receptor de superfície CD-284 relacionado com macrófagos M1. Em contrapartida, o dieno 1 estimula a síntese de citocinas imunomoduladora e estimula a atividade fagocítica relacionados a macrófagos M2. Elaborado pela autora.

7 REFERÊNCIAS

A MANTOVANI, *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 677-686, dez. 2004.

ABDULKHALEQ, L. A. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: a review. **Veterinary World**, [S.L.], v. 11, n. 5, p. 627-635, maio 2018.

AGHASAFARI, Parya *et al.* A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 59-74, 10 out. 2018.

ALTAN-BONNET, Grégoire *et al.* Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 205-217, 15 fev. 2019.

ATRI, Chiraz *et al.* Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1801, 19 jun. 2018.

BARNES PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2010; 120(2-3):76-85.

BOSURGI, Lidia *et al.* Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. **Science**, [S.L.], v. 356, n. 6342, p. 1072-1076, 11 maio 2017.

BRUBAKER, Sky W. *et al.* Innate Immune Pattern Recognition: a cell biological perspective. **Annual Review Of Immunology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 257-290, 21 mar. 2015.

CHAO, Louis Kuoping *et al.* Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 220-231, jan. 2008.

CHOUSTERMAN, Benjamin G. *et al.* Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 517-528, 29 maio 2017.

CINELLI, Maris A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 158-189, 13 jun. 2019.

CONTI, Bruno José *et al.* Cinnamic Acid Is Partially Involved in Propolis Immunomodulatory Action on Human Monocytes. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2013, p. 1-7, 2013. Hindawi Limited.

DAI, Bo *et al.* Coccomyxa Gloeobotrydiformis Polysaccharide Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophages. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 2523-2535, 2018.

DESHMANE, Satish L. *et al.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal Of Interferon & Cytokine Research**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 313-326, jun. 2009.

DORAN, Amanda C. *et al.* Efferocytosis in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, Nova York, v. 20, n. 4, p. 254-267, abr. 2020.

DUQUE, Guillermo Arango *et al.* Macrophage Cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 5, p. 1-13, 7 out. 2014.

FAJGENBAUM, David C. *et al.* Cytokine Storm. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 383, n. 23, p. 2255-2273, 3 dez. 2020.

FAKURAZI, Sharida *et al.* Enhanced anti-inflammatory potential of cinnamate-zinc layered hydroxide in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Drug Design, Development And Therapy**, [S.L.], p. 2475, abr. 2015.

FORSTERMANN, U. *et al.* Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, [S.L.], v. 33, n. 7, p. 829-837, 1 set. 2011.

FUNES, Samanta C. *et al.* Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, [S.L.], v. 154, n. 2, p. 186-195, 8 mar. 2018.

GERMIC, Nina *et al.* Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. **Cell Death & Differentiation**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 715-727, 8 fev. 2019.

GUZIK, T.J. *et al.* NITRIC OXIDE AND SUPEROXIDE IN INFLAMMATION AND IMMUNE REGULATION. **Journal Of Physiology And Pharmacology**, Poland, v. 54, n. 4, p. 1-19, out. 2003.

GUZMAN, Juan *et al.* Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. **Molecules**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 25 nov. 2014.

HANKE, Thomas *et al.* Small molecules with anti-inflammatory properties in clinical development. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 157, p. 163-187, jan. 2016.

HESSE, Matthias *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **The Journal Of Immunology**, Rockville, v. 11, n. 167, p. 6534-6544, 19 jan. 2001.

HOLEK, Jan *et al.* Investigation of Anti-Inflammatory Potential of N-Arylcinnamamide Derivatives. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 24, p. 4531, 11 dez. 2019.

IYER, Shankar Subramanian *et al.* Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Critical Reviews™ In Immunology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 23-63, 2012.

JANEWAY, C.A. *et al.* Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, [S.L.], v. 54, p. 1-13, 1 jan. 1989.

JORDAN, Stanley C. *et al.* Interleukin-6, A Cytokine Critical to Mediation of Inflammation, Autoimmunity and Allograft Rejection. **Transplantation**, [S.L.], v. 101, n. 1, p. 32-44, jan. 2017.

KIM, Mi Eun *et al.* Anti-inflammatory effects of trans-cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated macrophage activation via MAPKs pathway regulation. **Immunopharmacology And Immunotoxicology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 219-224, 22 jan. 2018.

KUMAR, Kanthasamy *et al.* Bornyl Cinnamate Inhibits Inflammation-Associated Gene Expression in Macrophage Cells through Suppression of Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway. **Planta Medica**, [S.L.], v. 81, n. 01, p. 39-45, 17 dez. 2014.

L.ALESSANDRI, Ana *et al.* Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, Belo Horizonte, v. 139, n. 2, p. 189-212, ago. 2013.

LEE, Seung Hoon *et al.* Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-9, 31 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

LI, Danyang *et al.* Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-25, 4 ago. 2021.

LIAO, Jung-Chun *et al.* Anti-Inflammatory Activities of Cinnamomum cassia Constituents In Vitro and In Vivo. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2012, p. 1-12, 2012.

LIN, Shih-Shen Chou *et al.* In Vivo Cytokine Modulatory Effects of Cinnamaldehyde, the Major Constituent of Leaf Essential Oil from Cinnamomum osmophloeum Kaneh. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 1511-1518, 11 mar. 2011.

LIU, Gang *et al.* TLR4-MyD88 signaling pathway is responsible for acute lung inflammation induced by reclaimed water. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 396, p. 122586, set. 2020.

LIU, Xin *et al.* Immunomodulatory effects of an acetylated Cyclocarya paliurus polysaccharide on murine macrophages RAW264.7. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Nanchang, v. 98, n. 2, p. 576-581, fev. 2017.

LO FARO, M. L. *et al.* Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide**, v. 41, p. 38–47, 2014.

MANTOVANI A. SICA A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance and diversity. **Curr Opin Immunol**. 2010; 22(2): 231-7.

MARTINEZ-POMARES, Luisa *et al.* The mannose receptor. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 92, n. 6, p. 1177-1186, dez. 2012.

MCCORMICK, Sarah M. *et al.* Commentary: il-4 and il-13 receptors and signaling. **Cytokine**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 38-50, set. 2015

MCKERNAN, Declan P. *et al.* Pattern recognition receptors as potential drug targets in inflammatory disorders. **Inflammatory Disorders, Part A**, [S.L.], p. 65-109, 2020.

MERLY, Liza *et al.* Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something?. **Immunopharmacology And Immunotoxicology**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 55-58, 2 fev. 2017.

MIGLIORINI, Paola *et al.* The IL-1 family cytokines and receptors in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 102617, set. 2020.

NIELSEN, Marlene Christina *et al.* Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1175, 9 maio 2020.

NOWARSKI, Roni *et al.* Innate Immune Cells in Inflammation and Cancer. **Cancer Immunology Research**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 77-84, ago. 2013.

NUNES, Clara dos Reis *et al.* Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 16, p. 3726, 15 ago. 2020.

PANNEE, Chinjareernpan *et al.* Antiinflammatory effects of essential oil from the leaves of Cinnamomum cassia and cinnamaldehyde on lipopolysaccharide-stimulated J774A.1 cells. **Journal Of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 164, 2014.

PINCI, Francesca *et al.* C-tag TNF: a reporter system to study tnf shedding. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 295, n. 52, p. 18065-18075, dez. 2020.

PONTIKI, Eleni *et al.* Multi-Target Cinnamic Acids for Oxidative Stress and Inflammation: design, synthesis, biological evaluation and modeling studies. **Molecules**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 12, 20 dez. 2018.

RAO, Li *et al.* Lignans and Neolignans with Antioxidant and Human Cancer Cell Proliferation Inhibitory Activities from Cinnamomum bejolghota Confirm Its Functional Food Property. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 33, p. 8825-8835, 27 jul. 2020.

ROMERIO, Alessio *et al.* Increasing the Chemical Variety of Small-Molecule-Based TLR4 Modulators: an overview. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-16, 10 jul. 2020.

RUWIZHI, Ngonidzashe *et al.* Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 16, p. 5712, 9 ago. 2020.

SARAIVA, Margarida *et al.* The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 170-181, 15 fev. 2010.

SCHMID-SCHÖNBEIN, Geert W. *et al.* ANALYSIS OF INFLAMMATION. **Annual Review Of Biomedical Engineering**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 93-151, ago. 2006.

SERHAN, Charles N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **Faseb**, Boston, v. 21, n. 2, p. 325-332, fev. 2007.

SCHONHOFF, Aubrey M. *et al.* Innate and adaptive immune responses in Parkinson's disease. **Progress In Brain Research**, [S.L.], p. 169-216, 2020.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 233, n. 9, p. 6425-6440, mar. 2018.

SOVA, M.. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 749-767, 1 maio 2012.

STRIZ, Ilija *et al.* Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clinical Science**, [S.L.], v. 126, n. 9, p. 593-612, 14 jan. 2014.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Resolution of Inflammation: what controls its onset?. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 7, p. 1-18, 26 abr. 2016.

TACIAK, Bartłomiej *et al.* Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 1-13, 11 jun. 2018.

TARTEY, Sarang *et al.* Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **International Reviews Of Immunology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 57-73, 6 jan. 2017.

TLIBA O, Damera G, Banerjee A, Gu S, Baidouri H, Keslacy S, Amrani Y. Cytokines induce an early steroid resistance in airway smooth muscle cells: novel role of interferon regulatory factor-1. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 2008; 38(4):463-472.

TSUCHIYA, Kazuo *et al.* Macrophage Mannose Receptor CD206 Predicts Prognosis in Community-acquired Pneumonia. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-10, dez. 2019.

WAJANT, Harald *et al.* TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [S.L.], v. 7, p. 1-14, 29 maio 2019.

WANG, Yibo *et al.* Small-Molecule Modulators of Toll-like Receptors. **Accounts Of Chemical Research**, [S.L.], v. 53, n. 5, p. 1046-1055, 1 abr. 2020.

WANG, Youhan *et al.* M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 70, p. 459-466, maio 2019.

WANG, Yu *et al.* Zinc ferrate nanoparticles for applications in medicine: synthesis, physicochemical properties, regulation of macrophage functions, and in vivo safety evaluation. **Nanotoxicology**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 1381-1398, 19 out. 2020.

WARRINGTON, Richard *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-8, 10 nov. 2011.

YIN, Miao *et al.* Advances in Research on Immunoregulation of Macrophages by Plant Polysaccharides. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-8, 5 fev. 2019.

YUNNA, Chen *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 877, p. 173090, jun. 2020.

ZHU, Gengzheng *et al.* Targeting pattern-recognition receptors to discover new small molecule immune modulators. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 144, p. 82-92, jan. 2018.

ZHU, Sipin *et al.* The molecular structure and role of CCL2 (MCP-1) and C-C chemokine receptor CCR2 in skeletal biology and diseases. **Journal of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 236, p 7211-72222, 2021.

ZHUANG, Xinyu *et al.* Time- and Stimulus-Dependent Characteristics of Innate Immune Cells in Organ-Cultured Human Corneal Tissue. **Journal Of Innate Immunity**, Freiburg, v. 1, n. 1, p. 1-14, jun. 2021.

WU, Ruyan; LI, Jun-Xu. Toll-Like Receptor 4 Signaling and Drug Addiction. **Frontiers In Pharmacology**, New York, v. 603445, n. 11, p. 1-11, 24 nov. 2020.

