



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

Gustavo Oliveira dos Reis

**Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* de cromenos sintéticos e
Revisão Sistemática sobre a eficácia anti-inflamatória de cumarinas em
modelos murinos de inflamação aguda pulmonar induzida por LPS**

Florianópolis
2022

Gustavo Oliveira dos Reis

**Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* de cromenos sintéticos e
Revisão Sistemática sobre a eficácia anti-inflamatória de cumarinas em
modelos murinos de inflamação aguda pulmonar induzida por LPS**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis

2022

Reis, Gustavo Oliveira dos

Avaliação do potencial anti-inflamatório in vitro de cromenos sintéticos e Revisão Sistemática sobre a eficácia anti-inflamatória de cumarinas em modelos murinos de inflamação aguda pulmonar induzida por LPS / Gustavo Oliveira dos Reis ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2022.

110 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

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

GUSTAVO OLIVEIRA DOS REIS

**Avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* de cromenos sintéticos e
Revisão Sistemática sobre a eficácia anti-inflamatória de cumarinas em
modelos murinos de inflamação aguda pulmonar induzida por LPS**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 20 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^aDra Izabel Galhardo Demarchi
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. José Roberto Santin
Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI

Prof. Dr. Julio César Machado Junior
Universidade do Porto

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.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Orientador(a)

Florianópolis, 2022

Dedico este trabalho primeiramente a minha Mãe,
minha inspiração, minha fortaleza, minha heroína.
Também dedico a todos àqueles que, como eu, defendem
a Educação pública, gratuita e de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Esta Tese de Doutorado não seria possível sem a participação direta ou indireta de diversas pessoas.

Em primeiro lugar, manifesto minha eterna gratidão à pessoa mais importante da minha vida: a minha Mãe. Agradeço o suporte durante toda a minha jornada de aprendizado, ao grande exemplo de ser humano, de resiliência e de honestidade. Minha mãe sempre foi minha maior torcida e sempre será minha fortaleza.

Agradeço aqui a todo o meu grupo de pesquisa, composto pelos colegas: Eduarda Mohr, Eduarda Fratoni, Laís Theindl, Tainá Lubschinski, Mariano Felisberto, Bruno Facchin, Julia Salvan, Guilherme Nicácio, Prof^a Ziliani Buss, Prof^a Izabel Galhardo Demarchi e Prof^a Iara Kretzer. Agradeço a todos os professores pela troca de aprendizados e conhecimentos, aos colegas de bancada pelas parcerias nos dias de experimentos longos e cansativos, além da troca de experiências e colaborações.

Desejo um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela confiança depositada em mim para a execução do projeto de pesquisa que deu origem a esta tese, bem como na dedicação na construção do meu conhecimento durante a pós-graduação.

Agradeço ao Prof Louis Pergaud Sandjo e ao seu aluno de Doutorado Erlon Martin, do Programa de Pós-graduação em Farmácia (PGFar) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela colaboração e fornecimento dos insumos necessários para os experimentos executados neste trabalho.

Aos meus amigos, que durante esse período foram responsáveis em me trazer alegria, muito obrigado pelos momentos de atenção, diversão, conselhos e pela compreensão nos momentos em que tive que estar ausente.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário/UFSC, meu agradecimento pelo suporte e ajuda por se adaptarem as minhas mudanças de horários de trabalho.

Por fim, agradeço a UFSC, que é a minha Universidade de formação e a qual eu tenho muito orgulho que faça parte da minha história, por ser uma instituição de ensino público, gratuito e de qualidade.

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção. A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não podem dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria (FREIRE, 2003, p.47)

RESUMO

Introdução: A resposta inflamatória é uma característica comum de muitas condições patológicas ainda sem cura, havendo assim a necessidade urgente por novas substâncias que minimizem os efeitos nocivos da inflamação nesse contexto. Os cromenos e cumarinas representam classes de compostos com múltiplas ações farmacológicas já descritas e que podem ser potenciais candidatos à investigação da sua ação terapêutica. **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo testar novas moléculas derivadas de 4-aril-4*H*-cromeno em um modelo *in vitro* de inflamação usando células Raw 264.7 induzidas por lipopolissacarídeo (LPS), além de compilar os dados da literatura para concluir se as cumarinas são eficazes como compostos anti-inflamatórios, quando usadas em modelos animais de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida pelo LPS. **Metodologia:** Na primeira parte deste estudo, sete compostos derivados de 4-aril-4*H*-cromeno foram testados em células Raw 264.7 para avaliar seus efeitos citotóxicos. Em seguida, foi analisado o efeito dos compostos selecionados na produção de mediadores pró-inflamatórios (NO, TNF, MCP-1, IL-6) e anti-inflamatórios (IL-10 e IL-13) e, finalmente, foi avaliado o efeito dos compostos em relação à apoptose de macrófagos e na expressão de receptores de superfície (TLR-4 e Manose). Já a segunda parte do estudo, por meio da utilização da metodologia PRISMA para Revisões Sistemáticas, diferentes bases de dados foram consultadas (PubMed, Web of Science, SCOPUS e Google Scholar), a fim de reunir um número significativo de estudos a respeito do efeito anti-inflamatório de cumarinas em modelos murinos de LPA induzida por LPS. A extração de dados foi focada na população, intervenção, comparação, desfecho e estratégia de desenho do estudo (PICOS) e o risco de viés nos manuscritos selecionados foi avaliado usando a ferramenta SYRCLE para estudos experimentais em animais. **Resultados:** Os resultados da primeira etapa do estudo demonstraram que alterações na estrutura molecular do 4-aril-4*H*-cromeno alteraram seu perfil citotóxico. Portanto, os derivados que mostraram resultados seguros foram selecionados para análises posteriores (compostos nomeados: 4, 5 e 6). Nesses experimentos, tais compostos foram capazes de diminuir as concentrações de NO e a produção de MCP-1, IL-6, IL-10 e IL-13. Além disso, esses derivados foram eficazes na redução da apoptose de macrófagos e na expressão TLR-4. Os compostos 5 e 6 ainda foram eficazes em aumentar a expressão do receptor de manose, um marcador de superfície característico do fenótipo M2 dos macrófagos. Em seguida, a revisão dos estudos sobre cumarinas resultou na seleção final de 8 manuscritos, os quais abordaram a eficácia anti-inflamatória de compostos cumarínicos sobre a formação de edema e o influxo de leucócitos nos pulmões com LPA induzida por LPS. A maioria destes estudos também destacou o papel dos compostos na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais efeitos foram associados à interferência nas vias de sinalização celular, que foram investigadas por parte dos estudos incluídos nesta revisão. A avaliação da qualidade metodológica mostrou que os estudos avaliados apresentaram de moderado a alto risco de viés, relacionado à falta de dados quanto à randomização dos animais e ao cegamento dos investigadores, o que compromete a confiabilidade dos resultados experimentais publicados. **Conclusão:** Os resultados indicam que o efeito anti-inflamatório produzido pelos cromenos está ligado à repolarização dos macrófagos (M1 a M2). Da mesma forma, as cumarinas têm importantes efeitos anti-inflamatórios na LPA induzida por LPS em camundongos, inibindo principalmente o influxo de leucócitos e a formação de edema nos pulmões. No entanto, a falta de informações metodológicas, em todos os estudos avaliados,

compromete esta afirmação categórica sobre os efeitos anti-inflamatórios desta classe de compostos.

Palavras-chave: inflamação; cromenos; cumarinas; lesão aguda pulmonar.

ABSTRACT

Introduction: The inflammatory response is a common feature of many pathological conditions that remain without solution, thus there is an urgent need for new substances that minimize the deleterious effects of inflammation. Chromenes and coumarins represent classes of compounds with multiple pharmacological actions already described and which may be potential candidates for the research of their therapeutic action. **Objectives:** This study aimed firstly to test new molecules derived from 4-aryl-4*H*-chromene in an *in vitro* model of inflammation using Raw 264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS), the second part of this study was compiling data from the literature to conclude whether coumarins are effective as anti-inflammatory compounds when used in animal models of LPS-induced acute lung injury (ALI). **Methodology:** In the first part of this study, seven compounds derived from 4-aryl-4*H*-chromene were tested in Raw 264.7 cells to evaluate their cytotoxic effects. Then, the effect of the selected compounds on the release of pro-inflammatory (NO, TNF, MCP-1, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10 and IL-13) mediators was analyzed and, finally, it was supervised the effect of the compounds concerning the apoptosis of macrophages and in the expression of surface receptors (TLR-4 and Mannose). In the second part of the study, using the PRISMA methodology for Systematic Reviews, different databases were consulted (PubMed, Web of Science, SCOPUS, and Google Scholar), to gather a considerable number of studies regarding the anti-inflammatory effect of coumarins in murine models of LPS-induced LPA. Data extraction focused on population, intervention, comparison, outcome, and study design strategy (PICOS), and the risk of bias in the selected manuscripts was assessed by the SYRCLE tool for experimental animal studies. **Results:** The results of the first part of this study showed that alterations in the molecular structure of 4-aryl-4*H*-chromene altered its cytotoxic profile. Therefore, derivatives that showed safe results were selected for further analysis (named compounds: 4, 5, and 6). In these experiments, these compounds were able to decrease NO concentrations and the production of MCP-1, IL-6, IL-10, and IL-13. Furthermore, these compounds were effective in reducing macrophage apoptosis and TLR-4 expression. Compounds 5 and 6 were also effective in increasing the expression of the mannose receptor, a surface marker characteristic of the macrophage M2 phenotype. Then, a review of studies on coumarins evolved into the final selection of 8 manuscripts, which unanimously addressed the anti-inflammatory efficacy of coumarin compounds in reducing edema formation and leukocyte influx in lungs with LPS-induced ALI. Most of these studies also highlighted the role of coumarin compounds in decreasing the production of pro-inflammatory cytokines, these effects were associated with interference in cell signaling pathways, which were investigated by part of the studies included in this review. The evaluation of the methodological quality showed that the studies obtained a moderate to high risk of bias, related to the lack of data regarding the randomization of the animals and the blinding of the researchers, which compromises the reliability of the published experimental outcomes. **Conclusion:** The results show, that the anti-inflammatory effect produced by chromenes is linked to the repolarization of macrophages (M1 to M2). Likewise, coumarins have prominent anti-inflammatory effects in LPS-induced ALI in mice, mainly inhibiting leukocyte influx and edema formation in the lungs. However, the lack of methodological information in all evaluated studies compromises this categorical statement about the anti-inflammatory effects of this class of compounds.

Keywords: inflammation; chromene; coumarin; acute lung injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das diferentes estruturas básicas de cromenos.	28
Figura 2. Esquema geral de reação de síntese dos compostos derivados do 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno.	32
Figura 3. Efeito citotóxico dos Compostos (1-7) derivados de 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno em células RAW 264.7.	39
Figura 4. Curva sigmóide da resposta normalizada dos compostos (4-6) derivados de 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno sobre a concentração de NO em células RAW 264.7.	41
Figura 5. Efeito de compostos (4-6) derivados de 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno na produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS.	43
Figura 6. Representação gráfica do efeito de compostos derivados (4-6) de 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno na apoptose de macrófagos RAW 264.7 induzida por LPS.	44
Figura 7. Efeito de compostos derivados de 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno (4-6) na expressão de receptores de manose (CD206), em macrófagos RAW 264.7.	45
Figura 8. Efeito de compostos derivados de 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno (4-6) na expressão de TLR-4 (CD284/MD-2), em macrófagos RAW 264.7.	46
Figura 9. Resumo gráfico do efeito anti-inflamatório <i>in vitro</i> de diferentes compostos (4-6) derivados do 4-aril-4 <i>H</i> -cromeno sobre as células Raw 264.7 inflamadas com LPS.	51
Figura 10. Estrutura química geral das cumarinas.	70
Figura 11. Efeitos das cumarinas na via de sinalização dos TLRs.	71
Figura 12. Diagrama de fluxo PRISMA 2020 para revisões sistemáticas.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégias de busca exaustiva nas diferentes bases de dados da literatura científica.	79
Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão aplicados para a seleção dos estudos...80	
Tabela 3. Resumos descritivos das características gerais dos estudos incluídos (n=8).....	88
Tabela 4. Resumos descritivos das características gerais dos estudos incluídos (n=8) (Continuação).	89
Tabela 5. Avaliação de risco de viés dos estudos incluídos por meio da ferramenta SYRCLE.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ANOVA	Análise de variância
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> (Citrometria por matrizes esféricas)
CCAE	Conferência de Consenso Americana-Européia
CD206	Cluster of differentiation 206 (receptor de manose)
CD284	Cluster of differentiation 284 (receptor do tipo <i>Toll-4</i>)
CO ₂	Gás carbônico
COVID-19	<i>Coronavirus disease 19</i> (Doença do coronavírus de 2019)
COX	Cicloxigenase
DAMP	Padrão molecular associado a danos
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DEXA	Dexametasona
DMEM	Meio Eagle Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
IFN- γ	Interferon gama
I κ B	Inibidor do fator nuclear kappa B
IKK	Quinase do Inibidor do fator nuclear kappa B
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico síntase induzida
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LBA	Lavado broncoalveolar

LPA	Lesão pulmonar aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX-5	Lipoxigenase-5
M1	Macrófago fenótipo tipo 1/inflamatório
M2	Macrófago fenótipo tipo 2/resolutivo
MAPK	Proteínas quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MDA	Malondialdeído
Mesh	<i>Medical Subject Headings</i>
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide 88
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OSF	<i>Open Science Framework</i>
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
PBS	Solução de tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
PGFar	Programa de Pós-graduação em Farmácia
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PTX	Paclitaxel
RNA	Ácido ribonucleico
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TLR-2	Receptor do tipo <i>toll 2</i>
TLR-4	Receptor do tipo <i>toll 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
SOD	Superóxido dismutase
U/S	Relação úmido/seco
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UTI	Unidade de terapia intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
	CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO IN VITRO DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H- CROMENO	20
2	DESENVOLVIMENTO	21
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1.1	PROCESSO INFLAMATÓRIO	21
2.1.2	CROMENOS	28
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS	32
4.2	CULTURA CELULAR	33
4.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	33
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	33
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS.....	34
4.6	AVALIAÇÃO DA APOPTOSE INDUZIDA PELO LPS	35
4.7	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD206.....	35
4.8	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD284/MD-2	36
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	377
5	RESULTADOS	38
5.1	EFEITOS DE CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS EM CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS POR LPS.....	38
5.2	EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	40
5.3	EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS.	42
5.4	EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA APOPTOSE CELULAR INDUZIDA PELO LPS.....	44
5.5	EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA EXPRESSÃO DE CD206 (RECEPTOR DE MANOSE)	45

5.6	EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA EXPRESSÃO DE CD284/MD-2 (TLR4).....	46
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	CAPÍTULO 2: REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A EFICÁCIA ANTI-INFLAMATÓRIA DE CUMARINAS EM MODELOS MURINOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS.....	62
8	DESENVOLVIMENTO.....	63
8.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	63
8.1.1	LESÃO PULMONAR AGUDA /SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO.....	63
8.1.2	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	67
8.1.3	CUMARINAS.....	69
8.1.4	REVISÃO SISTEMÁTICA.....	72
9	OBJETIVOS.....	75
9.1	OBJETIVO GERAL.....	75
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	75
10	MATERIAS E MÉTODOS.....	76
10.1	BUSCAS NA LITERATURA.....	76
10.2	SELEÇÃO DOS ESTUDOS.....	77
10.3	EXTRAÇÃO DE DADOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	77
10.4	RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	78
11	RESULTADOS.....	81
11.1	FASE DE ELEGIBILIDADE.....	81
11.2	CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	82
11.3	DEFECHOS PRINCIPAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	84
11.4	DEFECHOS SECUNDÁRIOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	86
11.5	SUGESTÕES DE MECANISMOS DE AÇÃO INTRACELULARES DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	86
11.6	RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	90
12	DISCUSSÃO.....	93
13	CONCLUSÃO.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE A ESTA TESE	108
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO	109
ANEXO B – EMAIL DE SUBMISSÃO DE ARTIGO.....	110

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de novas entidades farmacológicas ainda é um desafio. A busca por novas moléculas capazes de reduzir o sofrimento e trazer novas perspectivas, para melhorar a qualidade de vida ou as chances de sobrevivência a doenças que oferecem risco a vida, têm sido um importante alvo de estudo para diferentes condições clínicas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2020).

A pesquisa sobre a ação biológica de produtos naturais tem fornecido suporte altamente significativo para a descoberta de entidades químicas candidatas a novos fármacos. Prova disto é que, até o momento, mais de 50% dos fármacos aprovados para uso clínico têm origem de produtos naturais, ou são inspirados nestes (NEWMAN, CRAGG 2020). Além disso, cabe ressaltar que o Brasil ocupa uma posição de destaque no mercado mundial de consumo de medicamentos. O que contrasta com a realidade da indústria nacional que é grande importadora de matérias primas para a produção de medicamentos para uso interno no país (RODRIGUES, COSTA, KISS, 2018). Dentre os entraves de maior destaque para a descoberta de novas entidades estão o tempo e o alto custo para aprovação destes compostos, cerca de 20 anos e 1 bilhão de dólares, respectivamente (TRIVELLA *et al.*, 2022).

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) representam um importante alvo de estudos para a intervenção de novas substâncias, principalmente no que diz respeito as suas complexidades. No mundo, 74% das mortes são resultantes de DCNTs (WHO, 2022), já no Brasil cerca de mais da metade da população adulta já referiu ter alguma DCNT, cuja prevalência possui forte caráter socioeconômico (MALTA *et al.* 2021). Uma característica comum encontrada nas DCNT é a resposta inflamatória, a qual tem servido de base para diversos cenários fisiopatológicos onde a ativação celular e a liberação de mediadores químicos resultam em vias de sinalização relacionadas à resposta imune do hospedeiro contra os estímulos nocivos (SINGH *et al.*, 2019). Uma inflamação descontrolada é a chave para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (CHEN *et al.*, 2018). Portanto, a produção de mediadores e moléculas sinalizadoras precisa ser regulada para conter o avanço da resposta inflamatória.

Durante a inflamação um elenco diversificado de mediadores químicos é secretado com a finalidade de ativar a resposta de defesa do hospedeiro frente a um

possível agente lesivo (CHEN *et al.*, 2018). Apesar disso, torna-se crucial a inibição dos danos gerados pela inflamação por meio da regulação negativa da síntese de tais mensageiros, como as citocinas e o óxido nítrico (NO). Essas moléculas de sinalização celular são responsáveis pela comunicação entre as diferentes células presentes no sítio inflamatório (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; PAPI; AHMADIZAR; HASANVAND, 2019). A deflagração do estímulo da inflamação pode surgir em decorrência de fatores de naturezas variados, podendo ser um agente químico, físico ou biológico (CHEN *et al.*, 2018). O reconhecimento desses elementos ocorre por células residentes e recrutadas da corrente sanguínea e que desempenham uma importante função na resposta imune inata, por meio da interação com padrões moleculares associados a danos (DAMP), ou a patógenos (PAMP), com seus receptores específicos (HATO, DAGHER, 2015).

Os neutrófilos e macrófagos são células chaves no reconhecimento de DAMPs e PAMPs e representam a primeira linha de defesa na resposta imune inata, uma vez que ambas apresentam grande capacidade de comunicação entre si, por meio da secreção de citocinas que osquestram o processo inflamatório (SCHULZ, PETZOLD, ISHIKAWA-ANKERHOLD, 2020). Os neutrófilos são eficazes no processo de destruição do agente lesivo, principalmente por meio da fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (CHATFIELD, THIEBLEMONT, WITKO-SARSAT, 2018). Os macrófagos também são células fagocitárias, produtoras de quimiocinas e mediadores inflamatórios, mas que possuem atividade primordial na etapa de resolução da inflamação, sendo um elemento celular ativo em todas as etapas da resposta inflamatória (FULLERTON, O'BRIEN, GILROY, 2013). Tanto neutrófilos como os macrófagos utilizam mecanismos similares de defesa, como as armadilhas extracelulares: NETs e METs, respectivamente. Estas são estruturas em formato de teia composta por cromatina misturada com proteínas celulares e são extrusadas do corpo celular para formar redes extracelulares capazes de "aprisionar" e matar microrganismos. A composição das proteínas armadilhas extracelulares pode ser influenciada tanto pelo tipo de célula quanto pelo ambiente local em que as armadilhas são liberadas (DOSTER *et al.*, 2017).

No sítio inflamatório, caso a resposta não seja autolimitada, danos teciduais significativos podem ser gerados, e esta perpetuação da resposta celular é uma característica comum nas doenças inflamatórias crônicas (SCHETT, NEURATH, 2018). Os macrófagos desempenham um papel importante na restauração da

homeostase tecidual após a lesão (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Neste processo estão inclusas as mudanças celulares fenotípicas, caracterizados pela queda da produção de mediadores pró-inflamatórios, seguidos de um contexto resolutivo marcado pela remoção de corpos apoptóticos (eferocitose) de neutrófilos e macrófagos fagocitários e a liberação de mediadores responsáveis pelo processo de cicatrização celular (GILROY, MAEYER, 2015).

O uso massivo de anti-inflamatórios não esteroidais e/ou corticóides, com o objetivo de reduzir a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, não tem produzido necessariamente os resultados esperados em muitas condições inflamatórias como artrite reumatoide, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico, entre outros (TASNEEM *et al.*, 2019). Ao tentar resolver esse confuso quebra-cabeça, muitos pesquisadores têm se empenhado arduamente em desvendar os mecanismos celulares que estão envolvidos com a resolução de condições inflamatórias, uma vez que a simples inibição de mediadores pró-inflamatórios parece não ser a resposta final (OISHI; MANABE, 2018). Neste contexto, os macrófagos parecem ser a resposta para este enigma, uma vez que desempenham papéis importantes e diversificados ao longo da maioria dos estágios da inflamação e cicatrização, bem como na remodelação patológica que pode contribuir para os processos envolvendo as doenças (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018; YURDAGUL JR *et al.*, 2018). Visto que, a pesquisa de compostos que induzam as alterações na polarização dos macrófagos para o fenótipo de resolução (M2) surge como uma nova abordagem para lidar com condições inflamatórias, até então refratárias aos tratamentos convencionais.

Dessa forma, a busca por novas moléculas com propriedades bioativas, das quais os cromenos e cumarinas, que são compostos heterocíclicos com um anel benzênico fundido a um núcleo pirano, destacam-se por serem conhecidos como um amplo grupo de produtos naturais com notável relevância por suas atividades químicas e biológicas (COSTA *et al.*, 2016; SHARIFI-RAD *et al.*, 2021). A importância das propriedades farmacológicas dos cromenos e cumarinas tem sido investigada por diversos estudos, incluindo anticancerígenos (HALAWA *et al.*, 2017; PATIL *et al.*, 2013; PONTES *et al.*, 2018; SONG, HUO, GUO, 2021; WU *et al.*, 2020), antimicrobianos (HU *et al.*, 2017; NASTASÃ *et al.* 2016; THANH *et al.*, 2019), efeitos antivirais (HASSAN *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2013), antioxidantes (BUBOLS *et al.*, 2013; FERNÁNDEZ-BACHILLER *et al.*, 2012) e anti-inflamatórios (ELSHAWI;

NABEEL, 2019; HEO *et al.* 2014; KIRSCH, ABDELWAHAB, CHAIMBAULT, 2016). Uma vez que há uma variedade de possibilidades de interações moleculares, estas classes de produtos naturais se tornaram fontes de compostos importantes para avaliar a estrutura de novas substâncias farmacológicas sintetizadas ou modificadas.

O presente trabalho está dividido em dois capítulos, para facilitar o entendimento das partes. No primeiro capítulo são apresentados os resultados obtidos dos experimentos realizados *in vitro*, utilizando o modelo experimental de indução da inflamação por LPS em macrófagos Raw 264.7, tratados com os diferentes compostos derivados de 4-aril-4*H*-cromeno. Já o segundo capítulo avalia por meio de uma revisão sistemática, a eficácia anti-inflamatória de derivados de cumarinas em modelo *in vivo* de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS em camundongos.

CAPÍTULO 1

***AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO IN VITRO DOS DERIVADOS
DE 4-ARIL-4H- CROMENO***

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO IN VITRO DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H- CROMENO

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O sistema imunológico humano adquiriu duas principais linhas de defesa no processo evolutivo, a resposta imune inata e adaptativa, as quais conferem proteção ao hospedeiro a insultos que possuem potencial lesivo aos órgãos e sistemas orgânicos que o compõe (BUCKLEY, YODER, 2022; CRONKITE, STRUTT, 2018; KAUR, SECORD, 2019). O processo inflamatório nada mais é do que uma reação de defesa de ampla complexidade, cuja fisiopatologia envolve um conjunto de mecanismos celulares tanto da imunidade inata quanto da adaptativa (CRONKITE, STRUTT, 2018).

Inicialmente, a inflamação ocorre pelo reconhecimento do gatilho inflamatório primário, que pode ser um agente químico, físico ou biológico (CHEN *et al.*, 2018), por células residentes ou teciduais, que dão início a resposta imunológica inata, caracterizada pela interação célula-antígeno, a qual, a nível molecular, é promovida pelo reconhecimento de importantes padrões de reconhecimento das moléculas antigênicas, que sinalizam condições de “perigo” ao hospedeiro, os chamados DAMPs e PAMPs (HATO, DAGHER, 2015). Os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) são as estruturas, citosólicas ou membranares, que se ligam aos DAMPs e PAMPs, e deflagram vias de sinalização que resultam na transcrição de genes que controlam a resposta celular. Estima-se que o sistema imune inato seja capaz de reconhecer mais de 103 tipos diferentes de padrões antigênicos (HATO, DAGHER, 2015).

Os receptores de tipo *Toll* (TLR) se destacam entre os PRR, por apresentarem uma ampla capacidade de induzir variadas cascatas inflamatórias (COCHET, PERRI, 2017). Estas estruturas são expressas na maior parte das células de origem mielóide e apresentam cerca de 10-13 tipos diferentes (NIE *et al.*, 2018). É também por meio da ativação dos TLR que as células do sistema imune inato dão

início a inflamação, principalmente com a ativação de células residentes (ex. macrófagos), recrutamento de células fagocitárias (ex neutrófilos), indução da secreção de mediadores solúveis e opsoninas e ativação de células apresentadoras de antígenos, as quais irão futuramente direcionar o reconhecimento antigênico para o sistema imune adaptativo (HATO, DAGHER, 2015).

Nos processos infecciosos, o LPS, uma endotoxina presente na parede celular de bactérias gram negativas, é um importante exemplar para entender a participação de TLR na ativação celular. O LPS é um agonista do TLR-4, um receptor presente na superfície da membrana plasmática celular e com domínio de sinalização intracelular, encontrado em células do sistema imune como macrófagos, neutrófilos e células apresentadoras de antígenos (WANG, QUINN, 2010). A estimulação do TLR-4 deflagra sinais intracelulares, por meio de mensageiros secundários, que culminam na ativação de fatores de transcrição gênica como o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), responsável pela expressão de genes envolvidos na produção de mediadores pró-inflamatórios (PARK, LEE, 2013).

Um elenco diversificado de células participa da resposta inflamatória, sendo que os neutrófilos e macrófagos ocupam uma posição de destaque no que diz respeito ao reconhecimento e eliminação dos agentes lesivos. Os neutrófilos podem ser considerados as células de infantaria do sistema imune inato, agindo rapidamente na eliminação de agentes intrusos que porventura possam causar danos ao hospedeiro (SCHULZ, PETZOLD, ISHIKAWA-ANKERHOLD, 2020). Apesar do tempo de meia-vida curta controverso (7-9 horas ou até aproximadamente 4 dias), a produção de neutrófilos ocorre constantemente na medula óssea, por meio da regulação de *feedback* causada por mediadores solúveis responsáveis pela sua proliferação, maturação e sobrevivência (ex. G-CSF) (BUGL *et al.*, 2012). A falha no processo de produção de neutrófilos compromete a resposta imune inata, resultando em danos imunológicos severos o que conseqüentemente expõe o organismo a ameaças externas (HATO, DAGHER, 2015; KOENDERMAN, TESSELAAR, VRISEKOOOP, 2022).

Na primeira etapa da resposta inflamatória, conhecida como fase aguda, o influxo de neutrófilos e monócitos da corrente sanguínea para o tecido lesionado é um passo crucial, ao mesmo tempo em que depende da secreção de mediadores quimiotactantes como a interleucina (IL)-8 ou a proteína quimiotectante de monócitos-1 (MCP-1) (MENIAILO *et al.*, 2018). No sítio inflamatório, estas células

agem na eliminação de agentes nocivos, esse processo ocorre principalmente em decorrência da internalização de partículas exógenas, células malignas e/ou microrganismos (LIM, GRINSTEIN, ROTH, 2017).

A fagocitose de corpos estranhos é um mecanismo de defesa celular que visa eliminar principalmente agentes externos que possam representar uma ameaça ao funcionamento do organismo (LIM, GRINSTEIN, ROTH, 2017). Para aprimorar seus mecanismos de defesa, os neutrófilos são munidos de um maquinário celular que favorece a sua atividade fagocitária (KOLACZKOWSKA, KUBE, 2013). No espaço citosólico dos neutrófilos, existe uma grande quantidade de grânulos, cuja composição é feita de peptídeos antimicrobianos e enzimas proteolíticas, os quais otimizam o processo de digestão celular e neutralização de patógenos (BORREGAARD, SØRENSEN, THEILGAARD-MONCH, 2007). Entretanto, a degranulação deste conteúdo, de forma excessiva no ambiente extracelular, leva a um comprometimento tecidual resultante da ação proteolítica dos grânulos secretados (BORREGAARD, SØRENSEN, THEILGAARD-MONCH, 2007).

Ademais, os neutrófilos apresentam também uma alta capacidade de gerar EROs, que são moléculas produzidas pelo estresse oxidativo e possuem alto grau de instabilidade, cuja interação com proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos resultam em danos estruturais severos (WINTERBOURN, KETTLE, HAMPTON, 2016). Portanto, ainda que suas funções associadas à defesa do hospedeiro sejam de vital importância, a existência massiva e constante de neutrófilos ativados no sítio inflamatório pode acarretar sérios danos teciduais (BUGL *et al.*, 2012). A presença e a ativação de neutrófilos no local da inflamação são mediadas pela ação de macrófagos. A comunicação entre ambas às células é um ponto-chave para o gatilho da inflamação (SCHULZ, PETZOLD, ISHIKAWA-ANKERHOLD, 2020). Porém, são os macrófagos, juntamente com as células teciduais, as “sentinelas” responsáveis por reconhecer o estímulo inflamatório e sinalizar por meio de mediadores solúveis a necessidade do recrutamento de neutrófilos para o tecido lesionado (TANG, NIKOLIC- PATERSON, LAN, 2019). Os macrófagos ativados no sítio da lesão são importantes fontes de fatores estimuladores de colônia (ex. G-CSF) e quimiocinas (ex. IL-8), e, portanto, estimulam a produção e migração de neutrófilos para o tecido inflamado (BALAMAYOORAN *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2018).

A origem dos macrófagos ainda é alvo de muitas pesquisas. Sabe-se, que sua presença em diferentes órgãos se inicia na fase embrionária (SCHULZ, PETZOLD, ISHIKAWA-ANKERHOLD, 2020). Porém, com a finalidade de manter a homeostase tecidual, estas células, de forma geral, podem se multiplicar nos tecidos primários onde residem ou serem provenientes da migração e diferenciação de monócitos do sangue periférico, os quais adquirem as características epigenéticas do nicho tecidual específico para onde migraram (WCULEK *et al.*, 2022).

A quimiotaxia de monócitos da corrente sanguínea para o sítio da inflamação é reazaliada por mediadores quimiotactantes como MCP-1, cujas fontes primárias são células epiteliais, células endoteliais, células musculares lisas, monócitos/macrófagos, fibroblastos, astrócitos e células microgliais que são reguladas por várias outras citocinas e fatores. A participação desta quimioquina tem sido relacionada com processos patológicos em que a resposta inflamatória é o cenário principal, por exemplo: aterosclerose, COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), diabetes, tuberculose, osteoartrite entre outras (SINGH, ANSHITA, RAVICHANDIRAN, 2021).

Na resposta inflamatória, os macrófagos apresentam diferentes perfis fenotípicos, os quais estão baseados nos tipos de estímulos em que são submetidos, o que define a curiosa plasticidade destas células. Dados da literatura mostram que os macrófagos estão presentes nos tecidos em um estado fenotípico de repouso (M0), mas que logo se diferenciam para o tipo M1, sob estimulação pró-inflamatória de DAMPs e/ou PAMPs (ex. LPS), citocinas inflamatórias (ex. IFN- γ) ou fatores ambientais (WANG *et al.*, 2021; WCULEK *et al.*, 2022). Por outro lado, para dar início à fase de resolução, os macrófagos podem ainda se diferenciar no fenótipo M2, que ocorre em decorrência da estimulação do M0, ou de monócitos provenientes da corrente sanguínea, por citocinas como IL-4 e IL-13, com a finalidade de se garantir o início da fase de homeostase tecidual (WANG *et al.*, 2021).

A possibilidade de troca do padrão fenotípico de M1 para M2 ainda é um campo de estudo que está sendo explorado. Alguns estudos utilizando modelos experimentais de doenças renais, como glomerulonefrite e hipóxia/reperfusão renal, têm demonstrado dados importantes em relação a esta alteração ocorrendo *in vivo* (TANG, NIKOLIC- PATERSON, LAN, 2019). Um estudo realizado por Montana e Lampiasi (2016) demonstrou a capacidade *in vitro* de células Raw 264.7 tratadas

com substância P e estimuladas com LPS de apresentarem modificações fenotípicas que resultaram no desenvolvimento de um fenótipo semelhante a M2 nos M0, bem como de macrófagos M1 (MONTANTA, LAMPIASI, 2016).

A polarização de macrófagos nos ajuda a compreender melhor os distintos papéis que essas células atuam durante a imunomodulação das fases da resposta inflamatória. Fato é que, o perfil M1 é uma peça pivô no início da infamação, pois, uma vez ativadas, estas células são produtoras de importantes mediadores inflamatórios como IL-1 β e fator de necrose tumoral (TNF), além de expressarem intensamente a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzindo elevas concentrações NO, um gás solúvel e um dos principais exemplos de mensageiros químicos produzidos na resposta inflamatória, a qual, uma vez exacerbada, resulta em efeitos deletérios como: a formação de edema, hiperalgesia, produção de espécies reativas e estimulação contínua de células imunes (PAPI; AHMADIZAR; HASANVAND, 2019; WANG *et al.*, 2021).

Ao que tudo parece, nos processos infecciosos onde o LPS é o agente indutor da inflamação, a estimulação do TLR-4 em macrófagos M1 dá início a cascata de sinalização intracelular, por meio da ativação das vias envolvendo a proteína de diferenciação mielóide 88 (Myd88) e NF- κ B, o que resulta na expressão gênica dos mediadores inflamatórios (CIESIELSKA, MATYJEK, KWIATKOWSKA, 2021). Para tanto, a produção de citocinas pró-inflamatórias por parte de macrófagos ativados é a forma mais comum de comunicação com as células envolvidas na inflamação. Estes mediadores químicos de baixo peso molecular (<40kDa) são biomoléculas sinalizadoras de condições fisiológicas e patológicas, as quais atuam com foco na modulação das atividades celulares, principalmente no que diz respeito às funções imunológicas. As citocinas TNF e IL-6, por exemplo, são centrais no processo de manutenção da inflamação, principalmente em doenças crônicas autoimunes, enquanto que a IL-10 desempenha a função antagônica, conferindo ação anti-inflamatória e contribuindo para a restauração da homeostase tecidual (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

Ao se encaminhar para a fase de resolução da resposta inflamatória, o perfil de citocinas expresso no sítio da lesão começa a se tornar distinto. É uma fase que se caracteriza pelo início da queda da produção de mediadores pró-inflamatórios e pelo aumento expressivo de citocinas com perfil voltado para ativação de elementos celulares envolvidos com o reparo e homeostase tecidual (FULLERTON, GILROY,

2016). Para orquestrar essa fase resolutive, os macrófagos entram em cena mais uma vez, atuando fenotipicamente por meio do perfil M2, cuja produção de citocinas está destinada a agir principalmente no processo de remodelamento tecidual (JAIN, MOELLER, VOGEL, 2019). Nesta fase, está inclusa a remoção de corpos apoptóticos, também chamada de eferocitose, e que mesmo ocorrendo de forma constitutiva, como parte da renovação do *pool* de neutrófilos do sangue e dos tecidos, contribui para uma melhor homeostase imunológica (SCHULZ, PETZOLD, ISHIKAWA-ANKERHOLD, 2020).

O processamento de corpos apoptóticos durante a fase resolutive da inflamação ocorre principalmente pela ação de macrófagos fagocitários, o que tem sido aceito nos últimos anos pela literatura científica se tratar da ação anti-inflamatória dos macrófagos M2, os quais expressam uma maior quantidade de receptores eferocíticos (LIM, GRINSTEIN, ROTH, 2017). Sinais de “encontre-me” e “coma-me”, como a exposição de fosfatidilserina, um componente da membrana celular exposto na camada externa da célula em decorrência das alterações morfológicas do processo de apoptose, contribuem para a formação da sinapse fagocítica e conseqüentemente no reconhecimento e remoção de corpos apoptóticos (KOURTZELIS; HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS, 2020). No entanto, em casos de danos prolongados, alguns macrófagos apoptóticos podem surgir e seu acúmulo é prejudicial ao hospedeiro devido à possibilidade de necrose tardia (YURDAGUL JR *et al.*, 2018). Mesmo que a eferocitose esteja completa, parte dos macrófagos, que usualmente deixam o sítio da inflamação pelo sistema linfático, permanece e sofre apoptose local (FULLERTON, GILROY, 2016). Portanto, diminuir a apoptose em macrófagos também é um passo importante no processo de cicatrização tecidual visto que a eferocitose permite que os macrófagos mudem de uma função pró-inflamatória para uma função pró-resolução.

Além disso, no contexto do processo de reparo do tecido lesionado, o receptor de manose (CD206), que é uma glicoproteína pertencente à família das lectinas tipo C, é predominantemente expresso pela maioria dos macrófagos fagocitários e permite a ligação a açúcares (manose e fucose) com alta afinidade, estes são encontrados principalmente como constituintes estruturais de patógenos invasores (AZAD; RAJARAM; SCHLESINGER; 2014). O papel do CD206 na remoção de células apoptóticas foi demonstrado experimentalmente pela estimulação de macrófagos com componentes da parede celular de micobactérias

(GARCIA-AGUILAR *et al.*, 2016). No entanto, a relação entre o papel do CD206 e a apoptose induzida por LPS ainda precisa ser mais bem evidenciada.

A heterogeneidade encontrada entre os diferentes tipos de fenótipos de macrófagos é, portanto, determinada pelos distintos fatores presentes nos microambientes onde se encontram e que induzem os programas de diferenciação necessários para o curso da resposta inflamatória (WANG *et al.*, 2021). A plasticidade dessas células é um campo de conhecimento ainda muito complexo, ainda que estudos estejam em andamento, com o intuito de avaliar o sequenciamento de ácido ribonucleio (RNA) de macrófagos individualizados, para que assim se tornem possíveis fontes de respostas e forneçam um melhor entendimento do papel dos macrófagos nos diferentes cenários patológicos (TANG, NIKOLIC-PATERSON, LAN, 2019).

As falhas no processo de resolução ou a perpetuação do estímulo pró-inflamatório são pontos importantes no desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (GILROY, MAEYER, 2015; SCHETT, NEURATH, 2018). Isso ocorre em virtude de variados fatores, como por exemplo: a resistência a apoptose (gerada pelo estímulo excessivo de citocinas pró-inflamatórias como: TNF, IL-1 β e IL-6) e a presença constante de DAMPs e/ou PAMPs, uma característica comum presente em doenças inflamatórias graves, tais como: LPA e a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (FULLERTON, O'BRIEN, GILROY, 2013). Para que a fase de resolução ocorra com sucesso é fundamental a eliminação do estímulo nocivo, principalmente quando se trata de doenças autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, onde o agente que induz a resposta inflamatória é um componente do próprio hospedeiro (FULLERTON, GILROY, 2016).

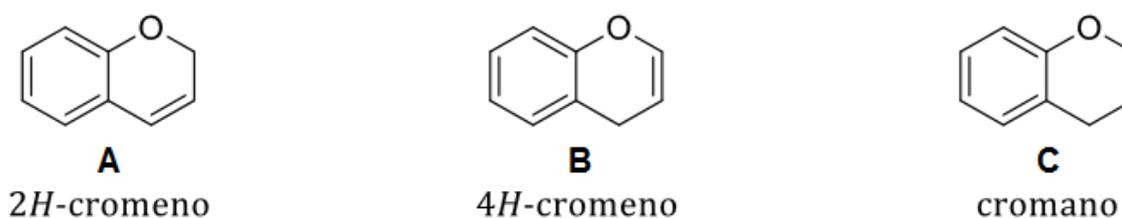
Atualmente, existem poucas opções de medicamentos anti-inflamatórios que podem efetivamente reduzir a ativação do TLR-4, uma vez que a maioria dos medicamentos anti-inflamatórios atualmente aprovados e em uso tem seus principais mecanismos relacionados à inibição da ciclooxigenase (COX)-1/2 (AIN; BATOOL; CHOI, 2020; FOKUNANG *et al.*, 2018), ou voltados para a inibição inespecífica da expressão gênica de mediadores inflamatórios, é o caso dos corticosteróides, cujo mecanismo de ação está vinculado a sua ligação com receptores intracelulares, os quais se ligam e suprimem regiões promotoras de genes da resposta inflamatória (ex. genes que codificam citocinas pró-inflamatórias) além de inibirem fatores de transcrição gênica presentes no citoplasma (BARNES,

2006). Outro mecanismo já descrito, envolvendo o uso de corticóides, é o aumento da liberação de segundos mensageiros, como a Anexina A1, envolvida principalmente no processo de adesão dos neutrófilos nas paredes dos vasos do sítio da inflamação (SINNIAH, YAZID, FLOWER, 2021). Dessa forma, novos candidatos a moléculas capazes de diminuir a inflamação cujo mecanismo de ação está direcionado a receptores, como a expressão de TLR-4 e CD206 ou mensageiros químicos, são substâncias promissoras no futuro.

2.1.2 CROMENOS

Os cromenos são compostos heterocíclicos caracterizados pela fusão entre um anel benzênico com um anel pirano (LI *et al.*, 2010). Tais compostos podem ser divididos em duas principais conformações mediante a posição da dupla ligação presente no anel pirano, o que fornece as seguintes estruturas: 2*H*-cromeno (Figura 1A) e 4*H*-cromeno (Figura 1B). A ausência de insaturações no anel pirano fornece outro tipo de derivado, também conhecido como cromano (Figura 1C) (COSTA *et al.*, 2016; RAJ, LEE, 2020).

Figura 1. Representação das diferentes estruturas básicas de cromenos.



Fonte: Adaptado de COSTA *et al.*, 2016

Em relação ao uso industrial, tais compostos despertam o interesse por serem importantes componentes da síntese de corantes e pesticidas (MEEPAGALA *et al.*, 2013). Entretanto, as diferentes conformações químicas do cromenos, ilustradas na Figura 1 permitem o desenvolvimento de novas rotas de síntese que resultam na formação de uma gama variada de compostos derivados, como cumarinas, cromonas, cromanonas e flavanonas, os quais são apontados como substâncias promissoras para uso farmacológico (RAJ, LEE, 2020). Um exemplo disto são as cumarinas, compostos naturais ou sintéticos, produzidas principalmente

por plantas, e que podem ser obtidas por meio da dupla ligação na posição 2 do anel pirano presente na estrutura do 2*H*-cromeno (2-oxo-2*H*-cromeno) (COSTA *et al.*, 2016).

A presença do núcleo benzopirano fornece aos cromenos e seus derivados um grupo farmacofórico de destaque e com importantes propriedades biológicas (THANH *et al.*, 2019), das quais já foram descritas as seguintes atividades: anticancerígena (HALAWA *et al.*, 2017; PATIL *et al.*, 2013; PONTES *et al.*, 2018), antiviral (HU *et al.*, 2013), antimicrobiana (NASTASÃ *et al.* 2016; THANH *et al.*, 2019) e anticonvulsivante (ANGELOVA *et al.*, 2016).

Uma série de derivados de cromenos já foi descrita na literatura a respeito dos seus efeitos inibitórios no processo inflamatório. Chung *et al.* (2016) demonstraram os efeitos anti-inflamatórios dos derivados de 4*H*-cromeno e cromeno[2,3-*b*]piridina *in vitro*, por meio do modelo de inflamação induzida por TNF em condrócitos humanos e porcinos, e em *in vivo*, no modelo de edema de pata em ratos, induzido por carragenina (CHUNG *et al.*, 2016). Neste mesmo modelo experimental *in vivo*, Kumar *et al.* (2012) descreveram a caracterização e os efeitos anti-inflamatórios do derivado sintético 3-hidroxi-2-(fenil substituído)-4*H*-cromen-4-ona e Naseer e Husain (2019) mostraram redução no edema de pata de ratos tratados com derivados de cromenos com triazol (KUMAR *et al.*, 2012; NASEER, HUSAIN, 2019). Sargacromanol D, um derivado de cromeno extraído de algas marinhas da espécie *Sargassum siliquastrum*, demonstrou ação anti-inflamatória *in vitro* em células Raw 264.7 inflamadas por LPS (HEO *et al.*, 2014). De forma similar, outro estudo publicado por Liu *et al.* (2012), utilizando derivados difenólicos de cromenos, evidenciou o seu potencial efeito anti-inflamatório em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e em células RAW 264.7 inflamados por LPS (LIU *et al.*, 2012). Makkar e Chakraborty (2018) extraíram de algas vermelhas da espécie *Gracilaria opuntia* um composto derivado do 2*H*-cromeno com ação inibitória *in vitro* das enzimas COX-2 e Lipoxigenase-5 (LOX-5), duas enzimas envolvidas na produção de mediadores inflamatórios eicosanóides, como prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente (MAKKAR, CHAKRABORTY, 2018; SHEPPE, EDELMANN, 2021). O potencial inibitório de cromenos inéditos sob mediadores pró-inflamatórios já havia sido também avaliado por Cheng *et al.* (2003), que mostraram a capacidade de tais compostos em inibir a produção *in vitro* de TNF em células de sangue periférico humano estimuladas por LPS (CHENG *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório das moléculas sintéticas derivadas do 4-aril-4*H*-cromeno em modelo experimental *in vitro* de inflamação induzida por LPS em células Raw 264.7.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Examinar a atividade citotóxica dos compostos derivados dos derivados do 4-aril-4*H*-cromeno em cultura de macrófagos RAW 264.7;
2. Avaliar a capacidade dos compostos derivados do 4-aril-4*H*-cromeno de inibir a produção de NO em cultura de macrófagos RAW 264.7;
3. Investigar a capacidade dos compostos derivados do 4-aril-4*H*-cromeno de reduzir a produção das citocinas: TNF, Proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), IL-6, IL-10 e IL-13, em cultura de macrófagos RAW 264.7;
4. Avaliar o efeito dos compostos derivados do 4-aril-4*H*-cromeno sobre a apoptose induzida por LPS em cultura de macrófagos RAW 264.7;
5. Analisar ação dos compostos derivados do 4-aril-4*H*-cromeno sobre a expressão dos receptores de superfície: TLR-4 (CD284/MD-2) e CD206, em cultura de macrófagos RAW 264.7;

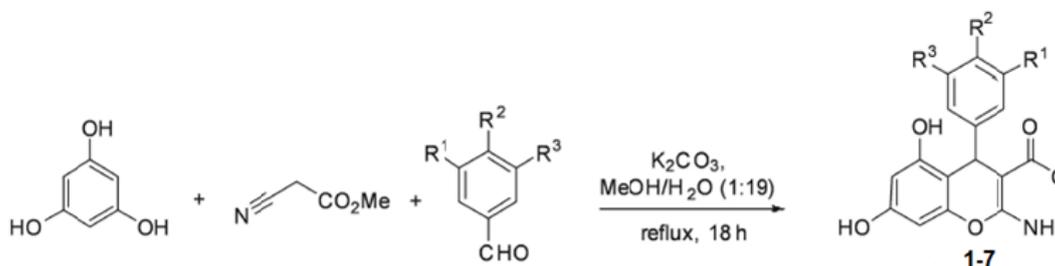
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

Os derivados de cromenos utilizados neste estudo foram produzidos e fornecidos pelo aluno de Doutorado Erlon Ferreira Martin do PGFar/UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo do Departamento de Química da UFSC.

Os compostos foram sintetizados e caracterizados conforme publicação realizada previamente pelo estudo de MARTIN *et al.* (2018). De forma resumida, a partir da molécula de 4-aryl-4*H*-cromeno foi realizada a síntese de novos compostos, resultando num total de 7 substâncias inéditas, que foram utilizados neste estudo para avaliação das suas propriedades bioativas (Figura 2).

Figura 2. Esquema geral de reação de síntese dos compostos derivados do 4-aryl-4*H*-cromeno.



Nº composto	R ¹	R ²	R ³	Name
1	H	Cl	H	Metil 2-amino-4-(4-clorofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato a
2	H	Br	H	Metil 2-amino-4-(4-bromofenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato
3	H	NO ₂	H	Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-nitrofenil)-4H-cromeno-3-carboxilato
4	OMe	OMe	H	Metil 2-amino-4-(3,4-dimetoxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-cromeno-3-carboxilato
5	OMe	OMe	OMe	Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato
6	OMe	OH	OMe	Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato
7	OMe	OH	H	Metil 2-amino-5,7-dihidroxi-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4H-cromeno-3-carboxilato

Fonte: Adaptado de MARTIN *et al.*, 2018.

4.2 CULTURA CELULAR

A linhagem celular de macrófagos murinos Raw 264.7 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. A cultura foi realizada em meio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) suplementado com 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (FBS), a 37°C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂). Os experimentos foram realizados quando a cultura celular atingiu cerca de 80% de confluência, entre a 3^a e a 7^a passagem, e após a verificação da viabilidade celular pela técnica de exclusão de coloração vital com azul de Trypan.

4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para avaliar o efeito do potencial citotóxico de 4-*aril-4H*-cromenos em macrófagos RAW 264.7, foi utilizado o reagente de atividade metabólica celular Alamar Blue (resazurina) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Resumidamente, 5x10⁴ células/poço foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubada com 100 µL de meio de cultura a 37°C até completa aderência e confluência das células (em atmosfera umidificada com 5% de CO₂). Após 24 horas, todos os compostos testados (1-7) foram usados em diferentes faixas de concentração (1 - 1000 µM) por mais 24 horas de incubação. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 100 µL do reagente Alamar Blue (1,5 mg/mL), seguido de 4 horas de incubação a 37°C. O sobrenadante (100 µL) foi transferido para uma placa de 96 poços e a densidade óptica (DO) foi medida em um espectrofotômetro LS-55 (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA). A concentração de CC₁₀, que representa a dose mínima capaz de matar apenas 10% da linhagem testada, foi calculada por meio de análise de regressão não linear do logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (software GraphPad Prism® versão 8.0, San Diego, Califórnia, EUA).

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

O NO foi medido por meio da quantificação do seu metabólito correspondente, concentração de nitrito, no sobrenadante da cultura de células. Para isso, 5x10⁴ células/poço foram semeadas em uma placa de 96 poços por 24

horas. Uma vez que a adesão e confluência completas foram alcançadas, as células foram tratadas com os compostos de menor citotoxicidade em concentrações variando de 1 a 100 μM (abaixo do valor CC_{10}). Após 1 hora, as células receberam LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e foram incubadas a 37°C por 24 horas. A quantidade de nitrito foi determinada por meio da reação de Griess, e a leitura das DOs foi realizada em um leitor de placas de ensaio imunoenzimático (ELISA) (ELISA MB-580, HEALES, Gouwei Road, SZN, China) com comprimento de onda de 540 nm (GREEN *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos em μM e a IC_{50} foi determinada para cada composto avaliado, o que permitiu determinar a concentração do composto capaz de inibir 50% da concentração de nitrito, em relação ao controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram acompanhados dos seguintes grupos: Controle branco (células não inflamadas, tratadas apenas com veículo DMSO 1%), Controle Negativo (células inflamadas apenas com LPS) e Controle Positivo (células inflamadas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS e pré-tratado com Dexametasona (DEXA) 7 μM).

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS

Para determinar a concentração de citocinas secretadas pelas células Raw 264.7 induzidas por LPS, 1×10^5 células/poço foram semeadas em uma placa de 24 poços por 24 horas. Uma vez que a adesão e confluência total foram alcançadas, as células foram tratadas com as concentrações de IC_{50} de cada composto selecionado. Após 1 hora, o grupo de células tratado recebeu LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e estas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi coletado para posterior análise. Os mesmos critérios utilizados anteriormente para os grupos de controle foram utilizados para esta análise. A quantificação de TNF, MCP-1, IL-6 e IL-10 foram obtidas por análise de citocinas multiplex, que foi realizada usando o *Cytometric Bead Array (CBA) – Kit Cell Inflammation* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Os CBAs foram realizados em um citômetro de fluxo FACSVerse® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) usando o software FCAP Array® para criar curvas padrão (0-5000 pg/mL) de cada citocina, convertendo a intensidade fluorescente média de cada amostra em uma concentração. A avaliação da IL-13 foi realizada por um kit comercial, em ELISA (PreproTech, Rocky Hill, NJ, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os valores foram expressos em pg/mL . Todos os

experimentos foram realizados em triplicata e foram acompanhados dos seguintes grupos: Controle branco (células não inflamadas, tratadas apenas com veículo DMSO 1%), Controle Negativo (células inflamadas apenas com LPS) e Controle Positivo (células inflamadas com 1 µg /mL de LPS e pré-tratado com 7 µM DEXA).

4.6 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE INDUZIDA PELO LPS

A apoptose em células de macrófagos Raw 264.7 foi avaliada por citometria de fluxo, onde 1×10^5 células/poço foram semeadas em uma placa de 24 poços e tratadas previamente com as concentrações de IC_{50} de cada composto selecionado derivado de 4-*aril-4H*-cromeno, por 1 hora antes da indução de LPS de 24 horas. A apoptose celular foi determinada usando um kit de detecção de anexina V - isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e a necrose foi avaliada usando um corante de ácido nucleico 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Resumidamente, as células foram removidas dos poços e centrifugadas, depois lavadas com 300 µL de solução tampão fosfato (PBS) e centrifugadas novamente. Em seguida, o sedimento celular foi ressuspenso em 300 µL de tampão de ligação (HEPES 0,1 M, pH 7,4; NaCl 1,4 M; $CaCl_2$ 25 mM). Para cada grupo estudado, foram adicionados 2,5 µL de anexina V-FITC por 15 minutos e 2,5 µL de 7-AAD, na ausência de luz. A leitura da fluorescência foi realizada em até 1 hora, com citômetro de fluxo FACSVerse® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), utilizando o software FACSuite®, no qual foram obtidos 10.000 eventos. Os resultados foram expressos em porcentagens de células em apoptose. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram acompanhados dos seguintes grupos: Controle branco (células não inflamadas, tratadas apenas com veículo DMSO 1%), Controle Negativo (células inflamadas apenas com LPS) e Controle Positivo (células inflamadas com 1 µg /mL de LPS e pré-tratado com 7 µM DEXA). Um grupo de células foi tratado apenas com Paclitaxel (PTX) 30 µM como grupo controle para apoptose.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD206.

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a quantidade de CD206 expressa em macrófagos estimulados com LPS e tratados com diferentes

compostos derivados de 4-aril-4*H*-cromenos. Resumidamente, 1×10^5 células/poço foram semeadas em uma placa de 24 poços e tratadas previamente com diferentes compostos derivados de 4-aril-4*H*-cromeno por 1 hora antes da estimulação com LPS por 24 horas. Cada grupo de células foi removido dos poços e centrifugado, e o pellet celular foi ressuspenso com 300 μ L de PBS frio e centrifugado novamente. Após descartar o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspenso usando albumina a 1% diluída em PBS frio e deixado em repouso por 2 horas. Outra centrifugação foi realizada com PBS frio e o sobrenadante foi removido. O pellet de células foi ressuspenso com 300 μ L de tampão de ligação e, em seguida, 2,5 μ L de anti-CD206 conjugado com FITC (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) foram adicionados. As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro. A leitura de fluorescência (aquisição) foi realizada em até 1 hora no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células Raw 264.7 expressando CD206^{hi}. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram acompanhados dos seguintes grupos: Controle branco (células não inflamadas, tratadas apenas com veículo DMSO 1%), Controle Negativo (células inflamadas apenas com LPS) e Controle Positivo (células inflamadas com 1 μ g /mL de LPS e pré-tratado com 7 μ M DEXA).

4.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CD284/MD-2

A presença do marcador de superfície TLR-4 ou CD284/MD-2 foi determinada por citometria de fluxo seguindo os protocolos do fabricante. Para resumir, 1×10^5 células/poço foram semeadas em uma placa de 24 poços e pré-tratadas com diferentes compostos derivados de 4-aril-4*H*-cromeno por 1 hora antes da estimulação com LPS por 24 horas. Em seguida, as células foram removidas dos poços e centrifugadas. O pellet celular foi ressuspenso com 300 μ L de PBS frio e centrifugado novamente. Após a remoção do sobrenadante, o pellet celular foi ressuspenso com 300 μ L de tampão de ligação e, em seguida, 2,5 μ L de anti-CD284/MD-2 conjugado com Ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) foi adicionado. As amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro. A leitura de fluorescência (aquisição) foi realizada em até 1 hora no citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como uma porcentagem de células Raw 264.7 expressando CD284/MD-2^{hi}. Todos os experimentos foram realizados em triplicata

e foram acompanhados dos seguintes grupos: Controle branco (células não inflamadas, tratadas apenas com veículo DMSO 1%), Controle Negativo (células inflamadas apenas com LPS) e Controle Positivo (células inflamadas com 1 µg /mL de LPS e pré-tratado com 7 µM DEXA).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

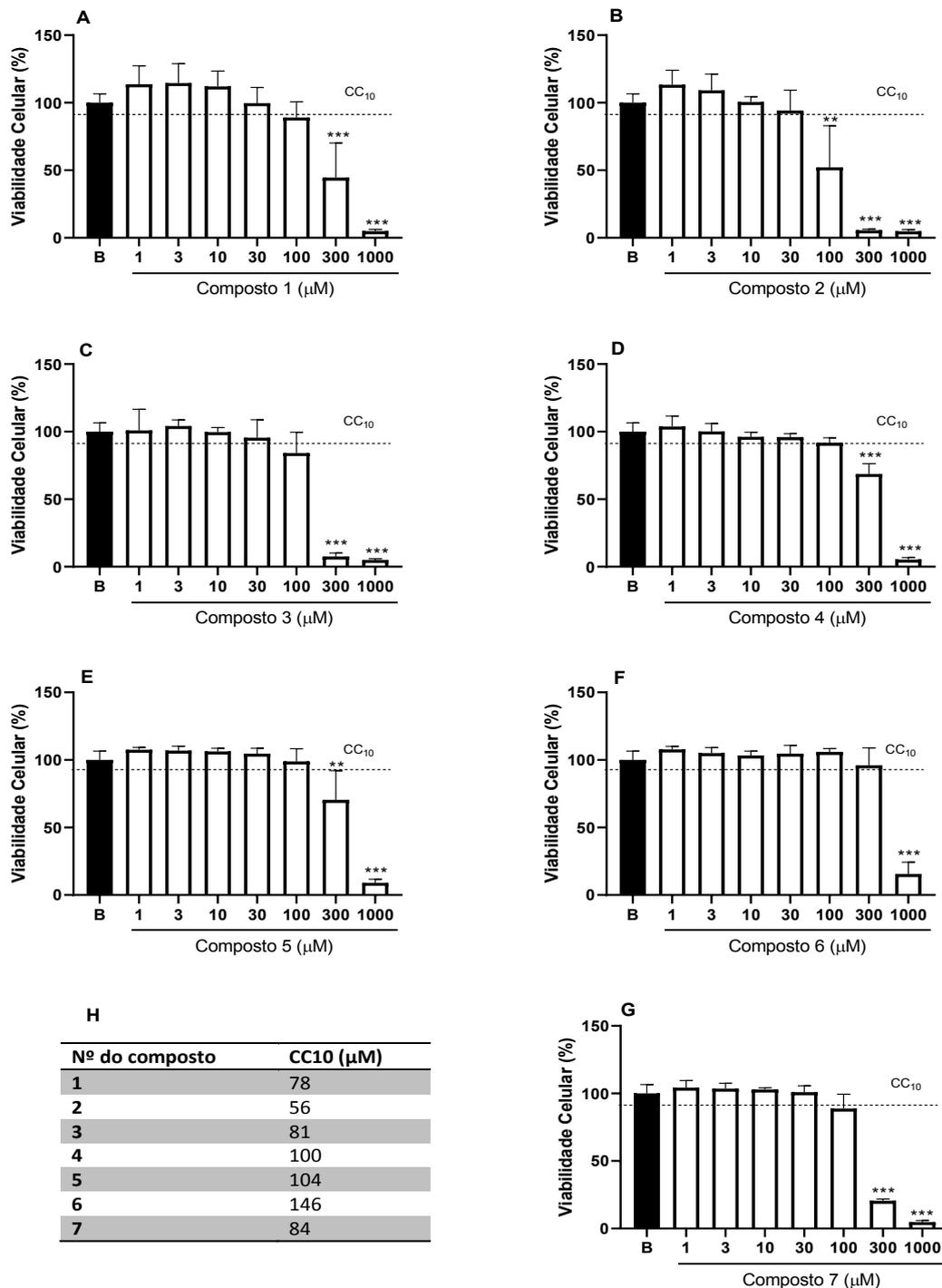
Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade com o teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Para determinar a diferença estatística entre os grupos tratados e controles, todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Tukey. Os valores de IC₅₀ para NO foram calculados por análise de regressão não linear usando o logaritmo da concentração versus resposta normalizada. O software GraphPad Prism® versão 8.0 (San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para avaliar os resultados, os quais foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DE CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4*H*-CROMENOS EM CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS POR LPS

Primeiramente, diferentes compostos derivados de 4-*aril*-4*H*-cromeno (1-7) foram analisados devido à sua possível citotoxicidade em células Raw 264.7 medidas pelo ensaio Alamar blue (Figura 3). Três compostos derivados apresentaram um perfil mais seguro, com toxicidade significativa apenas quando utilizados em concentrações acima de 100 μ M (4, 5 e 6). Estes foram, portanto, selecionados para avaliação nos experimentos seguintes. Os resultados permitiram o cálculo do CC₁₀, o que garante, neste protocolo experimental, a presença de 90% de células viáveis (Figura 3).

Figura 3. Efeito citotóxico dos Compostos (1-7) derivados de 4-aryl-4H-cromeno em células RAW 264.7



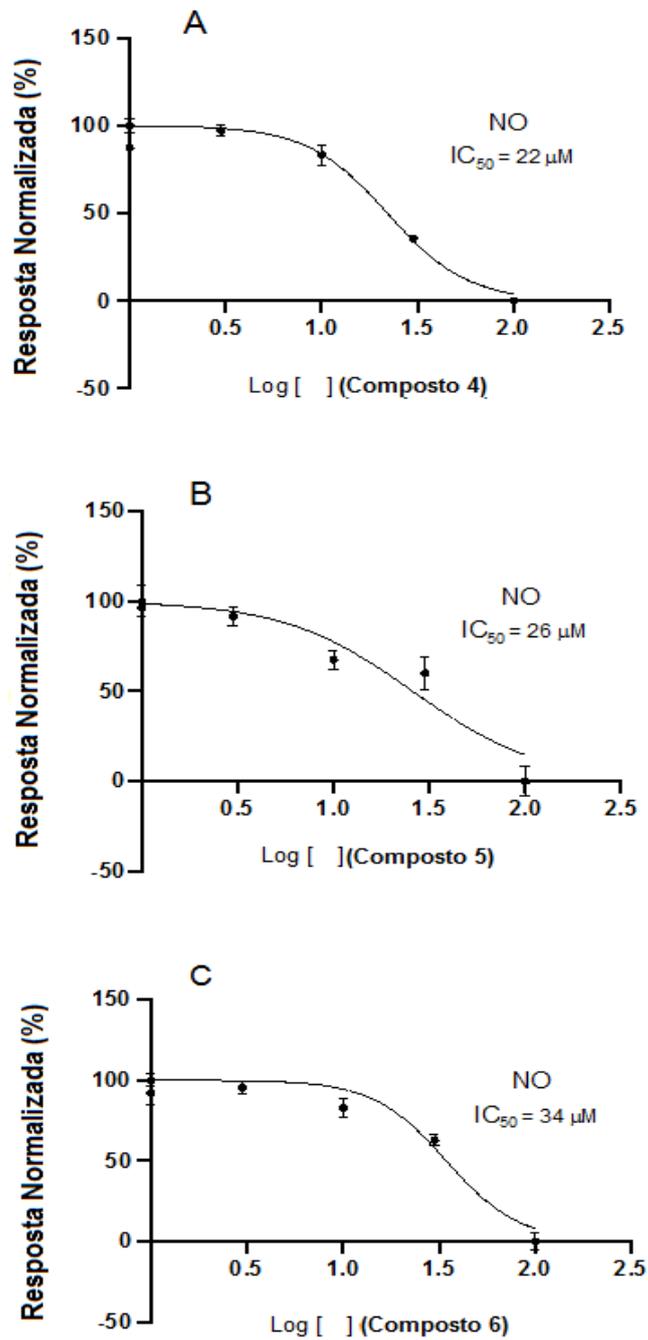
Legenda: (A) Composto 1; (B) Composto 2; (C) Composto 3; (D) Composto 4; (E) Composto 5; (F) Composto 6; (G) Composto 7 e (H) CC₁₀. B: células tratadas com 1% de dimetilsulfóxido estéril (DMSO); Composto: Células pré-tratadas com Compostos 1-7 em concentrações de 1 a 1000 μM; CC₁₀: Concentração do Composto capaz de matar 10% das células (calculada). Cada barra representa a sobrevivência média dos macrófagos em experimentos independentes ± EPM (n=3). ** P < 0,01 e *** P < 0,001.

5.2 EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4*H*-CROMENOS NA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.

Os seguintes testes foram realizados para determinar as concentrações de NO, usando valores abaixo da CC₁₀ para garantir um perfil de segurança dos compostos.

Neste protocolo experimental, os compostos testados derivados de 4-aril-4*H*-cromenos (4-6) foram capazes de reduzir significativamente a concentração de NO nas amostras de sobrenadante de células Raw 264.7 induzidas por LPS. Os resultados obtidos nestes experimentos permitiram o cálculo do IC₅₀, ou seja, as concentrações capazes de inibir a produção de NO em até 50% em relação ao grupo controle (LPS), com o intuito de determinar o percentual de resposta normalizada em função da concentração de compostos (Figura 4).

Figura 4. Curva sigmóide da resposta normalizada dos compostos (4-6) derivados de 4-aryl-4Hcromeno sobre a concentração de NO em células RAW 264.7.



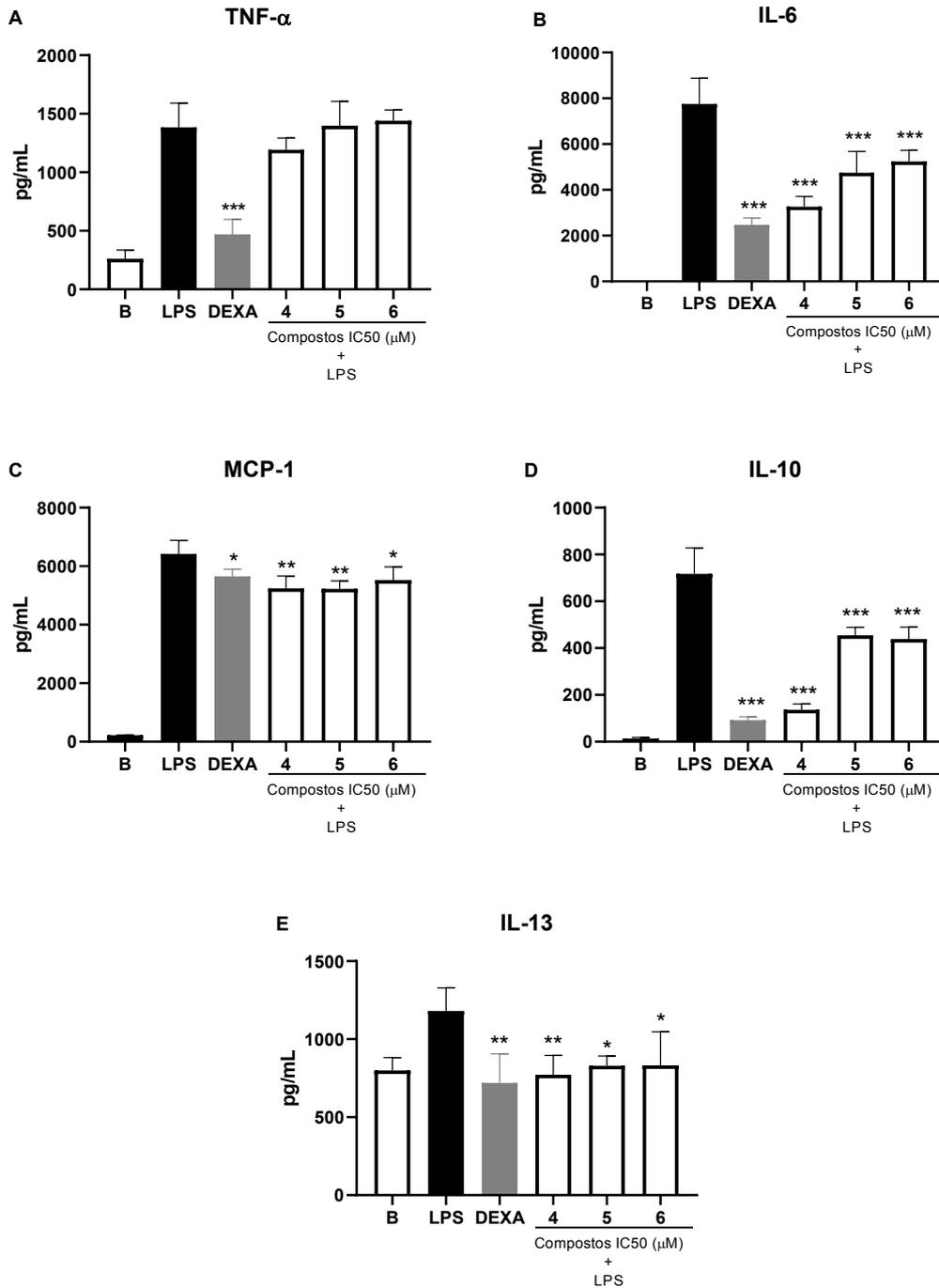
Legenda: (A) Composto 4, (B) Composto 5 e (C) Composto 6 e NO IC_{50} (μM) calculado. O eixo X representa, em escala Log, a concentração dos compostos usados nos experimentos (1, 3, 10, 30 e 100 μM), o eixo Y representa a resposta normalizada do NO. NO IC_{50} foi calculado por regressão não linear usando o logaritmo da concentração versus resposta normalizada.

5.3 EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4*H*-CROMENOS NA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS.

Conforme descrito anteriormente, para avaliar a produção de citocinas em células Raw 264.7 induzidas por LPS, foram utilizadas as concentrações de IC₅₀ dos compostos selecionados (4, 5 e 6).

Nenhum dos compostos testados foi capaz de diminuir significativamente a liberação de TNF ($P > 0,05$) (Figura 5A). No entanto, todos os compostos testados inibiram significativamente a produção de IL-6, MCP-1, IL-10 e IL-13. O composto 4 (% de inibição: IL-6: $57,9 \pm 4,8\%$; MCP-1: $18,3 \pm 5,3\%$; IL-10: $81,0 \pm 2,8\%$; IL-13: $34,6 \pm 8,6\%$) ($P < 0,05$) (Figuras 5B, 5C, 5D e 5E); Composto 5 (% de inibição: IL-6: $38,8 \pm 9,8\%$; MCP-1: $18,6 \pm 3,5\%$; IL-10: $36,5 \pm 3,8\%$; IL-13: $29,7 \pm 4,2\%$) ($P < 0,05$) (Figuras 5B, 5C, 5D e 5E); Composto 6 (% de inibição: IL-6: $32,4 \pm 5,1\%$; MCP-1: $14,0 \pm 5,7\%$; IL-10: $38,8 \pm 5,8\%$; IL-13: $29,5 \pm 5,8\%$) ($P < 0,05$) (Figuras 5B, 5C, 5D e 5E). A DEXA (7 μ M), usada como controle, inibiu a produção de TNF, IL-6, MCP-1, IL-10 e IL-13 nas seguintes proporções: (% de inibição: TNF: $66,1 \pm 8,0\%$; IL-6: $68,1 \pm 3,4\%$; MCP-1: $12,0 \pm 3,3\%$; IL-10: $87,6 \pm 1,7\%$; IL-13: $39,1 \pm 14,0\%$) ($P < 0,05$) (Figuras 5B, 5C, 5D e 5E).

Figura 5. Efeito de compostos (4-6) derivados de 4-*aril-4H*-cromeno na produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS.

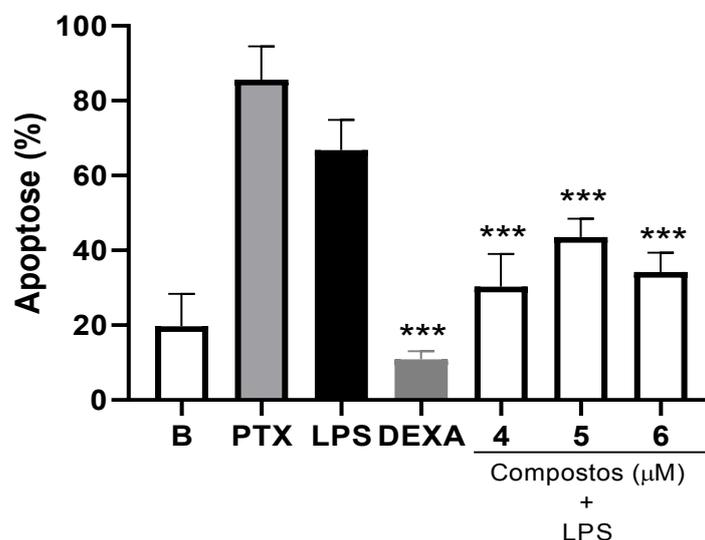


Legenda: (A) TNF; (B) IL-6; (C) MCP-1; (D) IL-10 e (E) IL-13; B: células tratadas com DMSO estéril a 1%; LPS: células tratadas apenas com LPS (1 μ g/mL); DEXA: células pré-tratadas com dexametasona (7 μ M); Compostos 4-6: células pré-tratadas com os compostos 4-6 em concentrações de IC₅₀ em μ M. Os resultados foram expressos como médias \pm EPM em triplicata. *P<0,05; ** P<0,01 e *** P<0,001 vs. grupo controle LPS.

5.4 EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA APOPTOSE CELULAR INDUZIDA PELO LPS.

O processo de morte celular em macrófagos Raw 264.7 foi avaliado por citometria de fluxo através da ligação da anexina V à fosfatidilserina, que está exposta na camada externa da membrana plasmática das células em apoptose, bem como a capacidade do corante 7-AAD de se ligar a ácidos nucleicos em células em necrose. As células expostas apenas ao LPS demonstraram um perfil de aumento da taxa de apoptose (Figura 6). Por outro lado, o tratamento com os compostos selecionados reduziu significativamente a apoptose gerada pelo LPS (Figura 6), composto 4 (% de inibição: $54,7 \pm 11,5\%$) ($P < 0,001$) (Figura 6); composto 5 (% de inibição: $34,8 \pm 7,1\%$) ($P < 0,001$) (Figura 6) e composto 6 (% de inibição: $48,7 \pm 7,1\%$) ($P < 0,001$) (Figura 6). A DEXA, usada como controle, também inibiu significativamente a apoptose (% de inibição: $83,6 \pm 2,6\%$) ($P < 0,001$) (Figura 6).

Figura 6. Representação gráfica do efeito de compostos derivados (4-6) de 4-aryl-4H-cromeno na apoptose de macrófagos RAW 264.7 induzida por LPS.

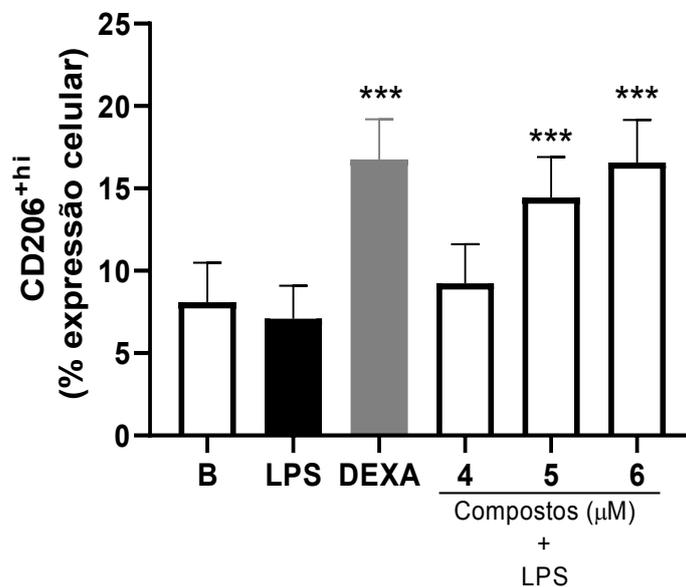


Legenda: B: célula tratada com veículo; LPS: Células estimuladas com LPS (1µg/mL); DEXA: Células pré-tratadas com Dexametasona (7 µM) 30 min antes da administração de LPS; PTX: células pré-tratadas com Paclitaxel (30 µM) antes da administração de LPS; Compostos (4-6): células pré-tratadas com compostos (4-6) com a IC₅₀ (calculada) antes da administração de LPS. Os resultados apresentados no modo gráfico foram expressos como média ± EPM; n = 4 (tamanho da amostra em cada grupo); ***P<0,001 vs grupo LPS.

5.5 EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA EXPRESSÃO DE CD206 (RECEPTOR DE MANOSE)

A expressão do marcador de superfície CD206 foi avaliada por citometria de fluxo em células Raw 264.7 induzidas por LPS e tratadas com compostos selecionados derivados de 4-aril-4H-cromeno. Os dados obtidos na análise mostraram que o tratamento com o composto 4 não foi significativamente eficaz em aumentar a expressão de CD206 (Figura 7) ($P > 0,05$). No entanto, os grupos de células tratadas com os compostos 5 e 6 apresentaram um aumento significativo na expressão de CD206, quando comparados estatisticamente com o grupo de células tratadas apenas com LPS (% de aumento: $96,3 \pm 25,5\%$ e $125,0 \pm 30,6\%$, respectivamente) (Figura 7) ($P < 0,001$). Da mesma forma, a DEXA, utilizada como controle, aumentou significativamente a expressão do receptor de manose (% de aumento: $119,9 \pm 30,1\%$) (Figura 7) ($P < 0,001$).

Figura 7. Efeito de compostos derivados de 4-aril-4H-cromeno (4-6) na expressão de receptores de manose (CD206), em macrófagos RAW 264.7.

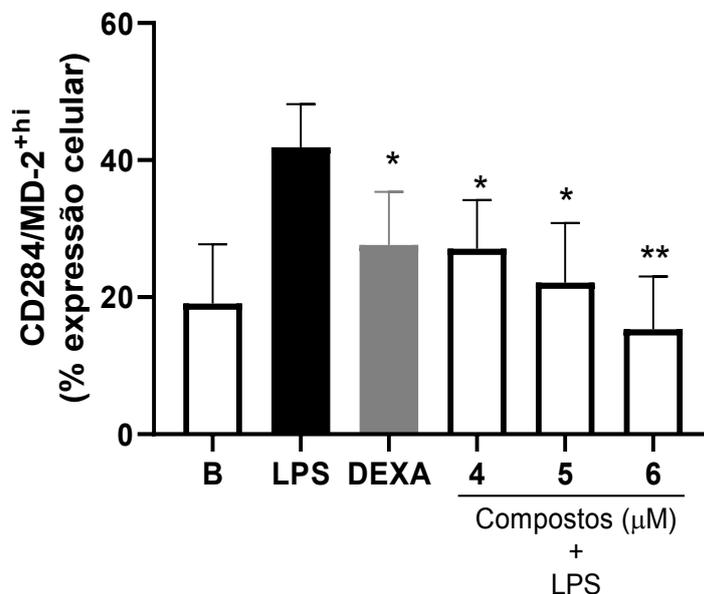


Legenda: B: célula tratada com veículo; LPS: Células estimuladas com LPS ($1\mu\text{g/mL}$); DEXA: Células pré-tratadas com Dexametasona ($7\mu\text{M}$) 30 min antes da administração de LPS; Compostos (4-6): células pré-tratadas com compostos (4-6) com a IC_{50} (calculada) antes da administração de LPS. As barras representam % de macrófagos com alta expressão de CD206 e são representadas como média \pm EPM; $n=4$ (tamanho da amostra em cada grupo); *** $P < 0,001$ vs grupo LPS.

5.6 EFEITOS DOS DERIVADOS DE 4-ARIL-4H-CROMENOS NA EXPRESSÃO DE CD284/MD-2 (TLR4).

A análise de citometria de fluxo também foi usada para medir a expressão de superfície de CD284/MD-2 em células Raw 264.7 induzidas por LPS tratadas com os compostos selecionados derivados de 4-aryl-4H-cromenos. Os resultados mostraram que o grupo que recebeu apenas LPS aumentou a expressão de CD284/MD-2 (Figura 8). Todos os grupos de células tratadas com as melhores concentrações (IC₅₀) dos compostos estudados demonstraram uma redução significativa na expressão de superfície de CD284/MD-2 (Figura 8), composto 4 (% de inibição: 35,4 ± 14,6%) (P<0,05) (Figura 8); composto 5 (% de inibição: 47,2 ± 17,9%) (P<0,05) (Figura 8) e composto 6 (% de inibição: 63,4 ± 15,9%) (P<0,01) (Figura 8). Da mesma forma, a DEXA também foi capaz de diminuir a expressão de CD284/MD-2 (% de inibição: 34,0 ± 15,9%) (P<0,05) (Figura 8).

Figura 8. Efeito de compostos derivados de 4-aryl-4H-cromeno (4-6) na expressão de TLR-4 (CD284/MD-2), em macrófagos RAW 264.7.



Legenda: B: célula tratada com veículo; LPS: Células estimuladas com LPS (1µg/mL); Dexa: Células pré-tratadas com Dexametasona (7 µM) 30 min antes da administração de LPS; Compostos (4-6): células pré-tratadas com compostos (4-6) com a IC₅₀ (calculada) antes da administração de LPS. As barras representam % de macrófagos com alta expressão de CD284/MD-2 e são representadas como média ± EPM; n=4 (tamanho da amostra em cada grupo); * P<0,05 e ** P<0,01 vs. grupo controle LPS.

6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou o potencial efeito anti-inflamatório de derivados de 4-*H*-cromeno por meio da inflamação induzida por LPS em células Raw 264.7. Inicialmente, sete compostos foram avaliados, três demonstraram menor toxicidade para as células, pois, mesmo em altas concentrações, mostraram-se seguros em manter mais que 90% das células viáveis em cultura. Assim, os compostos nomeados como 4, 5 e 6 foram selecionados e submetidos aos testes para avaliação da ação anti-inflamatória. Uma possível relação com a relação estrutural-atividade destas moléculas podem ter relação direta com a ação citotóxica, uma vez que a inserção do grupamento metóxi na posição do radical 1(R1) resultou em um efeito citoprotetor mais significativo.

Após seleção dos compostos com menor citotoxicidade, foi avaliada capacidade dos compostos em inibir a produção de NO em macrófagos Raw 264.7, seguido da estimulação por LPS. O NO é um importante mediador inflamatório solúvel produzido em altas concentrações pela enzima iNOS e é um marcador característico clássico da presença do fenótipo do macrófago do tipo M1 (TALAVERA *et al.*, 2017). O papel do NO na fisiopatologia da inflamação é extenso e está associado principalmente aos efeitos de vasodilatação e produção de espécies reativas com o objetivo de destruir o agente lesivo, o que consequentemente contribui para o dano tecidual (PAPI; AHMADIZAR; HASANVAND, 2019). Neste estudo, observou-se que todos os compostos selecionados foram capazes de reduzir a produção deste mediador inflamatório pelos macrófagos murinos. Um perfil de inibição semelhante foi obtido por Chung *et al.* (2015) que demonstraram a redução significativa nas concentrações de NO, quando duas culturas de células foram pré-tratadas com uma série de 4*H*-cromenos, no modelo inflamatório *in vitro* de condrócitos humanos e suínos induzidos por TNF (CHUNG *et al.*, 2015). Uma recente revisão sistemática com metá-análise publicada por Facchin *et al.* (2022) demonstrou a importância da dosagem de NO como biomarcador da resposta inflamatória no processo de triagem de compostos químicos em modelos experimentais de inflamação por LPS em células Raw 264.7, visto ser um parâmetro que permite traçar um paralelo com a inibição de citocinas pró-inflamatórias, com boa reprodutibilidade e com custo baixo (FACCHIN *et al.*, 2022)

A comunicação entre os diferentes tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória é basicamente orquestrada por mediadores solúveis comumente denominadas de citocinas. Esses mediadores atuam diretamente na resposta celular local a fim de associar a resposta imune inata à adaptativa e, conseqüentemente, culminar com a eliminação do agente causal no processo inflamatório (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2017). Sob estimulação de LPS, os macrófagos Raw 264.7 secretam um conjunto diversificado de citocinas, das quais o TNF, IL-6 e MCP-1 conduzem a resposta imune para permitir maior recrutamento e proliferação de leucócitos, bem como ativação de células T, no local da inflamação (DESHMANE *et al.*, 2009; KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019; YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Nos experimentos deste estudo, os derivados de 4-aril-4H-cromeno apresentaram importantes resultados neste contexto. Embora a inibição do TNF não tenha sido alcançada no tratamento com compostos nas concentrações estudadas, outros autores também demonstraram resultados semelhantes, como o estudo publicado por Heo *et al.* (2014). Onde foi demonstrado que o efeito inibitório de derivados de cromenos foi reduzido em relação à secreção de TNF. A inibição significativa ocorreu apenas quando se utilizou altas concentrações dos compostos em estudo (HEO *et al.*, 2014). Outro estudo, conduzido por Liu *et al.* (2012) demonstrou que o uso de (E)-5,7-dihidroxi-3-(3-oxo-3-fenilprop-1-en-1-il)-4H-cromen-4-ona (DCO-6), um novo derivado difenólico de cromeno, também não foi capaz de diminuir a concentração de TNF no mesmo modelo inflamatório utilizado nesta pesquisa (LIU *et al.*, 2012). Uma das hipóteses levantadas para explicar este resultado negativo, é que múltiplas vias de MAPK ativadas por LPS estão envolvidas na regulação da produção de TNF e é possível que somente a inibição de p38 MAPK, característica dos cromenos, não seja capaz de produzir uma redução significativa da atividade transcricional de TNF e conseqüente secreção de proteína (ZHU *et al.*, 2000).

Por outro lado, os experimentos demonstraram que a produção de IL-6 foi significativamente reduzida com o tratamento dos macrófagos com os compostos estudados. Esse achado corrobora com dados publicados anteriormente, que utilizaram compostos semelhantes (derivado de 4-aril-4H-cromeno), e onde ocorreu redução significativa na expressão de mRNA de iNOS, IL-1 β e IL-6 em macrófagos, sugerindo que a redução de NO, IL-1 β e IL-6 por estes compostos tem sido relacionada à inibição transcricional do mRNA (LIU *et al.*, 2012).

Além disso, os compostos testados também foram eficazes em reduzir a secreção de MCP-1, sendo esta uma quimiocina responsável por recrutar mais macrófagos para o sítio inflamatório. Este achado permite hipotetizar que em condições *in vivo*, isso poderia contribuir para diminuir o acúmulo de macrófagos ativados e também contribuir para uma redução da lesão tecidual produzida pela intensa secreção de mediadores pró-inflamatórios secretados pelos macrófagos M1 (CARSON et al., 2018; VIOLA et al., 2019).

Outra importante citocina reduzida pelo tratamento dos macrófagos com os compostos testados foi a IL-10. Essa citocina participa efetivamente do processo de cicatrização de tecidos lesados e demonstra uma relação direta na inibição da secreção de TNF (SOUZA; TEIXEIRA, 2005). Dagvadorj et al. (2018) demonstraram anteriormente que o tratamento de células Raw 264.7 com IL-10 foi eficaz em diminuir a secreção de TNF sob estimulação de LPS, demonstrando que existe uma relação negativa da IL-10 na via de sinalização celular responsável pela secreção de TNF (DAGVADORJ et al., 2018). Este fato permite sugerir que, como não houve redução da concentração de TNF nos experimentos, os macrófagos, mesmo tratados com os compostos não foram capazes aumentar a produção de IL-10 de forma significativa.

Outra citocina que é produzida por diferentes células de origem hematopoiética, como os macrófagos, é a IL-13. O processo inflamatório que ocorre devido à resposta alérgica nas vias aéreas é orquestrado por esta citocina que desempenha um papel central na resposta celular (JUNTTILA, 2018; MARONE et al., 2019). O tratamento *in vitro* de macrófagos Raw 264.7 com os compostos selecionados foi capaz de reduzir a secreção de IL-13. Esse resultado complementa dados já publicados na literatura sobre a ação pleiotrópica da IL-13, bem como também permite estabelecer uma relação com a redução da IL-6 observada em nossos experimentos, uma vez que a diminuição da ativação do receptor de IL-13 pode reduzir a fosforilação de STAT3 um dos principais fatores de transcrição relacionados à ativação da produção de IL-6 (DEROCQ et al., 1994).

O processo de restauração tecidual é essencial para evitar a intensificação dos danos nocivos decorrentes do processo inflamatório. A permanência prolongada da inflamação pode gerar a formação de macrófagos apoptóticos a partir do processo de defesa do hospedeiro, cuja remoção por eferocitose pode ser insuficiente e resultar em necrose celular (YURDAGUL JR et al., 2018). O tratamento

de células Raw 264.7 com derivados de 4-*aril-4H*-cromeno provou ser eficaz na prevenção da apoptose induzida por LPS. A redução de macrófagos apoptóticos contribui para uma melhor eferocitose, característica do macrófago no fenótipo M2, e evita que o processo inflamatório seja acentuado devido ao estágio de necrose tardia (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Em relação à redução da presença de corpos apoptóticos no sítio inflamatório, o aumento da expressão de CD206 já foi descrito na literatura em experimentos envolvendo macrófagos J-774A, que aumentaram a sua função fagocitária, em células apoptóticas derivadas da medula óssea de camundongos Balb/c, após indução com componentes da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* (GARCIA-AGUILAR *et al.*, 2016). Entretanto, o uso de células Raw 264.7, para avaliação experimental de fagocitose, ainda precisa ser mais bem avaliado, uma vez que existem diferenças significativas no proteoma dos fagossomos quando comparadas a macrófagos primários (GUO *et al.*, 2015).

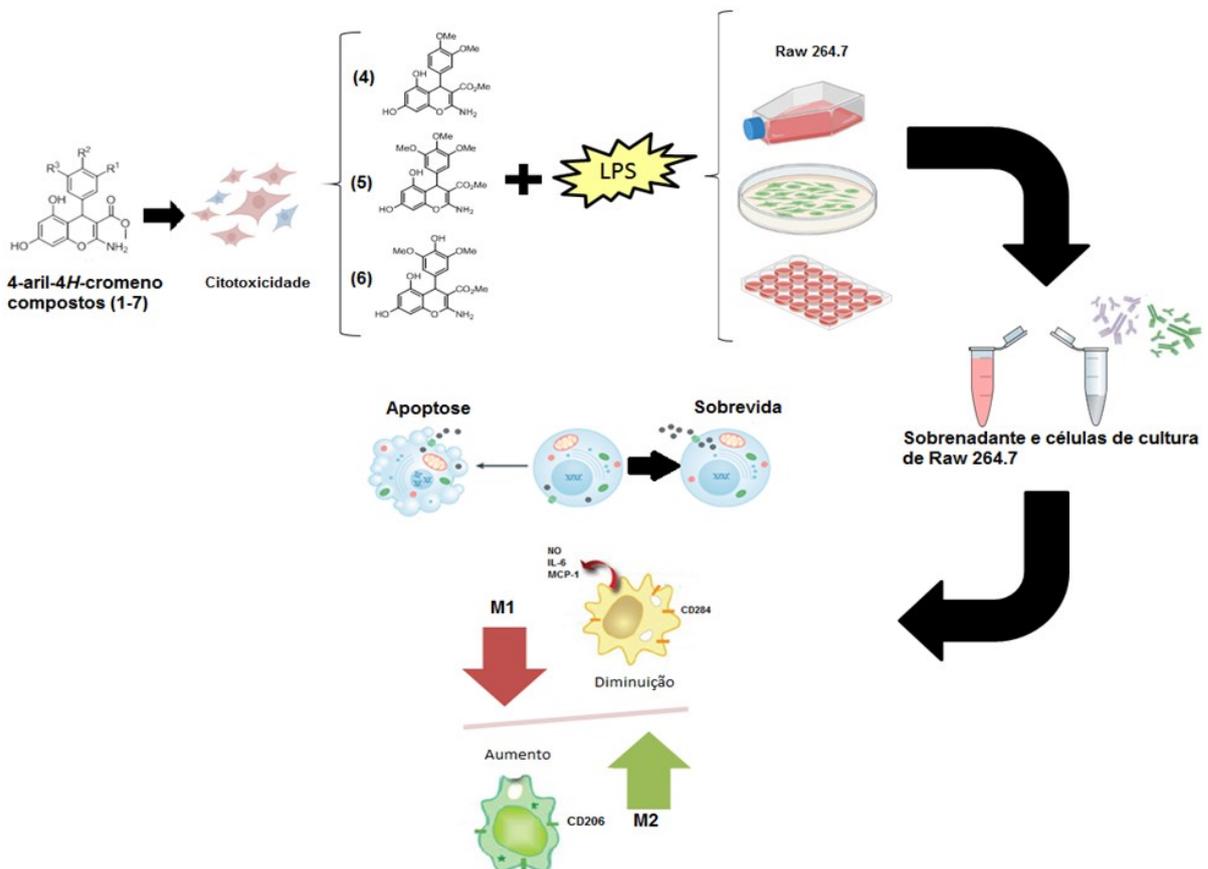
O aumento da expressão de CD206 também corrobora com estudos já publicados que mostraram *in vitro* e *in vivo* a contribuição do aumento da produção do receptor de manose em modelos experimentais de inflamação induzidos por LPS usando células Raw 264.7 e em camundongos submetidos ao modelo de LPA, onde as inibições do NF- κ B e de fator transformador de crescimento beta (TGF- β) parecem estar diretamente associados (Xu *et al.*, 2015). Além de alvo terapêutico, o CD206 também tem sido cogitado como um importante biomarcador de prognóstico de pneumonia em humanos (KAZUO *et al.*, 2019).

Nesse contexto, estes resultados permitem concluir que o aumento da expressão de CD206, ao mesmo tempo, redução de CD284 (TLR-4) observado no tratamento com compostos 5 e 6 em células inflamadas por LPS, pode ser mais um indicativo do início da troca de perfil fenotípico de macrófagos de M1 para M2 (CUI *et al.*, 2020).

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível observar que os derivados de 4-*aril-4H*-cromeno são compostos com ação anti-inflamatória e o mecanismo, pelo menos no contexto *in vitro*, parece envolver o processo de repolarização de macrófagos. No entanto, estudos complementares, utilizando modelos experimentais *in vivo*, precisam ser realizados para investigar a ação de compostos sistemicamente, além de avaliar diferentes mediadores, vias de sinalização e fatores de transcrição envolvidos nesse fenômeno principalmente em modelos de inflamação relacionados ao LPS.

Figura 9. Resumo gráfico do efeito anti-inflamatório *in vitro* de diferentes compostos (4-6) derivados do 4-*aril-4H*-cromeno sobre as células Raw 264.7 inflamadas com LPS.



Legenda: Os compostos foram inicialmente triados quanto a sua citotoxicidade, e àqueles que demonstraram ser mais seguros foram usados nos ensaios seguintes. A avaliação do sobrenadante e das células em cultura revelou que o tratamento com os derivados do 4-*aril-4H*-cromeno, os compostos (4-6), aumentaram a sobrevivência de macrófagos inflamados por LPS, reduzindo a apoptose destas células, bem como atuou na repolarização fenotípica do macrófago de perfil M1 (inflamatório) para M2 (resolutivo).

REFERÊNCIAS

AIN, Q.U.; BATOOL, M.; CHOI, S. TLR4-Targeting Therapeutics: Structural Basis and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. **Molecules**, Basileia, v. 25, n. 3, p. 627, 2020.

ANGELOVA, V. T.; ANDREEVA-GATEVA, P. A.; VASSILEV, N. G.; TAFRADJIISKA-HADJIOLOVA, R.; SURCHEVA, S.; TCHEKALAROVA, J. Anticonvulsant activity of newly synthesized 2H-chromene based hydrazones in ICR mice. **Comptes Rendus de L'Academie Bulgare des Sciences**, Sofiia, v. 69, p. 513–520, 2016.

AZAD, A.K.; RAJARAM, M.V.S.; SCHLESINGER, L.S. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. **Journal of Cytology & Molecular Biology**, Los Angeles, v.10, p. 1-10, 2014.

BALAMAYOORAN, G. *et al.* Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 43, p.5–16, 2010.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 148, n. 3, p. 245–254, 2006.

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MONCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, Oxford, v.28, p. 340-345, 2007.

BUBOLS, G.B. *et al.* The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v.13, p. 318-334, 2013.

BUCKLEY, K. M.; YODER, J. A. The evolution of innate immune receptors: investigating the diversity, distribution, and phylogeny of immune recognition across eukaryotes. **Immunogenetics**, New York, v.74, p.1-4, 2022.

BUGL *et al.* Current insights into neutrophil homeostasis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1266, p. 171-178, 2012.

CARSON, W.F. *et al.* Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. **Cellular Immunology**, Amsterdam, v. 314, p. 63-72, 2018.

CHATFIELD, S. M.; THIEBLEMONT, N.; WITKO-SARSAT, V. Expanding Neutrophil Horizons: New Concepts in Inflammation. **Journal of Innate Immunity**, Basel, v. 10, p. 422-431, 2018.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, Estados Unidos da América, v. 9, n.6, p.7204-7218, 2018.

CHENG, J. *et al.* Novel Chromene Derivatives as TNF- α Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 13, p.3647-3650, 2003.

CHUNG, S.T. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activities of 4H-chromene and chromeno[2,3-b] pyridine derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, Amsterdam, v.42, n p.1195–1215, 2015.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.78, p. 1233-1261, 2021.

COCHET, F.; PERRI, F. The Role of Carbohydrates in the Lipopolysaccharide (LPS)/Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, 2318, 2017.

COSTA, M. *et al.* Biological importance of structurally diversified chromenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 123, p. 487-507, 2016.

CRONKITE, D.A.; STRUTT, T. M. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2018, 1467538, 2018.

ELSHAWI, O.E.; NABEEL, A. I. Modulatory effect of a new benzopyran derivative via COX-2 blocking and down regulation of NF- κ B against γ -radiation induced- intestinal inflammation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, Lausanne, v. 192, p. 90-96, 2019.

FACCHIN *et al.* Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, Basel, v.7, p. 741-758, 2022.

FERNÁNDEZ-BACHILLER, M.I. *et al.* New Tacrine–4-Oxo-4H-chromene Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer’s Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and β -Amyloid-Reducing Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 55, n.3, p. 1303-1317, 2012.

FOKUNANG, C. *et al.* Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in resource limited countries. **MOJ Toxicology**, Edmond, v. 4, n.1, p. 5-13, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (org.). Advancing health through innovation: new drug therapy approvals 2019. **Food and Drug Administration**. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2019>. Acesso em: 11 mar. 2022.

FULLERTON, J. N., O’BRIEN, A. J., GILROY, D. W. Pathways mediating resolution of inflammation: when enough is too much. **The Journal of Pathology**, London, v. 231, p. 8-20, 2013.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 15, 551-567, 2016.

GARCIA-AGUILAR, T. *et al.* The Mannose Receptor Is Involved in the Phagocytosis of Mycobacteria-Induced Apoptotic Cells. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2016, p. 1-14, 2016.

GILROY, D.; MAEYER, R.D. New insights into the resolution of inflammation. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 27, p. 161-168, 2015.

GREEN, L.C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.126, p.131–38, 1982.

HALAWA, A. H. *et al.* Anticancer activities, molecular docking and structure-activity relationship of novel synthesized 4*H*-chromeno [2,3-*d*] pyrimidine candidates. **Medicinal Chemistry Research**, Cambridge, v. 26, p. 2624-2638, 2017.

HASSAN, M.Z. *et al.* Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 123, p. 236-255, 2016.

HATO, T.; DAGHER, P.C. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 10, p 1459-1469, 2015.

HEO, S. *et al.* Chromene suppresses the activation of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 67, p. 169-175, 2014.

HU, Q. *et al.* Antiviral Phenolic Compounds from *Arundina graminifolia*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 76, n.2, p. 292-296, 2013.

HU, X.L.*et al.* Recent Developments of Coumarin Hybrids as Anti-fungal Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v.17, p. 3219-3231, 2017.

JAIN, N.; MOELLER, J.; VOGEL, V. Mechanobiology of Macrophages: How Physical Factors Coregulate Macrophage Plasticity and Phagocytosis. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v.21, p. 267-297, 2019.

KANY, S.; VOLLRATH, J.T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basileia, v. 20, n.23, p.6008, 2019.

KAUR, B. P.; SECORD, E. Innate Immunity. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 66, p. 905–911, 2019.

KIRSCH, G.; ABDELWAHAB, A.B.; CHAIMBAULT, P. Natural and Synthetic coumarins with effects on inflammation. **Molecules**, Basel, v. 21, p.1322, 2016.

KOENDERMAN, L.; TESSELAAR, K.; VRISEKOOOP, N. Human neutrophil kinetics: a call to revisit old evidence. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 868-876, 2022.

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

KOURTZELIS, I.; HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, p. 1-8, 2020.

KUMAR, N. *et al.* 3-hydroxy-2- (substituted phenyl) -4h-chromen-4-one derivatives-synthesis, spectral characterization and pharmacological screening. **World Research Journal of Biochemistry**, India, v. 1, p.1-5, 2012.

LI *et al.*, Synthetic Strategies in the Construction of Chromones. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, Albuquerque, v. 47, p. 785-799, 2010.

LIM, J. J.; GRINSTEIN, S.; ROTH, Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7:191, 2017.

LIU, H. *et al.* A novel chromone derivative with anti-inflammatory property via inhibition of ROS-dependent activation of TRAF6-ASK1-p38 pathway. **PLoS One**, São Francisco, v.7, n.8, e37168, 2012.

MAKKAR, F.; CHAKRABORTY, K. Highly oxygenated antioxidative 2H-chromen derivative from the red seaweed *Gracilaria opuntia* with pro-inflammatory cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties. **Natural Product Research**, Milton Park, v. 32, p. 2756- 2765, 2018.

MALTA, D.C. *et al.* Desigualdades socioeconômicas relacionadas às doenças crônicas não transmissíveis e limitações: Pesquisa Nacional de Saúde, 2019. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.24, p. 1-13, 2021.

MARTIN, E. F. *et al.* Prospecting for cytotoxic and antiprotozoal 4-aryl-4H-chromenes and 10-aryldihydropyrano[2,3-f]chromenes. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 351, e1800100, 2018.

MEEPAGALA *et al.* Mosquito Repellents Based on a Natural Chromene Analogue with Longer Duration of Action than N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, 9293-7, 2013.

MENIAILO, M.E. *et al.* Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 56, p. 217-221, 2018.

MONTANA, G.; LAMPIASI, N. Substance P Induces HO-1 Expression in RAW 264.7 Cells Promoting Switch towards M2-Like Macrophages. **PLoS One**, San Francisco, v.11, n.12, :e0167420, 2016.

NASEER, M.A.; HUSAIN, A. Studies on Chromene based 2, 6-disubstituted-Thiazolo [3,2-B] [1,2,4] Triazole derivatives: Synthesis and Biological Evaluation. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, Greater Noida, v.9, p. 236-242, 2019.

NASTASĂ, C. M. *et al.* Development of new 5-(chromene-3-yl) methylene-2,4-thiazolidinediones as antimicrobial agents. **Clujul Medical Journal**, Cluj-Napoca, v. 89, n.1, p. 122-127, 2016.

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**, Cincinnati, v.83, p. 770-830, 2020.

NIE, L. *et al.* Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9:1523, 2018.

OISHI, Y; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International Immunology**, Oxford, v.30, n.11, p. 511-528, 2018.

PAPI, S.; AHMADIZAR, F.; HASANVAND, A. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. **Immunopathologia Persa**, Isfahan, v.5, n.1, e08, 2019.

PARK, B. S.; LEE, J. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & Molecular Medicine**, Seoul, v. 45, e66, 2013.

PATIL, S. A. *et al.* Chromenes: potential new chemotherapeutic agents for cancer. **Future Medicinal Chemistry**, Londres, v. 5, n.14, p. 1647-1660, 2013.

PONTES, O. *et al.* Exploitation of new chalcones and 4H-chromenes as agents for cancer treatment. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 157, p. 101-114, 2018.

RAJ, V.; LEE, J. 2H/4H-Chromenes-A Versatile Biologically Attractive Scaffold. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 8:623, 2020.

RODRIGUES, P.H.A.; COSTA, R.D.F.; KISS, C. A evolução recente da indústria farmacêutica brasileira nos limites da subordinação econômica. **Physis - Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.28, p. 1-22, 2018.

SCHETT, G.; NEURATH, M.F. Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts. **Nature Communications**, London, v.9:3261, 2018.

SCHULZ, C.; PETZOLD, T.; ISHIKAWA-ANKERHOLD, H. Macrophage Regulation of Granulopoiesis and Neutrophil Functions. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 35, p. 182-191, 2020.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, Filadélfia, v.233, p. 6425-6440, 2018.

SHARIFI-RAD *et al.* Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2021, p.1-19, 2021.

SHEPPE, A. E. F.; EDELMANN, M. J. Roles of Eicosanoids in Regulating Inflammation and Neutrophil Migration as an Innate Host Response to Bacterial Infections. **Infection and Immunity**, Washington, v. 89, e0009521, 2021.

SINGH, N. *et al.* Inflammation and Cancer. **Annals of African Medicine**, Sokoto, v.18, n 3, p. 121 – 26, 2019.

SINGH, S.; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.101,107598, 2021.

SINNIAH, A.; YAZID, S.; FLOWER, R. J. From NSAIDs to Glucocorticoids and Beyond. **Cells**, Basel, v.10, n.12, p. 3524, 2021.

SONG, F.; HUO, X.; GUO, Z. Anti-breast cancer potential of natural and synthetic coumarin derivatives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 21, p. 1692-1709, 2021.

TANG, P. M.; NIKOLIC- PATERSON, D. J.; LAN, H. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, London, v.15, p. 144-158, 2019.

TASNEEM, S. *et al.* Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, London, v. 139, p. 126-140, 2019.

THANH, N. D. *et al.* Efficient click chemistry towards novel 1H-1,2,3-triazole-tethered 4HchromeneD-glucose conjugates: Design, synthesis and evaluation of in vitro antibacterial, MRSA and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 167, p. 454-471, 2019.

TRIVELLA, D.B.B. *et al.* Descoberta de fármacos a partir de produtos naturais e a abordagem Molecular Power House (MPH). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Supl.(2), p. 176-192, 2022.

VIOLA, A. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v.10, p. 1462, 2019.

WANG *et al.* Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v.12, 803037, 2021.

WANG, X.; QUINN, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 49, p. 97-107, 2010.

WCULEK, S.K. *et al.* Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. **Cellular & Molecular Immunology**, Beijing, v. 19, p. 384-408, 2022.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.85, p. 765-792, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Noncommunicable diseases progress monitor 2022. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, Genova, 2022.

WU, Y. *et al.* A review on anti-tumor mechanisms of coumarins. **Frontiers in Oncology**, Switzerland, v. 10, 592853, 2020.

YADAV, U.C.S.; RAMANA, K.V. Endotoxin-Induced Uveitis in Rodents. Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, vol. 1960, p. 161-168, 2019.

YURDAGUL JR, A. *et al.* Mechanisms and Consequences of Defective Efferocytosis in Atherosclerosis. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, Lausanne, v. 8, p. 1-10, 2018.

CAPÍTULO 2

REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A EFICÁCIA ANTI-INFLAMATÓRIA DE CUMARINAS EM MODELOS MURINOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE A EFICÁCIA ANTI-INFLAMATÓRIA DE CUMARINAS EM MODELOS MURINOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

8 DESENVOLVIMENTO

8.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

8.1.1 LESÃO PULMONAR AGUDA /SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO

A primeira descrição histórica de estresse respiratório agudo é datada de 1915, pela equipe médica das Forças Armadas Canadenses, em relação a um soldado intoxicado por gás (SLOGGETT, 1915). Ainda sem uma definição mais precisa, o termo SDRA foi usado inicialmente por Ashbaugh *et al.* (1967), que descreveram um conjunto de sintomas respiratórios induzidos por variados estímulos, um quadro similar ao que ocorria em neonatos deficientes da produção de surfactantes pulmonares (ASHBAUGH *et al.*, 1967). Anos depois, em 1994, a Conferência de Consenso Americana-Européia (CCAE) trouxe novas definições a respeito da síndrome respiratória, mas ainda sem conseguir distinguir LPA de SDRA com precisão, devido às características de hipóxia e a interpretação de exames de imagens (BUTT, KURDOWSKA, ALLEN, 2016). Segundo a CCAE, os critérios de definição são os seguintes: (1) manifestações de sintomas respiratórios agudos resultantes da exposição a fatores de risco, em pelo menos sete dias após estimulação; (2) hipoxemia grave resistente à oxigenoterapia, com presença de insuficiência respiratória mais grave e com relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) igual a 200 mmHg (26,7 kPa) definida como “SDRA”; a forma mais branda com PaO_2/FiO_2 de 200-300 mmHg (40 kPa) foi denominada “LPA”; (3) infiltrados bilaterais difusos na radiografia de tórax; d) ausência de edema pulmonar cardiogênico devido a pressão arterial pulmonar igual a 18 mmHg ou ausência de sintomas clínicos de hipertensão do ventrículo esquerdo (MOKRA, 2020).

Em 2012, uma nova definição da SDRA foi estabelecida pela classificação de Berlim, onde ficou definido que existiam três categorias (branda, moderada e grave)

baseadas no grau de hipoxemia. Mais precisamente, a um nível de pressão expiratória final positiva de 5 cm H₂O (0,5 kPa): a) SDRA leve com PaO₂/FiO₂ entre 200-300 mmHg; b) SDRA moderada com PaO₂/FiO₂ entre 100-200 mmHg e c) SDRA grave com PaO₂/FiO₂ igual a 100 mmHg, juntamente com exames radiológicos compatíveis sem presença de sobrecarga de fluidos ou insuficiência cardíaca (FIORETTO, CARVALHO, 2013). Na Conferência de Berlim, o termo LPA foi omitido, sendo atualmente atribuído de forma geral a estas condições ou a modelos experimentais em animais, aos quais os critérios clínicos de definição não podem ser atribuídos (MOKRA, 2020).

Os dados epidemiológicos da LPA/SDRA mostram que a sua incidência pode ser variável conforme as características geográficas, variabilidades genéticas regionais, diferenças nos sistemas de saúde e também na forma como foi diagnosticada (MOKRA, 2020). Contudo, um estudo realizado em 50 países demonstrou que a LPA/SDRA representa 10,4% das admissões em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com uma taxa de mortalidade de 35-46% (BELLANI *et al.*, 2016).

O mecanismo fisiopatológico na LPA/SDRA ainda é um campo de estudo a ser desbravado, ainda que a divisão em estágios facilite o melhor entendimento dos processos patológicos e dos principais atores envolvidos no desenvolvimento da síndrome. O primeiro estágio (0 a 7 dias) é caracterizado pela fase exudativa ou aguda, onde ocorrem intensos danos em células epiteliais e endoteliais, resultando na perda da função barreira e aumento da permeabilidade capilar dos avéolos, conseqüentemente há acúmulo de fluido nos pulmões, transmigração de células sanguíneas e comprometimento na troca gasosa (MOKRA, KOSUTOVA, 2015; MOKRA, 2020). Clinicamente, esta fase se caracteriza pela hipóxia e presença de imagens radiográficas com padrão de opacidade bilateral de vidro fosco com diminuição da complacência pulmonar, o que pode ocorrer dentro das primeiras 24 horas após o contato com o insulto patogênico (FAN, BRODIE, SLUTSKY, 2018). Também é neste estágio que ocorre a formação de edema, colapso alveolar com a possibilidade de hemorragia de capilares, formação de microtrombos e necrose de pneumócitos. Em seguida, inicia-se a fase proliferativa (5 a 7 dias), que se define por mudanças fenotípicas como a hiperplasia e aumento da atividade de pneumócitos tipo II e fibroblastos (BUTT, KURDOWSKA, ALLEN, 2016; MOKRA, KOSUTOVA, 2015). Nesta fase a regeneração do epitélio permite a diminuição do edema e os

restos celulares começam a ser retirados por macrófagos e demais células inflamatórias. A restauração do tônus vascular permite o restabelecimento da função de troca gasosa e o gradual retorno da oxigenação do tecido. Para alguns pacientes, a fase proliferativa pode persistir e isso leva ao estágio fibrótico, ou seja, uma fase caracterizada pela deposição de colágeno e mudanças fibróticas difusas no tecido pulmonar (MOKRA, 2020).

O processo inflamatório, que foi revisado no primeiro capítulo desta tese, é o mecanismo celular que explica a patogenia da LPA/SDRA. Ainda no estágio inicial, na fase aguda, ocorre uma intensa ativação do sistema imune inato em virtude do estímulo causado por DAMPs e PAMPs no tecido pulmonar e que deflagram sinais de alerta ao sistema imune para iniciar o processo de defesa do hospedeiro. Assim, após o reconhecimento do estímulo nocivo por parte dos PRR, como o TLR, cascatas de ativação celular são iniciadas, resultando na formação e liberação de mediadores pró-inflamatórios e recrutamento de neutrófilos para o tecido (COCHET, PERRI, 2017; HATO, DAGHER, 2015). Os estímulos que deflagram o processo inflamatório, são variados. Quanto à origem, eles podem ser: a) locais, quando inoculados diretamente no tecido pulmonar; e b) extrapulmonares, quando os estímulos nocivos são oriundos de outros sistemas orgânicos, o que ocorre no quadro de sepse, pela elevação da concentração de citocinas pró-inflamatórias, histonas e ácidos nucleicos mitocondriais, os quais agem como DAMPs ativando a inflamação no pulmão (MOKRA, 2020).

A pneumonia é um processo patológico típico da indução de LPA/SDRA, possui alta frequência entre crianças e idosos e representa uma das principais causas de mortalidade em pacientes hospitalizados (FERDOUS *et al.*, 2018; LI, DING, YIN, 2015). No contexto atual, com o surgimento dos novos casos de infecção respiratória envolvendo o novo coronavírus SARS-CoV-2, os quadros de pneumonias oportunistas se somam a severidade prévia causada pela infecção viral, comprometendo ainda mais a recuperação de pacientes em estado crítico (KURRA *et al.*, 2022). Com base nos mecanismos celulares envolvidos na resposta a patógenos, é possível entender com mais facilidade os processos imunológicos da infamação associada à patogênese da LPA/SDRA.

A infiltração de neutrófilos no pulmão com LPA/SDRA é o ponto de partida para os danos teciduais e modificações no parênquima pulmonar (BALAMAYOORAN *et al.*, 2020). Isso ocorre primeiramente em decorrência

reconhecimento de PAMPs, como o LPS, por parte de macrófagos alveolares e células epiteliais redidentes, os quais secretam altas concentrações de quimiocinas, como IL-8, e recrutam neutrófilos para o sítio da inflamação nos pulmões. As quimiocinas estão presentes em grande quantidade no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com LPA/SDRA (WILLIAMS *et al.*, 2017). A perda da integridade das paredes alveolares permite, além do vazamento de proteínas plasmáticas e acúmulo de fluido nos espaços aéreos, a passagem de mais células sanguíneas, favorecendo ainda mais o aparecimento de neutrófilos no tecido. Como já revisado no capítulo anterior, a presença de neutrófilos de forma prolongada leva a danos teciduais acentuados, principalmente em decorrência da exposição dos constituintes de seus grânulos citoplasmáticos e produção de EROs (BALAMAYOORAN *et al.*, 2020; CHABOT *et al.*, 1998; GROMMES, SOEHNLEIN, 2011). Prova disto, pôde ser evidenciada em estudos em humanos e em animais, os quais já mostram que a presença de neutrófilos no LBA de pacientes como SDRA grave é um fator associado à gravidade do desfecho, bem como modelos experimentais em animais que mostraram que a depleção de neutrófilos atenua os efeitos deletérios causados pelos insultos pulmonares (GROMMES, SOEHNLEIN, 2011; NARASARAJU *et al.*, 2011).

Assim, como em todo processo inflamatório, a perpetuação da resposta do sistema imune pode levar a severos danos teciduais ou gerar doenças crônicas (CHEN *et al.*, 2018). Para que isso seja interrompido, algumas modalidades de tratamento para LPA/SDRA são utilizadas, com o intuito de desacelerar a resposta celular e assim permitir um melhor suporte, retornar a homeostase tecidual e reduzir o percentual de mortalidade em virtude da doença. Para tanto, nas últimas décadas diferentes estratégias foram desenvolvidas para melhorar o manejo dos pacientes com LPA/SDRA (MOKRA, 2020). A ventilação mecânica é uma intervenção não-farmacológica e uma das alternativas mais utilizadas, cujo impacto na queda da mortalidade é significativo. Esta modalidade de tratamento é indicada para a maior parte dos casos severos de SDRA, permitindo uma efetiva ventilação dos pulmões, cujos alvéolos perderam a capacidade de troca gasosa. A ventilação de baixo volume corrente, para prevenir hiperinsuflação corrente, e aplicação de pressão expiratória final positiva, para melhorar a hipoxemia e atelectasia cíclica limite, são os aspectos-chave da ventilação protetora na SDRA (BANAVASI *et al.*, 2021). Intervenções farmacológicas permanecem sendo um desafio no tratamento da

LPA/SDRA devido à heterogeneidade de respostas nos pacientes, o que leva a uma considerável limitação na farmacoterapia. O uso de corticóides ainda é controverso, porém alguns estudos têm demonstrado bons resultados, onde a terapia tem reduzido a formação de edema pulmonar e estresse oxidativo, assim como a mortalidade de pacientes (MOKRA, 2020). Um estudo randomizado e multicêntrico realizado recentemente na Espanha demonstrou que o uso de dexametasona intravenosa por 10 dias reduziu a mortalidade e a necessidade de ventilação mecânica em pacientes apresentando SDRA moderada-grave (VILLAR *et al.*, 2020).

Outras classes de fármacos já demonstraram resultados promissores, é o caso dos inibidores da fosfodiesterase, os quais mostraram ser efetivos em reduzir a inflamação e melhorar as funções pulmonares (MOKRA, 2020). Os bloqueadores neuromusculares também têm sido apontados como substâncias promissoras, devido a sua associação com a ventilação mecânica e em estabelecer uma melhor pressão pulmonar. Entretanto, o mecanismo exato dos benefícios do uso de tais fármacos ainda permanece em investigação (FAN, BRODIE, SLUTSKY, 2018). Uma nova alternativa para o tratamento de LPA/SDRA tem sido proposta nos últimos tempos e está baseada na investigação do potencial de produtos naturais. A variada gama de substâncias capazes de intervir em múltiplas vias do processo inflamatório dá destaque a compostos promissores, que são candidatos a novos fármacos e também futuramente podem auxiliar no suporte terapêutico do LPA/SDRA, o que tem sido demonstrado em uma série de estudos *in vivo* e *in vitro* por representantes das classes dos flavonóides, alcalóides, terpenóides, saponinas e cumarinas (HE *et al.*, 2021).

8.1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

Os modelos experimentais de LPA são ferramentas úteis desenvolvidas pela pesquisa científica, a fim de reproduzir características clínicas importantes do processo inflamatório no tecido pulmonar. Ainda que a doença em seres humanos apresente algumas características únicas para sua reprodução em modelos animais, haja vista que a doença em si não ocorre no animal em que está sendo viabilizado o experimento, não se chegou a um consenso sobre quais características da LPA precisam ser contempladas para validar a doença em modelos experimentais (MATUTE-BELLO *et al.*, 2010). Isso ocorre em decorrência da heterogeneidade de

resposta clínica que a doença se apresenta, somada as variabilidades nos desfechos experimentais encontrados nos diversos protocolos que existem hoje. As alterações encontradas nos animais de experimentação ocorrem basicamente em função das variabilidades genéticas existentes nas diferentes linhagens, o que pode aumentar, ou não, a sua susceptibilidade ao estímulo inflamatório. Ademais, a resposta observada em animais de diferentes sexos já se mostrou distinta, é o caso de camundongos machos, que parecem ser mais predispostos a desenvolver LPA que as fêmeas, possivelmente um efeito decorrente da resposta protetora dos hormônios sexuais (CHEN, BAI, WANG, 2010).

A importância e a contribuição científica dos modelos experimentais em animais para o manejo do paciente com LPA/SDRA é sem dúvida um ponto valioso. Para tanto, diferentes protocolos já foram padronizados, os quais reproduziram os desfechos característicos da LPA, onde a perda da função de barreira dos capilares alveolares seguida do aumento permeabilidade vascular são os desfechos mais importantes. Soma-se a isto, o fato de que a migração de leucócitos para pulmão pode ocorrer em poucas horas após o estímulo lesivo, e de forma geral os neutrófilos ativados representam as células granulocíticas mais decisivas desse processo patológico (BUTT, KURDOWSKA, ALLEN, 2016). Em seguida, outros achados se destacam com maior relevância, como: alterações histológicas do parênquima pulmonar, aumento da atividade de enzimas inflamatórias, como a mieloperoxidase (MPO), e de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF), presença de restos celulares e hipóxia (MATUTE-BELLO *et al.*, 2010).

A utilização de LPS como agente flogístico é amplamente usada por pesquisadores. Isso ocorre devido às grandes vantagens que essa endotoxina fornece no disparo do alarme inflamatório, ou seja, o alto potencial em ativar a resposta de defesa do hospedeiro, principalmente o sistema imune inato, estimulando a migração e ativação de leucócitos, e a produção de mediadores pró-inflamatórios (DOMSCHEIT *et al.*, 2020). Além disso, é possível mimetizar sistemicamente um desfecho similar às infecções bacterianas e endotoxemias, sem que exista a manipulação de microrganismos por parte dos investigadores, reduzindo riscos de acidentes biológicos (MATUTE-BELLO *et al.*, 2010). A utilização de LPS fornece facilidade na padronização, execução e controle das técnicas experimentais, além de auxiliar no estudo sobre a farmacologia de mediadores inflamatórios produzidos pela ativação de TLR-4 (DOMSCHEIT *et al.*, 2020;

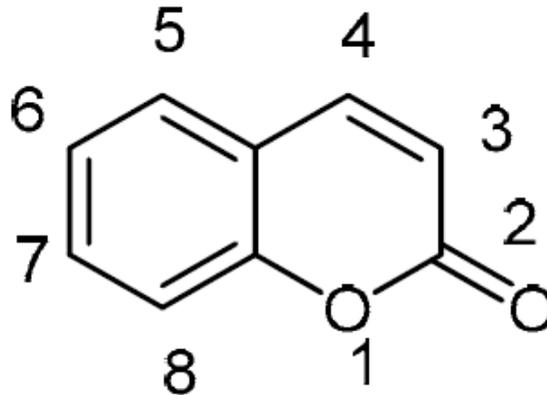
KORNEEV, 2019). Trata-se de um composto com boa estabilidade, o que permite a sua utilização por diferentes vias de administração e com ajustes de doses que refletem na intensidade da resposta celular desejada. Contudo, algumas limitações podem existir, como: a falta de reprodutibilidade para infecções polimicrobianas, a resposta imune é relativamente curta, existem variabilidades intra e interespecíficas e apesar de serem aplicáveis para estudos pré-clínicos seu uso é raramente indicado para estudos clínicos (KORNEEV, 2019).

A administração de LPS varia conforme a resposta desejada. Os protocolos experimentais para LPA/SDRA utilizam com mais frequência as rotas: intranasal, intratraqueal, intraperitoneal e intravenosa (CHEN, BAI, WANG, 2010). A administração de LPS por vias parenterais são inespecíficas, atingindo múltiplos órgãos, mas apresentando um importante valor quando se pretende avaliar a resposta da sepse na indução da inflamação pulmonar. As vias aéreas são comumente usadas para o estudo de LPA/SDRA, onde o LPS consegue rapidamente induzir a inflamação local (CHEN, BAI, WANG, 2010). De forma geral, os estudos experimentais de LPA/SDRA induzidos por LPS demonstram que as vias de sinalização fisiopatológicas são diferentes conforme a rota e o tempo de administração do agente flogístico, o que pode refletir nos desfechos obtidos nos estudos das possíveis intervenções terapêuticas que se pretende avaliar (DOMSCHEIT *et al.*, 2020).

8.1.3 CUMARINAS

Como foram abordadas no primeiro capítulo desta tese, as cumarinas, assim como os cromenos, são produtos naturais caracterizados pela presença do núcleo benzopirano em sua molécula. A estrutura molecular básica destes compostos é caracterizada pela presença de um anel heterocíclico formado pela fusão de um anel benzeno a um anel pirona (Figura 10). Na natureza, estes compostos são produzidos principalmente por plantas, mas há algumas espécies de fungos e bactérias também capazes de produzi-los. Com base em suas estruturas químicas, as cumarinas podem ser divididas em seis tipos: hidroxycumarinas (cumarinas simples), furanocumarinas, piranocumarinas, benzocumarinas, fenilcumarinas e biscumarinas (ROSTOM *et al.*, 2022).

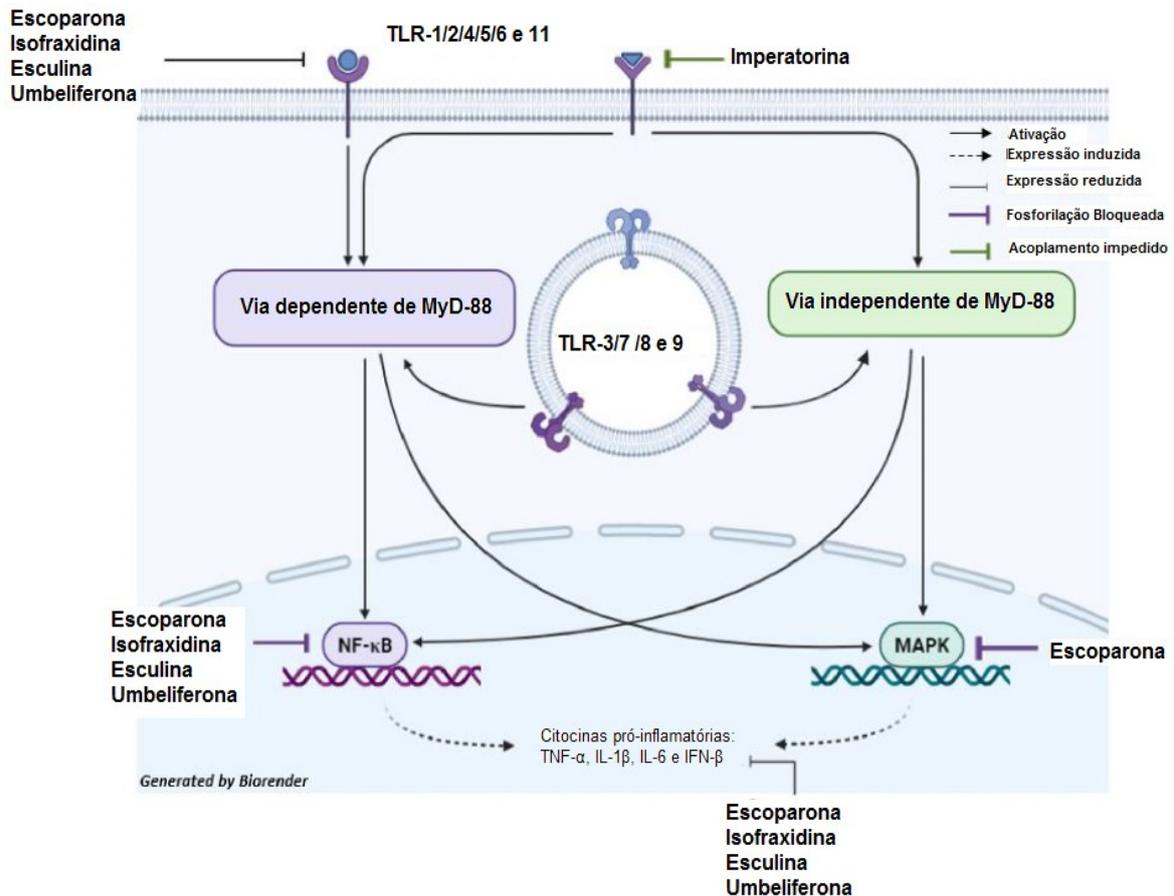
Figura 10. Estrutura química geral das cumarinas.



Fonte: Adaptado de STEFANACHI *et al.*, 2018.

As cumarinas sintéticas e naturais vêm despertando o interesse de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas devido às variadas propriedades bioativas que já foram descritas na literatura científica em relação a estes compostos (SRIKRISHNA, GODUGU, DUBEY, 2018). Dentre as atividades biológicas, destacam-se: ação anti-tumoral (KENNEDY, LACY, 2004; MENEZES, DIEDERICH, 2019), anti-viral (KOSTOVA *et al.*, 2006; ONG *et al.*, 2011), anti-coagulante (TIMSON, 2017), anti-oxidante (SAHU *et al.*, 2017) e anti-microbiana (HU *et al.*, 2017; REEN *et al.*, 2018). Na prática clínica, já são usados compostos cumarínicos, como por exemplo: os anticoagulantes antagonistas de vitamina K (warfarina) e os psoralênicos (metoxsaleno) (GARG *et al.*, 2020). Já o efeito anti-inflamatório das cumarinas vem sendo abordado por muitos estudos na comunidade científica, onde a ação desses compostos parece fornecer intervenções em múltiplas vias e sinais celulares que são responsáveis pela manutenção do processo inflamatório. Exemplo disto, pode ser evidenciado na Figura 11 adaptada da revisão realizada por Rostom *et al.* (2022), a qual demonstra a importante ação dos compostos cumarínicos em rotas inflamatórias intracelulares onde o NF-κB e as MAPK exercem papel de destaque, independente ou não da ação da MyD-88 (ROSTOM *et al.*, 2022).

Figura 11. Efeitos das cumarinas na via de sinalização dos TLRs.



Legenda: Cumarinas simples e furanocumarinas, Escoparona, Isofraxidina, Esculina e Umbeliferona, podem reduzir a expressão de TLR enquanto a Imperatorina bloqueia a montagem do complexo TLR. As cumarinas também podem afetar a maquinaria de sinalização intracelular, como NF-κB e vias MAPK. Adaptado de ROSTOM *et al.*, 2022.

Os mecanismos supracitados podem ser atribuídos à presença do núcleo benzopirano na estrutura molecular destes compostos, o que confere às cumarinas um privilegiado esqueleto molecular capaz de exercer funções versáteis nos diferentes cenários biológicos (STEFANACHI *et al.*, 2018).

A ação das cumarinas tem sido explorada em muitos modelos experimentais de estudo do processo inflamatório, no intuito de fornecer suporte científico que contribua para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de agir em vias de sinalização que, até o momento, não são alcançadas pelos fármacos utilizados na prática clínica. Para tanto, uma série de trabalhos têm avaliado o papel destes compostos em diferentes cenários da inflamação e os modelos experimentais de inflamação pulmonar oferecem um interessante cenário para o estudo dessas substâncias.

A Angelicina, uma furanocumarina encontrada na fruta da espécie *Psoralea corylifolia* L., demonstrou notável ação anti-inflamatória no modelo experimental de hiperresponsividade de vias aéreas induzida por ovalbumina em camundongos, um modelo que mimetiza as condições clínicas da asma, por meio da inibição da infiltração de células inflamatórias no pulmão, da redução da secreção de imunoglobulina E e das citocinas: IL-4, IL-5 e IL-13, além de diminuir a ativação do NF- κ B (WEI *et al.*, 2016). Neste mesmo modelo experimental, Wang *et al.* (2021) mostraram que o tratamento de camundongos com Imperatorina, uma furocoumarina presente na espécie *Angelicae Dahuricae radix*, alcançou desfechos similares, além de evidenciar a redução da secreção de quimiocinas no LBA dos animais inflamados (WANG *et al.*, 2021). No modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina, a Escopoletina, uma hidroxycumarina presente no gênero *Scopolia*, foi capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos no pulmão inflamado e esse efeito foi acompanhado da diminuição da exsudação pulmonar. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o composto foi efetivo em diminuir a atividade de MPO, reduziu também a concentração de mediadores pró-inflamatórios, como o NO e citocinas pró-inflamatórias, além de inibir a via p38 e NF- κ B (PEREIRA *et al.*, 2016). Desfechos parecidos, neste mesmo modelo experimental, foram obtidos no tratamento com IMMLG5521, um derivado cumarínico sintético (LI *et al.*, 2011). Deng *et al.* (2019) demonstraram, no modelo experimental de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos, a capacidade de derivados sintéticos cumarínicos em atenuar a fibrose, pela inibição da via do TGF- β (DENG *et al.*, 2019). Já no modelo de LPA induzida por LPS, diferentes compostos cumarínicos apresentam resultados equivalentes aos modelos experimentais já descritos e os resultados destes estudos serão abordados no decorrer desta tese.

Tanto nos diferentes cenários da inflamação, como nos demais contextos biológicos, o tratamento com cumarinas permanece sendo alvo de inúmeras publicações e revisões, justamente por apresentarem potenciais atividades farmacológicas, o que futuramente pode tornar-las novas opções de tratamento de interesse para a indústria farmacêutica na produção de novos medicamentos.

8.1.4 REVISÃO SISTEMÁTICA

O termo revisão sistemática surgiu na década de 70 e pode ser entendido como uma metodologia científica que permite reunir um conjunto de estudos publicados na literatura, com o intuito principal de responder questões que possibilitem dar suporte a prática baseada em evidências, ou seja, um grupo de evidências científicas pode ser resumido para auxiliar pesquisadores ou clínicos a entender melhor os desfechos encontrados em diferentes estudos e que, ao mesmo tempo, permita responder a uma determinada questão, ou até mesmo instigar modificações em protocolos clínicos sugerindo a necessidade do aprimoramento de novas pesquisas (DE-LA-TORRE-UGARTE-GUANILO, TAKAHASHI, BERTOLOZZI, 2011; OWENS, 2021).

Uma revisão sistemática precisa ser transparente e trazer avaliações da qualidade dos dados dos estudos reunidos, a fim de aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade dos protocolos apresentados. Portanto, diferente de uma revisão narrativa, a revisão sistemática necessita de uma padronização da busca dos estudos seguindo um planejamento rigoroso para seleção e avaliação dos dados extraídos (CANTO, REUS, 2020; BAHADORAN *et al.*, 2020).

Para facilitar esse processo de sistematização dos estudos e dos seus dados, uma lista de verificação para orientar os autores na resposta da pergunta elaborada para a revisão deve conter dados sobre a população de estudo, os tipos de intervenções e as comparações, os desfechos de interesse (primários e/ou secundários) e os tipos de estudos que devem ser reunidos para que a pergunta do trabalho seja respondida com sucesso. Para isso, a estratégia utilizando o acrônimo PICOS, PECOS ou PIRD fornece uma base didática para a formação da pergunta do estudo sem que nenhum elemento essencial da pergunta seja excluído (CANTO, REUS, 2020; METHELEY *et al.*, 2014). A partir deste ponto, fica ainda mais clara a diferença entre a revisão sistemática e narrativa, pois se inicia o processo de elegibilidade dos estudos por meio da elaboração de critérios de inclusão e exclusão.

As bases de dados da literatura usadas para a pesquisa de manuscritos precisam ser definidas para a elaboração de uma estratégia de busca exhaustiva e abrangente, onde a combinação de termos ou palavras-chaves permita o resgate de um número significativo de estudos que contemplem os elementos abordados na pergunta de interesse. Esta etapa da estratégia do estudo precisa ser escrita de uma maneira que possa ser reproduzida por outras pessoas (BAHADORAN *et al.*, 2020;

GOPALAKRISHNAN, GANESHKUMAR, 2013). Após o alcance e seleção dos estudos, utilizando os critérios de elegibilidade, os autores precisam fazer uma análise minuciosa dos manuscritos, com a finalidade de extrair e padronizar os dados, para que então possa ser feita correlação e a análise dos desfechos reunidos (CANTO, REUS, 2020).

Uma das etapas mais importantes do processo de construção de uma revisão sistemática é a avaliação da qualidade dos estudos. Para isso, diferentes ferramentas já foram elaboradas com a finalidade de fornecer transparência das análises dos manuscritos revisados e evitar possíveis vieses que comprometam a confiabilidade dos desfechos obtidos. Para este propósito, várias ferramentas de avaliação de qualidade para estudos pré-clínicos e clínicos foram desenvolvidas, as quais incluem escalas que são sistemas de pontuação para vários componentes de qualidade ou listas de verificação em que perguntas são feitas para avaliar a qualidade dos manuscritos (BAHADORAN *et al.*, 2020).

Dessa forma, o uso de revisões sistemáticas se destaca como um dos pilares principais da saúde baseada em evidências, proporcionando um maior volume de literatura em saúde, com variadas publicações e ricas em evidências capazes de fornecer subsídios para pesquisadores e clínicos terem importantes tomadas de decisões (MEDINA, PAILAQUILÉN, 2010). Fato este já destacado na obra *Clinical judgement*, do autor Alvan Feinstein (1967), que enfatizou a necessidade do raciocínio clínico ser enriquecido pela avaliação de variados resultados, obtidos em diferentes formas de tratamentos (FEINSTEIN *et al.*, 1967).

9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão sistemática da literatura, trazendo uma compilação de estudos publicados nos últimos dez anos a respeito da eficácia anti-inflamatória de compostos cumarínicos usados em modelos experimentais de LPA induzida por LPS em camundongos.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Buscar, em diferentes bases de dados da literatura científica, manuscritos relacionados ao uso de compostos cumarínicos em modelos murinos de LPA induzida por LPS.
2. Realizar a extração de dados gerais e dos desfechos/conclusões trazidas pelos artigos selecionados;
3. Correlacionar os dados extraídos entre os manuscritos obtidos, avaliando a frequência dos desfechos de cada estudo;
4. Avaliar individualmente cada artigo revisado quanto ao risco de viés, encontrado em seu desenvolvimento.
5. Avaliar se os dados presentes na literatura são em número e também de qualidade suficientes, para se concluir se as cumarinas possuem efeito anti-inflamatório quando utilizadas no modelo murino de LPA.

10 MATERIAS E MÉTODOS

A metodologia para este estudo foi baseada na declaração PRISMA (MOHER *et al.*, 2009; PAGE *et al.*, 2021) e no Manual Cochrane para Revisões Sistemáticas de Intervenção (HIGGINS *et al.*, 2021). Um protocolo de revisão sistemática criado no PRISMA-P foi registrado no Open Science Framework (OSF) Registries for Systematic Reviews, sob o código identificador DOI 10.17605/OSF.IO/BCKV4.

A questão do estudo elaborada para a busca de artigos na literatura foi baseada no acrônimo PICOS (população, intervenção, comparação, desfecho e desenho do estudo): **Os efeitos anti-inflamatórios das cumarinas na lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos são comparáveis aos medicamentos anti-inflamatórios de referência?** População = modelos de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos; Intervenção = Tratamento com Cumarinas/Benzopirenos; Comparador: Tratamento com medicamentos de referência e/ou grupo inflamado; Desfecho: Inibição do edema/exsudação e migração leucocitária; Desenho do estudo: Estudos originais publicados usando modelos experimentais *in vivo*.

10.1 BUSCAS NA LITERATURA

As seguintes bases de dados eletrônicas foram usadas para uma busca sistemática da literatura: PubMed, Web of Science, Scopus e Google Scholar. A busca foi realizada utilizando o período de artigos publicados entre 1º de janeiro de 2011 até 21 de junho de 2022. Foi realizada uma busca piloto para estabelecer os termos de busca *Medical Subject Headings* (MeSH) e estratégias de busca, cuja validação foi realizada com a ajuda de três especialistas (JSR, FCM, EMD). Uma lista de artigos de referência (indicados por especialistas) foi utilizada para definir a estratégia de busca. As publicações do PubMed foram recuperadas usando termos MeSH, que foram agrupados em quatro blocos: 1) Doenças pulmonares; 2) Benzopiranos OU Lipopolissacarídeos; 3) Anti-inflamatórios OU Inflamação OU Citocinas OU NF-kappa B; e 4) Camundongos (Tabela 1). Todos esses blocos foram combinados. A primeira fase estabeleceu uma investigação de acordo com as características e estratégias de cada base de dados eletrônica. O EndNote

Reference Manager e o site Rayyan QCRIAs foram as ferramentas utilizadas para organizar as referências recuperadas da pesquisa e remover duplicatas (OUZZANI *et al.*, 2016).

10.2 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Os artigos selecionados foram escolhidos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, por seis revisores independentes, pareados e cegados (GOR, ZSB, TLL, ETBM, MF e TEPR). Os critérios de inclusão foram: estudos com animais murinos (camundongos) submetidos a modelos de LPA induzida por LPS, utilizando cumarina sintética e não sintética (compostos isolados) em qualquer dose, via de administração, tempo ou frequência. Os estudos também devem conter grupos controle compostos por camundongos inflamados e tratados com fármacos de referência, e as medidas que demonstram a eficácia anti-inflamatória das cumarinas devem expressar os desfechos primários que são: 1) formação de edema/exsudação e 2) migração de leucócitos. Além disso, apenas estudos originais publicados usando o modelo experimental de LPA *in vivo* foram incluídos (Tabela 2).

O primeiro passo para a aplicação dos critérios de elegibilidade foi a leitura dos títulos e resumos dos estudos selecionados. Da mesma forma, os artigos selecionados nesta etapa foram lidos na íntegra seguindo os mesmos critérios de inclusão citados acima. Em ambas as fases, todas as informações recuperadas foram cruzadas por um terceiro revisor (JSR, FCM ou EMD). A seleção final foi determinada na leitura do texto completo da publicação usando os elementos de busca com PICOS. Os estudos excluídos foram aqueles que não atenderam aos critérios de inclusão, mas que atenderam aos critérios de exclusão listados na Tabela 2. Também buscamos artigos nas listas de referência dos estudos elegíveis. Os revisores leram estudos revisados independentemente e quaisquer discordâncias foram resolvidas por meio de discussão e validação por um revisor especialista.

10.3 EXTRAÇÃO DE DADOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Os artigos foram distribuídos entre quatro revisores (GOR, TLL, ETBM e EMD) por meio do programa Research Randomizer® (URBANIACK, PLOUS, 2013). A extração dos dados aconteceu de forma independente e os resultados foram

retirados do texto, tabelas ou figuras, os quais foram transcritos em uma tabela padronizada. As discordâncias foram resolvidas por meio de discussão ou consulta a um terceiro revisor. Em seguida, os dados extraídos foram validados por dois revisores (JSR e EMD). A tabela padronizada apresentou as seguintes informações: dados básicos do estudo (nome dos autores, ano de publicação, país); dados sobre os animais (linhagem, sexo e peso); cumarinas (nomenclatura, doses dos compostos, vias de administração e tempo de tratamento com cumarinas até a eutanásia do animal); LPS (concentração e via de administração); intervalo de tempo entre o tratamento dos compostos e a indução da inflamação com LPS; anti-inflamatórios de referência (nome, dose, via de administração); objetivo dos estudos; tipo de análise estatística; principais métodos e resultados (resultados primários); inibição dos principais resultados (por cumarinas e fármacos de referência); resultados secundários; sugestões de mecanismos de ação e conclusão principal. Dois especialistas verificaram os dados extraídos e quaisquer discrepâncias foram resolvidas por meio de discussão (JSR e EMD)..

10.4 RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

O risco de viés foi conduzido por dois revisores cegados independentes (ZSB e MF) usando a ferramenta de risco de viés SYRCLE para estudos com animais (HOOIJMANS *et al.*, 2014), que é dividida por domínios: Domínio 1 Geração de sequência; Domínio 2 Características de base; Domínio 3: Ocultação de alocação; Domínio 4: Habitação aleatória; Domínio 5: Cegamento; Domínio 6: Avaliação de resultados aleatórios; Domínio 7: Cegamento; Domínio 8: Dados de desfechos incompletos; Domínio 9: Relato de desfechos seletivos; Domínio 10: Outras fontes de viés.

Dez perguntas foram aplicadas aos artigos incluídos na revisão sistemática, as respostas "SIM" indicam baixo risco de viés, "NÃO" indicam alto risco de viés e "INCERTO" indicam risco de viés sem clareza. Com base no percentual de resposta "SIM", foi considerado: Alto risco de viés <50%, moderado 50-75% e baixo >75%. Qualquer discordância entre os revisores foi resolvida por discussão com um terceiro membro revisor (GOR), até que todos chegassem a um consenso, caso não fosse solucionado, um especialista em modelo animal de inflamação foi consultado para solucionar a discordância (EMD).

Tabela 1. Estratégias de busca exaustiva nas diferentes bases de dados da literatura científica.

Busca	Pubmed (n=2.733)	Web of Science (n=2.085)	Scopus (n=2.680)	Google Scholar (n=18.000/100)
Bloco 1	"Lung Diseases"[Mesh]	TS=("Lung Diseases" OR "acute lung injury")	(TITLE-ABS-KEY("Lung Diseases")) OR (TITLE-ABS-KEY("Acute lung injury"))	"Lung Diseases" OR "acute Lung injury"
Bloco 2	"Benzopyrans"[Mesh Terms] OR "lipopolysaccharides"[MeSH Terms]	TS=(Benzopyrans OR Coumarins OR lipopolysaccharides)	TITLE-ABS-KEY (lipopolysaccharides OR benzopyrans OR coumarins)	Benzopyrans OR lipopolysaccharides OR coumarins
Bloco 3	"Anti-Inflammatory Agents"[Mesh] OR "Inflammation"[Mesh] OR "Cytokines"[Mesh] OR "NF-kappa B"[Mesh]	TS= ("Anti-Inflammatory Agents" OR Inflammation OR Cytokines OR "NF-kappa B")	(TITLE-ABS-KEY("Anti-Inflammatory Agents")) OR (TITLE-ABS-KEY(Inflammation)) OR (TITLE-ABS-KEY(Cytokines)) OR (TITLE-ABS-KEY("NF-kappa B"))	"Anti-Inflammatory Agents" OR Inflammation OR Cytokines OR "NF-kappa B"
Bloco 4	"Mice"[Mesh]	TS=(Mice)	TITLE-ABS-KEY(Mice)	Mice

Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão aplicados para a seleção dos estudos.

• PICOS	• Critérios de inclusão	• Critérios de exclusão
• P	<ul style="list-style-type: none"> Somente estudos experimentais <i>in vivo</i> com camundongos; Apenas inflamação induzida por LPS; Modelos experimentais de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS. 	1- População <ul style="list-style-type: none"> Estudos experimentais com modelos animais que não utilizaram camundongos; Estudos experimentais que não utilizaram animais (ex: cultura celular ou <i>ex-vivo</i>); Estudos sem inflamação induzida por LPS; Modelos experimentais que não avaliaram o efeito na inflamação pulmonar.
• I	<ul style="list-style-type: none"> Tratamento com derivados cumarínicos sintéticos e não sintéticos; Fontes sintéticas ou naturais; qualquer via de administração, tempo e frequência são permitidos. 	2- Intervenção <ul style="list-style-type: none"> Uso de compostos não derivados de cumarinas; Tratamento realizado com cumarinas em mistura de compostos;
• C	<ul style="list-style-type: none"> Uso de um grupo controle com medicamentos de referência Uso de controles inflamados; Com análise estatística dos resultados obtidos. 	3- Comparação <ul style="list-style-type: none"> Não foi usado grupo controle com fármaco anti-inflamatório de referência; Não foi usado grupo controle inflamado; Sem análise estatística.
• O	<ul style="list-style-type: none"> Migração de leucócitos (contagem ou índice celular por histologia); Edema/exsudação (Pulmão U/S, histologia e/ou dosagem de proteína); Citocinas pró-inflamatórias; NF-κB (expressão ou inibição da subunidade). 	4-Desfechos <ul style="list-style-type: none"> Sem avaliação de migração de leucócitos e/ou edema/exsudação
• S	<ul style="list-style-type: none"> Estudos experimentais <i>in vivo</i> 	5-Tipo de publicação <ul style="list-style-type: none"> Resenhas, Meta-análises, editoriais, teses e/ou dissertações, cartas, correspondências, artigos de opinião, congressos/eventos, pautas
Outros		6- Outro: Idioma estrangeiro diferente do inglês, manuscrito não disponível.

11 RESULTADOS

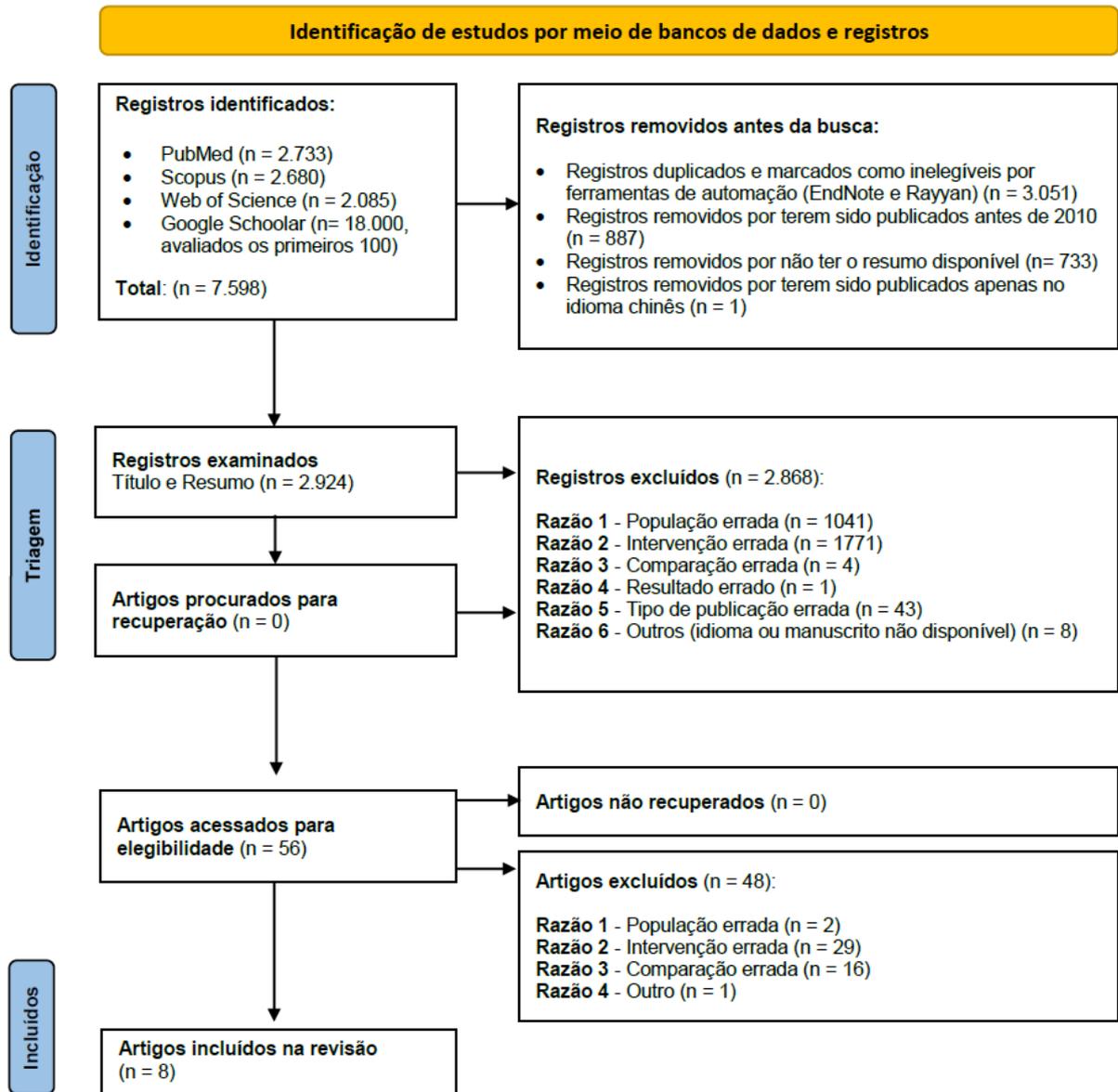
11.1 FASE DE ELEGIBILIDADE

A busca sistemática nas bases de dados selecionadas alcançou a recuperação de 7.598 artigos. Desse total, as duplicatas foram removidas pelo Endnote online e pelo site Rayyan, totalizando 3.051 artigos duplicados que foram eliminados. Posteriormente, os revisores consideraram 1.621 estudos inelegíveis para continuar nesta revisão, pois havia estudos publicados antes de 2010 (n=887), alguns não tinham o resumo disponível para leitura (n=733) e uma publicação foi realizada em um idioma diferente do inglês (n=1).

Para a primeira fase de leitura, títulos e resumos, 2.924 artigos foram avaliados pelos revisores que excluíram 2.868 estudos pelos seguintes motivos: (1) população errada (n=1.041), (2) intervenção errada (n=1.771), (3) comparação errada (n=4), (4) resultado errado (n=1), (5) tipo de publicação errada (n=43) e (6) outros (idioma diferente do inglês ou manuscrito não disponível) (n=8).

Um total de 56 estudos foi elegível para a fase de leitura do texto completo. Assim, os mesmos critérios de elegibilidade foram aplicados, resultando na exclusão de 48 estudos pelos seguintes motivos: (1) população errada (n=2), (2) intervenção errada (n=29), (3) comparação errada (n=16), (4) outro (n=1). Finalmente, para a realização desta revisão sistemática, oito estudos foram incluídos (Figura 12).

Figura 12. Diagrama de fluxo PRISMA 2020 para revisões sistemáticas.



Legenda: Fase de elegibilidade dos estudos obtidos nas bases de dados da literatura científica (Pubmed/Web of Science/Scopus/Google Scholar).

11.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

A China foi o principal país de origem dos artigos incluídos (n = 5) (CHEN *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022), os outros estudos foram realizados no Paquistão (n=1) (KHAN *et al.*, 2019),

Taiwan (n=1) (LEE *et al.*, 2020) e na República da Coreia (n=1) (LIM *et al.*, 2014). O ano de 2015 teve o maior número de publicações (n=3) (CHEN *et al.*, 2015; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015) (Tabela 3). Em relação aos animais utilizados nos experimentos, os estudos utilizaram camundongos com pesos que variaram entre 18-35 g, de ambos os sexos, sendo mais camundongos machos (n=7) (KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022) do que fêmeas (n=1) (CHEN *et al.*, 2015). Já a linhagem principal mais utilizada nos estudos foi BALB/c (n=5) (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022).

Não houve muita variação entre os manuscritos no que diz respeito ao tempo de tratamento com os compostos cumarínicos, a maioria deles utilizou protocolos experimentais com tempos de tratamento variando entre 6-8 horas (n=6) (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Apenas dois manuscritos apresentaram o período de tratamento mais longo (n=2) (KHAN *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2014). Doses únicas foram usadas em todos os manuscritos, exceto por Xuan *et al.* (2022) (Tabela 3).

O LPS foi usado como indutor inflamatório diretamente nas vias aéreas, em seis manuscritos, principalmente por via intratraqueal (n=5) (CHEN *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022) e via intranasal (n=1) (LIM *et al.*, 2014). A via intraperitoneal foi menos frequente e realizada em dois estudos (n=2) (KHAN *et al.*, 2019; NIU *et al.*, 2015). Por via intratraqueal, as concentrações de LPS variaram de 1-5 mg/kg (n=5) (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Pela via intranasal, Lim *et al.* (2014) utilizaram múltiplas administrações da concentração de 2 mg/kg de LPS (5 vezes) em seu protocolo experimental (n=1). Manuscritos que usaram a via intraperitoneal para causar LPA induzida por LPS usaram uma concentração de 5 mg/kg para induzir a inflamação (n = 2) (KHAN *et al.*, 2019; NIU *et al.*, 2015) (Tabela 3).

A Esculetina foi utilizada em dois dos artigos selecionados e, embora a via de administração tenha sido diferente nesses estudos, as doses efetivas foram as mesmas (20 e 40 mg/kg) e o tempo de tratamento até a eutanásia dos camundongos foi muito semelhante, variando apenas 30 minutos entre esses protocolos experimentais (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020). Os outros artigos

usaram diferentes compostos cumarínicos, como: Anomalina, Columbianadina, Esculina, Isofraxidina, Pterixina e Umbelliferona (KHAN *et al.*, 2019; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022).

Além disso, a cumarina e as doses utilizadas foram variadas, mas a via oral foi a rota de administração mais frequente entre elas (n=5) (CHEN *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). A via intraperitoneal foi escolhida com menos frequência (n=3) (KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; NIU *et al.*, 2015) (Tabela 3). Sete dos oito artigos inflamaram os camundongos após o tratamento com os compostos cumarínicos (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Khan *et al.*, (2019) não deixaram claro o tempo exato de indução da inflamação com LPS (antes ou depois) (Tabela 3a). Para comparar os grupos de animais inflamados e tratados, os artigos trouxeram em suas metodologias a utilização de grupos controle tratados com fármacos de referência, onde a dexametasona foi utilizada em todos os estudos apresentados nesta revisão (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015 e XUAN *et al.*, 2022). Porém, assim como houve variação nas doses e vias de administração dos compostos cumarínicos, o mesmo ocorreu nos grupos tratados com fármacos de referência. As doses e via de administração mais utilizadas foram 2 mg/kg (CHEN *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015) e 5 mg/kg (LEE *et al.*, 2020; NIU *et al.*, 2015; XUAN *et al.*, 2022) e a via oral (CHEN *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 3).

Para analisar os resultados encontrados, o método estatístico utilizado em todos os estudos foi ANOVA de uma via (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015 e XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 3).

11.3 DESFECHOS PRINCIPAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

O efeito anti-inflamatório foi baseado nos seguintes resultados primários associados: Exsudação/formação de edema e migração de leucócitos. Nesta revisão, foi observado que a medida de exsudato/edema foi avaliada seguindo

diferentes metodologias: relação peso úmido/seco (U/S) do pulmão, concentração de proteínas e análise histológica. Enquanto a avaliação da migração de leucócitos foi avaliada principalmente usando duas metodologias principais: contagem total e diferencial de leucócitos no LBA e análise histológica do pulmão. A formação de edema está correlacionada com a exsudação, que é definida como o vazamento de líquido do plasma vascular para o local da inflamação, e isso ocorre devido ao aumento da permeabilidade dos vasos e consequentemente permite o transporte de mediadores químicos e células da corrente sanguínea, e desempenhará um papel fundamental no processo inflamatório (SPEAR, 2012).

Nesta revisão, seis dos oito estudos selecionados avaliaram a formação de edema por meio da medida da relação de peso U/S pulmonar (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022), e dois autores complementaram esses resultados usando avaliação histológica para avaliar a formação de edema (KHAN *et al.*, 2019; XUAN *et al.*, 2022). Lee *et al.* (2020) utilizaram apenas análise histológica para avaliar o edema nos pulmões. O estudo publicado por Xuan *et al.* (2022) também complementou os resultados, determinando a concentração de proteínas totais no LBA, sendo assim o único artigo trazendo as três metodologias aqui citadas para a avaliação do edema (Tabela 4).

A presença de leucócitos no tecido inflamado é fundamental para o processo de defesa do hospedeiro e efetivação da inflamação, porém o acúmulo excessivo de células inflamatórias pode ser deletério ao órgão lesado (NOURSHARGH, ALON, 2014). Todos os artigos selecionados nesta revisão forneceram dados sobre a infiltração de leucócitos nos pulmões. A contagem total e diferencial de células do LBA foi realizada em cinco estudos (CHEN *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015), enquanto a análise histológica pulmonar foi o método escolhido por cinco estudos para complementar os resultados da contagem ou como única medida utilizada para avaliar a infiltração leucocitária (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 4). Todas as metodologias mostraram a presença de neutrófilos como célula-chave no processo inflamatório desencadeado pelo LPS. Todos os estudos mostraram inibição significativa dos resultados primários, tanto pelas cumarinas como pelos fármacos de referência (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*,

2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 4).

11.4 DESFECHOS SECUNDÁRIOS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Os desfechos secundários foram organizados de acordo com as propostas dos artigos para investigar a influência dos compostos testados na produção de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo e alterações histológicas na arquitetura pulmonar. A produção de citocinas pró-inflamatórias foi o principal desfecho secundário escolhido por sete artigos para evidenciar a atividade anti-inflamatória dos compostos cumarínicos, as citocinas: TNF, IL-1 β , IL-6, IL-17 e IL-23 foram as mais estudadas (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015 e XUAN *et al.*, 2022). Apenas Lim *et al.* (2014) não se propuseram a investigar a presença de citocinas em seu estudo.

A produção da enzima COX-2 foi adotada em dois estudos como medida indireta da liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (NIU *et al.*, 2015; XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 4). Para corroborar os dados sobre a infiltração de leucócitos no local da inflamação, principalmente neutrófilos, quatro estudos investigaram a atividade da MPO, um importante marcador destas células em tecidos inflamados (CHEN *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015). A MPO é uma enzima que também desempenha um papel importante na produção de EROs. A abordagem do estresse oxidativo foi realizada por Khan *et al.* (2019) e Tianzhu, Shumin (2015) que demonstraram aumento na atividade de marcadores antioxidantes (GST, GSH e SOD) e redução na concentração de Malondialdeído (MDA). Para continuar a compreensão das alterações histológicas envolvendo a LPA, Lee *et al.* (2020) e Lim *et al.* (2014) demonstraram que seus compostos cumarínicos testados foram capazes de reduzir o afinamento da parede alveolar, o que conseqüentemente resultou em uma melhor conservação da arquitetura do tecido pulmonar (Tabela 4).

11.5 SUGESTÕES DE MECANISMOS DE AÇÃO INTRACELULARES DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Diferentes mecanismos alternativos foram propostos para elucidar o papel inibitório dos derivados cumarínicos na resposta inflamatória, onde a determinação dos componentes envolvidos na via NF- κ B foi a mais utilizada (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022) seguida da investigação das vias de sinalização celular MAPK (ERK, JNK, p38) e AKT (LEE *et al.*, 2020; XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 4).

Um destaque foi dado por dois estudos sobre a expressão de TLR, Luo *et al.* (2016) e Tianzhu e Shumin (2015) demonstraram a capacidade dos compostos cumarínicos, Umbeliferona e Esculina, de diminuir a expressão de TLR-2 e TLR-4, e também das proteínas acessórias MyD88 e IRAK1 que estão intimamente envolvidas na ativação da via NF- κ B (LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015) (Tabela 4). Em dois estudos, a Esculetina demonstrou ter um efeito inibitório em diferentes vias de sinalização celular. Chen *et al.* (2015) associaram o efeito protetor da Esculetina com a inibição da via RhoA/ROCK, enquanto Lee *et al.* (2020) demonstraram que esta cumarina foi capaz de inibir a via de sinalização ROR γ t/IL-17 (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020). Luo *et al.* (2016) demonstraram que a Umbeliferona exerce um efeito protetor via inibição das caspases 3 e 9, além de regular negativamente a proteína pró-apoptótica BAX (LUO *et al.*, 2016).

Finalmente, Xuan *et al.* (2022) atribuíram o efeito anti-inflamatório da Pterixina a sua capacidade de interferir na via do inflamassoma NLRP3, responsável principalmente pela maturação da IL-1 β . Em seus experimentos, a Pterixina foi capaz de regular negativamente a ativação do complexo inflamassoma, constituído pelas proteínas ASC, Caspase-1 e NLRP3 (XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 4).

Tabela 3. Resumos descritivos das características gerais dos estudos incluídos (n=8).

Autor; Ano; País	Linhagem animal, (sexo, peso)	Cumarina (doses, via de administração, tempo de tratamento)	LPS (Concentração e via de administração)	Tratamento com cumarina (antes ou depois do LPS)	Fármaco anti-inflamatório de referência (nome, dose, via de administração)	Objetivos dos estudos	Estatísticas
CHEN <i>et al.</i> , 2015; China	BALB/c, (Fêmeas, 18-22 g)	Esculetina (20 e 40 mg/kg, v.o, 7 h)	1 mg/kg, i.t.	Antes (1 h)	Dexa, 2 mg/kg, v.o.	Investigar se o tratamento com Esculetina exerceu atividade protetora contra a inflamação pulmonar em camundongos.	ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de Tukey
KHAN <i>et al.</i> , 2019; Paquistão	BALB/c (Machos, 30-35 g)	Anomalina (1, 10 e 50 mg/kg, i.p., 24 h)	5 mg/kg, i.p.	Incerto	Dexa, 20 mg/kg, i.p.	Investigar o efeito da Anomalina, um derivado piranocumarínico da <i>Saposhnikovia divaricata</i> sobre a LPA e o mecanismo molecular através do qual a Anomalina confere essa proteção.	ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett
LEE <i>et al.</i> , 2020; Taiwan	C57BL/6C (B6) (Machos, 20–25g)	Esculetina (20 e 40 mg/kg, i.p., 6 h 30 min)	2,5 mg/kg, i.t.	Antes (30min)	Dexa, 5 mg/kg, i.p.	Investigar o papel protetor da Esculetina contra a LPA induzida por LPS por meio da modulação das vias AKT, MAPK, NF-κB e IL-17.	ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de Tukey
LIM <i>et al.</i> , 2014; Coréia	ICR livre de patógenos específicos (Machos, 18–22 g)	Columbianadina (20 e 60 mg/kg, v.o., 17 h)	10 mg/kg (2 mg/kg 5 vezes), i.n.	Antes (1 h)	Dexa, 30 mg/kg, v.o.	Estabelecer o papel terapêutico das raízes de <i>Angelica decursiva</i> e dos derivados cumarínicos na inflamação das vias aéreas para justificar cientificamente seu uso clínico e para identificar os novos agentes potenciais para o tratamento de doenças pulmonares inflamatórias.	ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett
LUO <i>et al.</i> , 2016; China	BALB/c (Machos, 18-22 g)	Umbeliferona (20 e 40 mg/kg, v.o., 6 h 15 min)	1 mg/kg, i.t.	Antes (15 min)	Dexa, 2 mg/kg, v.o.	Investigar os efeitos protetores da Umbeliferona na LPA induzida por LPS e explorar seus possíveis mecanismos anti-inflamação e anti-apoptose <i>in vivo</i> .	ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de Tukey
NIU <i>et al.</i> , 2015; China	Kunming (Machos, 22–25 g)	Isofraxidina 5, 10 e 15 mg/kg, i.p., 7 h)	5 mg/kg, i.p.	Antes (1 h)	Dexa, 5 mg/kg, i.p.	Explorar os efeitos protetores da Isofraxidina contra LPA induzida por LPS em camundongos	ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls
TIANZHU, SHUMIN, 2015; China	BALB/c (Machos, 18-20 g)	Esculina (20 e 40 mg/kg, v.o., 6 h 30 min)	1 mg/kg, i.t.	Antes (30 min)	Dexa, 2 mg/kg, v.o.	O objetivo do estudo é investigar se Esculina poderia proteger contra inflamação pulmonar inespecífica em camundongos	ANOVA de uma via ou testes t de Student
XUAN <i>et al.</i> , 2022; China	BALB/c (Machos, 18-22 g)	Pterixina (5, 10 e 25 mg/kg, v.o., 8 h)	5 mg/kg, i.t.	Antes 7 days (7 doses, uma vez ao dia)	Dexa, 5 mg/kg, v.o.	Investigar se a Pterixina pode aliviar a LPA induzida por LPS <i>in vivo</i> e os mecanismos envolvidos.	ANOVA de uma via seguida de testes de comparações múltiplas de Duncan.

Tabela 4. Resumos descritivos das características gerais dos estudos incluídos (n=8) (Continuação).

Autor; Ano; País	Principais Métodos e Desfechos	A cumarina inibiu os desfechos primários? (S/N)	O fármaco de referência inibiu os desfechos primários? (S/N)	Desfechos secundários	Sugestão de mecanismo de ação	Conclusão
CHEN <i>et al.</i> , 2015; China	Relação peso U/S do pulmão: Edema Contagem celular em LBA: Leucócitos totais/neutrófilos Mudanças na histopatologia pulmonar: infiltração de neutrófilos.	S	S	Citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-6 MPO	NF- κ B	Este estudo mostrou que a Esculetina desempenhou um potente papel anti-inflamatório na LPA induzida por LPS por meio da inibição da via RhoA/Rho quinase e via NF- κ B <i>in vivo</i> .
KHAN <i>et al.</i> , 2019; Paquistão	Relação peso U/S do pulmão: Edema Mudanças na histopatologia pulmonar: infiltração de neutrófilos e edema.	S	S	Citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-6 Atividade antioxidante: GSH, GST, Catalase e MDA Congestão pulmonar e inflamação intersticial	Não relatado	A Anomalina exibiu atividade protetora importante na LPA induzida por LPS, além de exibir atividade protetora por meio da inibição do eixo Akt e MAPKs/AP-1.
LEE <i>et al.</i> , 2020; Taiwan	Mudanças na histopatologia pulmonar: infiltração de neutrófilos, macrófagos e edema intersticial.	S	S	Citocinas: TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-17 e IL-23 Mudanças na histopatologia: afinamento da parede alveolar e congestão pulmonar	NF- κ B Proteínas MAPK: ERK, p38, JNK Vias AKT e ROR γ /IL-17	A Esculetina teve efeitos protetores contra LPA induzida por LPS em camundongos, atenuando a infiltração de células imunes inflamatórias e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias.
LIM <i>et al.</i> , 2014; Coréia	Contagem celular em LBA: Leucócitos totais, neutrófilos, macrófagos alveolares e intersticiais e células dendríticas	S	S	Mudanças na histopatologia: afinamento da parede alveolar	Não relatado	As raízes de <i>Angelica decursiva</i> e seu constituinte, Columbianadina, demonstraram possuir atividade inibitória contra a inflamação pulmonar. O mecanismo celular inibitório da cumarina inclui a supressão da expressão de enzimas pró-inflamatórias.
LUO <i>et al.</i> , 2016; China	Relação peso U/S do pulmão: Edema Contagem celular em LBA: Leucócitos totais/neutrófilos Mudanças na histopatologia pulmonar: infiltração de leucócitos.	S	S	Citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-6 MPO	NF- κ B TLR2 e TLR4 Expressão proteica: MyD88, RIP140, CBP, caspase-3, caspase-9, Bax e Bcl-2	A Umbeliferona exibiu um efeito protetor na LPA induzida por LPS, possivelmente por meio da supressão da apoptose pulmonar e da inflamação.
NIU <i>et al.</i> , 2015; China	Relação peso U/S do pulmão: Edema Contagem celular em LBA: Leucócitos totais/neutrófilos e macrófagos	S	S	Citocinas: TNF- α e IL-6 Score de lesão pulmonar COX-2 e PGE2 MPO	Não relatado	Os resultados mostraram que a Isofraxidina possui efeitos protetores contra a LPA induzida por LPS e os efeitos protetores podem resultar da supressão da expressão da enzima COX-2, que causa a redução da produção de PGE2.
TIANZHU, SHUMIN, 2015; China	Relação peso U/S do pulmão: Edema Contagem celular em LBA: Leucócitos totais/neutrófilos e macrófagos	S	S	Citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-6 MPO Atividade antioxidante: SOD e MDA	NF- κ B TLR2 e TLR4 Expressão proteica: MyD88 e IRAK1	O estudo mostrou que a Esculetina desempenhou um potente papel antiinflamatório na LPA induzida por LPS em camundongos.
XUAN <i>et al.</i> , 2022; China	Relação peso U/S do pulmão: Edema Concentração de proteína no LBA: Edema Mudanças na histopatologia pulmonar: infiltração de	S	S	Citocinas: TNF- α , IL1 β e IL-6 COX-2	NF- κ B Proteínas MAPK: ERK, p38, JNK Via Inflamassoma: NLRP3, ASC e Caspase 1	Este estudo demonstrou que a Pterixina pode aliviar a LPA induzida por LPS ao inibir a sinalização MAPK/NF- κ B e a ativação do inflamassoma NLRP3.

11.6 RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

Em relação ao possível viés na seleção, apenas um manuscrito não relatou a sequência de alocação dos animais de forma aleatória (LIM *et al.*, 2014), cinco estudos não ajustaram os resultados dos grupos com base nos resultados do controle (CHEN *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; XUAN *et al.*, 2022), e um estudo não ocultou adequadamente a alocação dos animais nos grupos de estudo (LIM *et al.*, 2014) (Tabela 5).

Todos os manuscritos avaliados apresentaram algum problema em relação ao risco de viés de desempenho. Em primeiro lugar, nenhum manuscrito descreveu claramente se os animais foram alojados aleatoriamente durante os experimentos (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015 e XUAN *et al.*, 2022), e nenhum manuscrito ocultou o conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante os experimentos (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015 e XUAN *et al.*, 2022) (Tabela 5).

A avaliação do risco de viés de detecção, também apresentou resultados surpreendentes. Sete estudos não randomizaram a seleção de animais para avaliar os resultados estudados (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015 e XUAN *et al.*, 2022), um deles não descreveu essa importante fonte de viés (LUO *et al.*, 2016) (Tabela 5).

Por outro lado, todos os manuscritos mostraram claramente os resultados individuais obtidos nos experimentos (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Todos os estudos relataram preocupações em relação aos desfechos obtidos, apresentando tabelas e figuras com alta definição e de fácil compreensão. Uma declaração de aprovação ética, para os experimentos com animais foi relatada em todas as publicações. Já declaração de conflito de interesse, estava presentes em apenas três artigos (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020; XUAN *et al.*, 2022).

Finalmente, observamos uma substancial heterogeneidade experimental e metodológica entre os estudos. Na avaliação final do viés usando a ferramenta SYRCLE, sete artigos foram classificados como tendo risco moderado de viés

(CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022), enquanto um estudo foi classificado como possuidor de alto risco de viés (LIM *et al.*, 2014) (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação de risco de viés dos estudos incluídos por meio da ferramenta SYRCLE.

TIPOS DE VIÉS		ESTUDOS INCLUÍDOS							
Viés de seleção	Domínio	CHEN <i>et al.</i> , 2015	KHAN <i>et al.</i> , 2019	LEE <i>et al.</i> , 2020	LIM <i>et al.</i> , 2014	LUO <i>et al.</i> , 2016	NIU <i>et al.</i> , 2015	TIANZHU, SHUMIN, 2015	XUAN <i>et al.</i> , 2022
Q1	Geração de sequência	S	S	S	N	S	S	S	S
Q2	Características de base	N	S	S	N	N	N	S	N
Q3	Ocultação de alocação	S	S	S	N	S	S	S	S
Viés de performance									
Q4	Habitação aleatória	I	I	I	I	I	I	I	I
Q5	Cegamento	N	N	N	N	N	N	N	N
Viés de detecção									
Q6	Avaliação de resultado aleatório	N	N	N	N	I	N	N	N
Q7	Cegamento	N	N	N	N	N	N	N	N
Viés de atrito									
Q8	Dados de desfechos incompletos	S	S	S	S	S	S	S	S
Viés de relatórios									
Q9	Relatos de desfechos seletivos	S	S	S	S	S	S	S	S
Q10	Outras fontes de viés	S	S	S	S	S	S	S	S
Score (% de resposta SIM)		50	60	60	30	50	50	60	50
JULGAMENTO FINAL		M	M	M	A	M	M	M	M

Questões = Q; Q1: A sequência de alocação foi adequadamente gerada e aplicada? Q2: Os grupos eram semelhantes no início do estudo ou foram ajustados para fatores de confusão na análise?; Q3: A alocação foi adequadamente oculta? Q4: Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?; Q5: Os cuidadores e/ou investigadores não sabiam qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento?; Q6: Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado?; Q7: O avaliador de resultados estava cegado?; Q8: Os dados de resultados incompletos foram tratados adequadamente?; Q9: Os resultados do estudo estão livres de relatórios de resultados seletivos?; Q10: O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés? Respostas= S: Sim; N: Não; I: Incerto; M: Risco moderado de viés; A: Alto risco de viés. Alto risco de viés <50%, moderado 50-75% e baixo >75%

12 DISCUSSÃO

As cumarinas são compostos heterocíclicos oxigenados naturais que inicialmente foram encontrados e isolados de uma planta da família *Fabaceae*, conhecida localmente como “coumaroun”, por Vogel em 1820 (BRUNETON, 1999). Nas plantas, a produção desses metabólitos secundários, denominados benzo- α -pirona (cumarina) e benzo- γ -pirona (cromona), ocorre devido à condensação de derivados do pirano com o benzeno (LACY, O’KENNEDY, 2004). Por serem compostos versáteis e facilmente modificados sinteticamente, as cumarinas são comumente utilizadas como alvos de interesse da indústria farmacêutica na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (MATOS *et al.*, 2015; SHARIFI-RAD *et al.*, 2021; STEFANACHI *et al.*, 2018). Embora esses compostos tenham sido usados como moldes no desenvolvimento de alguns fármacos, até agora, eles não foram usados como protótipos para desenvolver medicamentos capazes de lidar com uma condição inflamatória pulmonar crítica e complexa conhecida como LPA (COSTA *et al.*, 2016).

A inflamação representa um cenário típico encontrado em muitas doenças de difícil tratamento, como as doenças inflamatórias pulmonares que são uma importante fonte de complicações em pacientes com doenças crônicas ou hospitalizados (FREIRE, VAN DYKE, 2013; MOWERY *et al.*, 2020; SILVEYRA *et al.*, 2021). Por isso, nesta revisão, foram condensadas as informações mais recentes sobre o efeito das cumarinas no modelo murino de LPA, um modelo reconhecido de uma doença pulmonar inflamatória crítica.

Inicialmente, todos os manuscritos selecionados nesta revisão mostraram que as cumarinas têm importante inibição na formação de edema pulmonar e no influxo de leucócitos para o tecido inflamado, que são pontos-chave no desenvolvimento de qualquer condição inflamatória, incluindo a LPA (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Todos os estudos usaram metodologias que demonstraram a eficácia dos compostos em suprimir o extravazamento de fluido vascular para o local da inflamação e a metodologia mais frequente para demonstrar esse efeito foi a relação do peso pulmonar U/S (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). O uso de técnicas histológicas para evidenciar o edema

pulmonar foi menos frequente e geralmente realizado para complementar os resultados da relação do peso U/S dos pulmões (KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; XUAN *et al.*, 2022). Apenas Xuan *et al.* (2022) avaliaram a concentração de proteínas no LBA para corroborar com seus achados (XUAN *et al.*, 2022).

A contagem total de células no LBA foi o resultado mais comum para avaliar o infiltrado leucocitário, pois mais da metade dos artigos aqui revisados utilizaram essa metodologia (CHEN *et al.*, 2015; LIM *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015). Mais uma vez, a histologia pulmonar foi usada para complementar os resultados obtidos na contagem (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; XUAN *et al.*, 2022). Em ambas as técnicas, ficou evidente que a presença de neutrófilos foi reduzida com o uso de compostos cumarínicos. Esse achado destaca o potencial anti-inflamatório dos compostos testados, considerando que o acúmulo de neutrófilos está associado a um maior acometimento do tecido lesionado (BALAMAYOORAN *et al.*, 2009).

Para uma melhor investigação do mecanismo anti-inflamatório, a maioria dos autores avaliou a capacidade dos compostos cumarínicos em inibir a secreção de mediadores pró-inflamatórios, principalmente as concentrações de TNF, IL-1 β e IL-6 (CHEN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Essas três citocinas se destacam por serem importantes moléculas de comunicação entre os diversos tipos de células que participam da resposta inflamatória, fato que corrobora com os achados de todos os manuscritos avaliados (KANY *et al.*, 2019).

Algumas enzimas são produzidas em maior quantidade no processo inflamatório e são importantes marcadores do curso da inflamação. Nesta revisão, foi observado que dois estudos investigaram a intervenção da Isofraxidina e da Pterixina na produção de COX-2 (NIU *et al.*, 2015; XUAN *et al.*, 2022). Ambos os compostos se mostraram eficazes na inibição de sua produção, a qual costuma ser o alvo farmacológico dos anti-inflamatórios não esteroidais utilizados na prática clínica e cujo principal mecanismo é a inibição da síntese de prostaglandinas inflamatórias geradas pela COX-2 (SHEPPE, EDELMANN, 2021).

Esculina, Esculetina, Isofraxidina e Umbeliferona foram avaliados em quatro estudos independentes que mostraram uma diminuição na atividade enzimática da MPO no tecido pulmonar (CHEN *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2015; TIANZHU, SHUMIN, 2015). Esta enzima de grande importância na inflamação é um

marcador da presença de neutrófilos ativados no sítio inflamatório e também um mediador que possibilita a formação de espécies reativas de oxigênio (KOLACZKOWSKA, KUBE, 2013). O potencial antioxidante dos compostos foi avaliado por Khan *et al.* (2019) e Tianzhu e Shumin (2015), esses autores demonstraram a capacidade de Anomalina e Esculina de aumentar a concentração de marcadores antioxidantes e possivelmente reduzir os efeitos do estresse oxidativo na peroxidação lipídica devido à diminuição da concentração de MDA (KHAN *et al.*, 2019; TIANZHU, SHUMIN, 2015).

A maioria dos estudos apresentou sugestões de mecanismos de ação dos compostos cumarínicos principalmente relacionados às vias de sinalização celular. O fator de transcrição NF- κ B parece ser o maior alvo dos estudos revisados (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2016; TIANZHU, SHUMIN, 2015; XUAN *et al.*, 2022), dada a sua estreita relação com o processo inflamatório, na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (ROBERTI, CHAFFEY, GREAVES, 2022). A fosforilação diminuída da subunidade funcional do NF- κ B, p65-fosforilada e do inibidor citosólico I κ B- α parecem ser os mecanismos propostos pelos autores nesta via de sinalização. Isso porque o alvo da ação do LPS é principalmente o mecanismo primário da via canônica de ativação do NF- κ B, a qual consiste na inativação do I κ B- α por meio da sua fosforilação, com as quinases IKK α ou IKK β , resultando na sua degradação citosólica por ubiquitinação, esse processo libera o dímero de transcrição gênica do NF- κ B, composto principalmente pelas proteínas p65/p50 (LIU *et al.*, 2017). A presença da subunidade p65 na forma fosforilada parece ter relação direta com a expressão de genes envolvidos com a síntese de mediadores inflamatórios (GIRIDHARAN, SRINIVASAN, 2018). Além disso, a família de proteínas da via MAPK (p38, ERK e JNK), associada à ativação de NF- κ B, foi trazida por dois autores para fortalecer a evidência da eficácia inibitória de Esculetina e Pterixina (LEE *et al.*, 2020; XUAN *et al.*, 2022).

O LPS foi o agente flogístico utilizado em todos os protocolos experimentais dos artigos revisados. A ligação entre LPS e TLR-4 é o principal componente do gatilho inflamatório em modelos experimentais utilizando essa endotoxina bacteriana. A ativação de TLR-4 está associada às vias de sinalização celular que resultam na produção de mediadores inflamatórios (WANG, QUINN, 2010). Estudos publicados por Luo *et al.* (2016) e Tianzhu e Shumin (2015) mostraram a capacidade da Umbeliferona e da Esculina em reduzir a expressão do TLR-4 (LUO *et al.*, 2016;

TIANZHU, SHUMIN, 2015). Da mesma forma, ambos os estudos também mostraram uma diminuição na expressão das proteínas Myd88 e IRAK1, que estão diretamente ligadas ao mecanismo de desencadeamento da inflamação via ativação do TLR-4 (CIESIELSKA *et al.*, 2021). Esta via de sinalização explica a relação direta do LPS na via de sinalização celular do NF- κ B, uma vez que este processo resulta na ativação da IKKs responsáveis pela fosforilação e degradação do inibidor citosólico (I κ B) do dímero p65/p50, promovendo a sua translocação ao núcleo da célula onde se liga a genes específicos para a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios (PRESCOTT, MITCHELL, COOK, 2021).

Além do que já foi descrito, outros possíveis mecanismos foram propostos com menor frequência e envolviam a inibição da via RhoA/ROCK, propostos por Chen *et al.* (2015) que associaram esse achado a uma menor ativação do NF- κ B nos pulmões de camundongos inflamados por LPS. O estudo de Xuan *et al.* (2022) avaliou a influência da Pterixina na via do inflamassoma NLRP3, que corresponde a um complexo formado pelas proteínas NLRP3, ASC e caspase 1. O efeito inibitório relatado pelos autores baseia-se na redução da produção de IL-1 β e parece estar associado à inibição da via do inflamassoma NLRP3, uma vez que esta via está relacionada à maturação da pró-IL-1 β em sua forma ativa. Outro mecanismo de intervenção dos compostos cumarínicos foi proposto por Luo *et al.* (2016) que atribuíram à Umbeliferona um efeito protetor nas células pulmonares inflamadas por LPS. Segundo estes autores, o efeito ocorreu devido à menor expressão das proteínas caspase 3 e caspase 9, que são ativadas na via pró-apoptótica regulada pela proteína BAX, cuja expressão também foi afetada.

Por fim, a maioria dos artigos apresentou moderado risco de viés, pois todos os estudos apresentaram falta de clareza na descrição dos métodos de randomização dos animais e cegamento dos investigadores durante a realização dos experimentos. Ambas as falhas são fatores críticos que afetam a qualidade desses estudos, pois são fontes de resultados superestimados e comprometem a confiabilidade dos desfechos obtidos (BELLO *et al.*, 2014; HIRST *et al.*, 2014).

13 CONCLUSÃO

Com base em todos os achados apresentados pelos manuscritos avaliados, parece claro que as cumarinas têm efeitos anti-inflamatórios quando usadas no modelo de LPA. No entanto, todos os manuscritos apresentaram risco de viés moderado ou alto. Fato que compromete categoricamente esta afirmação e nos leva a sugerir que informações importantes sobre os experimentos *in vivo*, principalmente sobre como os grupos experimentais que foram randomizados e o cegamento dos investigadores, devem ser mais bem descritos pelos autores antes de submeter os manuscritos à publicação.

REFERÊNCIAS

ASHBAUGH, D.G. *et al.* Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, London, v.2, p. 319–323, 1967.

BAHADORAN, Z. *et al.* Importance of systematic reviews and meta-analyses of animal studies: challenges for animal-to-human translation. **American Association for Laboratory Animal Science**, Memphis, v. 59, n.5, p. 469-477, 2020.

BALAMAYOORAN, G. *et al.* Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 43, p.5–16, 2010.

BANAVASI, H. *et al.* Management of ARDS - what works and what does not. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 362, n. 1, p. 13-23, 2021.

BELLANI, G. *et al.* Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. **Jama**, Chicago, v. 315, n. 8, p.788-800, 2016.

BELLO, S. *et al.* Lack of blinding of outcome assessors in animal model experiments implies risk of observer bias. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 67, n.9, p. 973–983, 2014.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. Paris: Lavoisier, 1999.

BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute lung injury: A clinical and molecular review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v.140, p. 345-50, 2016.

CANTO, G. L.; REUS, J. C. Mãos à Obra. *In*: CANTO, G. L. **Revisões sistemáticas da literatura: Guia prático**. Curitiba: Brazil Publishing, 2020. p. 32-33.

CHABOT *et al.* Reactive oxygen species in acute lung injury. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 11, p.745–757, 1998.

CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review of Respiratory Medicine**, London, v. 4, n.6, p. 773-83, 2010.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, Albany, v. 9, n.6, p.7204-7218, 2018.

CHEN, T. *et al.* Effects of esculetin on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via regulation of RhoA/Rho Kinase/NF- κ B pathways in vivo and *in vitro*. **Free Radical Research**, Yverdon, v.49, n. 12, p. 1459-1468, 2015.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS induced proinflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 78, n.4, p. 1233-1261, 2021.

COCHET, F.; PERRI, F. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) signalling. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, 2318, 2017.

COSTA, M. *et al.* Biological importance of structurally diversified chromenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 123, p. 487-507, 2016.

DE LA TORRE UGARTE GUANILO, M. C.; TAKAHASHI, R. F.; BERTOLOZZI, M R. Revisão sistemática: noções gerais. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 45, n.5, p.1260-1266, 2011.

DENG, D. *et al.* Synthesis and discovery of new compounds bearing coumarin scaffold for the treatment of pulmonary fibrosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 185, 111790, 2019.

DOMSCHEIT, H. *et al.* Molecular dynamics of lipopolysaccharide-induced lung injury in rodents. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 11, p.36, 2020.

DOSTER, R. S. *et al.* Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. **Journal of Innate Immunity**, Basel, v. 10, n. 1, p. 3-13, 2018.

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment. **JAMA**, Chicago, v. 319, p. 698-710, 2018.

FEINSTEIN, A. R. **Clinical judgement**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1967.

FERDOUS, F. *et al.* Pneumonia mortality and healthcare utilization in young children in rural Bangladesh: a prospective verbal autopsy study. **Tropical Medicine and Health**, Nagasaki, v. 46, p.17, 2018.

FIORETTO, J. R.; CARVALHO, W. B. Temporal evolution of acute respiratory distress syndrome definitions. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v.89, p.523-530, 2013.

FREIRE, M. O.; DYKE, T. E. V. Natural resolution of Inflammation. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 63, n. 1, p. 149-164, 2013.

GARG, S. S. *et al.* Pharmacological and therapeutic applications of esculetin. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n. 20, p.12643, 2022.

GIRIDHARAN, S.; SRINIVASAN, M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. **Journal of Inflammation Research**, Auckland, v. 11, p. 407-419, 2018.

GOPALAKRISHNAN, S.; GANESHKUMAR, P. Systematic reviews and meta-analysis: understanding the best evidence in primary healthcare. **Journal of Family Medicine and Primary Care**. v. 2, n.1, p. 9-14, 2013.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 17, p. 293-307, 2011.

HATO, T.; DAGHER, P.C. How the innate immune system senses trouble and causes trouble. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 10, p 1459-1469, 2015.

HE, Y. Q. *et al.* Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms. **Pharmacological Research**, London, v. 163, p. 105224, 2021.

HIGGINS, J. P. T. *et al.* **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions**. Chichester: John Wiley & Sons, 2019.

HIRST, J. A. *et al.* The need for randomization in animal trials: an overview of systematic reviews. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 6, e98856, 2014.

HOOIJMANS, C. R. *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, London, v.14, p.43, 2014.

HU, X. L. *et al.* Recent developments of coumarin hybrids as anti-fungal agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v.17, p. 3219-3231, 2017.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n.23, p. 6008, 2019.

KENNEDY, R. O.; LACY, A. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.10, p. 3797-3811, 2004.

KHAN, A. *et al.* Anomalin attenuates LPS-induced acute lungs injury through inhibition of AP-1 signaling. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v. 73, p. 451-460, 2019.

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

KORNEEV, K. V. Mouse models of sepsis and septic shock. **Molecular Biology**, Moskva. v. 53, n. 5, p. 799-814, 2019.

KOSTOVA, I. *et al.* Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, Tel Aviv, v. 2006, p. 1-9, 2006.

KURRA, N. *et al.* Opportunistic infections in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Cereus**, Palo Alto, v. 14, n.3, e23687, 2022.

LACY, A.; O'KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 10, n. 30, p. 3797–3811, 2004.

LEE, H. C. *et al.* Esculetin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via modulation of the AKT/ERK/NF- κ B and ROR γ t/IL-17 pathways. **Inflammation**, New York, v. 43, n. 3, p. 962-974, 2020.

LI, Z. P. *et al.* Effect of compound IMMLG5521, a novel coumarin derivative, on carrageenan-induced pleurisy in rats. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 661, p. 118-23, 2011.

LI, W.; DING, C.; YIN, S. Severe pneumonia in the elderly: a multivariate analysis of risk factors. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, Madison, v. 8, n. 8, p. 12463–12475, 2015.

LIM, H. J., *et al.* Inhibition of airway inflammation by the roots of *Angelica decursiva* and its constituent, columbianadin. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 155, n.2, p. 1353-1361, 2014.

LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 2, p.17023, 2017.

LUO, F., *et al.* Umbelliferone attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury linked with regulation of TLRs–MyD88 and RIP140/NF- κ B signaling pathways. **RSC. Advances**, Cambridge, v. 6, 97503, 2016.

MATOS, M. J. *et al.* Coumarins — An important class of phytochemicals. *In*: RAO, A. V.; RAO, L. G. **Phytochemicals - Isolation, characterisation and role in human health**, London: IntechOpen, 2015.

MATUTE-BELLO, G. *et al.* An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 44, p. 725-38, 2011.

MEDINA, E. U.; PAILAQUILÉN, R. M. B. A revisão sistemática e a sua relação com a prática baseada na evidência em saúde. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 4, p. 08 telas, 2010.

MENEZES, J.; DIEDERICH, M. Translational role of natural coumarins and their derivatives as anticancer agents. **Future Medicinal Chemistry**, London, v. 11, n. 9, p. 1057-1082, 2019.

METHLEY, A. M. *et al.* PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. **BMC Health Services Research**, London, v. 14, p.579, 2014.

MOHER, D. *et al.* Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 6, n. 7, e1000097, 2009.

MOKRA, D. Acute lung injury - from pathophysiology to treatment. **Physiological Research**, Praha, v. 69, S353-S366, 2020.

MOKRA, D.; KOSUTOVA P. Biomarkers in acute lung injury. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, Amsterdam, v. 209, p. 52-58, 2015.

MOWERY, N.T.; TERZIAN, W. T. H.; NELSON, A.C. Acute lung injury. **Current Problems in Surgery**, Chicago, v. 57, n.5, 100777, 2020.

NARASARAJU, T. *et al.* Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.179, n.1, p.199-210, 2011.

NIU, X. *et al.* Protective effects of Isofraxidin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v. 24, n.2, p. 432-439, 2015.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. **Immunity**, Cambridge, v. 41, n.5, p. 694-707, 2014.

ONG, E. B. *et al.* Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 vpr inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 16, p. 14049-14056, 2011.

OUZZANI, M. *et al.* Rayyan — a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, London, v.5, n.1, p. 210, 2016.

OWENS, J. K. Systematic reviews: Brief overview of methods, limitations, and resources. **Nurse Author & Editor**, Lakewood, v. 31, p. 69-72, 2021.

PAGE, M. J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ Leader**, London, v. 372, n. 71, 2021.

PRESCOTT, J. A.; MITCHELL, J. P.; COOK, S. J. Inhibitory feedback control of NF- κ B signalling in health and disease. **The Biochemical Journal**, London, v. 478, n. 13. p. 2619-2664, 2021.

NASCIMENTO, M. V. P. S. N. *et al.* Inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, London, v. 38, n. 5, p.344–352, 2016.

REEN, F. J. *et al.* Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 102, n.5, p. 2063-2073, 2018.

ROBERTI, A.; CHAFFEY, L. E.; GREAVES, D. R. NF- κ B signaling and inflammation—drug repurposing to treat inflammatory disorders? **Biology (Basel)**, Basel, v. 11, n. 3, p. 72, 2022.

ROSTOM, B. *et al.* Coumarins derivatives and inflammation: Review of their effects on the inflammatory signaling pathways. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 922, 174867, 2022.

SAHU, D. *et al.* Antioxidant activity and protective effect of suramin against oxidative stress in collagen induced arthritis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 101, p. 125–139, 2017.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 23, 6492346. 2021.

SHEPPE, A. E. F.; EDELMANN, M. J. Roles of Eicosanoids in Regulating Inflammation and Neutrophil Migration as an Innate Host Response to Bacterial Infections. **Infection and immunity**, Bethesda, v. 89, n.8, e0009521, 2021.

SILVEYRA, P.; FUENTES, N.; BAUZA, D. R. Sex and gender differences in lung disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.1304, p. 227–258, 2021.

SLOGGETT, A. T. **Memorandum on Gas Poisoning in Warfare with notes on its Pathology and Treatment**. Montana: Kessinger Publishing, 1918.

SPEAR, M. Wound exudate--the good, the bad, and the ugly. **Plastic Surgical Nursing**, Waterloo, v. 32, n.2, p. 77-79, 2012.

SRIKRISHNA, D.; GODUGU, C.; DUBEY, P. K. A. Review on Pharmacological Properties of Coumarins. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v.18, p.113-141, 2018.

STEFANACHI, A.; LEONETTI, F.; PISANI, L.; CATTO, M.; CAROTTI, A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 2, p.250, 2018.

TIANZHU, Z.; SHUMIN, W. Esculin Inhibits the Inflammation of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice Via Regulation of TLR/NF- κ B Pathways. **Inflammation**, New York, v. 38, n. 4, p. 1529-1536, 2015.

TIMSON, D. J. Dicoumarol: A Drug which Hits at Least Two Very Different Targets in Vitamin K Metabolism. **Current Drug Targets Inflammation and Allergy**, Hilversum, v.18, n.5, p. 500-510, 2017.

URBANIAK G. C.; PLOUS S. **Research Randomizer Versão 4.0**. [Computer software]. [2013]. Disponível em: <http://www.randomizer.org/>. Acesso em: 1 julho de 2022.

VILLAR J. *et al.* Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. **Lancet Respiratory Medicine**, Kidlington, v. 8, p. 267-276, 2020.

WANG, N. *et al.* Imperatorin ameliorates mast cell-mediated allergic airway inflammation by inhibiting MRGPRX2 and CamKII/ERK signaling pathway. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 184, 114401, 2021.

WANG, X.; QUINN, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 49, n.2, p. 97-107, 2010.

WEI, D. *et al.* Effects of angelicin on ovalbumin (ova)-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. **Inflammation**, New York, v. 39, n. 6, p. 1876–1882, 2016.

WILLIAMS, A. E. *et al.* Evidence for chemokine synergy during neutrophil migration in ARDS. **Thorax**, London, v. 72, p. 66-73, 2017.

XUAN, T. Q. *et al.* Protective effect of Pteryxin on LPS-induced acute lung injury via modulating MAPK/NF- κ B pathway and NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 286, 114924, 2022.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO REFERENTE A ESTA TESE

Received: 15 March 2022 | Accepted: 10 June 2022

DOI: 10.1111/fcp.12809

ORIGINAL ARTICLE



Evidence that the anti-inflammatory effect of 4-aryl-4*H*-chromenes is linked to macrophage repolarization

Gustavo O. dos Reis¹ | Julia S. da Rosa¹ | Taina L. Lubschinski¹ |
Erlon F. Martin¹ | Louis P. Sandjo³ | Eduardo M. Dalmarco^{1,2}

¹Postgraduation Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

²Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Eduardo M. Dalmarco, Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, University Campus, Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.
Email: eduardo.dalmarco@ufsc.br; edalmarco@gmail.com

Abstract

The inflammatory response is a common feature of many pathological conditions, and there is urgent necessity for new substances that minimize the harmful effects of inflammation. Chromenes represent a class of compounds with multiple pharmacological actions that have already been described and may be potential candidates for studies of therapeutic action. This study aimed to test novel 4-aryl-4*H*-chromene-derived molecules in an in vitro model of inflammation using lipopolysaccharide (LPS)-induced Raw 264.7 cells. Seven compounds derived from 4-aryl-4*H*-chromene were tested on Raw 264.7 cells to evaluate their cytotoxic effects. Next, the effect of the selected compounds on the pro-inflammatory mediators (tumor necrosis factor- α [TNF- α], monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1], interleukin [IL]-6) and on the anti-inflammatory mediators (IL-10 and IL-13) was analyzed, and finally, the effect of the compounds on macrophage apoptosis and expression of surface receptors (toll-like receptor 4 [TLR-4] and mannose) was evaluated. The results of this study demonstrated that changes in the molecular structure of 4-aryl-4*H*-chromene altered its cytotoxic profile. Therefore, derivatives that showed safe results were selected for further analyses (named compounds: 4–6). In these experiments, the compounds were able to decrease nitric oxide (NO) levels and production of MCP-1, IL-6, IL-10, and IL-13. Furthermore, these derivatives were effective in reducing macrophage apoptosis and the expression of surface receptors, as TLR-4/CD284. Moreover, compounds 5 and 6 also were effective in increasing mannose receptor (CD206) expression. The results indicate, for the first time to our knowledge, that the anti-inflammatory effect produced by chromenes is linked to macrophage repolarization (M1 to M2).

KEYWORDS

chromenes, inflammation, LPS, macrophage polarization, Raw 264.7

List of Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; CBA, cytometric bead array; CD206, mannose receptor; DEXA, dexamethasone; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; IL, interleukins; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NO, nitric oxide; PE, phycoerythrin; PTX, paclitaxel; SEM, standard error of the mean; TLR-4/CD284, toll-like receptor-4; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; UFSC, Federal University of Santa Catarina.

1 | INTRODUCTION

The inflammatory process is the basis of many pathophysiological processes in which cell activation and the release of inflammatory mediators play a pivotal role [1]. Uncontrolled inflammation, particularly the production and release of pro-inflammatory mediators, seems

© 2022 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Fundam Clin Pharmacol. 2022;1–11.

wileyonlinelibrary.com/journal/fcp

1

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO

Inflammation Research
<https://doi.org/10.1007/s00011-022-01584-0>

Inflammation Research

REVIEW



Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis

Bruno Matheus Facchin¹ · Gustavo Oliveira dos Reis¹ · Guilherme Nicácio Vieira¹ · Eduarda Talita Bramorski Mohr¹ · Júlia Salvan da Rosa^{1,2} · Iara Fabricia Kretzer² · Izabel Galhardo Demarchi^{1,2,3} · Eduardo Monguilhott Dalmarco^{1,2}

Received: 8 November 2021 / Revised: 21 March 2022 / Accepted: 5 May 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Introduction Several experimental models have been designed to promote the development of new anti-inflammatory drugs. The *in vitro* model using RAW 264.7 cells has been widely used. However, there is still no consensus on which inflammatory mediators should initially be measured to screen for possible anti-inflammatory effects. To determine the rationality of measuring inflammatory mediators together with NO, such as the levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukins (IL) 1 β and 6, we carried out this systematic review (SR) and meta-analysis (MA).

Methodology We conducted this SR and MA in accordance with the Preferred Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analysis and the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention. This review was registered in the Open Science Framework (<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8C3HT>).

Results LPS-induced cells produced high NO levels compared to non-LPS induced, and this production was not related to cell density. TNF- α , IL-1 β , and IL-6, also showed high levels after cells had been stimulated with LPS. Though with some restrictions, all studies were reliable, as the risk of bias was detected in the test compounds and systems.

Conclusion Measurement of NO levels may be sufficient to screen for possible anti-inflammatory action in the context of LPS-induced RAW 264.7 cells.

Keywords Lipopolysaccharide · *In vitro* techniques · Macrophages · RAW 264.7 cells · Nitric oxide · Tumor necrosis factor- α · Interleukin-1 beta · Interleukin-6

Introduction

Inflammation is a physiological process that occurs in response to an infectious agent or tissue injury, to restore the homeostasis of the affected tissue. This response involves a cascade of events characterized by vascular and cellular

involvement, with activation of modulation pathways that depend on the type of harmful agent and the stimulus generated [1–4]. If successful, the inflammatory response tends to progress to the post-resolution phase, through a coordinated series of molecular and cellular events that restore tissue structure, organ function, and ‘adapted homeostasis’ [5]. However, uncontrolled inflammation can lead to tissue damage that gives rise to chronic inflammatory diseases, such as Alzheimer’s disease, atherosclerosis, cardiovascular diseases, and cancer [6, 7].

In this context, there is a continuous search for new anti-inflammatory drugs, and many experimental models have been developed and extensively used over the years [8, 9]. *In vitro* models represent the beginning of this complex development, and millions of potential compounds are proposed each year. Thus, fast and reliable screening is required for the next level of pharmacological research, optimizing the initial screening and reducing the use of animals [10]. For this purpose, *in vitro* models using RAW

Responsible Editor: John Di Battista.

✉ Eduardo Monguilhott Dalmarco
 edalmarco@gmail.com; eduardo.dalmarco@ufsc.br

¹ Programa de Pós-Graduação Em Farmácia (PPGFar), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

² Departamento de Análises Clínicas–CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário–Trindade, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação Em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brazil

Published online: 25 May 2022

Springer

ANEXO B – EMAIL DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Manuscript submitted to Mediators of Inflammation

De: Mediators of Inflammation (imrana.parveen@hindawi.com)

Para: gustavodos.reis@yahoo.com.br

Data: quinta-feira, 8 de dezembro de 2022 13:55 GMT-3



Hindawi

Dear Dr. Oliveira dos Reis,

The manuscript titled "Anti-inflammatory effects of Coumarins on a murine model of Acute Lung Injury (ALI): a Systematic Review" has been submitted to Mediators of Inflammation by Eduardo Dalmarco.

To confirm the submission and view the status of the manuscript, please verify your details by clicking the link below.

Thank you for submitting your work to Mediators of Inflammation.

[CREATE ACCOUNT](#)

Kind regards,
Imrana Parveen
Mediators of Inflammation