



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

Eduarda Fratoni

**Efeito anti-inflamatório da N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e seus derivados em modelo *in vitro* e revisão sistemática sobre o impacto da dexametasona na mortalidade de pacientes com sepse**

Florianópolis

2021

Eduarda Fratoni

**Efeito anti-inflamatório da N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e seus derivados em modelo *in vitro* e revisão sistemática sobre o impacto da dexametasona na mortalidade de pacientes com sepse**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

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.

Fratoni, Eduarda

Efeito anti-inflamatório da N-antipirina-3,4 dicloromaleimida e seus derivados em modelo in vitro e revisão sistemática sobre o impacto da dexametasona na mortalidade de pacientes com sepse / Eduarda Fratoni ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2021.

98 p.

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

Inclui referências.

1. Farmácia. I. Monguilhott Dalmarco, Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

Eduarda Fratoni

**Efeito anti-inflamatório da N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e seus derivados em modelo *in vitro* e revisão sistemática sobre o impacto da dexametasona na mortalidade de pacientes com sepse**

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

Profa. Marcia Maria de Souza, Dra.  
Universidade do Vale do Itajaí

Profa. Izabel Galhardo Demarchi, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Filipe Matheus Carvalho, Dr.  
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 doutor em Farmácia.

---

Profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco  
Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho aos meus pais, Evaldo e Marileia, minha irmã Angela e meu afilhado Tulio, por serem meu porto seguro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Evaldo e Marileia, minha irmã Angela e meu afilhado Tulio, por todo o incentivo e amor. Sem vocês nada disso seria possível!

Aos meus padrinhos, Roberto e Marilene, por toda ajuda e estadia nesses anos de doutorado. Aos demais familiares, avós, tios, primos que sempre me incentivaram.

À minha amiga e colega de laboratório Lais Cristina Theindl, por estar comigo nos finais de semana no laboratório, pela ajuda durante os experimentos, trocas de saberes e todos outros momentos que passamos juntas, sou eternamente grata.

Ao meu orientador Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela oportunidade, ensinamentos e compreensão.

À Profa. Dra. Fátima de Campos Buzzi, pelos compostos cedidos para execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade e seus alunos, por todos os ensinamentos e ajuda na elaboração da revisão sistemática.

Aos professores participantes da banca examinadora, pela disponibilidade para avaliar o trabalho e participar deste momento comigo.

A todos os meus amigos, por sempre acreditarem em mim e me proporcionarem momentos inesquecíveis.

Agradeço aos meus colegas de LAPI por toda ajuda para a conclusão deste trabalho. Obrigada Marcus, Yeo Jim, Gustavo, Bruno, Julia e tantos outros, por dividirem conhecimento e boas risadas diariamente.

À CAPES, pela bolsa de estudo e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – UFSC por todo suporte.

A todos os professores do PGFar/UFSC que transmitiram seus conhecimentos e me sanaram as dúvidas.

À UNIVALI, em especial a coordenação do curso de Biomedicina, que sempre me apoiou para a conclusão desse trabalho.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre (FREIRE, 1989).

## RESUMO

O processo inflamatório é uma resposta a estímulos nocivos que visa a destruição de agentes estranhos para posteriormente reparar o local afetado. Quando a inflamação é descontrolada ou não resolvida, pode levar a lesões teciduais significativas como os quadros de sepse. Muitos fármacos anti-inflamatórios têm sido utilizados para o tratamento de processos inflamatórios, como a dexametasona. No entanto, a demanda por novas moléculas mais eficazes com maiores margens de segurança permanece ativa. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório *in vitro* dos compostos N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e seus derivados e revisar sistematicamente a literatura para avaliar a mortalidade de pacientes com sepse ou choque séptico em uso de dexametasona. No estudo experimental desta tese, macrófagos RAW 264.7 foram utilizados para avaliar a citotoxicidade e a atividade anti-inflamatória por meio da mensuração de óxido nítrico, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 e ativação do NF- $\kappa$ B. Primeiramente, foi verificado que nenhum composto apresentou citotoxicidade significativa ( $CC_{50} < 100 \mu M$ ). Posteriormente, foi avaliado o potencial de inibição do óxido nítrico como triagem e de todos os compostos testados, três mostraram um perfil promissor. Quando avaliado o efeito desses três compostos na produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , apenas os compostos N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida apresentaram um perfil de inibição significativo. Além disso, esses dois compostos também foram capazes de aumentar a produção de citocinas conhecidas pelo perfil anti-inflamatório (IL-4 e IL-13), e ainda inibiram significativamente a fosforilação da subunidade p-p65 NF- $\kappa$ B. A busca sistemática da literatura foi realizada em quatro bancos de dados eletrônicos e as avaliações de risco de viés foram realizadas usando a ferramenta *Cochrane Collaboration* e a qualidade da notificação foi avaliada usando a lista de verificação baseada no CONSORT. O protocolo de estudo da revisão sistemática foi registrado no banco de dados PROSPERO (CRD42018088150). Os três estudos selecionados incluíram oitenta pacientes adultos com sepse ou choque séptico que receberam dexametasona como intervenção. Dos três artigos, dois concluíram que o uso de dexametasona reduz significativamente a mortalidade em pacientes com sepse ou choque séptico. Os resultados de risco de viés da ferramenta *Cochrane Collaboration* mostraram que nenhum dos estudos estava completamente livre de viés e, por meio da lista de verificação CONSORT, verificou-se que nenhum dos estudos atendia a 50% ou mais dos requisitos aplicáveis. Em conclusão, fica claro a partir da revisão sistemática que mais ensaios clínicos randomizados comparando o uso de dexametasona com placebo em terapia adjuvante para pacientes com sepse são necessários. A partir dos resultados experimentais, dois compostos apresentam um efeito anti-inflamatório significativo com fortes indícios que seu mecanismo envolva imunomodulação dos macrófagos, qualificando-os como protótipos promissores para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios com características imunomoduladoras.

**Palavras-chave:** Sepse. Inflamação. Dexametasona. Imidas Cíclicas. Macrófagos RAW 264.7.

*In vitro.*



## ABSTRACT

The inflammatory process is a response to harmful stimuli aimed at destroying foreign agents to later repair the affected site. When inflammation is uncontrolled or unresolved, it can lead to significant tissue damage such as sepsis. Many anti-inflammatory drugs have been used to treat inflammatory processes, such as dexamethasone. However, the demand for new, more effective molecules with greater safety margins remains active. Thus, the aim of the study was to evaluate the *in vitro* anti-inflammatory effect of N-antipyrine-3,4-dichloromaleimide compounds and their derivatives and to systematically review the literature to assess the mortality of patients with sepsis or septic shock using dexamethasone. In the experimental study of this thesis, RAW 264.7 macrophages were used to assess cytotoxicity and anti-inflammatory activity by measuring nitric oxide, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-4, IL-13, and NF- $\kappa$ B activation. First, it was verified that no compound showed significant cytotoxicity ( $CC_{50} < 100 \mu\text{M}$ ). Subsequently, the potential for inhibition of nitric oxide was evaluated as a screening and of all tested compounds, three showed a promising profile. When evaluating the effect of these three compounds on the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$ , only the compounds N-antipyrine-3,4-dichloromaleimide and N-antipyrine-3-chloro-4-(3,4-dichloroaniline)maleimide showed a significant inhibition profile. Furthermore, these two compounds were also able to increase the production of cytokines known for their anti-inflammatory profile (IL-4 and IL-13), and significantly inhibited the phosphorylation of the p-p65 NF- $\kappa$ B subunit. A systematic literature search was performed in four electronic databases and risk of bias assessments were performed using the Cochrane Collaboration tool and the quality of reporting was assessed using the CONSORT-based checklist. The study protocol of the systematic review was registered in the PROSPERO database (CRD42018088150). The three selected studies included eighty adult patients with sepsis or septic shock who received dexamethasone as an intervention. Of the three articles, two concluded that the use of dexamethasone significantly reduced mortality in patients with sepsis or septic shock. The risk of bias results from the Cochrane Collaboration tool showed that none of the studies was completely free of bias and, through the CONSORT checklist, none of the studies were found to meet 50% or more of the applicable requirements. In conclusion, it is clear from the systematic review that more randomized controlled trials comparing the use of dexamethasone with placebo in adjuvant therapy for patients with sepsis are needed. Based on the experimental results, two compounds have a significant anti-inflammatory effect with strong evidence that their mechanism involves macrophage immunomodulation, qualifying them as promising prototypes for the development of new anti-inflammatory drugs with immunomodulatory characteristics.

**Keywords:** Sepsis. Inflammation. Dexamethasone. Cyclic Imides. Macrophages RAW 264.7. *In vitro*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resumo dos diferentes estimulantes, citocinas secretadas e funções biológicas entre os macrófagos M1 e M2. ....	20
Figura 2 – Sinalização do NF- $\kappa$ B via TLR4.....	21
Figura 3 – O sistema imune na fisiopatologia da sepse.....	29
Figura 4 – Estrutura química do composto N-antipirina-3,4-dicloromaleimida. ....	33
Figura 5 – Pirâmide das evidências científicas.....	35
Figura 6 – Estrutura química de N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e derivados.....	42
Figura 7 – Avaliação da citotoxicidade dos compostos <b>1-6</b> em macrófagos RAW 264.7. ....	47
Figura 8 – Curva dose-resposta dos compostos <b>1-6</b> sobre os níveis óxido nítrico (NO $_x$ ) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. ....	49
Figura 9 – Efeito dos compostos <b>1, 3 e 5</b> nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ e INF- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.....	52
Figura 10 – Efeito dos compostos <b>1 e 3</b> nos níveis de IL-4 e IL-13 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. ....	53
Figura 11 – Efeito dos compostos <b>1 e 3</b> na fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. ....	54
Figura 12 – Fluxograma do processo de pesquisa, triagem e seleção de literatura para ensaios elegíveis.....	67
Figura 13 – Resumo do risco de viés pela ferramenta Cochrane. ....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontuação da avaliação sequencial de falências de órgãos na sepse. ....	27
Tabela 2 – Avaliação da viabilidade celular (CC <sub>50</sub> ) e efeitos inibitórios na produção de NO <sub>x</sub> (CI <sub>50</sub> ) dos compostos <b>1-6</b> em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS. ....	50
Tabela 3 – Descrição dos critérios do PICO e pergunta da pesquisa definida para revisão sistemática. ....	64
Tabela 4 – Características dos estudos. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

CC<sub>50</sub> – Concentração de composto necessário para matar 50% das células viáveis

CD40L – Ligante CD40

CENTRAL – Cochrane Central Register of Controlled Trials

CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória mínima de 50%

CLRs – Receptores do tipo lectina C

COX 2 – Ciclooxigenase 2

DAMPs – Padrões moleculares associados a dano

DMSO – Dimetilsulfóxido

ELISA – Ensaio imuno enzimático

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

EPM – Erro padrão da média

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FIO<sub>2</sub> – Fração de oxigênio inspirado

IκBα – Subunidade inibitória α do fator de transcrição nuclear κB

IL-1 – Interleucina 1

IL-1β – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-33 – Interleucina 33

ILAS – Instituto Latino-Americano para Estudos da SEPSE

INF-γ – Interferon gama

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1/CCL2 - Proteína quimiotática de monócito 1

MyD88 – Proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NLRs – Receptores do tipo NOD

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal  
NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
NO<sub>x</sub> – Metabólitos do óxido nítrico  
ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito  
PAM – Pressão arterial média  
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos  
PaCO<sub>2</sub> - Pressão parcial de dióxido de carbono  
PaO<sub>2</sub> – Pressão parcial de oxigênio  
PICO – População, intervenção, comparação e desfecho  
PIRO – *Predisposition, infection, inflammatory response e organ dysfunction*  
PMN - Polimorfonuclear  
PRISMA - Itens de relatório preferenciais para a revisão sistemática e meta-análise  
PROSPERO – *International Prospective Register of Systematic Reviews*  
PRRs – Receptores reconhedores de padrões  
RLRs – Receptores do tipo induzível pelo ácido retinóico  
SOFA - Avaliação Sequencial de Falências de Órgãos  
SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica  
STAT – Sinal transdutor e ativador de transcrição  
TAK-1 – Quinase 1 ativada por fator β  
TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta  
TLRs – Receptores do tipo Toll  
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa  
TRAF-6 – Proteína fator 6 associado ao receptor TNF  
UTI – Unidade de terapia intensiva  
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
1.1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	18
1.1.2 SEPSE E CHOQUE SÉPTICO .....	25
1.1.3 IMIDAS CÍCLICAS .....	32
1.1.4 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA .....	34
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>38</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>2.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
2.2.1 OBJETIVO GERAL .....	41
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>2.3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
2.3.1 COMPOSTOS UTILIZADOS .....	42
2.3.2 CULTURA CELULAR .....	43
2.3.3 CITOTOXICIDADE .....	43
2.3.4 DOSAGEM DE METABÓLITOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO <sub>x</sub> ) .....	43
2.3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) E ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-4 E IL-13) .....	44
2.3.6 DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p-p65 DO NF- $\kappa$ B .	45
2.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>2.4 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
2.4.1 VIABILIDADE CELULAR .....	47
2.4.2 EFEITO DOS COMPOSTOS NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO <sub>x</sub> ) .....	48
2.4.3 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ E INF- $\gamma$ ) .....	50
2.4.4 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-4 E IL-13) .....	53
2.4.5 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA FOSFORILAÇÃO DA p65 DO NF- $\kappa$ B .....	54
<b>2.5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>2.6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>59</b>

<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>60</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
3.2.1 OBJETIVO GERAL .....	63
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	63
<b>3.3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>
3.3.1 REVISÃO DA LITERATURA .....	64
3.3.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO .....	65
3.3.3 EXTRAÇÃO DOS DADOS .....	66
3.3.4 AVALIAÇÃO CRÍTICA.....	66
<b>3.4 RESULTADOS</b> .....	<b>67</b>
3.4.1 RESULTADOS DA PESQUISA .....	67
3.4.2 CARACTERÍSTICAS DE BASE .....	68
3.4.3 AVALIAÇÃO DO RISCO DE VIÉS E QUALIDADE DOS RELATÓRIOS.....	70
<b>3.5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>72</b>
<b>3.6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>
<b>APÊNDICE A – Material suplementar do capítulo 1</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO A – Artigos referentes a tese</b> .....	<b>92</b>
<b>ANEXO B – Artigos em parceria durante o período de doutorado</b> .....	<b>94</b>





## INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação a um dano tecidual infeccioso ou estéril e tem como finalidade restaurar a homeostase do tecido. No entanto, quando a inflamação é descontrolada ou não resolvida pode originar uma infinidade de doenças inflamatórias, essas são complexas, envolvem o sistema imunológico e podem ser agudas e/ou crônicas (NETEA *et al.*, 2017). Quando a resposta inflamatória a um agente infeccioso é sistêmica e exacerbada temos por definição a sepse, que provoca anormalidades fisiológicas culminando na falência dos órgãos. O estágio avançado da sepse é o choque séptico, caracterizado por um alto risco de o paciente ir a óbito e maior gravidade nas disfunções do metabolismo circulatório e celular (POLL *et al.*, 2017; SINGER *et al.*, 2016).

Em 2017, foi estimado aproximadamente 48,9 milhões de casos e 11,0 milhões de mortes por sepse no mundo (RUDD *et al.*, 2020). No Brasil, é estimado que um paciente com sepse resulte em um gasto hospitalar anual de aproximadamente R\$ 38.867,60 (BARRETO *et al.*, 2016). Como tratamento farmacológico para a sepse e choque séptico temos os corticosteroides, os quais vêm sendo utilizados há muito tempo. Tais medicamentos atuam na inibição no processo inflamatório por diferentes vias, como por exemplo reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (FINK; WARREN, 2014; GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; POLL *et al.*, 2017). Na década de 80, nos protocolos hospitalares empregados para o tratamento de sepse eram administradas altas doses de glicocorticoides, com o tempo foi observado que menores doses com um tempo maior de administração se observa uma melhora na mortalidade desses pacientes (ANNANE *et al.*, 2009; 2019; SPRUNG *et al.*, 1984; THOMPSON; VENKATESH; FINFER, 2019). No entanto, ainda falta evidências para a escolha de um corticosteroide eficiente para a sepse e choque séptico, devido a variabilidade dos efeitos que causam, farmacocinética e a capacidade imunossupressora (GIBBISON *et al.*, 2017; GUPTA; BHATIA, 2008). Os corticosteroides mais utilizados para os casos de sepse e choque séptico são a hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona e a dexametasona (LIANG *et al.*, 2021).

A busca por substâncias com potencial anti-inflamatório mais eficazes e com menos reações vem crescendo a cada ano, sendo eles produtos sintéticos ou naturais (HANKE *et al.*, 2016). Estudos científicos com os compostos da classe das imidas cíclicas demonstram que essas substâncias possuem promissor potencial para a atividade anti-inflamatória (NEHA; WAKODE, 2021). A N-antipirina-3,4-dicloromaleimida é uma substância pertencente a classe

das imidas cíclicas e em estudos anteriores publicados demonstrou efeitos antinociceptivos, incluindo a redução da dor causada por processo inflamatório em modelos comportamentais semelhantes à dor induzidos por carragenina (QUINTÃO *et al.*, 2010).

Assim como, os estudos primários experimentais são de grande importância para os avanços na ciência, os trabalhos científicos de revisões de literatura também têm seu papel fundamental. As revisões da literatura são métodos de pesquisa científica que utilizam informações dos resultados já publicados, principalmente em periódicos, e tem como objetivo fundamentar ou responder uma pergunta. Dentre os tipos de revisões temos as narrativas, integrativas e as sistemáticas com ou sem meta-análise (ROTHER, 2007). As revisões se diferem entre si, principalmente pela elaboração da pergunta de pesquisa, modo de busca dos artigos que os compõem, avaliação de risco de viés e a análise robusta dos artigos selecionados (UMAN, 2011). As revisões sistemáticas são utilizadas para compilar e sintetizar as evidências de estudos primários de uma forma onde se tenha uma precisão e confiabilidade nos resultados. Além, de atualizar um determinado assunto, também fornecem informações para possíveis mudanças de protocolos clínicos e instigam a realização de novas pesquisas (BRASIL, 2012; GALVÃO; PEREIRA, 2014; LIBERATI *et al.*, 2009).

Nesse contexto, essa tese está dividida em três capítulos, para facilitar o entendimento das partes. No primeiro capítulo é apresentado uma revisão da literatura no qual é abordado os principais temas desta tese. O segundo capítulo compreende a avaliação das moléculas sintéticas derivadas da N-antipirina-3,4-dicloromaleimida quanto aos possíveis efeitos anti-inflamatório (*in vitro*). Esse artigo foi submetido para a revista *Immunopharmacology and Immunotoxicology* – Fator de Impacto pelo *Journal Citation Reports* (JCR): 2,730, conforme comprovante no Anexo A. E por fim, o terceiro capítulo apresenta os resultados obtidos da revisão sistemática da literatura publicada na revista *SN Comprehensive Clinical Medicine* (<https://doi.org/10.1007/s42399-020-00334-9>), foi desenvolvida para esclarecer se o glicocorticoide dexametasona é eficaz na redução da mortalidade em pacientes adultos e idosos com sepse ou choque séptico.

## **CAPÍTULO 1**

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é a resposta do imune protetora do organismo a diversos estímulos, como patógenos, substâncias tóxicas, radiações ou até mesmo por sinais endógenos como células em processo de apoptose (CHEN *et al.*, 2017; NETEA *et al.*, 2017; SUGIMOTO *et al.*, 2019). O processo inflamatório é desencadeado com a finalidade de proteger o organismo e promover o reparo tecidual, esse processo é caracterizado pelas fases de indução, pico e resolução da inflamação (NETEA *et al.*, 2017; SCHETT, NEURATH, 2018).

A resposta ao agente agressor inicia com o seu reconhecimento, que é mediado por receptores reconhecedores de padrões (PRRs). Os PRRs são acionados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sinais exógenos indicativos de invasão de patógenos ou por padrões moleculares associados a danos (DAMPs), sinais endógenos indicativos de lesão de tecido estéril (JANEWAY, 1989; STYLIANOU, 2018). As células como leucócitos reconhecem os patógenos através dos PAMPs pelos PRRs. Dentre os PRRs que reconhecem PAMPs, os mais comuns são os receptores do tipo *Toll* (TLRs), receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo induzível pelo ácido retinóico (RLRs) e receptores do tipo lectina C (CLRs) (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; POLL *et al.*, 2017). Após o reconhecimento há ativação de uma variedade de vias de sinalização incluindo moléculas adaptadoras, quinases e fatores de transcrição. As vias de transdução de sinal resultam na síntese de muitas moléculas, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular, resultando no recrutamento de células para o local da lesão, na produção de proteínas de fase aguda, ativação plaquetária, febre e vasodilatação (DINARELLO, 2007; MOGENSEN, 2009). A fase da resolução tem como objetivo remover detritos celulares, patógenos e inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias, impedindo assim uma resposta exacerbada do processo inflamatório e retornando à homeostase. Se a inflamação aguda não for resolvida, ela pode se tornar crônica, danificando o tecido e comprometendo a sua função (NETEA *et al.*, 2017; STYLIANOU, 2018).

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN), principalmente os neutrófilos, são as primeiras células do sistema imune a alcançarem ao sítio inflamatório e possuem papel fundamental na resolução da inflamação (LEY *et al.*, 2007). Os neutrófilos atraem monócitos e macrófagos para o local da inflamação através de quimiocinas, esse processo é desencadeado também quando os próprios neutrófilos entram em apoptose, a remoção dos restos celulares

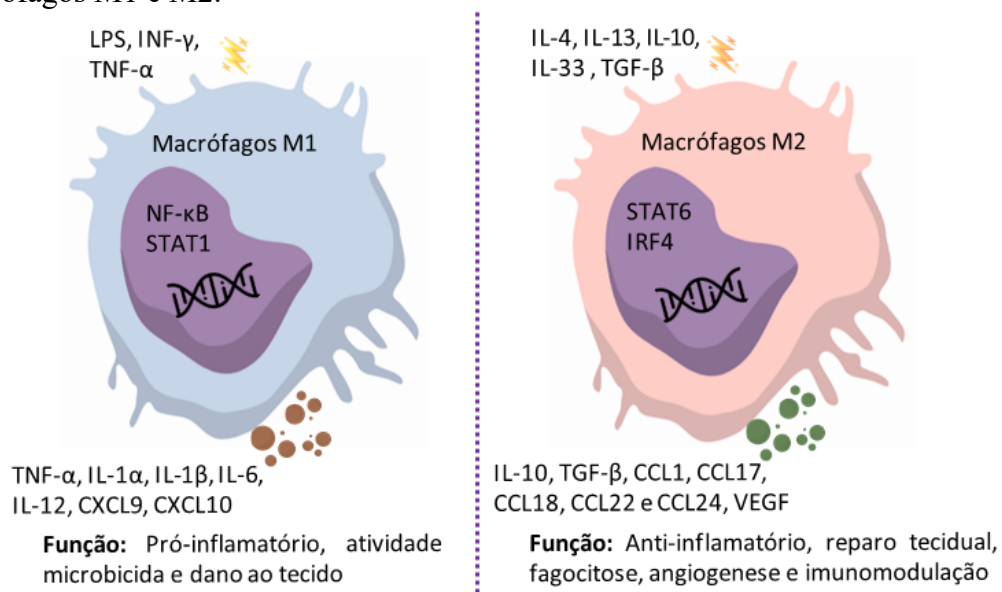
pelos macrófagos resulta na resolução da inflamação e cura do tecido. Quando o mecanismo de apoptose dos neutrófilos não é inicializado, uma maior quantidade dessas células se desloca até o local lesionado e conseqüentemente se tem uma resposta exacerbada da inflamação (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; SOEHNLEIN *et al.*, 2017).

Outra linhagem celular importante no processo de reparo tecidual são os macrófagos, os quais são ativados também por PAMPs ou DAMPs. Dentre as linhagens de macrófagos, temos os macrófagos residentes dos tecidos e os macrófagos provenientes de monócitos circulantes. Essas células possuem capacidade de mudar seu fenótipo funcional, sendo polarizados em macrófagos classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2), dependendo do estímulo e sinais liberados no microambiente. De maneira geral podemos classificar os macrófagos M1 em pró-inflamatórios e os M2 em anti-inflamatórios (ARANGO-DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; WANG *et al.*, 2021). As células com fenótipo M1 são ativadas principalmente por lipopolissacarídeo (LPS) e citocinas como interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Os macrófagos M1 induzem a liberação de várias citocinas, como TNF- $\alpha$ , interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 12 (IL-12) e quimiocinas (CXCL9 e CXCL10), exercendo feedback positivo sobre os macrófagos não polarizados. Já as células com fenótipo M2 são ativadas por citocinas como interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), interleucina 10 (IL-10), interleucina 33 (IL-33) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e possuem regulação positiva das citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e quimiocinas CCL1, CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24, esses também contribuem para o processo de prevenção de infecções, reparação de tecidos, angiogênese e imunomodulação (Figura 1). Ainda, o fenótipo M2 é dividido nas subcategorias M2a, M2b, M2c e M2d, diferindo em seus marcadores de superfície celular, citocinas secretadas e funções biológicas (YAO; XU; JIN, 2019).

A cascata de eventos que ocorre após uma agressão ao organismo é iniciada através dos PRRs, como já mencionado. A classe de PRRs mais estudada é a família *Toll* e não se sabe ao certo, mas estima-se que a maioria das espécies de mamíferos tenham de 10 a 15 TLRs. Eles são expressos em todas as células imunes inatas, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, *natural killers*, mastócitos, basófilos e eosinófilos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004; SOEHNLEIN *et al.*, 2017). Os TLRs são proteínas transmembranas e conseguem detectar vários PAMPs e DAMPs, esses receptores e a cascata de sinalizações que promovem, estão sendo cada vez mais estudados como alvo terapêutico em doenças inflamatórias. Da família *Toll*, o TLR4 que é ativado por LPS, molécula essa presente na membrana de bactérias gram-

negativas, que tem seu mecanismo de ação bem caracterizado, o que permite a investigação dos efeitos da modulação da sinalização desse receptor (MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016). Quando esse receptor é ativado, acoplam a proteína adaptadora MyD88 e iniciam diversas reações intracelulares, ativando a proteína fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF-6) e quinase 1 ativada por fator  $\beta$  (TAK-1), posteriormente ativam a via do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que leva à produção de mediadores inflamatórios (EL-ZAYAT; SIBAI; MANNAA, 2019).

Figura 1 – Resumo dos diferentes estimulantes, citocinas secretadas e funções biológicas entre os macrófagos M1 e M2.

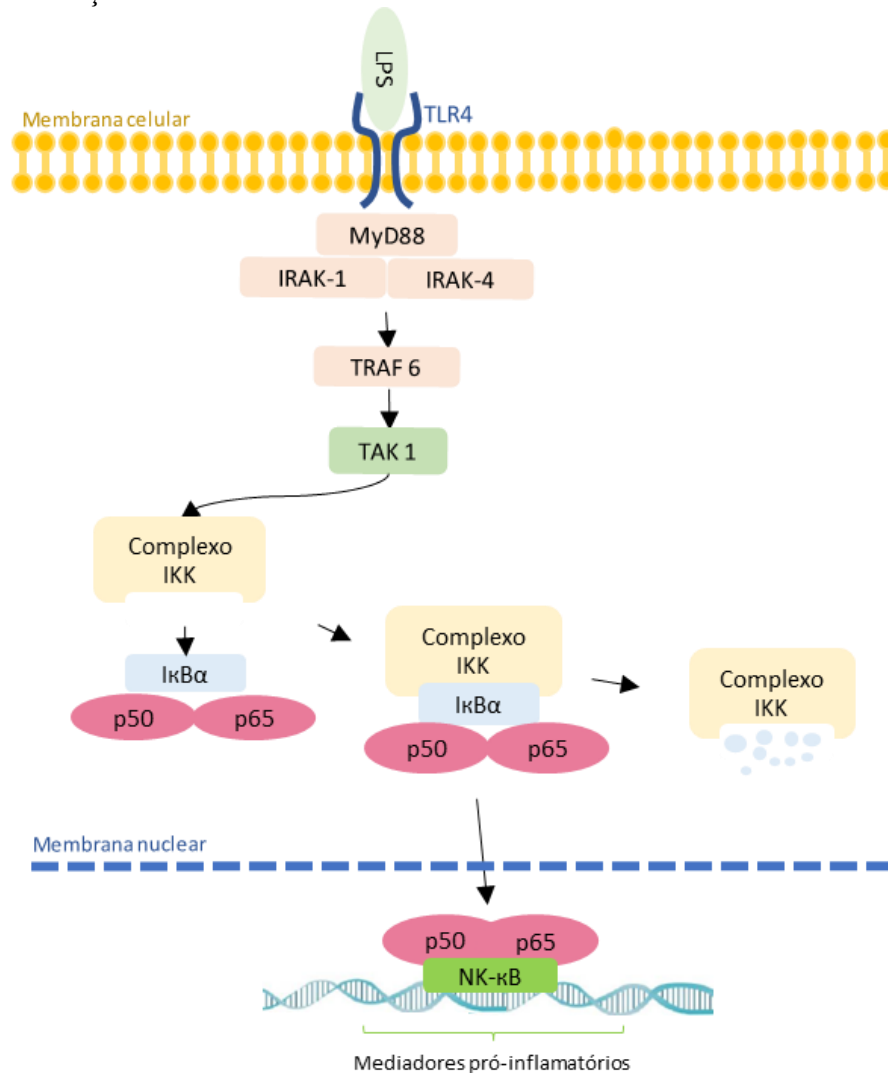


Legenda: IFN- $\gamma$ : interferon-gama; IL: interleucina; NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B; LPS: lipopolissacarídeo; STAT: sinal transdutor e ativador de transcrição; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento beta; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; CCL e CXCL: quimiocinas. Fonte: Adaptado de Yao, Xu e Jin (2019).

O NF- $\kappa$ B é um dos reguladores mais importantes na resposta inflamatória, é responsável pela indução na produção de várias proteínas envolvidas neste processo. Dois tipos de vias de sinalização do NF- $\kappa$ B são conhecidos, a via clássica (canônica) e a alternativa (não canônica). A via clássica é ativada por PAMPs, DAMPs e citocina pró-inflamatórias, já a alternativa é ativada por citocinas da família do TNF, como a linfotóxina B, o ligante de receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANKL), o ligante CD40 (CD40L), o fator ativador de células B (TANIGUCHI; KARIN, 2018). A via clássica, resulta na ativação dos dímeros p50 e p65, proteínas membros do NF- $\kappa$ B. O dímero p50/p65 é encontrado no citoplasma das células associado a proteína subunidade inibitória  $\alpha$  do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), impedindo que NF- $\kappa$ B seja translocado para o núcleo. Após o estímulo, como exemplo por

LPS, o complexo IKK fosforila especificamente a proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , assim o dímero p65/p50 é translocado para o núcleo onde irá induzir a expressão gênica (Figura 2). A sinalização clássica do NF- $\kappa$ B tem com alvos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (como TNF, IL-1 e IL-6), fatores de crescimento, quimiocinas (como CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL2, CCL5), iNOS, VEGF, moléculas de adesão e inibidores da sinalização de NF- $\kappa$ B (como I $\kappa$ B $\alpha$ ) (ZHANG; LEONARDO; BALTIMORE, 2017).

Figura 2 – Sinalização do NF- $\kappa$ B via TLR4.



Legenda: O processo inflamatório se inicia com a ligação de LPS ao receptor TLR4. Posteriormente o MyD88 se liga ao IRAK1 e IRAK4. O complexo IRAK então se dissocia do MyD88 e interage com o TRAF6. O TRAF6 forma um complexo com TAK que ativa o complexo IKK, esse induz a fosforilação I $\kappa$ B $\alpha$ , o que leva à dissociação do I $\kappa$ B $\alpha$  com o dímero p50/p65 (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B se transloca para o núcleo e medeia a expressão de vários genes de mediadores inflamatórios. IKK: proteína inibitória kappa B quinase; I $\kappa$ B $\alpha$ : subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B; LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo Toll-like 4. Fonte: Adaptado de Yang *et al.* (2016).

Dentre os mediadores que são liberados no processo inflamatório pelas células do sistema imune, destaca-se a produção óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre produzido pelas enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS), resultado da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina. Em estado normal, o organismo produz NO derivado das enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), possuindo papel importante em várias funções biológicas, incluindo vasodilatação, relaxamento do músculo liso, neurotransmissão e resposta imune (CINELLI *et al.*, 2019; LIND *et al.*, 2017). O NO liberado na resposta inflamatória é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), essa enzima no geral é estimulada por LPS e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IFN- $\gamma$ . O acionamento dos receptores de membrana, leva a fosforilação de proteínas intracelulares e posteriormente a ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e o sinal transdutor e ativador de transcrição 1 (STAT1). Com o deslocamento desses fatores para o núcleo há a ligação a regiões promotoras do gene iNOS, que induzem a sua expressão e posteriormente a produção NO (CINELLI *et al.*, 2019; KLEINERT; SCHWARZ; FÖRSTERMANN, 2003)

A produção de NO pela indução da iNOS, gera quantidades significativas deste metabólito na circulação, quantidade essa considerável para defesa contra patógenos invasores. Nessas condições, o NO exibe atividades antivirais, antimicrobianas, citotóxicas (danos ao tecido) e age de forma imunoestimuladora (pró-inflamatório) ou imunossupressora (anti-inflamatório). Em contrapartida, devido as suas características químicas, o NO tem capacidade de reagir rapidamente com outros radicais livres, como oxigênio (O<sub>2</sub>) ou superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e formar nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). A alta concentração de ERNs está associada a muitas condições patológicas, como a inflamação crônica, choque séptico, aterosclerose, diabetes e câncer (GHOSH; ERZURUM, 2011; PREDONZANI *et al.*, 2015; SHARMA; AL-OMRAN; PARVATHY, 2007). Essas condições resultam da alta difusibilidade do ONOO<sup>-</sup> através das membranas celulares, o que desencadeia lesão tecidual, oxidação de proteínas que está associado à reação entre os aminoácidos e ONOO<sup>-</sup>, resultando na formação de aminoácidos nitrados, como a nitrotirosina (WEIDINGER; KOZLOV, 2015), além de induzir a peroxidação lipídica da lipoproteína de baixa densidade (VIOLI *et al.*, 1999).

As citocinas são mediadores liberados também no processo inflamatório, e possuem papel fundamental na regulação do sistema imune. São proteínas pequenas, secretadas por quase todas as células como neutrófilos, macrófagos, monócitos, linfócitos B e T, *natural killers*, células endoteliais, epiteliais e dendríticas. O termo citocina é amplo, outros nomes mais específicos para essas proteínas são: quimiocina (citocinas com atividades quimiotáticas),



interleucina (citocinas produzidas por um leucócito atuando em outros leucócitos), linfocina (citocinas produzidas por linfócitos) e monocina (citocinas produzidas por monócitos). As citocinas possuem ação autócrina (na própria célula), parácrina (células próximas) e endócrina (células distantes) (ZHANG; NA, 2007). Quando liberadas em um processo inflamatório distinguem-se pela sua ação, como pró-inflamatória e anti-inflamatórias. Atualmente, se tem conhecimento que a liberação simultânea de citocina pró e anti-inflamatórias é de extrema importância em qualquer resposta imune, sua secreção é em cascata, assim uma citocina estimula células-alvo e induz a produção de outras citocinas (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; ZHANG; AN, 2007).

Das citocinas conhecidas podemos citar, por exemplo, as da família CC e CXC das quimiocinas, a CCL2 e CXCL1 respectivamente, sendo estas proteínas fatores quimiotáticos de células da resposta inflamatória. A proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1/CCL2) é uma quimiocina secretada por várias células, principalmente monócitos e macrófagos em resposta a citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo. Tem como função direcionar o recrutamento de monócitos, neutrófilos e linfócitos para o local da inflamação (DESHMANE *et al.*, 2009). A elevada produção de MCP-1/CCL2 está ligada com muitas doenças inflamatórias, como artrite reumatoide, aterosclerose e câncer (GONG *et al.*, 1997; PALOMINO; MARTI, 2015). Alguns estudos realizados *in vitro* em células do tipo macrófagos, no qual houve a indução da inflamação com LPS, ao inibir essa quimiocina pode-se reduzir os efeitos do processo inflamatório (LEE; PARK, 2015). Esta inibição se torna eficaz, uma vez que o excesso de células acelera o processo inflamatório, induzindo o recrutamento de mais células, resultando na liberação de vários mediadores pró-inflamatórios e lesão tissular grave (AZIZ *et al.*, 2013).

Após o recrutamento de macrófagos e neutrófilo para o sítio inflamatório, as células iniciam secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ . Os monócitos e macrófagos são os principais secretores de IL-1 $\beta$ , porém células como *natural killers*, dendrítica, epiteliais, linfócito B e fibroblasto também liberam essa citocina. A produção de IL-1 $\beta$  é induzida por vários produtos microbianos, reconhecido através dos receptores TLRs e ativação de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B, além de induzir a si mesma (DINARELLO, 2018). Diferente das outras interleucinas da família IL-1, a IL-1 $\beta$  é produzida na sua forma inativa, para que ocorra a secreção de IL-1 $\beta$  ativa pelas células, é indispensável a ativação do inflamassoma. O inflamassoma é um complexo de multiproteínas, dentre elas está a caspase-1, enzima essa conversora de IL-1 $\beta$  biologicamente inativo em ativo (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). Assim, a IL-1 $\beta$  ativa tem como função promover a liberação de histamina através dos

mastócitos, provocar vasodilatação, aumentar a expressão de moléculas de adesão em células do sistema imune e produção de quimiocinas (ARANGO-DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

A IL-6 também é classificada como uma citocina pró-inflamatória e tem sua ativação desencadeada após algum fator danoso, ela induz a produção de proteínas de fase aguda e reduz a produção de fibronectina, albumina e transferrina. A IL-6 não está envolvida só nas respostas inflamatórias e imunológicas, mas desempenha função na hematopoiese, desenvolvimento embrionário, metabolismo ósseo e em outros processos biológicos. A sua secreção é estimulada por IL-1, TNF $\alpha$ , espécies reativas de oxigênio (EROs), DAMPs e PAMPs via receptor TLR. O gene IL-6 possui vários ligantes que o expressão, incluindo o NF- $\kappa$ B (HIRANO, 2021). Muitos estudos mostram que a intensificação da produção de IL-6 pode desempenhar papel patológico e contribuir para a cronificação das doenças infamatórias, sendo um dos exemplos a produção excessiva do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), levando a angiogênese e permeabilidade vascular aumentada. Uma vez inibida, é observado uma melhora os sintomas da doença e normaliza a produção das proteínas de fase aguda (HASHIZUME *et al.*, 2009; NISHIMOTO, 2008; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Outra citocina que merece destaque é o TNF- $\alpha$  uma potente citocina liberada em resposta a um agente agressor. Seus receptores estão presentes em células de diversos órgãos, como no fígado, estimulando a produção de proteínas de fase aguda, e no hipotálamo, estimulando a liberação do hormônio liberador corticotrópico induzindo a febre (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019). O TNF- $\alpha$  é responsável pela vasodilatação e perda da permeabilidade vascular, o que influencia no aumento do número de células no local da lesão, também regulam as quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL5 e a expressão de moléculas de adesão celular. Sendo um pivô central da resposta inflamatória, sabe-se que o excesso na secreção dessa citocina leva ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal, psoríase, artrite reumatoide, asma, câncer, doenças infecciosas e outras doenças autoimunes (ARANGO-DUQUE; DESCOTEAUX, 2014). Estudos publicados, demonstraram que em células neuronais a inibição de TNF- $\alpha$  leva ao alívio da dor, bem como, a utilização de antagonistas levam a uma melhora de doenças inflamatórias como psoríase, doença de Crohn ou artrite reumatoide (ZHANG; AN, 2007).

As citocinas pertencentes a família dos interferons (INF) são divididas em três classes, INF tipo I, II e III. Dentre o tipo I, duas citocinas possuem maior relevância, INF- $\alpha$  e INF- $\beta$ , no INF tipo II apenas uma única citocina, INF- $\gamma$ . O termo interferon, originou-se há muito tempo, devido a comprovação da capacidade dessas citocinas em inibir a replicação viral. O INF- $\gamma$  possui um papel importante na ativação de macrófagos tanto na resposta imune inata quando

adaptativa. As principais células que secretam essa citocina incluem, *natural killer*, linfócitos T, macrófagos e dendríticas. A ativação de IFN- $\gamma$  no processo inflamatório, facilita a expressão de iNOS e a produção de citocinas pró-inflamatórias (KAK; RAZA; TIWARI, 2018; ROMERO *et al.*, 2010).

A resolução da inflamação é alcançada devido a produção de mediadores com características anti-inflamatórias, como por exemplo a secreção das citocinas IL-4 e IL-13. As interleucinas IL-4 e IL-13 são encontradas adjacentes uma à outra no cromossomo 5 em humanos, suas funções são muito parecidas, atuam em respostas imunes do tipo 2, incluindo a diferenciação de células T CD4 em Th2, produção de IgE e polarização de macrófagos M1 para M2 (BAO; REINHARDT, 2015; HEEB; EGHOLM; BOYMAN, 2020). A diferenciação em células Th2 por IL-4 e IL-13 é regulada pela indução da fosforilação do sinal transdutor e ativador de transcrição 6 (STAT6), levando a produção de citocinas do tipo 2 (OUYANG *et al.*, 2000; BAO; REINHARDT, 2015). Tanto a IL-4 quanto a IL-13 estão ligadas a diminuição de vários mediadores inflamatórios e de dor, como a IL-1 $\beta$ , NO, TNF- $\alpha$  e prostaglandina E2. São secretadas por diversas células imunológicas como as células T ativadas, mastócitos, basófilos, eosinófilos e células *natural killer* (HART *et al.*, 1989; VANDERWALL; MILLIGAN, 2019).

### 1.1.2 SEPSE E CHOQUE SÉPTICO

No ano de 1991, foi realizada a primeira conferência de consenso do *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* em Northbrook, para elaborar uma definição para a sepse, e ficou estabelecido que a sepse resultava da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) à uma infecção, sendo adotado como critérios clínicos: temperatura  $> 38$  °C ou  $< 36$  °C, frequência cardíaca  $> 90$ /min, frequência respiratória  $> 20$ /min ou PaCO<sub>2</sub>  $< 32$  mmHg, contagem de glóbulos brancos  $> 12000$ /mm<sup>3</sup> ou  $< 4000$ /mm<sup>3</sup> ou  $> 10\%$  de formas imaturas. Nesta mesma conferência foi elaborado também definições para a sepse grave, classificando como uma disfunção orgânica secundária a sepse com acidose láctica, oligúria ou alteração do estado mental, e o choque séptico como sendo uma instabilidade cardiovascular persistente com a necessidade de administração de vasopressores (BONE *et al.*, 1992).

Em 2001 uma nova conferência ocorreu, e esta expandiu os critérios de diagnósticos para sepse, mas não mudou sua definição. Esses critérios estabelecidos foram a febre (temperatura  $> 38,3$  °C), hipotermia (temperatura  $< 36$  °C), frequência cardíaca  $> 90$  bpm;

taquipneia > 30 bpm, estado mental alterado, edema significativo (> 20 mL/kg/24h), hiperglicemia (> 110 mg/dL), leucocitose (> 12000/ $\mu$ L) ou leucopenia (< 4000/ $\mu$ L) ou > 10% de formas imaturas, proteína C reativa (> 2 DP acima do valor normal), e procalcitonina (> 2 DP acima do valor normal), hipotensão arterial (pressão arterial sistólica < 90 mmHg, saturação de oxigênio > 70%, hipoxemia arterial PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> < 300); oligúria aguda, aumento da creatinina, anormalidades da coagulação, trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100000/ $\mu$ L), hiperbilirrubinemia, hiperlactatemia (> 3 mmol/L) e aparecimento de manchas. Nessa mesma conferência propuseram também o sistema P.I.R.O. (do inglês P – *predisposition*; I – *infection*; R – *inflammatory response*; O – *organ dysfunction*), assim categorizando o paciente quanto aos fatores que causam predisposição a sepse, o agente agressor, o grau da disfunção orgânica e as respostas inflamatórias desencadeadas pelo hospedeiro. Também estabeleceram os novos critérios para o choque séptico em adultos e crianças, no qual em adultos é uma insuficiência circulatória caracterizada por hipotensão persistente (pressão arterial sistólica < 90 mmHg, pressão arterial média < 60 ou redução da pressão arterial sistólica > 40 mmHg) e em crianças é definido como uma taquicardia apresentando diminuição da perfusão, alerta alterado, manchas, extremidades frias e oligúria (LEVY *et al.*, 2003).

Com todos os avanços científicos que se tem sobre a sepse e o melhor entendimento sobre biologia celular, bioquímica, imunologia, hematologia e fisiopatologia levou as diversas mudanças na definição da sepse e choque séptico, o que contribui para um melhor diagnóstico e tratamento (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019). Assim, em 2014 diversos especialistas no assunto reuniram e propuseram novas definições sobre sepse e choque séptico, o documento é conhecido como *Sepsis-3* e substitui as definições implantadas nos documentos publicados em 1992 e 2003. Portanto, atualmente a sepse é definida como uma disfunção orgânica que gera risco para a vida, desenvolvida por uma resposta desregulada a uma infecção. Já o choque séptico é um estado onde há um risco maior de mortalidade do que na sepse, anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas apresentam uma maior intensidade (SINGER *et al.*, 2016).

Para um melhor manejo clínico e a avaliação da disfunção dos órgãos causada na sepse, o documento *Sepsis-3* utiliza a Avaliação Sequencial de Falências de Órgãos (*Sequential Organ Failure Assessment* – SOFA), sendo que um aumento de 2 ou mais pontos no escore do SOFA está associado a uma maior mortalidade dos pacientes (SINGER *et al.*, 2016). O SOFA é baseado em seis escores diferentes, abordando os sistemas respiratórios, da coagulação, hepático, cardiovascular, neurológico e renal (Tabela 1). Cada escore possui uma pontuação que vai de 0 a 4 pontos e o aumento é proporcional a disfunção ou falha dos órgãos. O objetivo

do SOFA não é prever o desfecho dos pacientes, embora esteja ligado que o aumento do escore leve a uma maior mortalidade destes, mas sim, avaliar a falência dos órgãos (LAMB DEN *et al.*, 2019). O SOFA é um sistema muito utilizado na terapia intensiva, porém muitos profissionais da saúde desconhecem ou não sabem utilizar, para isso foi desenvolvido na conferência *Sepsis-3* o *quick* SOFA (qSOFA), uma ferramenta mais simples que pode ser facilmente utilizada em ambientes extra-hospitalar, emergências ou enfermarias. O qSOFA avalia três parâmetros clínicos, frequência respiratória  $\geq 22$ /min, escala de coma de Glasgow  $< 15$  ou pressão arterial sistólica  $\leq 100$  mmHg, se o paciente apresentar pelo menos 2 desses critérios o profissional da saúde deve investigar melhor a disfunção dos órgãos e avaliar o encaminhamento para terapia intensiva.

Tabela 1 – Pontuação da avaliação sequencial de falências de órgãos na sepse.

Sistemas	Pontuação				
	0	1	2	3	4
<b>Respiratório</b>					
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> (mmHg)	$\geq 400$	$< 400$	$< 300$	$< 200$ com suporte ventilatório	$< 100$ com suporte ventilatório
<b>Coagulação</b>					
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	$\geq 150$	$< 150$	$< 100$	$< 50$	$< 20$
<b>Hepático</b>					
Bilirrubina (mg/dL)	$< 1,2$	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	$> 12,0$
<b>Cardiovascular</b>					
	PAM $\geq 70$ mmHg	PAM $< 70$ mmHg	Dopamina $< 5$ ou dobutamina (qualquer dose) ( $\mu$ g/kg/min)	Dopamina 5,1 – 15 ou epinefrina $\leq 0,1$ ou norepinefrina $\leq 0,1$ ( $\mu$ g/kg/min)	Dopamina $> 15$ ou epinefrina $> 0,1$ ou norepinefrina $> 0,1$ ( $\mu$ g/kg/min)
<b>Neurológico</b>					
Escala de coma de Glasgow	15	13 -14	10 - 12	6 - 9	$< 6$
<b>Renal</b>					
Creatinina (mg/dL)	$< 1,2$	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	$> 5,0$
Volume urinário (mL/dia)				$< 500$	$< 200$

Legenda: PaO<sub>2</sub>: pressão parcial de oxigênio; FIO<sub>2</sub>: fração de oxigênio inspirado; PAM: pressão arterial média; Fonte: Singer *et al.* (2016).

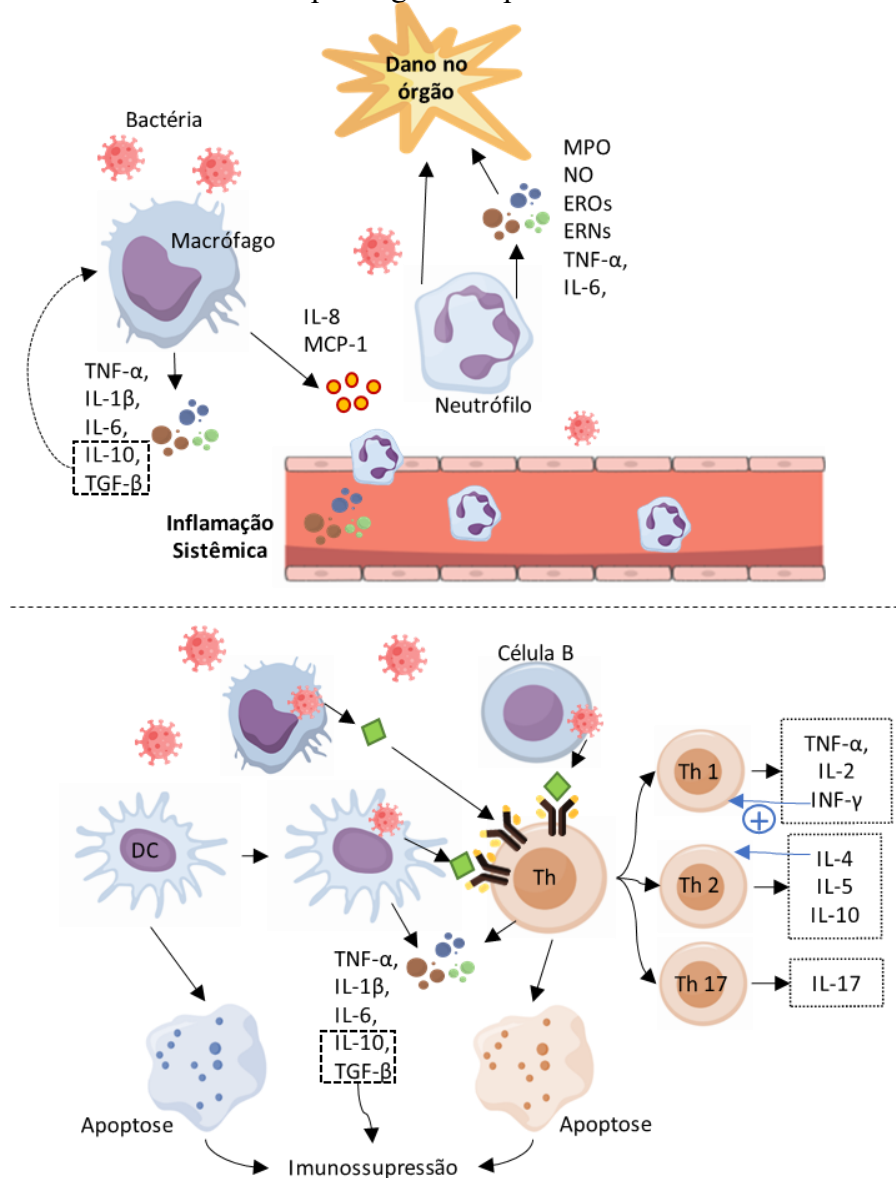
O choque séptico é definido pela *Sepsis-3* como um subconjunto da sepse e está associado a um maior risco de morte. Para diagnosticar um paciente com choque séptico, estes devem apresentar a necessidade do uso de vasopressores para manter uma pressão arterial média de 65 mmHg ou superior e o nível de lactato sérico superior a 2 mmol/L (> 18 mg/dL) na ausência de hipovolemia. Os critérios clínicos adotados para a conclusão do choque séptico foram hipotensão e hiperlactatemia, uma combinação no qual é possível detectar disfunção celular e cardiovascular, e isso leva a um aumento da mortalidade dos pacientes (EVANS, 2018; SINGER *et al.*, 2016).

Ao longo dos anos, com uma melhor compreensão da fisiopatologia da sepse aprimorou-se a capacidade da sua definição, bem como os estudos epidemiológicos e farmacológicos tiveram grandes avanços. Por muito tempo se acreditava que a sepse levava a uma resposta inflamatória desproporcional ao agente infeccioso, e isso era a patogênese central da doença, atualmente sabe-se que além da resposta inflamatória excessiva também há uma imunossupressão, desregulação da homeostasia e disfunção celular (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; POLL *et al.*, 2017).

Como toda resposta inflamatória, na sepse também há inicialmente uma ativação do sistema inato do hospedeiro. Células como leucócitos, células epiteliais e endoteliais reconhecem os patógenos através dos PAMPs, resultando na ativação de vias de transdução e sinalização intracelular, o que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-8 e MCP-1, além de mediadores que danificam o tecido, como NO, EROs e ERNs. As citocinas ativam leucócitos, sistema do complemento, moléculas de adesão e as proteínas de fase aguda. Posteriormente a essa fase, em um processo inflamatório normal a homeostase é retomada, no entanto, na sepse a resposta imune é exacerbada e não resolvida (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; POLL *et al.*, 2017). Nessa inflamação exacerbada ocorre a liberação DAMPs como adenosina trifosfato (ATP) e DNA mitocondrial, liberados de células mortas ou danificadas, esses DAMPs podem ativar muitos PRRs, o que resulta em um ciclo vicioso, com ativação imunológica e disfunção orgânica (POLL *et al.*, 2017). As células dendríticas após contato com o patógeno, apresentam o antígeno as células linfócitos T naive (Th), essas proliferaram e se diferenciam em Th1, Th2 e Th17. As células Th1 produzem TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e leucotrienos, por outro lado as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, citocinas imunomoduladoras. Um desequilíbrio entre a produção das citocinas Th1 e Th2 levam a uma supressão imunológica, observada em estágios avançados da sepse. Da mesma maneira, a produção de citocinas IL-17 pelas células Th17, são responsáveis pela indução da produção de citocinas pró-inflamatória, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , esse

desequilíbrio aumenta a probabilidade do hospedeiro de adquirir infecções hospitalares e o não retorno da homeostase (Figura 3) (AZIZ *et al.*, 2013).

Figura 3 – O sistema imune na fisiopatologia da sepse.



Legenda: Após a invasão do patógeno, os macrófagos liberam citocinas pró-inflamatórias. Essas células também liberam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , que contrabalançam a respostas imunológicas excessivas. Patógenos bacterianos e mediadores pró-inflamatórios promovem a ruptura da barreira epitelial, exacerbando a inflamação. As quimiocinas, como IL-8 e MCP-1, ativam e promovem a migração de neutrófilos para o local da inflamação. Os mediadores liberados por neutrófilos intensifica a lesão em órgãos. As células DCs imaturas se transformam em sua forma madura e apresentam antígenos para as células T, assim como os macrófagos. As células T ativadas se diferenciam em incluem Th1, Th2 e Th17, gerando perfis de citocinas distintos. As DCs também podem produzir citocinas pró e anti-inflamatórias. Na sepse, as células imunes sofrem apoptose, levando a um ambiente imunossupressor. IFN- $\gamma$ : interferon-gama; IL, interleucina; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; TGF- $\beta$ : fator transformador de crescimento beta; NO: óxido nítrico; MPO: mieloperoxidase; EROs: espécies reativas de oxigênio; ERNs: espécies reativas de nitrogênio; MCP-1: proteína quimiotática de monócito-1. DC: células dendríticas; Th: células T. Fonte: Adaptado de Aziz *et al.* (2013).

A ativação do complemento também é um componente essencial da imunidade para remover um agente agressor, no entanto na sepse essa ativação leva a danos teciduais e eventos trombóticos. O dano exacerbado no endotélio, proteínas bacterianas e citocinas inflamatórias ativam o fator tecidual, que aciona a via extrínseca da coagulação sanguínea. O estado protrombótico que ocorre na sepse leva a uma coagulação intravascular disseminada e ao bloqueio da microvasculatura, esse bloqueio vascular obstrui o fluxo sanguíneo o que leva a hipóxia e a falência dos órgãos e isso está associado com uma maior mortalidade dos pacientes sépticos (CHANG, 2019).

A sepse e o choque séptico são considerados doenças fatais que acomete o mundo todo, sendo a principal causa de morte nas unidades de terapias intensivas (UTIs). No Brasil, não se sabe ao certo a quantidade de pacientes com sepse. Estima-se que 30% dos leitos são destinados a pacientes com choque séptico ou sepse, ainda o Instituto Latino-Americano para Estudos da SEPSE (ILAS) estima que a letalidade seja próxima aos 50% (VIANA; MACHADO; SOUZA, 2017). Essas condições elevam os gastos hospitalares, e está diretamente ligado a gravidade do quadro de sepse. Nos Estados Unidos, a sepse é considerada uma das principais causas dos gastos hospitalares, com aproximadamente US\$ 24 bilhões por ano (RUDD *et al.*, 2020). No Reino Unido, estima-se que é gasto anualmente £ 15,6 bilhões com sepse e conta com aproximadamente 52.000 mortes (DANIELS *et al.*, 2019). No Brasil, um estudo realizado mostrou que custo total de um hospital para pacientes diagnosticados com sepse ou choque séptico durante um ano foi de R\$ 3.692.421,00 com média de R\$ 38.867,60 por paciente (BARRETO *et al.*, 2016).

Recentemente um estudo abordou a incidência e mortalidade em 195 países ocasionada pela sepse entre os anos de 1990 e 2017. Os resultados mostraram que houve uma redução de 18,8% nos casos de sepse e 29,7% no número de mortes entre os anos avaliados, sendo que 2017 apresentou uma estimativa de 48,9 milhões de casos e 11,0 milhões de mortes. A causa mais comum de sepse, independentemente da idade ou sexo, foram as doenças diarreicas e a causa de morte foram as infecções respiratórias. Entre todos os casos de sepse a maior incidência é no sexo feminino, com 26,2 milhões de casos, já o número de óbitos ocorre no sexo masculino, com 5,8 milhões de mortes. A maior incidência ocorre em países com índice socioeconômico médio baixo, representando 41,5 milhões dos casos em 2017 (RUDD *et al.*, 2020).

Para o tratamento da sepse não há uma medicação específica, e sim um combinado de diferentes terapias, como antimicrobianas, anti-inflamatórias, vasopressoras além do tratamento da patologia de base (THOMPSON; VENKATESH; FINFER, 2019). A primeira linha de



tratamento para os casos de sepse são os antimicrobianos, eles devem ser iniciados logo após diagnóstico. Devem ser administrados antibióticos de amplo espectro, com o objetivo de tratar todos os patógenos possíveis (DUGAR; CHOUDHARY; DUGGAL, 2020). Dentre os fármacos com ação anti-inflamatória utilizados na sepse estão os glicocorticoides, estes também possuem ação imunossupressora (BECKER, 2013). Os glicocorticoides são sintetizados de forma endógena pela glândula suprarrenal e possuem atividades no metabolismo de carboidratos e de proteínas, além disso possuem efeitos na regulação do mecanismo de defesa do organismo. Dentre os glicocorticoides exógenos mais conhecidos estão a hidrocortisona, prednisona e dexametasona. Possuem ação inibitória no processo inflamatório, atuando na redução da síntese dos mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e interleucinas, recrutamento de células e inibição dos genes responsáveis pela expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS. Essa inibição ocorre por exemplo, pela interação do corticoide com fatores de transcrição nuclear, como o NF- $\kappa$ B e proteína ativadora 1 (AP-1), impedindo que eles se desloquem até o núcleo das células e que ocorra a expressão dos genes que codificam a maioria dos mediadores pró-inflamatórios (ANNANE *et al.*, 2019; WILLIAMS, 2018). Os corticoides são amplamente utilizados em pacientes com doença de Addison, em alergias, rinite, conjuntivite, eczema, artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, anemias hemolíticas, neoplasias, doença do enxerto *versus* hospedeiro e redução de edema cerebral (TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019).

Na sepse os glicocorticoides inicialmente eram usados em altas doses para o controle do processo inflamatório, mas com o decorrer dos anos foi verificado que a redução da dose e um maior tempo de administração aumentou a sobrevida dos pacientes (GYAWALI; RAMAKRISHNA; DHAMOON, 2019; VENKATESH *et al.*, 2018). Dentre os glicocorticoides utilizados na sepse está a dexametasona, no entanto ainda não se tem conclusões significativas quanto ao uso da mesma no tratamento da sepse e choque séptico (ANNANE *et al.*, 2019; THOMPSON; MARIK, 2019). No ano de 2018, foi publicado um estudo clínico randomizado, que utilizou 3.658 pacientes com sepse, no qual foi administrado infusão intravenosa de hidrocortisona (200 mg/dia) em 1.832 pacientes. Esse estudo foi realizado em hospitais da Austrália, Reino Unido, Nova Zelândia, Arábia Saudita e Dinamarca. Após 90 dias do início do estudo, não foi possível observar diferença entre a mortalidade dos pacientes incluídos no grupo tratado e grupo controle (placebo). Entretanto, foi evidenciado uma melhora na resolução do choque séptico, menor quantidade de transfusões sanguíneas, redução no tempo de

permanência na UTI e o tempo médio para a cessar a ventilação mecânica no grupo tratado (VENKATESH *et al.*, 2018)

Em uma revisão sistemática, realizada para avaliar o uso de glicocorticoides em crianças e adultos com sepse e choque séptico, incluíram 61 estudos clínicos randomizados, no qual obteve um número de 12.192 participantes. Em conclusão geral obtida pela revisão, os corticosteroides reduzem a mortalidade por todas as causas analisadas em 28 dias e 90 dias, além de reduzir o tempo de internação na UTI e hospital. Os autores declaram a evidência de certeza moderada, pois de todos os estudos analisado, apenas 19 foram julgados como baixo risco de viés. Em relação aos diferentes corticoides avaliados (hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona e dexametasona), não foi encontrado diferença entre os grupos na mortalidade dos pacientes e nenhum dos ensaios incluídos definiu a sepse pelo documento *Sepsis-3* (ANNANE *et al.*, 2019). Em outro estudo realizado recentemente também por revisão sistemática, 12.304 pacientes foram incluídos através dos artigos selecionados, dos quais foram tratados com hidrocortisona, hidrocortisona mais fludrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, dexametasona e betametasona. Os resultados dessa revisão mostraram que o uso de corticoides não reduziu a mortalidade dos pacientes em 28 dias, para os estudos que incluíram esse tempo de tratamento, porém na análise dos demais estudos resultou em uma diminuição significativa na mortalidade intra-hospitalar e na UTI, além de um aumento de dias sem vasopressor, tempo sem ventilação, reversão do choque nos dias 7 e 28. Ainda, o estudo verificou que uma dose de 200 mg/dia ou menos de corticoides promoveu resultados mais benéficos, o que faz considerar que alterações em dose e tempo de administração (iniciar mais cedo) desses fármacos podem melhorar a sobrevivência dos pacientes. No entanto, alguns estudos analisados possuíam potencial risco de viés, o que direciona que estudos clínicos mais detalhados ao uso de corticoides devem ser realizados para sepse e choque séptico (LIANG *et al.*, 2021).

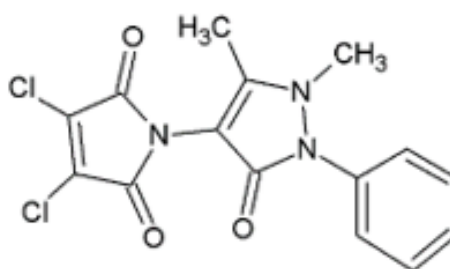
### 1.1.3 IMIDAS CÍCLICAS

Os compostos pertencentes a classe das imidas cíclicas possui o grupo  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$ . O radical (R) pode ser um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou grupo arila. Esses compostos podem ser divididos em subclasses (maleimidias, succinimidias, glutarimidias, ftalimidias, naftalimidias etc.) e seus respectivos derivados (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003). Essa classe de compostos possui várias propriedades biológicas, como antibacteriano, antifúngico, antiviral, analgésico, antitumoral, anti-inflamatórias, ansiolíticas, antidepressivas,

anticonvulsivantes e relaxantes musculares (AZZAWI; AL-OBIADI, 2016; de CAMPOS *et al.*, 2002; KHALIL; BERGHOT; GOUDA, 2010; NEHA; WAKODE, 2021; ROSOLEN *et al.*, 2015; YUNES *et al.*, 2008). Em sua revisão, Neha e Wakode (2021) apresentaram diversos compostos cíclicos com atividade anti-inflamatória, entre eles, as imidas cíclicas. Os estudos demonstraram, que esses compostos possuíram atividade inibitória seletiva para COX-2 em estudos realizados *in vivo* e de *docking* molecular (ABDEL-AZIZ *et al.*, 2020; ABDEL-AZIZ; ELTAHIR; ASIRI, 2011). Em outro estudo, realizado *in vitro* em macrófagos, compostos derivados da maleimida e anidrido maleico isolados da espécie de fungo *Antrodia cinnamomea*, apresentaram potencial de inibição na produção de NO pelos macrófagos quando estimuladas com LPS (WU *et al.*, 2008, 2013).

O composto N-antipirina-3,4-dicloromaleimida (Figura 4) é um produto sintético obtido diretamente pela reação de anidrido 3,4-dicloromaleico e aminofenazona com ácido acético sob refluxo. Este apresentou efeito antinociceptivo usando o modelo de contorção induzido por ácido acético a 10 mg/kg, administrado por via intraperitoneal e no teste da dor induzida por formalina (de CAMPOS *et al.*, 2002). Em outro estudo, demonstraram que N-antipirina-3,4-dicloromaleimida possui atividade antinociceptiva avaliado em teste *in vivo* induzida por carragenina. Além disso, foi observado que o glutamato ou seus receptores (inotrópicos e metabotrópicos) estão envolvidos nos efeitos antinociceptivos (QUINTÃO *et al.*, 2010).

Figura 4 – Estrutura química do composto N-antipirina-3,4-dicloromaleimida.



Fonte: Fonte: Mahle *et al.* (2010).

Mahle *et al.* (2010) sintetizaram vinte e dois compostos através da reação da N-antipirina-3,4-dicloromaleimida com aminas específicas em etanol, sob agitação, *overnight* em temperatura ambiente, todos os compostos obtiveram rendimentos satisfatórios. Quatro dessas moléculas (N-antipirina-3-cloro-4-(4-cloroanilina)maleimida, N-antipirina-3-cloro-4-(4-bromoanilina)maleimida, N-antipirina-3-cloro-4-(4-fluoroanilina)maleimida, N-antipirina-3-

caloro-4-(4-cloro-3-nitroanilina)maleimida) apresentaram resultados promissores de atividade antinociceptiva e seis derivados (N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida, N-antipirina-3-cloro-4-(4-bromoanilina)maleimida, N-antipirina-3-cloro-4-(4-fluoroanilina)maleimida, N-antipirina-3-cloro-4-(4-etilanilina)maleimida, N-antipirina-3-cloro-4-(4-benzilamina)maleimida) exibiram atividade contra fungos patogênicos, com valores de concentração inibitória mínima entre 40 e 100 mg/mL.

#### 1.1.4 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

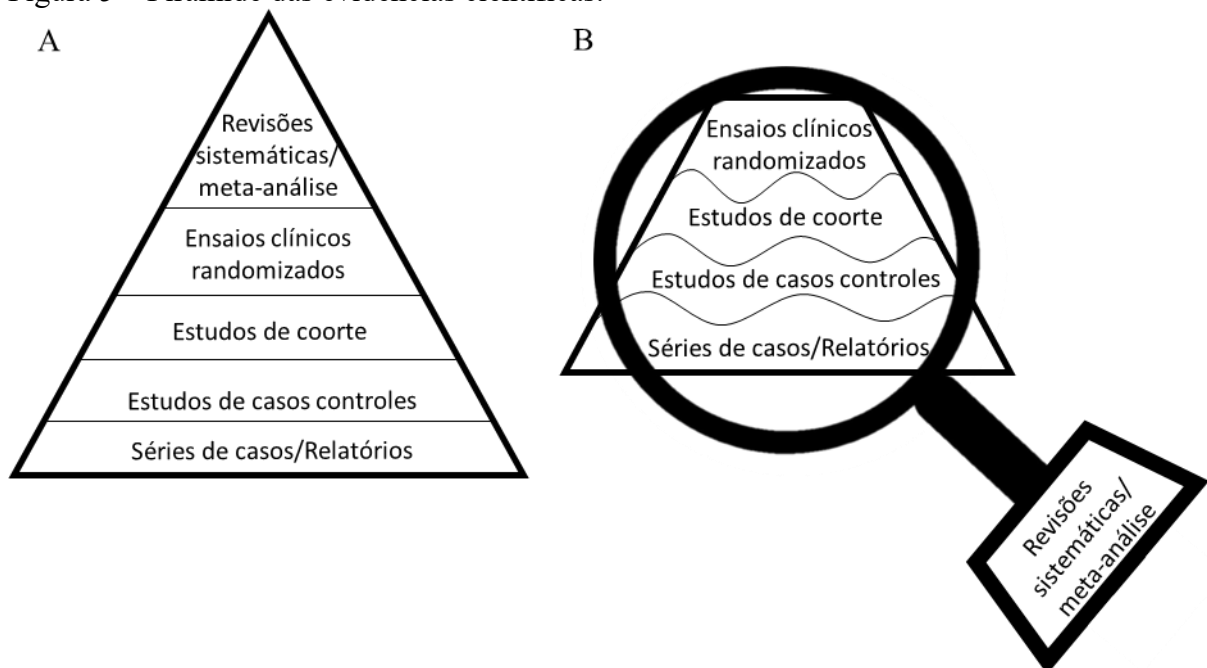
As revisões da literatura são métodos de pesquisa que utilizam informações de resultados já publicados, principalmente em periódicos, e tem como objetivo fundamentar ou responder uma pergunta. Dentre os tipos de revisões temos as narrativas e as sistemáticas (ROTHER, 2007). Esses dois tipos de revisões diferem entre si, principalmente pela elaboração da pergunta de pesquisa, pelo modo de busca dos artigos que compõe a revisão, pela avaliação de risco de viés e a análise dos artigos selecionados (UMAN, 2011).

As revisões sistemáticas são utilizadas para compilar e sintetizar as evidências de estudos primários de uma forma onde se tenha uma precisão e confiabilidade nos resultados. As maiores produções são de ensaios clínicos randomizados, porém há um aumento também nas revisões de trabalhos de coorte, caso-controle, transversal, série e relato de casos. As revisões sistemáticas além de atualizar um determinado assunto, também fornecem informações para possíveis mudanças de protocolos clínicos e instigam a realização de novas pesquisas (BRASIL, 2012; GALVÃO; PEREIRA, 2014; HIGGINS *et al.*, 2011; LIBERATI *et al.*, 2009). As revisões sistemáticas, tem como características responder uma pergunta específica de pesquisa, usar métodos sistemáticos e critérios de elegibilidade para selecionar os estudos primários, avaliar os riscos de viés de cada estudo, apresentar de forma sistemática as características dos resultados que foram incluídos e quando possível utilizar métodos estatísticos (meta-análise) (LIBERATI *et al.*, 2009). O termo meta-análise é usado quando em uma revisão sistemática é empregado análise estatística para gerar um único efeito, utilizando dois estudos ou mais. Em muitas revisões é empregado a meta-análise, mas algumas não, dependendo do estudo não é recomendado utilizar o método estatístico, isso pode até gerar conclusões errôneas. Geralmente a meta-análise é conduzida em ensaios clínicos randomizados, por fornecerem um alto nível de evidência (AHN; KANG, 2018; BRASIL, 2012).

A Saúde Baseada em Evidências já é usada há muito tempo pelos profissionais da saúde, para isso são utilizados sistemas que estabelecem o nível e a força da evidência. Essas

evidências são classificadas em diferentes níveis dependendo do desenho do estudo e o impacto de cada um. A visualização mais comum dos níveis de evidência é em formato de pirâmide, comumente conhecida como pirâmide da evidência (Figura 5A). O grau de evidência é menor na base da pirâmide e cresce de forma gradual até o topo, onde temos os estudos com maior grau de evidências. Na base da pirâmide estão os estudos de ciência básica (experimental) e de casos, seguidos de caso-controle, coorte, ensaios clínicos randomizados e no topo as revisões sistemáticas e meta-análise. No entanto, dependendo do estudo, ele pode ter algum risco de viés, mesmo sendo um ensaio clínico randomizado, que estaria mais ao topo da pirâmide, enquanto em um estudo de coorte pode ter menos risco de viés, assim, uma nova proposta de pirâmide foi elaborada. No lugar de linhas retas que separa cada tipo de estudo, foi adicionado linhas onduladas, que representam os diferentes estudos indo para cima e para baixo com base na qualidade da evidência. Outra mudança, foi a retirada da revisão sistemática e a meta-análise do topo da pirâmide, e colocadas em forma de lupa sobre todos os outros tipos de estudo primários (Figura 5B), isso representa como os estudos dever ser avaliados e aplicados, uma vez que a revisão sistemática e meta-análise são sínteses de estudos primários (MURAD *et al.*, 2016).

Figura 5 – Pirâmide das evidências científicas.



Fonte: Adaptado de Murad *et al.* (2016).

Nos últimos anos, diversas revisões sistemáticas foram elaboradas, a fim de extrair com mais precisão os dados que diariamente são produzidos e publicados na área da saúde.

Porém, uma revisão que apresenta uma qualidade elevada, deve ser desenvolvida seguindo alguns passos. Para isso temos Manual Cochrane de Revisões Sistemáticas da Intervenção (HIGGINS *et al.*, 2011) e os Principais Itens para Relatar uma Revisão Sistemática e Meta-análise (PRISMA) (PAGE *et al.*, 2021).

O primeiro passo para realizar uma revisão sistemática é definir uma pergunta de pesquisa, a especificação detalhada da pergunta requer vários componentes-chave, no qual podem atender o acrônimo PICO (População, Intervenção, Comparação e Desfecho [do inglês *outcome*]) (AHN; KANG, 2018; HIGGINS *et al.*, 2021). A população, representa quem será avaliado no estudo, a quem se destinam os resultados da revisão que está sendo realizada. A intervenção deve ser bem definida e descrita, para que não ocorra tendenciosidades no estudo, já a comparação pode ser uma terapia ou placebo. O desfecho ou resultado, é o que cada estudo encontra no final da sua análise, geralmente é avaliado a mortalidade, complicações ou alta hospitalar (BARBOSA *et al.*, 2019).

Toda revisão sistemática deve ser registrada em uma base de dados com o intuito de diminuir o risco de viés e duplicidade de publicação de um mesmo tema. Nessa base, o pesquisador também consegue visualizar um panorama dos estudos que estão em andamento. Dentre as bases de registros de protocolos temos o PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*), a qual foi disponibilizada no ano de 2011 e já é recomendado por muitos periódicos na área da saúde (PACHECO *et al.*, 2018; HIGGINS *et al.*, 2021).

Após definir a pergunta e registrar a revisão, deve-se definir a estratégia de busca, ou seja, as palavras-chaves e as bases de dados que a pesquisa será feita. Deve ser elaborado também os critérios de inclusão/exclusão, para que ocorra a seleção dos artigos. A pesquisa geralmente é iniciada com a leitura dos títulos a cegas por pares de revisores, posteriormente é realizada a leitura dos resumos e por fim o trabalho na íntegra. A extração dos dados é um passo muito importante para o desenvolvimento da revisão, deve ser feita no mínimo por dois pesquisadores para ter mais transparência em todo o processo e menos tendenciosidades, se houver divergência entre os dois, um terceiro pesquisador pode resolver a discrepância ou por consenso dos pares. Os dados coletados devem ser precisos, completos e acessíveis para futuras atualizações da revisão e para compartilhamento de dados (AHN; KANG, 2018; BARBOSA *et al.*, 2019; HIGGINS *et al.*, 2021).

Posteriormente, é necessário avaliar a qualidade das evidências, ou seja, o risco de viés que cada trabalho selecionado pode apresentar. Para avaliar esses riscos, são utilizadas ferramentas previamente elaboradas, como o Rob 2 da *Cochrane* utilizada para estudos clínicos randomizados. O Rob 2 classifica os riscos em: viés decorrente do processo de randomização,

viés devido a desvio das intervenções pretendidas, viés devido à falta de dados de resultado, viés na medição do resultado e viés na seleção do relato (HIGGINS *et al.*, 2021). Outra ferramenta utilizada para avaliação do viés de relato é a *Consort Statement*, no qual os pesquisadores devem sinalizar se os estudos incluídos na revisão apresentam ou não um risco de viés, a lista é composta de trinta e sete itens (SCHULZ; ALTMAN; MOHER, 2010). Outras ferramentas de análise de riscos também são conhecidas, como o ROBINS-1 utilizado em estudos de intervenções não randomizados, o GRADE, que avalia a qualidade da evidência para cada desfecho, ferramentas disponíveis para estudos observacionais como STROBE e o próprio PRISMA para avaliar revisões (AHN; KANG, 2018; BARBOSA *et al.*, 2019; HIGGINS *et al.*, 2021; PAGE *et al.*, 2021). Esta análise de risco gera uma maior confiabilidade dos estudos, se eles forem tendenciosos o resultado da revisão também não será definitivo, o que instiga a realização de mais estudos que apresentem um menor risco de viés para responder à pergunta de pesquisa que foi proposta. As conclusões que são geradas em uma revisão sistemática de qualidade, fornecem uma maior confiança para tomar decisões na prática clínica, proporcionando novas estratégias para a saúde e da base para futuras pesquisas (AHN; KANG, 2018; BARBOSA *et al.*, 2019).

**CAPÍTULO 2**  
**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DA N-ANTIPIRINA-3,4-**  
**DICLOROMALEIMIDA E SEUS DERIVADOS EM MODELO *IN VITRO***



## 2.1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório compreende em uma cascata de eventos que funcionalmente é iniciada pelo organismo em resposta a algum agente agressor, sendo induzido mecanicamente, quimicamente ou biologicamente. Esse processo é caracterizado pelas fases de indução, pico e resolução da inflamação (NETEA *et al.*, 2017; SCHETT; NEURATH, 2018). A resposta ao agente agressor inicia com o seu reconhecimento, mediado por PRRs, esse podem ser da classe dos PAMPs e/ou DAMPs (STYLIANOU, 2018). Os sinais da inflamação quando persistentes e não resolvido, não são apenas típicos de doenças inflamatórias clássicas, mas também uma característica de várias condições humanas como a doença de Alzheimer, aterosclerose, doenças cardiovasculares e câncer (SUGIMOTO *et al.*, 2016). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), seis em cada dez adultos na América têm uma doença crônica, tendo um gasto de aproximadamente US \$ 3,5 trilhões anualmente (CDC 2018). As doenças com maior prevalência mediadas por inflamação crônica são a diabetes, doenças cardiovasculares, artrite e doenças articulares, alergias e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (PAHWA *et al.*, 2020).

O uso de medicamentos para combater a inflamação são conhecidos há séculos. Hoje em dia muitos desses medicamentos anti-inflamatórios estão disponíveis no mercado, sendo estes oriundos de produtos naturais ou sintéticos, quimicamente classificados como agentes esteroidais e não esteroidais (HANKE *et al.*, 2016). Entre janeiro de 1981 a setembro de 2019, cinquenta e três novos compostos tiveram indicação para o tratamento de doenças inflamatórias, sendo destes, trinta e oito eram de origem sintética (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Nesse contexto, tem crescido o estudo das imidas cíclicas e seus análogos, fato relacionado ao vasto potencial de aplicações desses compostos no campo da farmacologia. Os compostos pertencentes a classe das imidas cíclicas, podem ser divididos em subclasses como maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas e seus respectivos derivados (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003). O composto N-antipirina-3,4-dicloromaleimida é um produto sintético da classe das maleimidas, obtido diretamente pela reação de anidrido 3,4-dicloromaleico e aminofenazona com ácido acético sob refluxo (de CAMPOS *et al.*, 2002). Diversas moléculas baseadas nas imidas cíclicas, como a N-antipirina-3,4-dicloromaleimida vem demonstrando resultados promissores, principalmente em relação a atividade antinociceptiva, incluindo a redução da dor causada por um processo inflamatório (QUINTÃO *et al.*, 2010). No entanto, existem algumas lacunas no conhecimento dos efeitos anti-

inflamatórios desses compostos. Assim como o efeito dessas classes de compostos sobre as citocinas com perfis pró e anti-inflamatórios, bem como a ação dos compostos na principal via de sinalização inflamatória conhecida, a do NF- $\kappa$ B.

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos anti-inflamatórios do composto N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e seus derivados, em modelo *in vitro* com macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório da *N*-antipirina-3,4-dicloromaleimida e seus derivados a partir de estudo *in vitro* em macrófagos da linhagem RAW 264.7.

### 2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade dos compostos derivados da *N*-antipirina-3,4-dicloromaleimida em cultura de macrófagos RAW 264.7;

Avaliar a capacidade dos compostos derivados da *N*-antipirina-3,4-dicloromaleimida de inibir a concentrações de metabólitos do óxido nítrico (NO<sub>x</sub>) em cultura de macrófagos RAW 264.7;

Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre as citocinas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  em cultura de macrófagos RAW 264.7;

Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre as citocinas anti-inflamatórias: IL-4 e IL-13 em cultura de macrófagos RAW 264.7;

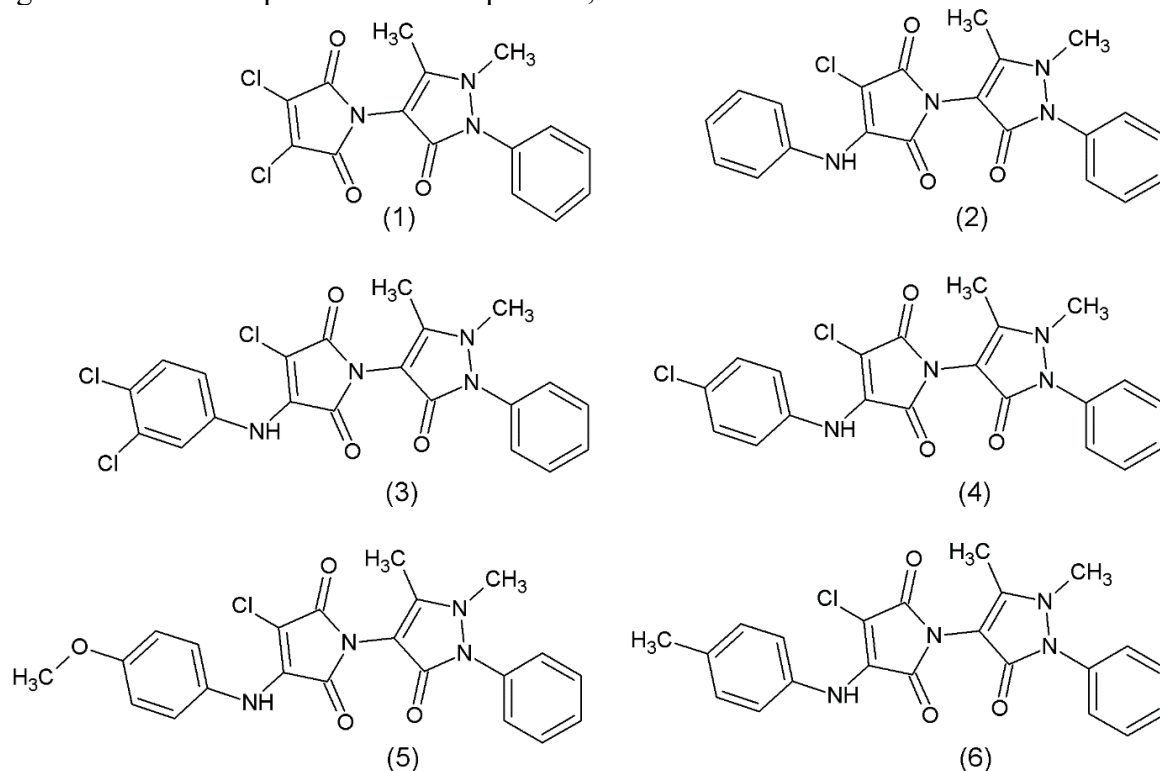
Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B em cultura de macrófagos RAW 264.7.

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1 COMPOSTOS UTILIZADOS

Os compostos utilizados neste estudo foram fornecidos pela professora Dra. Fátima de Campos Buzzi do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) – Itajaí, Santa Catarina, Brasil. Os compostos foram sintetizados através da reação da N-antipirina-3,4-dicloromaleimida com aminas específicas em etanol, sob agitação, *overnight* em temperatura ambiente, conforme descrito pelos autores (MAHLE *et al.*, 2010). Neste estudo, os compostos (Figura 6) foram numerados da seguinte forma: **(1)** N-antipirina-3,4-dicloromaleimida; **(2)** N-antipirina-3-cloro-4-anilnamaleimida; **(3)** N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida; **(4)** N-antipirina-3-cloro-4-(4-cloroanilina)maleimida; **(5)** N-antipirina-3-cloro-4-(4-metoxianilina)maleimida; **(6)** N-antipirina-3-cloro-4-(4-metilnilina)maleimida.

Figura 6 – Estrutura química de N-antipirina-3,4-dicloromaleimida e derivados.



Legenda: **1:** N-antipirina-3,4-dicloromaleimida; **2:** N-antipirina-3-cloro-4-anilnamaleimida; **3:** N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida; **4:** N-antipirina-3-cloro-4-(4-cloroanilina)maleimida; **5:** N-antipirina-3-cloro-4-(4-metoxianilina)maleimida; **6:** N-antipirina-3-cloro-4-(4-metilnilina)maleimida. Fonte: Mahle *et al.*, (2010).

### 2.3.2 CULTURA CELULAR

Células murinas RAW 264.7 (macrófagos) foram obtidas do Banco de Células do Rio (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, mantidas em garrafas para cultura celular a 37 °C em atmosfera umidificada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Antes dos experimentos, foi realizado o ensaio de exclusão com azul de Tripán para verificar a viabilidade celular. Os experimentos foram conduzidos entre a 3ª e a 8ª passagem das células, com uma confluência maior de 80%.

### 2.3.3 CITOTOXICIDADE

Os efeitos citotóxicos dos compostos foram avaliados utilizando o ensaio de MTT colorimétrico (MOSMANN, 1983). As células RAW 264.7 foram dispostas em placa de 96 poços (5 x 10<sup>4</sup> células/poço), e incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após o período de incubação, os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações dos compostos **1-6** (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µM). Os controles receberam as mesmas concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) que foi utilizado para preparar as respectivas soluções dos compostos (≤ 1%). As células foram novamente incubadas por mais 24 horas. Posteriormente, o meio foi descartado, e a solução de MTT (0,5 mg/mL) adicionada a cada poço, seguindo-se a incubação durante aproximadamente 3 horas em estufa. Decorrido o tempo, a solução de MTT foi descartado, e o DMSO adicionado para dissolver os cristais de formazan formados. A densidade óptica da cor formada foi verificada a 540 nm utilizando para isso um leitor de microplaca (Organon Teknika, Roseland, New Jersey, EUA). A viabilidade celular do controle foi considerada 100%. A concentração citotóxica que matou 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi calculada por meio de uma análise de regressão não linear utilizando o software Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

### 2.3.4 DOSAGEM DE METABÓLITOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO<sub>x</sub>)

Para a quantificação *in vitro* dos metabólitos de No<sub>x</sub>, os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placa de 96 poços (5 x 10<sup>4</sup> células/poço) por 24 horas. As culturas foram submetidas nas seguintes condições: (a) controle branco (B) células não inflamadas; (b)

controle negativo (LPS) células inflamadas; (c) controle positivo (DEX), células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ); e (d) grupos experimentais, células pré-tratadas com os compostos (1-100  $\mu\text{M}$ ). Após 1 hora, as células foram estimuladas com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS (exceto o grupo controle branco, que recebeu somente PBS estéril), e foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para uma placa de 96 poços (100  $\mu\text{L}$ ) e o reagente de Griess (100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado e incubados à temperatura ambiente durante 15 minutos (GREEN *et al.*, 1982). A densidade óptica a 540 nm foi determinada e através da interpolação de uma curva padrão de nitrito (0-100  $\mu\text{M}$ ) em meio DMEM e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ . Após a obtenção dos resultados, foi determinada a concentração de cada composto capaz de inibir 50% da produção de  $\text{NO}_x$ , por meio do software Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os compostos que apresentaram  $\text{IC}_{50} > 50$   $\mu\text{M}$  foram eliminados dos experimentos subsequentes, pois não demonstram uma ação anti-inflamatória significativa (JIANG *et al.*, 2013).

### 2.3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ) E ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-4 E IL-13)

Para verificar o perfil de imunomodulação de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placa de 24 poços (1 x 10<sup>5</sup> células/poço) por 24 horas. As culturas foram submetidas nas seguintes condições: (a) controle branco (B), células não inflamadas; (b) controle negativo (LPS), células inflamadas; (c) controle positivo (DEX), células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ); e (d) grupos experimentais, células pré-tratadas com os compostos (1-30  $\mu\text{M}$ ). Após 1 hora, as células foram estimuladas com 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS (exceto o controle branco, que recebeu somente PBS estéril), e foram incubadas em estufa por 24 horas, em seguida, o sobrenadante foi coletado em microtubos e armazenados a -80 °C para posterior dosagem. A concentração (pg/mL) das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4 e IL-13 no sobrenadante foram quantificadas utilizando kits de ELISA disponíveis comercialmente (IL-1 $\beta$  Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA e IL-4 e IL-13 Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Curvas-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina IL-1 $\beta$  (0,8 – 1000 pg/mL), IL-4 e IL-13 (0-1000 pg/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos das amostras. As leituras foram estimadas por meio da medida colorimétrica realizada em leitor de microplaca (Organon Teknika®, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/mL. Para a quantificação das citocinas IL-6, MCP-1 (CCL2),

TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, *Cytometric Bead Array* (CBA) *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 (0 – 5000 pg/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e quantificadas por meio do software FCAP Array versão 3.0 (BD Biosciences, São Jose, CA, EUA) e os valores expressos em pg/mL.

### 2.3.6 DETERMINAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p-p65 DO NF- $\kappa$ B

Para a determinação *in vitro* da proteína p65 fosforilada, os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em uma placa de 6 poços ( $2 \times 10^6$  células/poço) por 24 horas. As culturas foram divididas em grupos: (a) controle branco (B), células não inflamadas; (b) controle negativo (LPS), células inflamadas; (c) controle positivo (DEX), células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu$ M); e (d) grupos experimentais (células pré-tratadas com os compostos a 30  $\mu$ M). A dose de 30  $\mu$ M foi usada com base nos resultados obtidos na dosagem das citocinas realizadas anteriormente. Após 1 hora, as células foram estimuladas com 1  $\mu$ g/mL de LPS (exceto o grupo controle branco, que recebeu apenas PBS estéril), e foram incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram coletadas em microtubo com auxílio de raspador de células e lavadas com PBS estéril. Para este protocolo todas as amostras obtidas foram ajustadas pelo método de Lowry para terem a mesma concentração de proteína (10  $\mu$ g) e foram transferidas para microplacas de ELISA contendo anticorpos monoclonais específicos contra a proteína p65 fosforilada (Invitrogen, phosphor-NF $\kappa$ B p65 [pS536], San Diego, California, EUA). O protocolo experimental foi realizado seguindo as orientações do fabricante. Os resultados foram expressos pela razão do resultado do grupo controle negativo (solução salina), que representou a expressão basal da proteína p65 fosforilada.

### 2.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros inflamatórios foram expressos por média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e os experimentos foram realizados em triplicata e quadruplicata. As diferenças estatísticas dos parâmetros analisados entre os grupos controles e grupos tratados com os compostos foram realizadas por meio do teste de análise de variância (ANOVA)

complementado pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Para todas as análises, valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

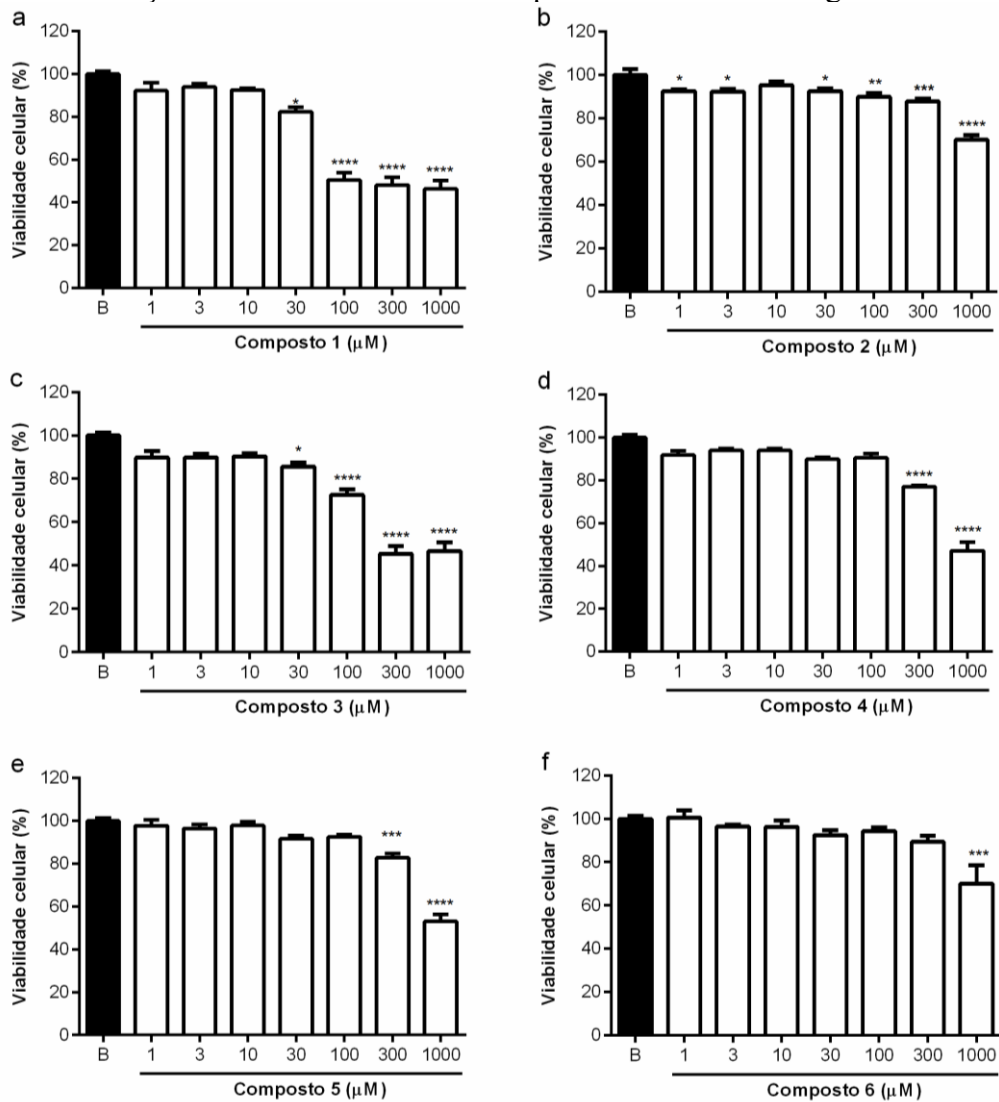


## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi realizada com todos os compostos (Figura 7), no qual foi determinado a concentrações que até 50% dos macrófagos RAW 264.7 sofrem morte celular ( $CC_{50}$ ), (Tabela 2). Com o  $CC_{50}$  determinada através do ensaio de viabilidade celular, prosseguiu os estudos para triar o efeito anti-inflamatório dos compostos (1-6) em macrófagos RAW 264.7.

Figura 7 – Avaliação da citotoxicidade dos compostos 1-6 em macrófagos RAW 264.7.



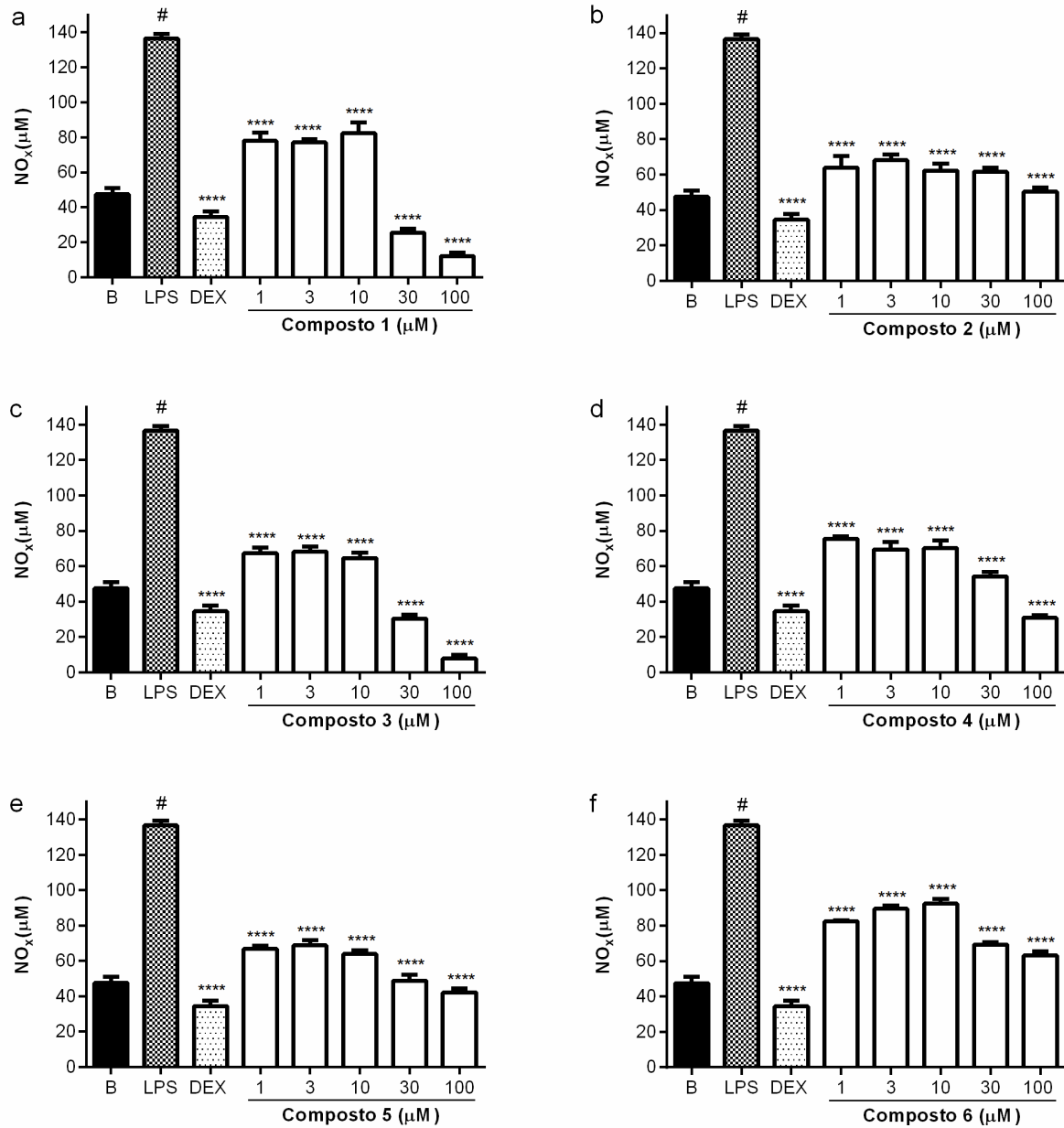
Legenda: B: células tratadas com DMSO estéril a 1%; Compostos: células pré-tratadas com os compostos 1-6 em diferentes concentrações, sem outra estimulação; \* p < 0,5, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 e \*\*\*\* p < 0,0001 vs grupo B. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e os experimentos foram realizados em quadruplicata. Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 2.4.2 EFEITO DOS COMPOSTOS NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO<sub>x</sub>)

A triagem inicial dos compostos na produção de NO<sub>x</sub>, como parâmetro inflamatório, foi realizado por meio de uma curva dose-resposta (1, 3, 10, 30 e 100 µM) para determinar a concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>). Os compostos que apresentaram CI<sub>50</sub> superior a 50 µM foram considerados não possuidores de atividade anti-inflamatória e não continuaram nas experimentações. Em paralelo, uma curva dose-resposta também foi realizada com o controle dexametasona e o CI<sub>50</sub> calculado deste medicamento.

Os compostos **(1-6)** inibiram significativamente a produção de NO<sub>x</sub> em concentrações de 1 a 100 µM ( $p < 0,0001$ ) (Figura 8). No entanto, quando a CI<sub>50</sub> foi calculada, apenas os compostos **1, 3 e 5** (Tabela 2) tem a capacidade de inibir a produção de NO<sub>x</sub> de uma maneira significativa (CI<sub>50</sub> < 50 µM) (% de inibição - **(1)**: 1 µM: 40,64 ± 6,92; 3 µM: 43,41 ± 2,47; 10 µM: 39,69 ± 7,92; 30 µM: 81,31 ± 3,80 e 100 µM: 91,11 ± 4,07; **(3)**: 1 µM: 50,70 ± 4,46; 3 µM: 50,03 ± 4,55; 10 µM: 52,80 ± 5,07; 30 µM: 77,75 ± 3,79 e 100 µM: 94,33 ± 3,59; **(5)**: 1 µM: 51,15 ± 3,07; 3 µM: 49,66 ± 5,11; 10 µM: 53,27 ± 3,59; 30 µM: 64,21 ± 5,25 e 100 µM: 69,05 ± 3,70) ( $p < 0,0001$ ). Portanto, os compostos **1, 3 e 5** foram usados nos experimentos subsequentes.

Figura 8 – Curva dose-resposta dos compostos 1-6 sobre os níveis óxido nítrico (NOx) em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.



Legenda: B: células sem nenhum tratamento; LPS: células estimuladas com LPS (1 µg/mL); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10 µM) e estimulados com LPS (1 µg/mL); Compostos: células pré-tratadas com os compostos 1-6 diferentes concentrações e estimulados com LPS (1 µg/mL). # p < 0,05 vs grupo B; \*\*\*\* p < 0,0001 vs grupo LPS. Os resultados foram expressos como média ± EPM e os experimentos realizados em quadruplicata. Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Avaliação da viabilidade celular ( $CC_{50}$ ) e efeitos inibitórios na produção de  $NO_x$  ( $CI_{50}$ ) dos compostos **1-6** em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

Compostos	$CC_{50}$ $\mu M$	$CI_{50}$ $\mu M$
1	252,35 $\pm$ 1,23	29,9 $\pm$ 0,2
2	2246,38 $\pm$ 1,16	>50
3	330,13 $\pm$ 1,19	47,9 $\pm$ 0,1
4	913,67 $\pm$ 1,12	>50
5	1208,75 $\pm$ 1,10	33,7 $\pm$ 0,2
6	3152,25 $\pm$ 1,22	>50
Dexametasona	-	1,9 $\pm$ 0,8

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 2.4.3 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ E INF- $\gamma$ )

Os resultados demonstram, que todos os três compostos (**1**, **3** e **5**) nas concentrações testadas foram capazes de inibir significativamente a produção de IL-1 $\beta$  (% de inibição - **(1)**: 1  $\mu M$ : 81,97  $\pm$  3,49; 3  $\mu M$ : 81,42  $\pm$  1,40; 10  $\mu M$ : 86,30  $\pm$  4,74 e 30  $\mu M$ : 94,80  $\pm$  2,56; **(3)**: 1  $\mu M$ : 71,66  $\pm$  11,36; 3  $\mu M$ : 77,35  $\pm$  7,19; 10  $\mu M$ : 81,30  $\pm$  6,18 e 30  $\mu M$ : 93,78  $\pm$  1,63; **(5)**: 1  $\mu M$ : 78,32  $\pm$  1,91 ; 3  $\mu M$ : 84,73  $\pm$  2,26; 10  $\mu M$ : 76,29  $\pm$  2,36 e 30  $\mu M$ : 84,61  $\pm$  0,40) ( $p < 0,0001$ ). A dexametasona testada a 10  $\mu M$  também foi capaz de inibir este parâmetro inflamatório de forma significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 9a).

Em seguida as citocinas IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  foram medidas pelo método de citometria de fluxo. Os compostos **1** e **3** apresentaram potencial inibitório nos níveis de IL-6 em todas as concentrações (% de inibição - **(1)**: 1  $\mu M$ : 7,86  $\pm$  10,65; 3  $\mu M$ : 26,15  $\pm$  7,70; 10  $\mu M$ : 44,27  $\pm$  7,22 e 30  $\mu M$ : 70,47  $\pm$  3,47; **(3)**: 1  $\mu M$ : 28,43  $\pm$  0,43; 3  $\mu M$ : 39,72  $\pm$  16,34; 10  $\mu M$ : 46,99  $\pm$  2,32 e 30  $\mu M$ : 81,96  $\pm$  3,45) ( $p < 0,05$ ), enquanto o composto **5** não reduziu as concentrações de IL-6 quando comparado ao grupo LPS ( $p > 0,05$ ). O grupo controle dexametasona foi capaz de inibir esse parâmetro inflamatório na concentração testada ( $p < 0,0001$ ) (Figura 9b).

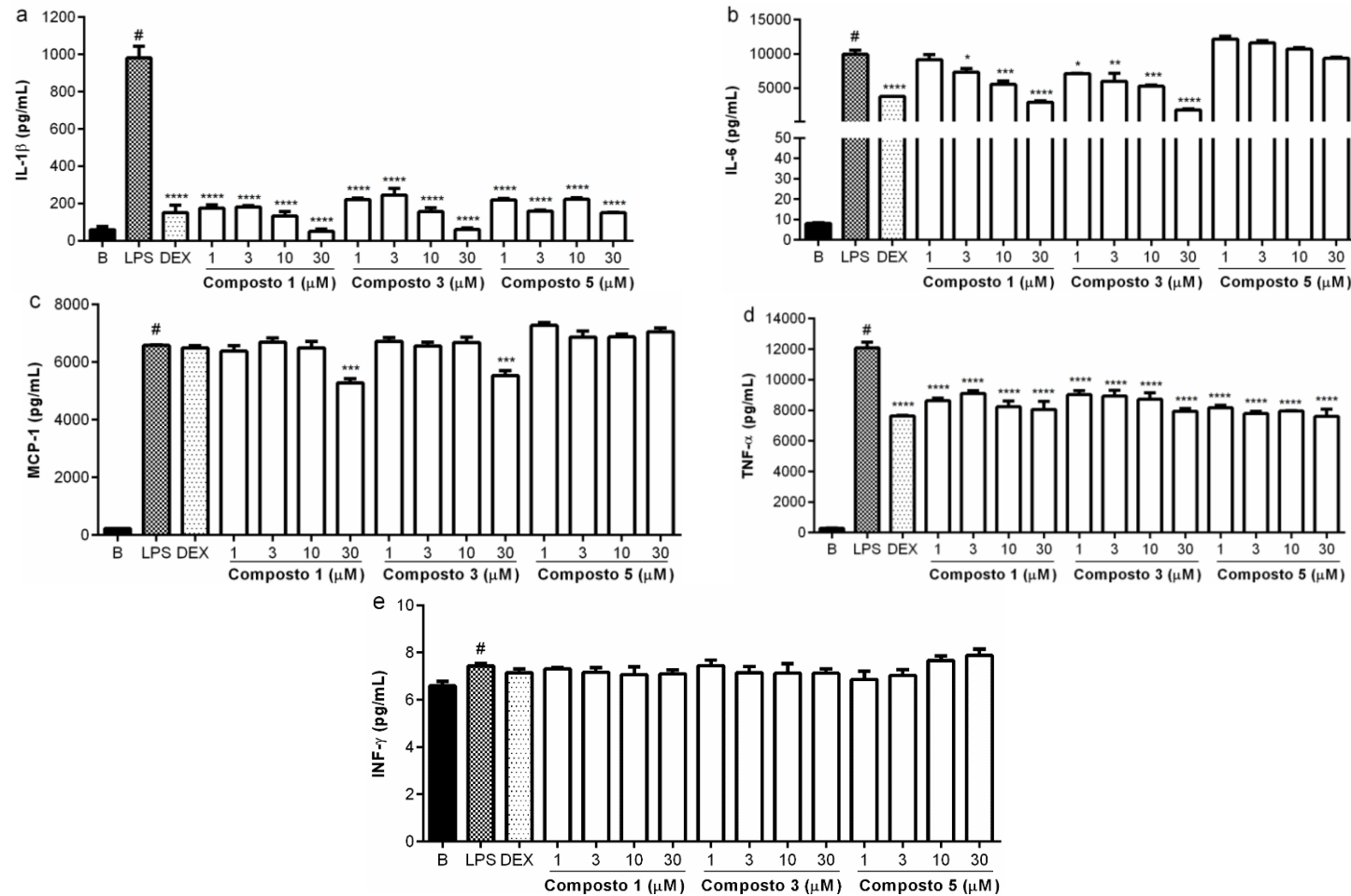
O efeito dos compostos nas concentrações da citocina MCP-1, conforme observado na Figura 9c, mostrou que os compostos **1** e **3** obtiveram efeitos inibitórios importantes quando testados na concentração de 30  $\mu M$  (% de inibição - **(1)**: 30  $\mu M$ : 19,72  $\pm$  3,69; **(3)** e 30  $\mu M$ :

16,02 ± 5,53), (p <0,001). O composto **5** em todas as concentrações testadas, bem como a dexametasona na dose testada, não apresentaram inibição significativa desta citocina (p >0,05).

O efeito dos compostos nas concentrações de TNF- $\alpha$  também foi determinado (Figura 9d). Considerando esses resultados, todos os compostos testados em todas as concentrações foram capazes de reduzir a produção dessa citocina pró-inflamatória (% de inibição - **(1)**: 1  $\mu$ M: 28,56 ± 3,34; 3  $\mu$ M: 24,62 ± 3,50; 10  $\mu$ M: 31,84 ± 7,59 e 30  $\mu$ M: 33,30 ± 10,54; **(3)**: 1  $\mu$ M: 25,29 ± 5,42; 3  $\mu$ M: 26,07 ± 6,22; 10  $\mu$ M: 27,75 ± 7,14 e 30  $\mu$ M: 34,35 ± 2,99; **(5)**: 1  $\mu$ M: 32,32 ± 2,66 ; 3  $\mu$ M: 35,56 ± 2,53; 10  $\mu$ M: 34,20 ± 0,65 e 30  $\mu$ M: 37,03 ± 7,78), (p <0,0001). O grupo controle de dexametasona também foi capaz de reduzir esse parâmetro inflamatório (p <0,0001). Curiosamente, os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células RAW 264.7 estimuladas com LPS não são reduzidos por nenhum composto testado, nem pela droga dexametasona na dose testada (p >0,05), (Figura 9e).

Uma vez que o composto **5**, diferente dos compostos **1** e **3**, não foi capaz de inibir os níveis de citocinas pró-inflamatórias importantes como IL-6 e MCP-1 neste momento, este composto não foi testado nos experimentos subsequentes.

Figura 9 – Efeito dos compostos 1, 3 e 5 nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

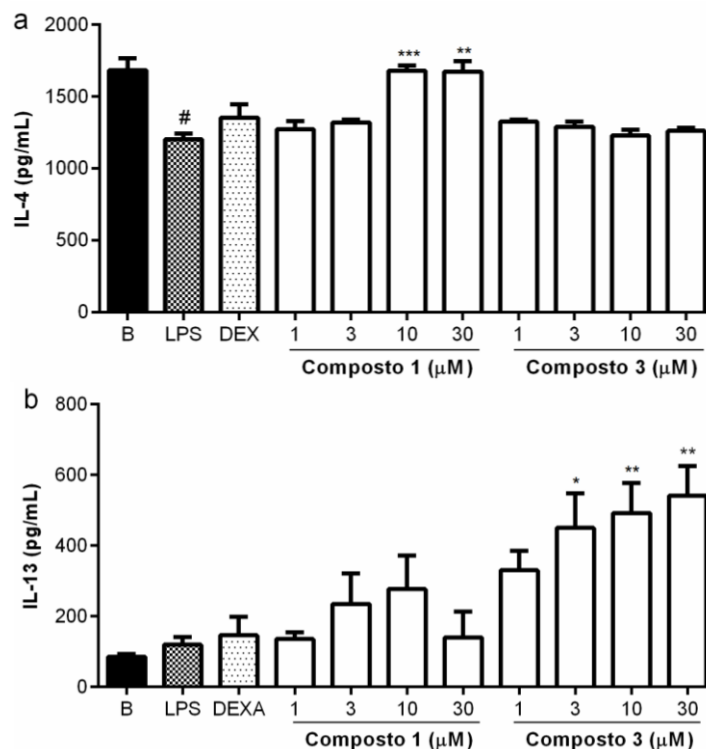


Legenda: B: células sem nenhum tratamento; LPS: células estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu$ M) e estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml); Compostos: células pré-tratadas com os compostos em diferentes concentrações (1-30  $\mu$ M) e estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml). #  $p < 0,05$  vs grupo B. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  vs grupo LPS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM. e os experimentos foram realizados em triplicata. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.4.4 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-4 E IL-13)

Observou-se nos experimentos a seguir a capacidade dos compostos selecionados (**1** e **3**) em estimular a produção de citocinas com perfil anti-inflamatório. O composto **1**, nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{M}$  foi capaz de induzir a produção de IL-4 quando comparado ao grupo controle LPS (% de aumento - 10  $\mu\text{M}$ :  $39,47 \pm 6,11$  e 30  $\mu\text{M}$ :  $39,12 \pm 10,30$ ), ( $p < 0,001$ ), (Figura 10a). Por outro lado, o composto **3**, em todas as concentrações testadas, não produziu este efeito ( $p > 0,05$ ) (Figura 10a). No entanto, o composto **3** mostra a capacidade de induzir a produção de IL-13 (% de aumento - 3  $\mu\text{M}$ :  $276,99 \pm 115,98$ ; 10  $\mu\text{M}$ :  $312,27 \pm 123,40$  e 30  $\mu\text{M}$ :  $353,35 \pm 98,52$ ), ( $p < 0,05$ ) (Figura 10b), fato não observado com o composto **1** ( $p > 0,05$ ), (Figura 10b). A dexametasona não foi capaz de induzir a produção de nenhuma das citocinas estudadas, IL-4 ou IL-13, na dose testada ( $p > 0,05$ ), (Figura 10a e b).

Figura 10 – Efeito dos compostos **1** e **3** nos níveis de IL-4 e IL-13 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.

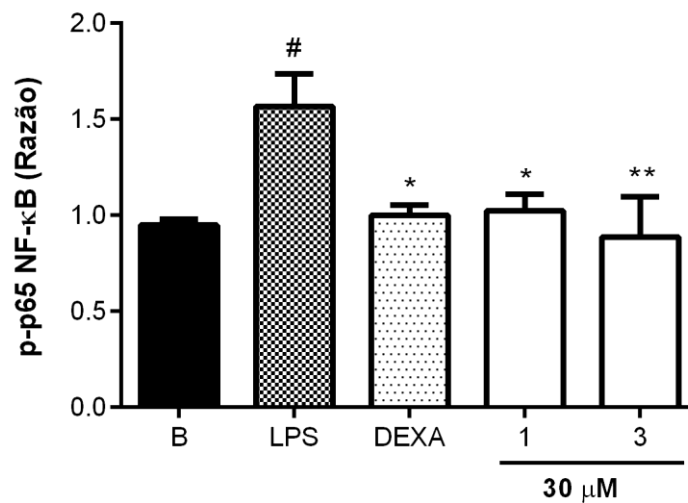


Legenda: B: células sem nenhum tratamento; LPS: células estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ) e estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ); Compostos: células pré-tratadas com os compostos **1** e **3** em diferentes concentrações (1-30  $\mu\text{M}$ ) e estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ). #  $p < 0,05$  vs grupo B; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs grupo LPS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e os experimentos foram realizados em triplicata. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.4.5 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA FOSFORILAÇÃO DA p65 DO NF-κB

Neste experimento, os compostos testados **1** e **3** reduzem significativamente a fosforilação da subunidade p65 do NF-κB (% de inibição - **(1)**:  $85,98 \pm 12,62$  e **(3)**:  $92,59 \pm 9,52$ ) ( $p < 0,001$ ) (Figura 11). O anti-inflamatório de referência dexametasona também reduziu a fosforilação dessa proteína ( $p < 0,05$ ), (Figura 11).

Figura 11 – Efeito dos compostos **1** e **3** na fosforilação da subunidade p65 do NF-κB em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS.



Legenda: B: células sem nenhum tratamento; LPS: células estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); DEX: células pré-tratadas com dexametasona (10  $\mu\text{M}$ ) e estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Compostos: células pré-tratadas com os compostos **1** e **3** (30  $\mu\text{M}$ ) e estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). #  $p < 0,05$  vs grupo B; \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  vs grupo LPS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e os experimentos foram realizados em quadruplicata. Fonte: Elaborado pelo autor.



## 2.5 DISCUSSÃO

Até os dias de hoje, tem-se buscado por compostos para o tratamento de doenças inflamatórias refratárias ao tratamento convencional, destacando alternativas mais seguras e com menor número de efeitos colaterais. Nesse contexto, compostos que apresentam ação na repolarização de células diretamente envolvidas com o equilíbrio do sistema imunológico como os macrófagos são promissores (HU *et al.*, 2021; KIVIMÄKI *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021). Essas células são um elo fundamental entre as respostas imunes inatas e adaptativas e, além disso, são fontes de moléculas inflamatórias com perfil pró e anti-inflamatório (SCHULTZE, 2016; SHIRATORI *et al.*, 2018). Nos últimos tempos, pesquisadores têm voltado sua atenção para mediadores com perfil anti-inflamatório produzidos por macrófagos devem ser a resposta para o melhor tratamento de doenças inflamatórias refratárias ao tratamento convencional, uma vez que o próprio tratamento das doenças inflamatórias permanece insatisfatório (SHIRATORI *et al.*, 2018; SUGIMOTO *et al.*, 2019; PEI *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021). No local da lesão, os macrófagos têm a capacidade de adquirir fenótipos funcionais distintos, dependendo do tipo de estímulo que recebem. O fenótipo M1 tem a capacidade de apresentar antígenos, produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-12 e óxido nítrico por ativação de iNOS (AHMED, ISMAIL 2020). O fenótipo M2 é uma das células responsáveis pela resolução do processo inflamatório, com liberação principalmente de citocinas reparadoras de anti-inflamatórios como IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- $\beta$  (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). A grande maioria dos alvos terapêuticos em desenvolvimento para tratar a inflamação busca inibir mediadores pró-inflamatórios, seja pela inibição da produção, liberação ou interação com seus receptores-alvo (HANKE *et al.*, 2016).

Os compostos da classe das imidas cíclicas são utilizados há muito tempo pela indústria e na área farmacológica. Dentre esses compostos, a subclasse de maleimidas apresentam potencial terapêutico como antifúngico, antibacteriano e inseticida (CECHINEL-FILHO *et al.*, 2003; HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE, 1970). Nos últimos anos, esses compostos também têm sido investigados por sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória, principalmente N-antipirina-3,4-dicloromaleimida (de CAMPOS *et al.*, 2002; QUINTÃO *et al.*, 2010). Mahle *et al.* (2010) sintetizaram vinte e dois compostos derivados de N-antipirina-3,4-dicloromaleimida que foram avaliados por suas atividades antifúngica e nociceptiva. Curiosamente, nesses experimentos, muitos compostos produziram uma redução significativa na segunda ou última fase do teste da formalina, um ambiente inflamatório orquestrado pela

liberação de mediadores inflamatórios (KIDD; URBAN, 2001). Nesse contexto, decidimos investigar mais profundamente o possível efeito anti-inflamatório dos seis compostos selecionados sobre os níveis de importantes mediadores inflamatórios secretados por macrófagos.

Os compostos N-antipirina-3,4-dicloromaleimida (**1**), N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida (**3**), e a N-antipirina-3-cloro-4-(4-metoxianilina)maleimida (**5**) mostraram resultados mais pronunciados na produção de metabólitos do óxido nítrico (NOx), como indicativo da ação anti-inflamatória dos compostos. O óxido nítrico é um radical livre produzido pelas enzimas NOS. A iNOS, pertencente à família NOS, é estimulada por citocinas pró-inflamatórias e LPS, gerando quantidades significativas de NOx, sendo fundamental na resposta inflamatória (CINELLI *et al.*, 2019). Resultados semelhantes foram observados por Wu *et al.* (2008), em que, derivados de maleimida e anidrido maleico isolados do micélio de *Antrodia cinnamomea* tiveram importante efeito inibitório sobre os níveis de NOx produzidos por macrófagos induzidos com LPS (WU *et al.*, 2008). Alguns anos depois, o mesmo grupo de pesquisa também demonstrou o mesmo efeito inibitório de outros derivados da maleimida do fungo *Antrodia cinnamomea* BCRC 36799 na produção de óxido nítrico em macrófagos RAW264.7 ativados por LPS (WU *et al.*, 2013). Reforçando nossos resultados, em um estudo anterior, esses compostos foram testados em diferentes modelos inflamatórios e neuropáticos de dor em camundongos, e os resultados mostraram ações antinociceptivas e anti-inflamatórias significativas (QUINTÃO *et al.*, 2010).

Posteriormente, com base neste primeiro resultado, apenas os compostos **1**, **3** e **5** foram avaliados quanto ao seu possível efeito na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Dentre estes, os compostos selecionados foram capazes de inibir os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . No entanto, esta inibição não mostrou um perfil dependente da dose. As citocinas pró-inflamatórias são liberadas no início do processo inflamatório, principalmente por macrófagos com fenótipo M1. Estão envolvidos no processo de dor, ativação de proteínas inflamatórias, recrutamento de células para o local da lesão, além de induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; ZHANG; AN, 2007). É bem conhecido que o LPS é um forte indutor do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF) e interleucina-1 $\beta$  (FROST; NYSTROM; LANG, 2002). Durante a resposta inflamatória, essas duas citocinas são rapidamente desreguladas como a primeira resposta inata contra a invasão do hospedeiro. Além disso, há evidências de que a IL-1 $\beta$  potencializa a ação do TNF- $\alpha$ , produzindo modificações significativas nos receptores do TNF (SAPERSTEIN *et al.*, 2009). Por outro lado, os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e MCP-1 foram inibidos apenas

pelos compostos **1** e **3**, e  $\text{INF-}\gamma$  não foi inibido por nenhum composto nas concentrações testadas. Em outro estudo, também realizado com células RAW 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com compostos ftalimidas, derivados de imidas cíclicas, analisadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), mostrou que a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foram significativamente suprimidos quando os macrófagos foram tratados com esses compostos (BACH *et al.*, 2017).

Além disso, nossos resultados mostraram que os compostos **1** e **3** inibem significativamente a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B no citosol celular dos macrófagos. Está bem estabelecido que a expressão de mediadores inflamatórios, como as citocinas é estritamente controlada pelas vias de sinalização MAPK/NF- $\kappa$ B (DAI *et al.*, 2018). Em estados fisiológicos normais após a exposição a estimulantes inflamatórios, como o LPS, o NF- $\kappa$ B é ativado do citosol celular e transmigra para o núcleo, onde se liga às regiões promotoras que induzem a transcrição de muitos genes inflamatórios (ZHAO *et al.*, 2015). Um estudo realizado com a N-etilmaleimida, que possui capacidade alquilante para cisteínas, mostrou que o uso desse composto induziu a inibição do NF- $\kappa$ B devido à sua seletividade de alquilação principalmente na subunidade p65, bem como na p50 (GARCÍA-PIÑERES; LINDENMEYER; MERFORT, 2004).

Os macrófagos do tipo M2 têm papel inverso ao do tipo M1, pois apresentam atividade moduladora, regulando negativamente as citocinas pró-inflamatórias e induzindo a produção de mediadores anti-inflamatórios (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). A mudança da população de macrófagos, de M1 para M2, é um fenômeno interessante e depende de muitos fatores que naturalmente precisam de mudanças significativas no contexto inflamatório. Nossos resultados, não só mostraram a capacidade do composto selecionado em reduzir a produção de citocinas com perfil pró-inflamatório (M1), mas também mostraram a capacidade de estimular a produção de citocinas com perfil anti-inflamatório (M2), no qual o composto **1** estimula significativamente a produção de IL-4 e o composto **3** tem a capacidade de estimular a produção de IL-13. Pelo que sabemos, esta é a primeira vez relatado na literatura que derivados de maleimida apresentam características imunomoduladoras. Os resultados de nossos experimentos levam à hipótese de que os compostos selecionados têm a capacidade de induzir uma mudança no fenótipo do macrófago (M1 para M2), uma vez que o ambiente de citocinas foi completamente alterado com redução significativa das citocinas M1, inibição do NF- $\kappa$ B e, ao mesmo tempo, aumento dos níveis das citocinas M2. Essa alteração da polarização do macrófago do fenótipo inflamatório (M1) para o anti-inflamatório (M2) pode ter implicações

notáveis para a regeneração do tecido lesado, tratamento de doenças inflamatórias e alívio de doenças autoimunes.

## 2.6 CONCLUSÃO

Os compostos N-antipirina-3,4-dicloromaleimida (**1**) e N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida (**3**) apresentam importante atividade anti-inflamatória *in vitro* com base na capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e, ao mesmo tempo, aumentar os níveis de citocinas com perfil anti-inflamatório. Esses achados nos permitem concluir que esses dois compostos podem ser protótipos para o desenvolvimento de fármacos visando doenças inflamatórias onde o sistema imunológico e a polarização dos macrófagos têm papel central.

## **CAPÍTULO 3**

### **EFEITO DA DEXAMETASONA NA MORTALIDADE EM PACIENTES ADULTOS E IDOSOS COM SEPSE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

### 3.1 INTRODUÇÃO

A sepse é atualmente definida como uma disfunção orgânica fatal, causada por uma infecção com resposta desregulada do hospedeiro, provocando anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas. Já o choque séptico é definido como um subconjunto de sepse no qual as anormalidades ao metabolismo circulatório e celular são mais graves, aumentando significativamente o risco de morte para o paciente. Assim, o choque séptico é considerado uma condição mais grave, com maior probabilidade de morte que a sepse isolada (POLL *et al.*, 2017; SINGER *et al.*, 2016).

Na prática clínica, a sepse é representada por um aumento na SOFA de dois pontos ou mais. Pacientes com choque séptico devem ser clinicamente identificados como tendo sepse e necessitando de terapia vasopressora, mantendo uma pressão arterial média de 65 mmHg ou maior e níveis séricos de lactato maiores que 2 mmol/L (> 18 mg/dL) na ausência de hipovolemia (NAPOLITANO, 2018). As taxas de mortalidade por sepse hospitalar são maiores que 10%, enquanto as taxas por choque séptico são maiores que 40%. Estima-se que 5 milhões de pessoas morrem anualmente de sepse em todo o mundo. Nos Estados Unidos, os custos hospitalares devido à sepse representaram mais de US \$ 24 bilhões por ano (BRENT, 2017; RUDD *et al.*, 2020).

O tratamento inicial para sepse é a administração precoce e adequada de antimicrobianos. Sinais e sintomas clínicos, culturas microbiológicas apropriadas e técnicas de imagem relevantes devem ser usadas para determinar a fonte da infecção. O uso do antimicrobiano adequado no início do tratamento reduz significativamente o risco de morte (HOTCHKISS *et al.*, 2016). Outros tratamentos adicionais podem ser úteis, como vasopressores e inotrópicos nos casos de choque séptico, ventilação mecânica para sepse desenvolvida por pneumonia grave e terapia de substituição renal nos casos em que há lesão renal aguda (BRENT, 2017). Atualmente, diversos estudos estão em andamento para produzir um medicamento que possa bloquear os fenômenos inflamatórios exagerados e descontrolados e consequente o dano endotelial característico da sepse (HOTCHKISS *et al.*, 2016).

Os corticosteroides são utilizados há muito tempo na terapia intensiva para choque séptico. Na década de 1980, foram realizados ensaios clínicos para avaliar os benefícios de protocolos de tratamento em altas doses em um curto espaço de tempo com dexametasona em pacientes sépticos, e a conclusão foi que esses protocolos não eram eficazes. Desde então, vários estudos têm demonstrado que pequenas doses de corticosteroides diminuem a

necessidade de vasopressores para manter a homeostase cardiovascular, melhorando o estado clínico dos pacientes (SHAIKH *et al.*, 2012).

Os glicocorticoides inibem a inflamação por diferentes mecanismos e podem atuar como imunossupressores, dependendo do protocolo de tratamento. Alguns dos glicocorticoides mais utilizados são a metilprednisolona, dexametasona e a hidrocortisona (FINK; WARREN, 2012). O uso de glicocorticoides como agentes anti-inflamatórios administrados nos casos de sepse tem uma longa história, mas não foi possível estabelecer clinicamente se esse tratamento é eficaz (MARIK, 2018). O efeito específico da dexametasona na sepse ainda não está claro, no entanto, sabe-se que esse glicocorticoide difere de outros, pois possui maior poder imunossupressor, tempo de meia-vida mais longa e requer doses mais baixas para produção dos efeitos farmacológicos desejados (GUPTA, BHATIA, 2008; GIBBISON *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o objetivo desta revisão sistemática foi esclarecer se a glicocorticoide dexametasona é eficaz na redução da mortalidade em pacientes adultos e idosos com sepse ou choque séptico.



## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 OBJETIVO GERAL

Revisar sistematicamente a literatura para avaliar se há evidências que o uso de dexametasona é eficaz na redução da mortalidade quando utilizada como terapia complementar em pacientes com sepse ou choque séptico.

### 3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar busca em bases de dados da literatura de artigos relacionados ao uso de dexametasona em pacientes com sepse ou choque séptico;

Verificar a correlação entre a terapia com dexametasona e a mortalidade dos pacientes com choque séptico ou sepse;

Avaliar a qualidade e risco de viés de cada estudo individualmente, por meio de Cochrane e CONSORT.

### 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão sistemática foi conduzida de acordo com o Manual Cochrane de Revisões Sistemáticas da Intervenção (HIGGINS *et al.*, 2011) e PRISMA (LIBERATI *et al.*, 2009). O objetivo é responder à seguinte pergunta: Qual é o efeito da dexametasona na mortalidade em pacientes adultos e idosos com sepse em comparação com a mortalidade em pacientes que não usam terapia anti-inflamatória? O protocolo deste estudo foi registrado no banco de dados PROSPERO ([www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/](http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/)) (número de registro: CRD42018088150). Os critérios do PICO (população, intervenção/exposição, comparação e desfecho) e as questões de pesquisa utilizadas para determinar as palavras-chave e a estratégia de pesquisa estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição dos critérios do PICO e pergunta da pesquisa definida para revisão sistemática.

Parâmetros	Descrição
População	Pacientes com sepse, masculino e feminino, maiores de 18 anos
Intervenção	Tratamento com dexametasona, sem restrições quanto à via de administração ou protocolo de tratamento
Comparação	Pacientes que não receberam nenhum protocolo de tratamento com dexametasona
Desfecho	Mudanças na taxa de mortalidade
Pergunta de pesquisa	Qual é o efeito da dexametasona na mortalidade de pacientes adultos e idosos com sepse em comparação com pacientes que não usam terapia anti-inflamatória?

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 3.3.1 REVISÃO DA LITERATURA

Uma pesquisa sistemática da literatura foi realizada no *Cochrane Central Register of Controlled Trials* (CENTRAL), *Scopus*, *Web of Science* e *PubMed* para identificar todos os estudos relevantes até 6 de fevereiro de 2018 e uma pesquisa de atualização foi realizada em 1 de novembro de 2019. Foi utilizado termos de pesquisa, palavras-chave ou títulos de assuntos médicos relacionados a estratégia de busca PICO (paciente, intervenção, comparação e desfecho):

- Paciente (P) - pacientes adultos e idosos diagnosticados com sepse: (*Sepsis OR Sepsis OR Septicemia OR Septicaemia OR Bacteremia OR Pyemia OR Pyemias OR Pyaemia OR Pyaemias OR “Septic Infection” OR “Septic Infections” OR “Generalized infection” OR*

“Severe sepsis” OR “Systemic inflammation” OR “Systemic inflammatory response syndrome” OR “Septic shock” OR Toxemia OR Toxemias OR Toxaemia OR Toxaemias) AND (Adult OR Adults OR Patients OR Patient OR Old OR Ancient OR Old-aged OR Elder OR Elders);

- Intervenção (I) - Dexametasona: (Dexamethasone OR Dexametasona OR Dex OR “Dexamethasone acetate” OR Dexa OR Glucocorticoids OR Glucocorticoid OR Corticosteroid OR Corticosteroids OR Corticoid OR Corticoids OR Antiinflammatory OR Anti-inflammatory OR “Anti inflammatory” OR Antiinflammatories OR Anti-inflammatories OR “Anti inflammatories” OR Hexadrol OR Decadron);

- Comparação (C) - Nenhuma intervenção anti-inflamatória (omitida na estratégia de busca);

- Desfecho (O) – Mortalidade: (Mortality OR Death OR “Negative outcome” OR Outcome OR Survival OR Decease OR Dying OR Demise).

Os termos de pesquisa foram combinados usando operadores booleanos, *OR* foi usado para combinar termos de pesquisa do mesmo grupo, *AND*, para combinar termos de pesquisa de diferentes grupos e *NOT* para excluir termos de pesquisa. Nenhum filtro foi usado na pesquisa. As pesquisas foram realizadas no banco de dados on-line e os resultados exportados para o software gerenciador de referência Mendeley® (RELX Group, Nova York, EUA) para posterior análise e organização.

### 3.3.2 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Artigos duplicados ou triplicados foram excluídos da análise usando Mendeley®. Quando disponíveis, informações sobre títulos e resumos eram suficientes. Os artigos foram lidos na íntegra, para identificar os critérios de inclusão. Os ensaios clínicos que atenderam aos seguintes critérios foram incluídos:

- 1) Ensaios clínicos controlados ou randomizados, realizados em humanos;
- 2) Artigos totalmente publicados (resumos publicados não foram incluídos);
- 3) Artigos publicados em inglês;
- 4) Amostra de estudos composta apenas por pacientes com diagnóstico de sepse ou choque séptico (acima de 18 anos);
- 5) Dexametasona como tratamento (em qualquer protocolo de tratamento);
- 6) Avaliação da mortalidade dos pacientes (resultado do estudo).

### 3.3.3 EXTRAÇÃO DOS DADOS

Os artigos que atendiam a todos os critérios de inclusão foram lidos cuidadosamente por três revisores independentes para garantir a extração adequada dos dados. Os seguintes dados foram extraídos:

- 1) Lugar;
- 2) Período de coleta de dados;
- 3) Desenho do estudo;
- 4) Tamanho e perdas da amostra;
- 5) Características de intervenção/exposição (protocolo de tratamento);
- 6) Idade e sexo dos pacientes;
- 7) Mortalidade;
- 8) Principais resultados;

Após a estratificação dos dados brutos, os autores correspondentes dos artigos que atendiam aos critérios de inclusão para esta revisão foram contatados para obter mais informações. Quando não havia dados adicionais dos autores, esses artigos foram excluídos desta revisão. Os dados extraídos dos trabalhos finais selecionados foram organizados em planilhas do Microsoft Excel<sup>®</sup> pelos revisores e verificados.

### 3.3.4 AVALIAÇÃO CRÍTICA

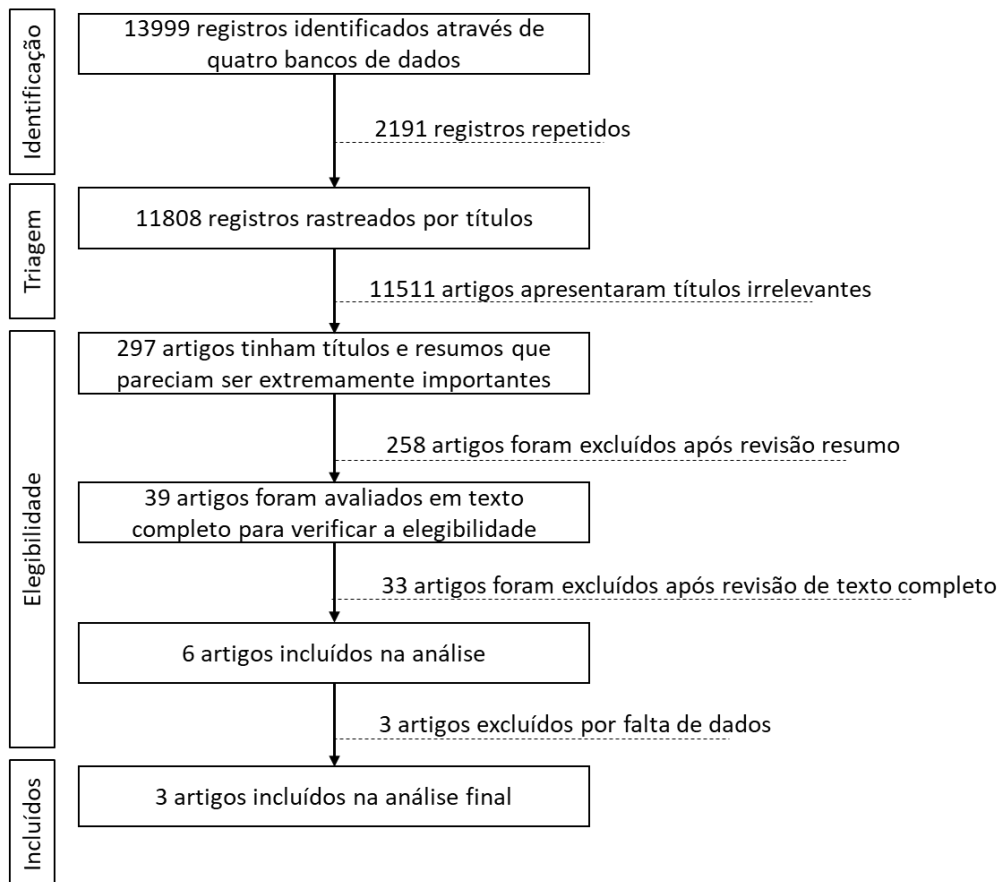
As avaliações de risco de viés foram realizadas com a ferramenta *Cochrane Collaboration* (LIBERATI *et al.*, 2009) e a qualidade da notificação foi avaliada com a lista de verificação CONSORT de possível viés (SCHULZ; ALTMAN; MOHER, 2010). A primeira ferramenta analisa o risco de ocorrência dos seis domínios de viés: viés de seleção, viés de desempenho, viés de detecção, viés de atrito, viés de relatório e outro viés. A revisão foi conduzida por três revisores e os estudos foram classificados como tendo alto, baixo ou incerto risco de viés. A segunda ferramenta consiste em uma lista de verificação que abrange aspectos de todas as seções de um ensaio clínico, desde o título até a discussão, entre outras informações importantes. Cada item relatado corretamente recebeu uma pontuação de 1 ou 0 e, no final, cada estudo teve uma pontuação final (faixa possível de 0 a 37 pontos). As divergências entre os autores na atribuição de escores foram resolvidas por discussão até chegar a um consenso.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 RESULTADOS DA PESQUISA

A pesquisa bibliográfica identificou inicialmente 13.999 registros (2.224 no *PubMed*, 9.641 no *Scopus*, 366 no *Cochrane* e 1.768 no *Web of Science*). Artigos repetidos foram excluídos e os demais 11.808 artigos foram selecionados. Após a leitura dos títulos, 11.511 artigos foram excluídos. Posteriormente, os resumos foram lidos e foram excluídos 258 artigos. 39 artigos foram avaliados através do texto completo e 6 foram selecionados. Desses artigos, três apresentaram dados incompletos e os autores foram contatados para solicitar mais dados (CICARELLI; BENSEÑOR; VIEIRA, 2006; FUNK *et al.*, 2014; SPRUNG *et al.*, 1984). Esses dados adicionais não foram fornecidos pelos autores. Por fim, foram incluídos 3 artigos (CICARELLI; VIEIRA; BENSEÑOR, 2007; LUCAS; LEDGERWOOD, 1984; SCHUMER, 1976). O processo de seleção é mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Fluxograma do processo de pesquisa, triagem e seleção de literatura para ensaios elegíveis.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.4.2 CARACTERÍSTICAS DE BASE

As características dos três estudos incluídos na revisão são mostradas na Tabela 4. Para facilitar os artigos foram numerados da seguinte forma: Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007) (1); Schumer (1976) (2); Lucas e Ledgerwood (1984) (3).

Tabela 4 – Características dos estudos.

<b>Estudo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>País</b>	Brasil	Estados Unidos	Estados Unidos
<b>Tratamento</b>	Dexametasona	Dexametasona	Dexametasona
<b>Design de estudo/ índice de qualidade (%)</b>	Paralelo ECR/ CONSORT: 41	Paralelo ECR/ CONSORT: 32	Estudo de caso CONSORT: 35
<b>População</b>	Pacientes com choque séptico	Pacientes com choque séptico	Pacientes com sepse severa
<b>Sexo</b>	M/F	M/F	M/F
<b>Idade (anos)</b>	61±27	22-84	Não incluído
<b>Tamanho amostral (n)</b>	29	172	48
<b>Intervenção - Doses</b>	0,6 mg/kg (n = 14)	3 mg/kg (n = 43)	6 mg/kg (n = 23)
<b>Controle - Doses</b>	Solução salina 0,9% (n = 15)	100 cc de salina (n = 86)	Não incluído (n = 25)
<b>Duração da intervenção (horas)</b>	108	24	48
<b>Resultados (intervenção vs controle)</b>	↓ Mortalidade	↓ Mortalidade	↔ Mortalidade

Legenda: 1: Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007); 2: Schumer (1976); 3: Lucas e Ledgerwood (1984). ECR: ensaio clínico randomizado; ↓: Redução; ↔: Sem diferença. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em 2007, Cicarelli, Vieira e Benseñor publicaram os resultados de um estudo realizado no Brasil com 29 pacientes diagnosticados com choque séptico; 13 homens e 16 mulheres, com idades entre 34 e 88 anos. O estudo prospectivo, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo foi conduzido entre novembro de 2004 e dezembro de 2005. Os pacientes foram divididos em dois grupos: que receberam 0,2 mg/kg em três doses em intervalos de 36 horas de dexametasona (n = 14); e o grupo placebo, que recebeu solução salina a 0,9%, três doses em intervalos de 36 horas (n = 15). Os pacientes receberam terapia convencional em relação a esquemas de antibióticos, hemoculturas e critérios de alta. Testes clínicos e laboratoriais foram realizados diariamente durante todo o estudo. Os pacientes foram avaliados durante a internação

na UTI quanto à duração do suporte vasopressor (escore SOFA para sistema cardiovascular de dois ou mais), tempo de ventilação mecânica e mortalidade. Todos os pacientes que desenvolveram choque séptico refratário foram excluídos do estudo e a administração de hidrocortisona foi iniciada. Os resultados do estudo, para o desfecho mortalidade, foram avaliados aos 7 e 28 dias. O tratamento de pacientes com dexametasona teve um índice de mortalidade em 21% em comparação com o grupo placebo, para o qual se obteve uma mortalidade de 67%. O grupo de tratamento mostrou uma tendência após 28 dias para a redução na mortalidade, o grupo tratado com dexametasona obteve uma mortalidade de 50% dos pacientes, enquanto o grupo placebo foi de 80%.

Um artigo publicado por Schumer (1976) relatou dois estudos, um prospectivo e outro retrospectivo, em pacientes com choque séptico tratados com dexametasona e metilprednisolona. Dado que o estudo retrospectivo carecia de detalhes sobre os grupos que receberam os diferentes corticosteroides, apenas o estudo prospectivo foi incluído nesta revisão. A pesquisa foi realizada com 172 pacientes nos Estados Unidos, entre 1967 e 1975. Os pacientes foram diagnosticados com base no histórico de casos, pressão arterial e hemocultura. O estudo foi um ensaio clínico randomizado no qual os pacientes foram divididos em grupos que receberam placebo, dexametasona e metilprednisolona como tratamento. Em nosso estudo, avaliamos apenas os resultados com a administração de placebo e dexametasona, portanto o grupo metilprednisolona foi excluído. O grupo placebo (n = 86) recebeu soro fisiológico sozinho e o grupo de dexametasona (n = 43) recebeu 3 mg/kg do medicamento em soro fisiológico. O tratamento foi administrado como infusão em bolus único através de um cateter venoso central. O antibiótico administrado nos primeiros anos do estudo (1967-1969) foi a cloromicetina, 48 pacientes receberam este tratamento: 24 no grupo controle e 12 no grupo dexametasona. Em 1970, os pacientes começaram a receber a combinação de gentamicina e clindamicina. Um total de 124 pacientes receberam este tratamento: 62 no grupo controle e 31 no grupo dexametasona. A idade dos pacientes variou de 22 a 84 anos, sendo 167 homens e 5 mulheres. Os resultados deste estudo mostraram uma taxa de mortalidade de 38,4% (33/86) para o grupo salina e 9,3% (4/43) no grupo tratado com dexametasona.

E por fim, em 1984, Lucas e Ledgerwood publicaram um estudo prospectivo de 48 pacientes com sepse grave. Este estudo ocorreu de agosto de 1978 a maio de 1980 nos Estados Unidos. Inicialmente, os pacientes foram tratados por infusão de solução eletrolítica balanceada (BES) para restaurar os déficits de volume plasmático. Nos casos em que apresentavam anemia, a administração de concentrado de hemácias estava associada à terapia. Os pacientes foram

divididos em dois grupos: 25 pessoas no grupo não tratado e 23 que receberam dexametasona. O tratamento foi iniciado como um bolus de 2 mg/kg, seguido de uma infusão de 2 mg/kg/24 horas por dois dias, resultando em uma dose total de 6 mg/kg/48 horas. A administração não ficou cega. O diagnóstico de choque séptico foi determinado por pressão arterial sistólica abaixo de 80 mmHg. Quatro pacientes foram excluídos do tratamento por necrose. Bicarbonato de sódio e suplementação de cálcio foram administrados conforme necessário para corrigir acidose e hipocalcemia. Foi administrada terapia antibiótica composta por aminoglicosídeo, clindamicina e penicilina G. Esses tratamentos foram dados a ambos os grupos, conforme necessário. Foram avaliados: insuficiência ventilatória, pressão capilar pulmonar, volume plasmático utilizando albumina sérica, temperatura corporal e contagem de glóbulos brancos. A análise estatística entre os dois grupos foi realizada pelo teste t de Student para variáveis independentes, assumindo significância quando o nível de confiança ultrapassou 95%. A idade média (55 anos), a gravidade da doença, o tempo de choque e a causa da sepse foram semelhantes nos pacientes de ambos os grupos. Os resultados encontrados neste estudo em relação à mortalidade foram 5 pacientes para cada grupo.

Todos os estudos avaliaram a morte como desfecho. Apenas dois (1 e 2) dos três estudos observaram uma redução significativa na mortalidade no grupo tratado em comparação ao grupo não tratado.

### 3.4.3 AVALIAÇÃO DO RISCO DE VIÉS E QUALIDADE DOS RELATÓRIOS

Os resultados do risco de viés pela ferramenta *Cochrane Collaboration* (HIGGINS *et al.*, 2011) são mostrados na Figura 13 (Tabela Suplementar 1). De acordo com essa ferramenta, nenhum dos estudos estava completamente livre de viés. Em todos os ensaios, o viés de seleção, viés de desempenho, viés de detecção e outras formas de viés não foram identificados. Não havia informações suficientes para formar julgamentos em relação a outros vieses. Por outro lado, os três estudos selecionados descrevem dados relacionados a resultados, incluindo perda e exclusão da análise, e, portanto, apresentam um viés de baixo atrito. Eles também deixam claro que incluíram todos os resultados desejados, dando a eles um baixo risco de viés de relato.

De acordo com a Lista de Verificação CONSORT (SCHULZ; ALTMAN; MOHER, 2010) (Apêndice - Tabela Suplementar 2), nenhum dos estudos atendeu a 50% ou mais dos requisitos aplicáveis. Dois estudos (2 e 3) não identificaram o desenho do estudo no título. Todos os ensaios cumpriram todos os requisitos para resumos. Nenhum estudo detalhou como o tamanho da amostra foi escolhido ou explicou quaisquer análises intermediárias, o método



usado para gerar a sequência de alocação aleatória, o tipo de randomização, o mecanismo usado para implementar a sequência de alocação aleatória, como a sequência de alocação aleatória foi gerada, quem inscreveu os participantes, ou quem designou os participantes para as intervenções. Um artigo (3) não atendeu aos critérios de elegibilidade para os participantes. O trabalho 1 não estabeleceu medidas e ensaios prévios e secundários para resultados primários e secundários (1 e 3) e não apresentou os métodos estatísticos usados para comparar grupos para resultados primários e secundários.

Dois estudos (1 e 3) não incluíram perdas e exclusões na seção "resultados". O número de participantes foi analisado quanto ao desfecho primário em todos os ensaios, o período e a interrupção do trabalho também foram registrados por todos. Os outros critérios estabelecidos na seção de resultados não foram realizados por nenhum estudo. A generalização dos achados e a interpretação consistente com os resultados foram demonstradas em todos os ensaios. Fontes de financiamento, número de registro e protocolo acessível não foram relatados em todos os ensaios clínicos.

Figura 13 – Resumo do risco de viés pela ferramenta Cochrane.

Estudo	Geração de sequência aleatória	Ocultação de alocação	Identificação de participantes e pessoa	Ocultação da avaliação de resultados	Livre de dados de desfechos incompletos	Relatórios seletivos	Outro viés
1	?	?	?	?	+	+	?
2	?	?	?	?	+	+	?
3	?	?	?	?	+	+	?

Legenda: 1: Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007); 2: Schumer (1976); 3: Lucas e Ledgerwood (1984). (+) Baixo risco de viés; (?) Risco pouco claro de viés. Fonte: Elaborada pelo autor.

### 3.5 DISCUSSÃO

A sepse é classificada como uma disfunção inflamatória sistêmica e exacerbada em resposta a uma infecção causada por um hospedeiro, geralmente uma infecção bacteriana, na qual essa disfunção pode ser fatal. Na prática clínica, a sepse é representada por um aumento na pontuação no SOFA de 2 ou mais pontos (BRENT, 2017; POLL *et al.*, 2017). O choque séptico é definido como um subgrupo da sepse, no qual anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas estão associadas a um risco maior de morte do que a sepse isoladamente (SINGER *et al.*, 2016). Durante a sepse em um paciente, ocorre inflamação ou supressão imune simples, bem como reorganização celular e metabólica (POLL *et al.*, 2017). Ainda não há acordo quanto ao melhor tratamento de suporte para pacientes com sepse que desenvolvem choque séptico. Apesar da necessidade de medicamentos vasopressores, o uso de corticosteroides como adjuvantes à antibioticoterapia ainda é controverso, é defendida por muitos, mas reprovadas por outros (MARIK, 2018).

A dexametasona é um glicocorticoide com importante efeito imunossupressor, reduzindo a transcrição de genes pró-inflamatórios por inibição do NF- $\kappa$ B (SCHEINMAN *et al.*, 1995). Alguns estudos têm focado no uso de corticosteroides para reduzir o processo inflamatório sistêmico produzido por sepse e choque séptico. Também na mesma linha, houve relatos de que o uso da hidrocortisona melhorou os resultados para pacientes que sofrem de choque séptico. O uso de metilprednisolona para resolver a síndrome do desconforto respiratório agudo também foi estudado. As recomendações atuais para o uso de corticosteroides no tratamento da sepse são que essa classe de medicamentos deve ser usada durante o choque séptico refratário, mas não durante a sepse grave na ausência de choque ou quando apenas choque leve é observado. Nossa revisão não limitou o uso de dexametasona apenas a essa condição, mas incluiu estudos que usavam dexametasona em pacientes sépticos em um estágio inicial. Nossa escolha de estudar o efeito da dexametasona em vez da hidrocortisona deveu-se ao fato de que esta droga possui mais potência, ação duradoura, efeitos anti-inflamatórios e mineralocorticoides mais baixos do que a hidrocortisona. Além disso, não causa alterações na reabsorção de sódio e não interfere no balanço hídrico, evitando possíveis distúrbios do sódio (SCHIMMER; PARKER, 1996).

Esta revisão sistemática foi realizada com três estudos que incluíram 80 pacientes adultos com sepse ou choque séptico que receberam dexametasona como intervenção. Todos os estudos foram realizados com pacientes em ambiente hospitalar. De todos os artigos analisados, dois (1 e 2) alcançaram uma redução na mortalidade dos pacientes com

dexametasona em comparação com o placebo. Embora não tenha sido o foco desta revisão avaliar outros parâmetros, os ensaios clínicos mostraram que os pacientes que receberam dexametasona obtiveram uma melhora na  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  e a duração da ventilação mecânica também foi menor (1 e 3). A produção de lactato (1) e a pressão sanguínea (3) não mostraram diferença entre os grupos tratado e placebo. A relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  é importante porque é um dos parâmetros para a definição do escore SOFA, em que  $\geq 400$  mmHg tem pontuação 0 e  $<100$  mmHg pontuação máxima 4. O trabalho de Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007) foi o único a avaliar os pacientes de acordo com o escore SOFA, mas esse estudo não encontrou diferença entre o grupo tratado e o placebo. Para determinar o SOFA, é necessário avaliar a relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , contagem de plaquetas, pressão arterial, bilirrubina e creatinina sérica, escala de coma de Glasgow e volume urinário. Quanto maior o valor do SOFA, maior a probabilidade de morte (SINGER *et al.*, 2016).

Os trabalhos de Schumer (1976) e Lucas e Ledgerwood (1984) não avaliaram a sepse através do SOFA porque os artigos foram publicados antes de 1991. Nesse ano, uma conferência definiu os termos sepse com mais precisão do que havia feito até então. Através de dados da literatura e relatórios de especialistas foi proposto que a sepse pudesse surgir de uma infecção ou não, por isso foi denominada síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS). As manifestações clínicas corresponderam a: temperatura corporal acima de  $38^\circ\text{C}$  ou abaixo de  $36^\circ\text{C}$ ; frequência cardíaca superior a 90 bpm; taquipneia; e alteração na contagem de glóbulos brancos (BONE *et al.*, 1992). Em 2001, uma nova conferência foi realizada para atualizar as definições de sepse e condições relacionadas. Uma lista de sinais e sintomas foi preparada para refletir melhor a resposta clínica, na qual a disfunção orgânica pode ser avaliada pelo SOFA (LEVY *et al.*, 2003), o que explica seu uso no estudo de Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007).

Dos três artigos selecionados e utilizados nesta revisão, dois concluíram que o uso de dexametasona como terapia adjuvante a antibioticoterapia reduz significativamente a mortalidade de pacientes com sepse ou choque séptico. No estudo realizado por Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007), o uso de dexametasona produziu um aumento no efeito da terapia vasopressora, fato que os autores atribuíram à redução da mortalidade dos pacientes após o dia sete. No estudo realizado por Schumer (1976), o autor, usando uma estratégia prospectiva, concluiu que o uso de glicocorticoides em pacientes com choque séptico reduz a taxa de mortalidade em comparação ao placebo. Além disso, concluiu que não há diferença entre a taxa de mortalidade do grupo tratado com metilprednisolona e o grupo tratado com dexametasona.

O estudo de Lucas, Ledgerwood (1984), no entanto, não encontrou diferença significativa entre a taxa de mortalidade nos grupos dexametasona e placebo.

### **3.6 CONCLUSÃO**

Esta revisão sistemática usou três ensaios clínicos randomizados, dois deles publicados antes de 1991 (o ano em que a sepse foi definida com mais precisão). Esse fato levou a um risco significativo de comparar esses estudos com os mais recentes. Assim, ficou claro que há necessidade de mais ensaios clínicos randomizados, focado em terapia adjuvante de sepse, para chegar a uma conclusão definitiva sobre esse tratamento clínico ou reduzir os índices de mortalidade em pacientes com sepse ou choque sistêmico.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por medicamentos anti-inflamatórios com menor efeito adverso é realizada constantemente no campo científico, como o que foi demonstrado no capítulo 2. A proposta de um novo protótipo para tratar doenças inflamatórias foi evidenciada neste trabalho, através da análise de compostos da classe das imidas cíclicas. Essa classe de compostos apresenta diversas atividades farmacológicas já evidenciadas, no atual estudo foi observado um perfil imunomodulador (inibição de mediadores pró-inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 (CCL2), TNF- $\alpha$  e redução na fosforilação da subunidade p65 do NF-kB e a indução da produção de mediadores anti-inflamatórios IL-4 e IL-13) para a N-antipirina-3,4-dicloromaleimida (**1**) e N-antipirina-3-cloro-4-(3,4-dicloroanilina)maleimida (**3**), dos seis compostos que foram testados.

A perspectivas futuras são elucidar o mecanismo de ação dessas moléculas através de estudos de biologia molecular, avaliando o local exato em que ocorre o bloqueio da via do NF-kB, além de se comprovar a capacidade dos compostos em repolarizar os macrófagos de M1 para M2, através da análise de marcadores de superfície como o TLR4 (M1) e o receptor de manose (M2), além da possível ação sobre a expressão e/ou inibição de genes característicos de M1 (iNOS e COX-2) e de M2 (Arginase-1 e FIZZ). Além disso, avaliar essas as moléculas quanto ao perfil de segurança em estudos *in vivo*.

Os resultados demonstrados no capítulo 3, referente ao uso da dexametasona como adjuvante ao tratamento antimicrobiano para o tratamento da sepse e o choque séptico, apontou que ainda é preciso mais estudos com intuito de melhorar o conhecimento sobre o uso concomitante a terapia antimicrobiana, quando se objetiva seu uso no tratamento dessas patologias. Embora existam estudos tentando responder este questionamento, foi evidenciado que apenas dois estudos relataram a redução da mortalidade dos pacientes com a terapia de dexametasona, porém, estes estudos eram antigos. O que reduziu muito a qualidade da evidência encontrada, haja visto que os critérios de definição de sepse mudaram muito nos últimos anos, além de que, todos os estudos não foram livres de viés.

Os estudos recentes publicados (ANNANE *et al.*, 2019; LIANG *et al.*, 2021; VENKATESH *et al.*, 2018) em que foram avaliados o uso de corticosteroides em pacientes que apresentam sepse ou choque séptico, foi evidenciado que ainda não é claro o uso desses medicamentos para o tratamento da patologia. Embora em alguns trabalhos é observada uma redução na mortalidade, há ainda necessidade de maior evidência do relato. Com a revisão realizada neste trabalho, exclusivamente com dexametasona em conjunto com o que foi

encontrado publicado recentemente na literatura, é evidente que mais estudos clínicos devem ser realizados. Para os estudos futuros, relatar de forma clara o uso de corticosteroides em diferentes doses, tempo de administração (melhor momento para o iniciar o tratamento), a população analisada (sexo, idade, estágio e causa da sepse), relacionar o uso desses fármacos com outras terapias e diagnosticar o quadro de sepse com a definição mais recente, *Sepsis-3*, evitando com que esses estudos de base científica apresentem pouco ou nenhum risco de viés. Assim, acreditamos que futuramente será possível tratar melhor a sepse e choque séptico, aumentando a sobrevida, a qualidade de vida desses pacientes, além de diminuir o tempo de internação que consequentemente reduzirá os gastos hospitalares.



## REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, A. A.; EL-AZAB, A. S.; ALSAIF, N. A.; ALANAZI, M. M.; EL-GENDY, M. A.; OBAIDULLAH, A. J.; ALKAHTANI, H. M.; ALMEHIZIA, A. A.; AL-SUWAIDAN, I. A. Synthesis, anti-inflammatory, cytotoxic, and COX-1/2 inhibitory activities of cyclic imides bearing 3-benzenesulfonamide, oxime, and  $\beta$ -phenylalanine scaffolds: a molecular docking study. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 610-621, 2020.
- ABDEL-AZIZ, A. A.; ELTAHIR, K. E.; ASIRI, Y. A. Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. Part 1: Molecular docking study. **European journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1648-1655, 2011.
- AHMED, I.; ISMAIL, N. M1 and M2 Macrophages polarization via mTORC1 influences innate immunity and outcome of *Ehrlichia* Infection. **Journal of Cellular Immunology**, v. 2, n. 3, p. 108-115, 2021.
- AHN, E.; KANG, H. Introduction to systematic review and meta-analysis. **Korean Journal of Anesthesiology**, v. 71, n. 2, p. 103-112, 2018.
- ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; BOLLAERT, P. E.; BRIEGEL, J.; CONFALONIERI, M.; DE GAUDIO, R.; KEH, D.; KUPFER, Y.; OPPERT, M.; MEDURI, G. U.; Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. **JAMA**, v. 301, n. 22, p. 2362-2375, 2009.
- ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; BOLLAERT, P. E.; BRIEGEL, J.; KEH, D.; KUPFER, Y.; PIRRACCHIO, R.; ROCHWERG, B. Corticosteroids for treating sepsis in children and adults. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 12, n. CD002243, p. 1-159, 2019.
- ARANGO-DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, n. 5, v. 491, p. 1-12, 2014.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 2018.
- AZIZ, M.; JACOB, A.; YANG, W.; MATSUDA, A.; WANG, P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 3, p. 329-242, 2013.
- AZZAWI, A. M. A.; AL-OBIADI, K. K. H. Synthesis and antimicrobial screening of new Bisschiff bases and their acetyl oxadiazole Azetidinone derivatives derived from Pyromelliticdiimide. **International journal of research in pharmacy and chemistry**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.
- BACH, D. H.; LIU, J. Y.; KIM, W. K.; HONG, J. Y.; PARK, S. H.; KIM, D.; QIN, S. N.; LUU, T. T.; PARK, H. J.; XU, Y. N.; LEE, S. K. Synthesis and biological activity of new

phthalimides as potential anti-inflammatory agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3396-3405, 2017.

BAO, K.; REINHARDT, R. L. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 25–37, 2015.

BARBOSA, F. T.; LIRA, A. B.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; SANTOS, L. L.; SANTOS, I.; BARBOSA, L. B.; RIBEIRO, M. V. M. R.; SOUSA-RODRIGUES, C. F. Tutorial para execução de revisões sistemáticas e metanálises com estudos de intervenção em anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 69, n. 3, p. 299-306, 2019.

BARRETO, M. F. C.; DELLAROZA, M. S. G.; KERBAUY, G.; GRION, C. M. C. Sepsis em um hospital universitário: estudo prospectivo para análise de custo da hospitalização de pacientes. **Revista Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. 2, p. 302-308, 2016.

BECKER, D. E. Basic and Clinical Pharmacology of Glucocorticosteroids. **Anesthesia Progress**, v. 60, n. 1, p. 25–32, 2013.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. **Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2012.

BRENT, A. J. Sepsis. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 649–653, 2017.

CECHINEL-FILHO, V.; de CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CHANG, J. C. Sepsis and septic shock: endothelial molecular pathogenesis associated with vascular microthrombotic disease. **Thrombosis journal**, v. 17, n. 10, p. 1-19, 2019.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2017.

CHRONIC DISEASES IN AMERICA. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/infographic/chronic-diseases.htm>. Acessado em: 22, julho de 2020.

CICARELLI, D. D.; BENSEÑOR, F. E. M.; VIEIRA, J. E. Effects of single dose of dexamethasone on patients with systemic inflammatory response. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 124, n 2, p. 90-95 2006.

CICARELLI, D. D.; VIEIRA, J. E.; BENSEÑOR, F. E. M. Early dexamethasone treatment for septic shock patients: a prospective randomized clinical trial. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 125, n. 4, p. 237-241, 2007.

CINELLI, M. A.; DO, H. T.; MILEY, G. P.; SILVERMAN, R. B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medical Research Review**, v. 40, n. 1, p. 158-189, 2019.

DAI, B.; WEI, D.; ZHENG, N. N.; CHI, Z. H.; XIN, N.; MA, T. X.; ZHENG, L. Y.; SUMI, R.; SUN, L. Coccomyxa gloeobotrydiformis polysaccharide inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 2523-2535, 2018.

DANIELS, R.; NUTBEAM, T.; SANGAN, V.; ANNAKIN, S.; MATTHEWS, L.; JONES, O. **The Sepsis Manual**. 5<sup>a</sup> ed. United Kingdom Sepsis Trust, Birmingham, 2019.

de CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; de SOUZA, M. M.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CECHINEL-FILHO, V. Studies on new cyclic imides obtained from aminophenazone with analgesic properties. Potent effects of a 3,4-dichloromaleimide derivative. **Arzneimittelforschung Drug Research**, v. 52, n. 6, p. 455-461, 2002.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal Immunol**, v. 37, p. 34-45, 2007.

DINARELLO, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 8-27, 2018.

DUGAR, S.; CHOUDHARY, C.; DUGGAL, A. Sepsis and septic shock: Guideline-based management. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 87, n. 1, p. 53-64, 2020.

EL-ZAYAT, S. R.; SIBAIL, H.; MANNAA, F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 187, p. 1-12, 2019.

EVANS, T. Diagnosis and management of sepsis. **Clinical Medicine**, v. 18, n. 2, p. 146-149, 2018.

FINK, M. P.; WARREN, H. S. Strategies to improve drug development for sepsis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 10, p. 741-58, 2014.

FROST, R. A.; NYSTROM, G. J.; LANG, C. H. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 3, p. 698-709, 2002.

FUNK, D.; DOUCETTE, S.; PISIPATI, A.; DODEK, P.; MARSHALL, J. C.; KUMAR, A. Low-dose corticosteroid treatment in septic shock: a propensity-matching study. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 11, p. 2333-2341, 2014.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, p. 183-184, 2014.

GARCÍA-PIÑERES, A. J.; LINDENMEYER, M. T.; MERFORT, I. Role of cysteine residues of p65/NF-kappaB on the inhibition by the sesquiterpene lactone parthenolide and N-ethyl maleimide, and on its transactivating potential. **Life sciences**, v. 75, n. 7, p. 841-856, 2004.

GIBBISON, B.; LÓPEZ-LÓPEZ, J. A.; HIGGINS, J. P.; MILLER, T.; ANGELINI, G. D.; LIGHTMAN, S. L.; ANNANE, D. Corticosteroids in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2017.

GONG, J. H.; RATKAY, L. G.; WATERFIELD, J. D.; CLARK-LEWIS, I. An Antagonist of Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) Inhibits Arthritis in the MRL-lpr Mouse Model. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 1, p. 131-137, 1997.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Metabolismo do óxido nítrico na fisiopatologia da asma. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1810, n. 11, p. 1008-1016, 2011.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUPTA, P.; BHATIA, V. Corticosteroid Physiology and Principles of Therapy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 75, n. 10, p. 1039-1044, 2008.

GYAWALI, B.; RAMAKRISHNA, K.; DHAMOON, A. S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE Open Medicine**, v. 7, p. 1-13, 2019.

HANKE, T.; MERK, D.; STEINHILBER, D.; GEISLINGER, G.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Small molecules with anti-inflammatory properties in clinical development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 157, p. 163-187, 2016.

HARGREAVES, M. K.; PRITCHARD, J. G.; DAVE, H. R. Cyclic carboxylic monoimides. **Chemical Reviews**, v. 70, n. 4, p. 439-469, 1970.

HART, P. H.; VITTI, G. F.; BURGESS, D. R.; WHITTY, G. A.; PICCOLI, D. S.; HAMILTON, J. A. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, n. 10, p. 3803-3807, 1989.

HASHIZUME, M.; HAYAKAWA, N.; SUZUKI, M.; MIHARA, M. IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF-alpha induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system. **Rheumatology international**, v. 29, n. 12, p. 1449-1454, 2009.

- HEEB, L. E. M.; EGHOLM, C.; BOYMAN, O. Evolution and function of interleukin-4 receptor signaling in adaptive immunity and neutrophils. *Genes Immun*, v. 21, p. 143–149, 2020.
- HIGGINS, J. P. T.; ALTMAN, D. G.; GÖTZSCHE, P. C.; JÜNI, P.; MOHER, D.; OXMAN, A. D.; SAVOVIĆ, J.; SCHULZ, K. F.; WEEKS, L. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. **BMJ**, v. 343, p. 5928, 2011.
- HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International Immunology**, v. 33, n. 3, p. 127–148, 2021.
- HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L.; OPAL, S. M.; REINHART, K.; TURNBULL, I. R.; VINCENT, J. L. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1-21, 2016.
- HU, G.; SU, Y.; KANG, B. H.; FAN, Z.; DONG, T.; BROWN, D. R.; CHEAH, J.; WITTRUP, K. D.; CHEN, J. High-throughput phenotypic screen and transcriptional analysis identify new compounds and targets for macrophage reprogramming. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 773, 2021.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.
- JANEWAY JR., C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, n. 54, p. 1-13, 1989.
- JIANG, H. Y.; WANG, W. G.; ZHOU, M.; WU, H. Y.; ZHAN, R.; LI, X. N.; DU, X.; LI, Y.; PU, J. X.; SUN, H. D. Enmein-type 6,7-seco-ent-kauranoids from *Isodon sculponeatus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2113-2119, 2013.
- KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ): Exploring its implications in infectious diseases. **Biomolecular Concepts**, v. 9, n. 1, p. 64-79, 2018.
- KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 20, p. 1-32, 2019.
- KHALIL, A. M.; BERGHOT, M. A.; GOUDA, M. A. Synthesis and study of some new 1,3-isoindoleione derivatives as potential antibacterial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1552-1559, 2010.
- KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. BJA: **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3–11, 2001.
- KIVIMÄKI, K.; LEPPÄNEN, T.; HÄMÄLÄINEN, M.; VUOLTEENAHO, K.; MOILANEN, E. Pinosylin shifts macrophage polarization to support resolution of inflammation. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2772, 2021.
- KLEINERT, H.; SCHWARZ, P. M.; FÖRSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biological chemistry**, v. 384, n. 10-11, p. 1343-164, 2003.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

LAMBDEN, S.; LATERRE, P. F.; LEVY, M. M.; FRANCOIS, B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 374, 2019

LEE, J. Y.; PARK, W. Anti-Inflammatory effect of wogonin on raw 264.7 mouse macrophages induced with polyinosinic-polycytidylic acid. **Molecules**, v. 20, p. 6888-6900, 2015.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; VINCENT, J.; RAMSAY, J. 2001SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 530–538, 2003.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LI, J.; CHEN, Y. H.; LI, L. Z.; WANG, F.; SONG, W.; ALOLGA, R. N.; ZHOU, W.; YU, H.; HUANG, F. Q.; YIN, X. Omics and transgenic analyses reveal that salvianolic acid B exhibits its anti-inflammatory effects through inhibiting the Mincle-Syk-related pathway in macrophages. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 7, p. 3734-3748, 2021.

LIANG, H.; SONG, H.; ZHAI, R.; SONG, G.; LI, H.; DING, X.; KAN, Q.; SUN, T. Corticosteroids for Treating Sepsis in Adult Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in immunology**, v. 12, n. 709155, 2021.

LIBERATI, A.; ALTMAN, D. G.; TETZLAFF, J.; MULROW, C.; GÖTZSCHE, P. C.; IOANNIDIS, J. P.; CLARKE, M.; DEVEREAUX, P. J.; KLEIJNEN, J.; MOHER, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. **Plos Medicine**, v. 62, n. 10, p. 1-28, 2009.

LIND, M.; HAYES, A.; CAPRNDA, M.; PETROVIC, D.; RODRIGO, L.; KRUZLIAK, P.; ZULLI, A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 93, p. 370-375, 2017.

LUCAS, C. E.; LEDGERWOOD, A. M. The Cardiopulmonary Response to Massive Doses of Steroids in Patients with Septic Shock. **Arch Surg**, v. 119, n. 5, p. 537-541, 1984.

MAHLE, F.; GUIMARÃES, T. da R.; MEIRA, A. V.; CORRÊA, R.; BELLA-CRUZ, R. C.; BELLA-CRUZ, A.; NUNES, R. J.; CECHINEL-FILHO, V.; de CAMPOS-BUZZI, F. Synthesis and biological evaluation of N-antipyrine-4-substituted amino-3-chloromaleimide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 4761-4768, 2010.

MARIK, P. E. Steroids for sepsis: yes, no or maybe. **Journal of Thoracic Disease**, v. 10, n. 9, p. 1070-1073, 2018.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.

MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. **Mediators of inflammation**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURAD, M. H.; ASI, N.; ALSAWAS, M.; ALAHDAB, F. New evidence pyramid. **BMJ Evidence-Based Medicine**, v. 21, n. 4, p. 125-127, 2016.

NAPOLITANO, L. M. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 117-125, 2018.

NEHA, K.; WAKODE, S. Contemporary advances of cyclic molecules proposed for inflammation. **European journal of medicinal chemistry**, v. 221, n. 113493, 2021.

NETEA, M. G.; BALKWILL, F.; CHONCHOL, M.; COMINELLI, F.; DONATH, M. Y.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; GOLENBOCK, D.; GRESNIGT, M. S.; HENEKA, M. T.; HOFFMAN, H. M.; HOTCHKISS, R.; JOOSTEN, L. A. B.; KASTNER, D. L.; KORTE, M.; LATZ, E.; LIBBY, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; MANTOVANI, A.; MILLS, K. H. G.; NOWAK, K. L.; O'NEILL, L. A.; PICKKERS, P.; POLL, T. V. D.; RIDKER, P. M.; SCHALKWIJK, J.; SCHWARTZ, D. A.; SIEGMUND, B.; STEER, C. J.; TILG, H.; MEER, J. W. M. V. D.; VEERDONK, F. L. V. D.; DINARELLO, C. A. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, n. 3, v. 83, p. 770-803, 2020.

NISHIMOTO, N.; TERAOKA, K.; MIMA, T.; NAKAHARA, H.; TAKAGI, N.; KAKEHI, T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3959-3964, 2008.

OUYANG, W.; LÖHNING, M.; GAO, Z.; ASSENMACHER, M.; RANGANATH, S.; RADBRUCH, A.; MURPHY, K. M. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. **Immunity**, v. 12, n. 1, p. 27-37, 2000.

PACHECO, R. L.; LATORRACA, C. O. C.; MARTIMBIANCO, A. L. C.; PACHITO, D. V.; RIERA, R. PROSPERO: base de registro de protocolos de revisões sistemáticas. Estudo descritivo. **Diagnóstico & Tratamento**, v. 23, n. 3, p. 101-104, 2018.

PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T. C.; MULROW, C. D.; SHAMSEER, L.; TETZLAFF, J. M.; AKL, E. A.; BRENNAN, S. E.; CHOU, R.; GLANVILLE, J.; GRIMSHAW, J. M.; HRÓBJARTSSON, A.; LALU, M. M.;

- LI, T.; LODER, E. W.; MAYO-WILSON, E.; MCDONALD, S.; MCGUINNESS, L. A.; STEWART, L. A.; THOMAS, J.; TRICCO, A. C.; WELCH, V. A.; WHITING, P.; MOHER, D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **British medical journal**, v. 372, :n. 71, 2021.
- PAHWA, R.; GOYAL, A.; BANSAL, P.; JIALAL, I. **Chronic Inflammation**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>. Acessado em 4 julho de 2020.
- PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.
- PREDONZANI, A.; CALÌ, B.; AGNELLINI, A. H.; MOLON, B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World journal of experimental medicine**, v. 5, n. 2, p. 64-76, 2015.
- PEI, L.; LE, Y.; CHEN, H.; FENG, J.; LIU, Z.; ZHU, J.; WANG, C.; CHEN, L.; DOU, X.; LU, D. Cynaroside prevents macrophage polarization into pro-inflammatory phenotype and alleviates cecal ligation and puncture-induced liver injury by targeting PKM2/HIF-1 $\alpha$  axis. **Fitoterapia**, v. 152, p. 104922, 2021.
- POLL, T.; VEERDONK, F. L.; SCICLUNA, B. P.; NETEA, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Review Immunol**, v. 17, n. 7, p. 407-420, 2017.
- QUINTÃO, N. L. M.; SILVA, G. F.; ANTONIALLI, C. S.; CAMPOS-BUZZI, F.; CORRÊA, R.; CECHINEL-FILHO, V. *N*-Antipyrine-3, 4-Dichloromaleimide, an Effective Cyclic Imide for the Treatment of Chronic Pain: The Role of the Glutamatergic System. **Anesthesia & Analgesia**, v. 110, n. 3, p. 942-950, 2010.
- ROMERO, C. R.; HERZIG, D. S.; ETOGO, A.; NUNEZ, J.; MAHMOUDIZAD, R.; FANG, G.; MURPHEY, E. D.; TOLIVER-KINSKY, T.; SHERWOOD, E. R. The role of interferon- $\gamma$  in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 4, p. 725-735, 2010.
- ROSOLEN, D.; NOLDIN, V. F.; WINTER, E.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL-FILHO, V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Intracellular ROS Generation Mediates Maleimide-induced Cytotoxicity in Leukemia Cells. **Anticancer. Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1164-1173, 2015.
- ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**. v. 20, n. 2, p. 1-2, 2007.
- RUDD, K. E.; JOHNSON, S. C.; AGESA, K. M.; SHACKELFORD, K. A.; TSOI, D.; KIEVLAN, D. R.; COLOMBARA, D. V.; IKUTA, K. S.; KISSOON, N.; FINFER, S.; FLEISCHMANN-STRUZEK, C.; MACHADO, F. R.; REINHART, K. K.; ROWAN, K.; SEYMOUR, C. W.; WATSON, R. S.; WEST, T. E.; MARINHO, F.; HAY, S. I.; LOZANO, R.; LOPEZ, A. D.; ANGUS, D. C.; MURRAY, C. J. L.; NAGHAVI, M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 395, p. 200–211, 2020.



- SAPERSTEIN, S.; CHEN, L.; OAKES, D.; PRYHUBER, G.; FINKELSTEIN, J. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 29, n. 5, p. 273-284, 2009.
- SCHEINMAN, R.; COGSWELL, P. C.; LOFQUIST, A. K.; BALDWIN, A. S. Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. **Science**, v. 270, n 5234, p. 283-286, 1995.
- SCHETT, G.; NEURATH, M. F. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p.3261, 2018.
- SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG, (eds). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill; p. 1459-85, 1996.
- SCHULTZE, J. L. Reprogramming of macrophages--new opportunities for therapeutic targeting. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 26, p. 10-15, 2016.
- SCHULZ, K. F.; ALTMAN, D. G.; MOHER, D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. **Annals of Internal Medicine** Logo, v. 152, n. 11, p. 726-732, 2010.
- SCHUMER, W. Steroids in the treatment of clinical septic shock. **Ann Surg**, v. 184, n. 3, p. 333-341, 1976.
- SHAIKH, S.; VERMA, H.; YADAV, N.; JAUHARI, M.; BULLANGOWDA, J. Applications of Steroid in Clinical Practice: A Review. **International Scholarly Research Notices**, p. 1-10, 2012.
- SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**. v. 15, n. 6, p. 252-259, 2007.
- SHIRATORI, H.; FEINWEBER, C.; LUCKHARDT, S.; WALLNER, N.; GEISLINGER, G.; WEIGERT, A.; PARNHAM, M. J. An in vitro test system for compounds that modulate human inflammatory macrophage polarization. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 328-338, 2018.
- SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M.; BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, J. D.; COOPERSMITH, C. M.; HOTCHKISS, R. S.; LEVY, M. M.; MARSHALL, J. C.; MARTIN, G. S.; OPAL, S. M.; RUBENFELD, G. D.; POLL, T.; VINCENT, J. L.; ANGUS, D. C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.
- SOEHNLEIN, O.; STEFFENS, S.; HIDALGO, A.; WEBER, C. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature reviews. Immunology**. v. 17, n. 4, p. 248-261, 2017.

SPRUNG, C. L.; CARALIS, P. V.; MARCIAL, E. H.; PIERCE, M.; GELBARD, M. A.; LONG, W. M.; DUNCAN, R. C.; TENDLER, M. D.; KARPFF, M. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 18, p. 1137-1143, 1984.

STYLIANOU, E. Epigenetics of chronic inflammatory diseases. **Journal of Inflammation Research**, v. 12, p. 1–14, 2018.

SUGIMOTO, M. A.; SOUSA, L. P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: what Controls its Onset?. **Frontiers in Immunology**. v. 7, n. 160, p. 1-18, 2016.

SUGIMOTO, M. A.; VAGO, J. P.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Mediators of the resolution of the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 3, p. 212-227, 2019.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biololy**, v. 10, n. 6, p. 1-16, 2014.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature reviews. Immunology**, v. 18, n. 5, p. 309-32, 2018.

THOMPSON, K.; VENKATESH, B.; FINFER, S. Sepsis and septic shock: current approaches to management. **Internal Medicine Journal**, v. 49, n. 2, p. 160–170, 2019.

TIMMERMANS, S; SOUFFRIAUX, J; LIBERT, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Frontiers in immunology*, v. 10, n. 1545, p. 1-17, 2019.

UMAN, L. S. Systematic Reviews and Meta-Analyses. **Journal of Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 57–59, 2011.

VANDERWALL, A. G.; MILLIGAN, R. D. Cytokines in pain: Harnessing endogenous anti-inflammatory signaling for improved pain management. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 3009, 2019.

VENKATESH, B.; FINFER, S.; COHEN, J.; RAJBHANDARI, D.; ARABI, Y.; BELLOMO, R.; BILLOT, L.; CORREA, M.; GLASS, P.; HARWARD, M.; JOYCE, C.; LI, Q.; MCARTHUR, C.; PERNER, A.; RHODES, A.; THOMPSON, K.; WEBB, S.; MYBURGH, J. ADRENAL Trial Investigators and the Australian–New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Adjunctive Glucocorticoid Therapy in Patients with Septic Shock. **The New England journal of medicine**, v. 378, n. 9, p. 797-808, 2018.

VIANA, R. A. P. P.; MACHADO, F. R. SOUZA, J. L. A Sepsis, um problema de saúde pública: a atuação e colaboração da enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença. 2ª ed. São Paulo: COREN-SP, 2017.

VIOLI, F.; MARINO, R.; MILITE, M. T.; LOFFREDO, L. Nitric oxide and its role in lipid peroxidation. **Diabetes metabolism research and reviews**, v. 15, n. 4, p. 283-288, 1999.

WANG, L.; LU, Q.; GAO, W.; YU, S. Recent advancement on development of drug-induced macrophage polarization in control of human diseases. **Life sciences**, v. 284, n. 119914, p. 1-14, 2021.

WANG, X.; JI, Q.; HU, W.; ZHANG, Z.; HU, F.; CAO, S.; WANG, Q.; HAO, Y.; GAO, M.; ZHANG, X. Isobavachalcone prevents osteoporosis by suppressing activation of ERK and NF- $\kappa$ B pathways and M1 polarization of macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 94, p. 107370, 2021.

WEIDINGER, A.; KOZLOV, A. V. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. **Biomolecules**, n. 5, v. 2, p. 472-484, 2015.

WILLIAMS, D. M. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. **Respiratory Care**, v. 63, n. 6, p. 655-670, 2018.

WU, M. D.; CHENG, M. J.; YECH, Y. J.; YUAN, G. F.; CHEN, J. J. Inhibitory effects of maleimide derivatives from the mycelia of the fungus *Antrodia cinnamomea* BCRC 36799 on nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW264.7 macrophages. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 434-441, 2013.

WU, M. D.; CHENG, M. J.; WANG, B. C.; YECH, Y. J.; LAI, J. T.; KUO, Y. R.; YUAN, G. F.; CHEN, I. S. Maleimide and maleic anhydride derivatives from the mycelia of *Antrodia cinnamomea* and their nitric oxide inhibitory activities in macrophages. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1258-1261, 2008.

YAO, Y., XU, X.; JIN, L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, n. 792, p. 1-13, 2019.

YANG, Y.; LV, J.; JIANG, S.; MA, Z.; WANG, D.; HU, W.; DENG, C.; FAN, C.; DI, S.; SUN, Y.; YI, W. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. **Cell death & disease**, v. 7, n. 5, p. e2234, 2016.

YUNES, J. A.; CARDOSO, A. A.; YUNES, R. A.; CORRÊA, R.; DE CAMPOS-BUZZI, F.; CECHINEL-FILHO, V. Antiproliferative effects of a series of cyclic imides on primary endothelial cells and a leukemia cell line. **Zeitschrift für Naturforschung. C, A journal of biosciences**, v. 63, n. 9-10, p. 675-680, 2008.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 years of NF- $\kappa$ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 37-57, 2017.

ZHAO, J.; LI, X.; MCGOWAN, S.; NIEDERNHOFER, L. J.; ROBBINS, P. D. NF- $\kappa$ B activation with aging: characterization and therapeutic inhibition. **Methods in Molecular Biology**, v. 1280, p. 543-57, 2015.

## APÊNDICE A – Material suplementar do capítulo 1

Ficha complementar 1 - Risco de avaliação do viés de acordo com o manual da Cochrane para o teste de prevenção.

<b>Critérios de avaliação - manual Cochrane</b>	<b>Baixo risco</b>	<b>Alto risco</b>	<b>Risco pouco claro</b>
Geração de sequência aleatória	-	-	1, 2 e 3
Ocultação de alocação	-	-	1, 2 e 3
Cegamento de participantes e pessoa	-	-	1, 2 e 3
Ocultação da avaliação de resultados	-	-	1, 2 e 3
Livre de dados de resultados incompletos	1, 2 e 3	-	-
Relatórios seletivos	1, 2 e 3	-	-
Outro viés	-	-	1, 2 e 3

Legenda: 1: Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007); 2: Schumer (1976); 3: Lucas e Ledgerwood (1984).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ficha complementar 2 - Qualidade da avaliação dos relatórios de acordo com a lista de verificação CONSORT para os estudos de prevenção.

(continua)

<b>Critérios de avaliação - lista de verificação CONSORT para ensaios</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>Título e Resumo</b>		
Identificar no título como um estudo clínico randomizado	1	2 e 3
Resumo estruturado de um desenho de estudo, métodos, resultados e conclusões	1, 2 e 3	-
<b>Introdução</b>		
Fundamentação científica e explicação do raciocínio	1, 2 e 3	-
Objetivos específicos ou hipóteses	1, 2 e 3	-
<b>Métodos</b>		
Descrição do estudo clínico (como paralelo, fatorial) incluindo a taxa de alocação	-	1, 2 e 3
Alterações importantes nos métodos após ter iniciado o estudo clínico (como critérios de elegibilidade), com as razões	-	1, 2 e 3
Crítérios de elegibilidade para participantes	1 e 2	3
Informações e locais de onde foram coletados os dados	1, 2 e 3	-
As intervenções de cada grupo com detalhes suficientes que permitam a replicação, incluindo como e quando eles foram realmente administrados	1, 2 e 3	-
Medidas completamente pré-especificadas definidas de desfechos primários e secundários, incluindo como e quando elas foram avaliadas	1	2 e 3
Quaisquer alterações nos desfechos após o estudo clínico ter sido iniciado, com as razões	1, 2 e 3	-
Como foi determinado o tamanho da amostra	-	1, 2 e 3
Quando aplicável, deve haver uma explicação de qualquer análise de interim e diretrizes de encerramento	-	1, 2 e 3
Método utilizado para geração de sequência randomizada de alocação	-	1, 2 e 3
Tipos de randomização, detalhes de qualquer restrição (tais como randomização por blocos e tamanho do bloco)	-	1, 2 e 3
Mecanismo utilizado para implementar a sequência de alocação randomizada (como recipientes numerados sequencialmente), descrevendo os passos seguidos para a ocultação da sequência até as intervenções serem atribuídas	-	1, 2 e 3
Quem gerou a sequência de alocação randomizada, quem inscreveu os participantes e quem atribuiu as intervenções aos participantes	-	1, 2 e 3

<b>Critérios de avaliação - lista de verificação CONSORT para ensaios</b>	(conclusão)	
	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
Se realizado, quem foi cegado após as intervenções serem atribuídas (ex. Participantes, cuidadores, assessores de resultado) e como	-	1, 2 e 3
Se relevante, descrever a semelhança das intervenções	-	1, 2 e 3
Métodos estatísticos utilizados para comparar os grupos para desfechos primários e secundários	1 e 3	2
Métodos para análises adicionais, como análises de subgrupo e análises ajustadas	-	1, 2 e 3
<b>Resultados</b>		
Para cada grupo, o número de participantes que foram randomicamente atribuídos, que receberam o tratamento pretendido e que foram analisados para o desfecho primário	1, 2 e 3	-
Para cada grupo, perdas e exclusões após a randomização, junto com as razões	1 e 3	2
Definição das datas de recrutamento e períodos de acompanhamento	1, 2 e 3	-
Dizer os motivos de o estudo ter sido finalizado ou interrompido	1, 2 e 3	-
Tabela apresentando os dados de base demográficos e características clínicas de cada grupo	-	1, 2 e 3
Para cada grupo, número de participantes (denominador) incluídos em cada análise e se a análise foi realizada pela atribuição original dos grupos	-	1, 2 e 3
Para cada desfecho primário e secundário, resultados de cada grupo e o tamanho efetivo estimado e sua precisão (como intervalo de confiança de 95%)	-	1, 2 e 3
Para desfechos binários, é recomendada a apresentação de ambos os tamanhos de efeito, absolutos e relativos	-	1, 2 e 3
Resultados de quaisquer análises realizadas, incluindo análises de subgrupos e análises ajustadas, distinguindo-se as pré-especificadas das exploratórias	-	1, 2 e 3
Todos os importantes danos ou efeitos indesejados em cada grupo	-	1, 2 e 3
<b>Discussão</b>		
Limitações do estudo clínico, abordando as fontes dos potenciais vieses, imprecisão, e, se relevante, relevância das análises	-	1, 2 e 3
Generalização (validade externa, aplicabilidade) dos achados do estudo clínico	1, 2 e 3	-
Interpretação consistente dos resultados, balanço dos benefícios e danos, considerando outras evidências relevantes	1, 2 e 3	-
<b>Outras informações</b>		
Número de inscrição e nome do estudo clínico registrado	-	1, 2 e 3
Onde o protocolo completo do estudo clínico pode ser acessado, se disponível	-	1, 2 e 3
Fontes de financiamento e outros apoios (como abastecimento de drogas), papel dos financiadores	-	1, 2 e 3

Legenda: 1: Cicarelli, Vieira e Benseñor (2007); 2: Schumer (1976); 3: Lucas e Ledgerwood (1984).

Fonte: Elaborada pelo autor.

## ANEXO A – Artigos referentes a tese

Revista: *SN Comprehensive Clinical Medicine*

SN Comprehensive Clinical Medicine (2020) 2:886–892  
<https://doi.org/10.1007/s42399-020-00334-9>

MEDICINE

Check for updates

SN

## Effect of Dexamethasone on Mortality in Adult and Elderly Patients with Sepsis: a Systematic Review

Eduarda Fratoni<sup>1</sup> · Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento<sup>1</sup> · Eduarda Talita Bramorski Mohr<sup>1</sup> · Ethiene da Silva Fontoura<sup>2</sup> · Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade<sup>2</sup> · Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>1</sup> 

Accepted: 22 May 2020 / Published online: 19 June 2020  
 © Springer Nature Switzerland AG 2020

**Abstract**

Sepsis is a serious disease that affects many people worldwide, and many therapies are used, including corticosteroids such as dexamethasone. However, there is no conclusion as yet, concerning the use of dexamethasone in patients with sepsis or septic shock. The aim of this study was to perform a literature review to assess the mortality of patients with sepsis or septic shock using dexamethasone, answering the following question: What is the effect of dexamethasone on mortality in adult and elderly patients with sepsis compared with mortality in patients who do not use anti-inflammatory therapy? The protocol of this study was registered in the PROSPERO database. The systematic literature search was performed in four electronic databases. Bias risk assessments were performed using the Cochrane Collaboration tool, and notification quality was assessed using the CONSORT-based checklist. The literature search initially identified 13,999 records. The three selected studies included eighty adult patients with sepsis or septic shock who had received dexamethasone as an intervention. Of the three articles, two concluded that the use of dexamethasone significantly reduces the mortality in patients with sepsis or septic shock. The Cochrane Collaboration tool bias risk results showed that none of the studies was completely bias-free and through the CONSORT checklist, it was found that none of the studies met 50% or more of the applicable requirements. Thus, it is clear from this review that further randomized clinical trials comparing the use of dexamethasone to placebo in adjunctive therapy for sepsis patients are needed. The registration number in the PROSPERO database is CRD42018088150.

**Keywords** Sepsis · Septic shock · Corticosteroids · Dexamethasone · Therapy

**Introduction**

Sepsis is currently defined as a fatal organic dysfunction, which is caused by an infection with dysregulated host response, causing physiological, pathological, and biochemical abnormalities. Septic shock is defined as a subset of sepsis in

which abnormalities in circulatory and cellular metabolism are more severe, significantly increasing the risk of death to the patient. Thus, septic shock is considered a more serious condition, with a higher probability of death than isolated sepsis [1, 2].

In clinical practice, sepsis is represented by an increase in the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) of 2 points or more. Patients with septic shock should be clinically identified as having sepsis and requiring vasopressor therapy, maintaining a mean arterial pressure of 65 mmHg or greater and serum lactate levels greater than 2 mmol/L (> 18 mg/dL) in the absence of hypovolemia [3]. Hospital sepsis mortality rates are higher than 10%, while septic shock rates are higher than 40%. It is estimated that 5 million people die from sepsis annually worldwide. In the USA, hospital costs due to sepsis represent more than US \$ 24 billion per year [4, 5].

The initial treatment for sepsis is early and adequate administration of antimicrobials. Clinical signs and symptoms, appropriate microbiological cultures, and relevant imaging

---

This article is part of the Topical Collection on *Medicine*

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s42399-020-00334-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eduardo Monguilhott Dalmarco  
 eduardo.dalmarco@ufsc.br


<sup>1</sup> Postgraduation program in Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Trindade, Florianópolis, SC CEP 88040-900, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduation program in Nutrition, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil



SN Comprehensive Clinical Medicine  
 A SPRINGER NATURE JOURNAL

Revista: *Immunopharmacology and Immunotoxicology* - JCR: 2,730

11/02/21, 2:52 PM
Author Dashboard




**Taylor & Francis Group**  
an informa business




Hi, Eduardo ...

---


## My Articles

SUBMIT NEW MANUSCRIPT

	SUBMISSION	TITLE	JOURNAL	STATUS	CHARGES
	214941004	The in vitro anti-...	Immunopharmacology And Immunotoxi...	With Journal Administrator	



SUBMISSION ^

 Feedback

04 November 2021 Submission Created

---

04 November 2021 Submission Incomplete

---

04 November 2021 Manuscript Submitted

---

04 November 2021 With Journal Administrator

---

07 November 2021 Submission Returned to Author

---

07 November 2021 Submission Incomplete

---

07 November 2021 Manuscript Resubmitted

---

07 November 2021 With Journal Administrator

CONTACT

## ANEXO B – Artigos em parceria durante o período de doutorado



Revista: *Journal of Chromatography A*. JCR: 4,759

Journal of Chromatography A, xxx (xxxx) xxx

Contents lists available at ScienceDirect

**Journal of Chromatography A**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## A single-step isolation by centrifugal partition chromatography of the potential anti-inflammatory glaucolide B from *Lepidaploa chamissonis*

Layzon Antonio Lemos Da Silva<sup>a</sup>, Louis P. Sandjo<sup>a</sup>, Eduarda Fratoni<sup>b</sup>,  
Yeo Jim Kinoshita Moon<sup>b</sup>, Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>b</sup>, Maique Weber Biavatti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil  
<sup>b</sup> Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil

---

**ARTICLE INFO**

*Article history:*  
Received 27 March 2019  
Received in revised form 5 July 2019  
Accepted 8 July 2019  
Available online xxx

*Keywords:*  
Centrifugal partition chromatography (CPC)  
Glaucolide B  
Sesquiterpene lactone  
*Lepidaploa chamissonis*  
Anti-inflammatory activity

**ABSTRACT**

Sesquiterpene lactones (SL) are commonly found in Asteraceae and present a promising anti-inflammatory activity. Previously described in *Lepidaploa* genus, glaucolide B has never been investigated for its anti-inflammatory potential. This study aimed to establish an efficient process for the extraction of glaucolide B (**1**) from *Lepidaploa chamissonis* leaves and to develop a simple and fast method for its purification by using centrifugal partition chromatography (CPC), as well as to investigate *in vitro* the anti-inflammatory effects of glaucolide B. Thus, an optimized washing extractive process performed on *L. chamissonis* leaves allowed to obtain a SL enriched extract (4.11 g). After a successful defatting pretreatment of the crude extract, the glaucolide B enriched ethyl acetate portion (2.00 g) was fractionated by CPC affording, in a single-step isolation, compound **1** (1.04 g) in great yield (25%) and purity (97%). Cytotoxicity effect of **1** on RAW 264.7 macrophages was determined by using MTT assay, revealing a CC<sub>50</sub> of 14.11 μM. Compound **1** at 1, 3 and 10 μM inhibited the nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) metabolites production and the pro-inflammatory interleukin 6 (IL-6) secretion on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. The extractive process used turned to be selective for SL and CPC technique proved a simple and effective tool for the isolation of **1** within few hours. Isolated for the first time from *L. chamissonis* leaves, glaucolide B presented a significant inhibitory effect on both NO and IL-6 secretion under non-toxic concentrations. © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

---

### 1. Introduction

Glaucolide B, previously described in *Lepidaploa* genus [1,2], is a sesquiterpene lactone (SL) characterized by a ten-membered hydrocarbon structure bearing a fused endocyclic α,β-unsaturated (at C-7/C-11) γ-lactone ring and a conjugated C-13 acetoxy group [3]. Its structural features differ from those of other SL by the skeletal hydrocarbon and the presence of a fused exocyclic methylene (C-11/C-13) butyrolactone [4]. Glaucolides are widespread in Veroniceae tribe (Asteraceae) [5], to which belongs the species *Lepidaploa chamissonis* (Less.) H. Rob., popularly known in Brazil as “cambarazinho” [6,7].

SL may have a high significance in human health as pharmaceutical agents since many studies considered them as promising anti-inflammatory [8,9]. Different isolated and semisynthetic analogues are described in the literature with anti-inflammatory activities and their inhibitory effect is related to the secretion of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine RAW 264.7 macrophages [10–13]. Similarly, other SL such as endocyclic α,β-unsaturated γ-lactone SL hirsutinolide-type presented the same inhibitory effect on NO production and against the TNF-α-induced nuclear factor kappa B (NF-κB) activity in LPS-stimulated RAW 264.7 cells [14,15]. The proposed mechanism by which SL exert this biological activity was their effect on pro-inflammatory cytokines secretion and from the decrease of NF-κB activity which consequently affect the enzymatic activity of cyclooxygenase (COX) and inducible NO synthase (iNOS) [16,17]. Moreover, the capacity of SL of preventing the activation of NF-κB was reported to be related to a Michael addition reaction type of the nucleophilic cysteine (Cys-38 and Cys-120) sulfhydryl groups of the NF-κB (subunits p50/p65) complex, to the α,β- or α,β,γ-unsaturated carbonyl SL moieties [18–20]. In addition, such reduction of the NF-κB activation may also be associated with the induction of degradation of the inhibitors κBα (IκB-α) and β (IκB-β), interfering in the balance of the IKK (NF-κB/IκB kinase) complex [18,21,22].

<sup>\*</sup> Corresponding author.  
E-mail address: [maiique.biavatti@ufsc.br](mailto:maiique.biavatti@ufsc.br) (M.W. Biavatti).

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460362>  
0021-9673/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.





## Original article

## New pre-clinical evidence of anti-inflammatory effect and safety of a substituted fluorophenyl imidazole



Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento<sup>a</sup>, Antonio Carlos Mattar Munhoz<sup>a</sup>,  
Bruno Matheus De Campos Facchin<sup>a</sup>, Eduarda Fratoni<sup>a</sup>, Thaís Andreia Rossa<sup>b</sup>,  
Marcus Mandolesi Sá<sup>b</sup>, Carlo Cosimo Campa<sup>c</sup>, Elisa Ciraolo<sup>c</sup>, Emilio Hirsch<sup>c</sup>,  
Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduation program in Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

<sup>c</sup> Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Turin, Via Nizza 52, 10126, Torino, Italy

<sup>d</sup> Department of Clinical Analysis, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Imidazole  
Inflammation  
*In vivo*  
NF- $\kappa$ B  
p38 MAPK  
ARDS

## ABSTRACT

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is an inflammatory condition with high mortality rates, and there is still no pharmacological approach with proven effectiveness. In the past few years, several imidazole small molecules have been developed to treat conditions in which inflammation plays a central role. In the present work, we hypothesize that a novel substituted fluorophenyl imidazole synthesized by our research group would present *in vivo* anti-inflammatory effect in an ARDS murine model induced by LPS. Results shows that the fluorophenyl imidazole has the ability to inhibit leukocyte migration to the bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue of animals challenged intranasally with LPS. Furthermore, this inhibition is followed with reduction in myeloperoxidase activity, nitric oxide metabolites generation and cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$  and IL-10) secretion. This effect is at least partly related to the capacity of the fluorophenyl imidazole to inhibit p38 MAPK and NF- $\kappa$ B phosphorylation. Finally, fluorophenyl imidazole showed no signs of acute oral toxicity in the toxicological protocol suggested by OECD 423. Taken together, the results shows that fluorophenyl imidazole is a promising prototype for the development of a novel anti-inflammatory drug in which p38 MAPK and NF- $\kappa$ B plays a pivotal role.

## 1. Introduction

Inflammation is still one of the main problems responsible for the medical burden in clinics and hospitals, as this phenomenon is involved in various pathological processes, taking many different forms e.g. metabolic syndromes [1], cancer [2], neurodegenerative conditions [3] and infectious diseases [4]. As more information is gathered about specific diseases, it is becoming apparent that inflammation is involved in many of these pathologies. The continuous pursuit for novel anti-inflammatory drugs, with the intention of produce safer and more efficient molecules for specific inflammatory conditions, is therefore essential [5,6].

In this scenario, Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is an inflammatory condition defined by acute hypoxemia and pulmonary cellular infiltration with diffuse alveolar injury following a triggering

factor. To date, there is still no approved drug that can directly treat or resolve this complex pathology [7]. Mortality in patients with the severe form of ARDS is as high as 45%, and those who survive present a high risk of complications such as depression, post-traumatic stress disorder and cognitive decline [8]. Usually, ARDS is divided in two main phases: an exudative and a fibrotic phase. In the initial exudative phase, alveolar edema and cellular infiltration occur, mainly of neutrophils and macrophages. In conditions where the ARDS is indirectly caused by a septic process, activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) by lipopolysaccharide (LPS) triggers an intracellular response in pulmonary resident cells that results in the activation of transcription factors, such as NF- $\kappa$ B, and mitogen-activated protein kinases, such as p38. Because of this, pro-inflammatory cytokines, enzymes and several inflammatory parameters are generated, activated and secreted [9,10]. Although several pharmacological approaches to ARDS have been

\* Corresponding author at: Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail address: [eduardo.dalmarco@ufsc.br](mailto:eduardo.dalmarco@ufsc.br) (E.M. Dalmarco).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2019.01.052>

Received 18 December 2018; Received in revised form 15 January 2019; Accepted 16 January 2019  
0753-3322/ Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license  
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Journal Pre-proof

Antioxidant and anti-inflammatory action (*in vivo* and *in vitro*) from the trunk barks of Cabreúva (*Myrocarpus frondosus* Allemão, Fabaceae)

Mariana Bottamedi, Marcus Vinícius Pereira dos Santos Nascimento, Eduarda Fratoni, Yeo Jim Kinoshita Moon, Larissa Faqueti, Tiago Tizziani, Louis P. Sandjo, Alexandre Siminski, Eduardo Monguilhott Dalmarco, Beatriz Garcia Mendes

PII: S0378-8741(20)33433-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113545>

Reference: JEP 113545

To appear in: *Journal of Ethnopharmacology*

Received Date: 17 July 2020

Revised Date: 28 October 2020

Accepted Date: 30 October 2020

Please cite this article as: Bottamedi, M., Pereira dos Santos Nascimento, M.V., Fratoni, E., Kinoshita Moon, Y.J., Faqueti, L., Tizziani, T., Sandjo, L.P., Siminski, A., Dalmarco, E.M., Mendes, B.G., Antioxidant and anti-inflammatory action (*in vivo* and *in vitro*) from the trunk barks of Cabreúva (*Myrocarpus frondosus* Allemão, Fabaceae), *Journal of Ethnopharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113545>.







This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier B.V.



## Research Article

# ***In Vitro* Free Radical Scavenging Properties and Anti-Inflammatory Activity of *Ilex paraguariensis* (Maté) and the Ability of Its Major Chemical Markers to Inhibit the Production of Proinflammatory Mediators**

**Ingrid Vicente Farias** , **Eduarda Fratoni** , **Lais Cristina Theindl** ,  
**Angela Machado de Campos** , **Eduardo Monguilhott Dalmarco** ,  
**and Flavio Henrique Reginatto** 

*Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil*

Correspondence should be addressed to Eduardo Monguilhott Dalmarco; [eduardo.dalmarco@ufsc.br](mailto:eduardo.dalmarco@ufsc.br)

Received 20 May 2021; Accepted 7 October 2021; Published 1 November 2021

Academic Editor: Elisabetta Buommino


Copyright © 2021 Ingrid Vicente Farias et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae), popularly known as “yerba mate,” has great economic and social significance for the population of Southern Latin America. This study was conducted (1) to investigate the phytochemical composition of four different standardized extracts, (2) to investigate its free radical scavenging properties, and (3) to investigate the anti-inflammatory action of *I. paraguariensis* and its major chemical markers. The chemical profile was achieved by Folin-Ciocalteu, by LC/DAD, and by LC/MS assays, while the antioxidant and anti-inflammatory properties were investigated, respectively, by DPPH assay and by inhibition of nitric oxide (Griess reaction) and TNF- $\alpha$  (ELISA). Our results demonstrated that the IA (aqueous infusion extract) showed higher amounts of total phenolic contents ( $266.62 \pm 10.85 \text{ mg CAE} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DE}$ ), the highest amounts of all six chemical markers (theobromine, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, caffeine, and rutin), and stronger antioxidant activity ( $\text{EC}_{50} = 54.4 \pm 5.14 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). The IA extract also showed the lowest inhibition of NO $_x$  secretion ( $50.10 \pm 8.97\%$ ) as well as inhibition of TNF- $\alpha$  ( $83.33 \pm 4.01\%$ ). Regarding the chemical markers, all compounds showed strong inhibition of NO $_x$  secretion, especially theobromine, which was 200x more potent than dexamethasone. Furthermore, TNF- $\alpha$  secretion was also significantly decreased by THEO at  $0.033 \mu\text{M}$  ( $22.15 \pm 6.49\%$ ), NCA at  $1.97 \mu\text{M}$  ( $27.46 \pm 3.98\%$ ), CCA at  $0.35 \mu\text{M}$  ( $39.76 \pm 5.73\%$ ), CGA at  $0.56 \mu\text{M}$  ( $23.58 \pm 5.79\%$ ), CAF at  $0.52 \mu\text{M}$  ( $26.45 \pm 5.34\%$ ), and RUT at  $0.16 \mu\text{M}$  ( $40.18 \pm 3.70\%$ ). Our results suggest that *I. paraguariensis* and its major chemical markers have strong free radical scavenging properties as well as showed important anti-inflammatory activity and that these compounds in a plant extract may work based on several different mechanisms synergistically, resulting in moderating the immune system.

Artigo submetido - Revista: *Fundamental & Clinical Pharmacology*. JCR: 2.748

**Denise Jung** <onbehalf@manuscriptcentral.com> sex., 5 de nov. 10:42 (há 4 dias) ☆ ↶ ⋮  
para edalmarco, lais.theindi, mim, juliasalvann, tainallubschinski, lidiane.meier, marcus.sa ▾

---

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) ×

---

05-Nov-2021

Dear Dr. DALMARCO:

Your manuscript entitled "In vitro evidence that the anti-inflammatory effect of synthetic cinnamate-derived dienes is directly linked to an immunomodulatory context" by Theindi, Laís; Fratoní, Eduarda; da Rosa, Júlia; Lubschinski, Tainá; Meier, Lidiane; Sá, Marcus; DALMARCO, EDUARDO, has been successfully submitted online to the journal "Fundamental & Clinical Pharmacology".

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is FCP-FUND-OA-11-21-0371.