



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

BRUNO MATHEUS DE CAMPOS FACCHIN

Estudo do efeito anti-inflamatório de derivados da 1,4-dihidropiridina e a importância das determinações de mediadores pró-inflamatórios na fase de triagem de compostos com possível atividade anti-inflamatória *in vitro*: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise

FLORIANÓPOLIS

2023

Bruno Matheus de Campos Facchin

Estudo do efeito anti-inflamatório de derivados da 1,4-dihidropiridina e a importância das determinações de mediadores pró-inflamatórios na fase de triagem de compostos com possível atividade anti-inflamatória *in vitro*: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise

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
Coorientadora: Prof^a, Dr^a. Izabel Galhardo Demarchi

Florianópolis

2023

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

Facchin, Bruno Matheus de Campos

Estudo do efeito anti-inflamatório de derivados da 1,4 dihidropiridina e a importância das determinações de mediadores pró-inflamatórios na fase de triagem de compostos com possível atividade anti-inflamatória in vitro: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise / Bruno Matheus de Campos Facchin ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, coorientador, Izabel Galhardo Demarchi, 2023.
143 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Inflamação. 3. Óxido Nítrico. 4. 1,4 Dihidropiridina. 5. Células RAW264.7. I. Dalmarco, Eduardo Monguilhott . II. Demarchi, Izabel Galhardo . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. IV. Título.

BRUNO MATHEUS DE CAMPOS FACCHIN

Estudo do efeito anti-inflamatório de derivados da 1,4-dihidropiridina e a importância das determinações de mediadores pró-inflamatórios na fase de triagem de compostos com possível anti-inflamatória *in vitro*: Uma Revisão Sistemática e Meta-análise

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 08 de maio de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Dr^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a Beatriz Garcia Mendes
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a Ana Paula Dalmagro
Universidade de Blumenau

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 pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico esse trabalho à minha família que sempre foi minha fortaleza e base para que eu pudesse trilhar meus caminhos com tranquilidade e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família, que em todos os momentos de dificuldade estiveram ao meu lado, dando suporte, atenção, carinho e amor. Sou e serei eternamente grato por cada sacrifício dispendido por vocês para que eu pudesse estudar e ter acesso àquilo que infelizmente milhares de jovens não tem. Melhor seria o mundo se cada pessoa tivesse a sorte de ter a um núcleo familiar tão bom quanto o que eu tenho. Amo vocês.

Deixo aqui também um agradecimento especial ao meu orientador e amigo Eduardo Monguilhott Dalmarco, que acompanha meus passos e crescimento profissional a quase 15 anos. Obrigado pela confiança depositada em mim para estar sob sua orientação na elaboração desse trabalho e por todos os conhecimentos compartilhados durante todos esses anos.

Não menos importante, minha eterna gratidão a todos meus colegas de laboratório Tainá Lubschinski Gustavo dos Reis, Eduarda Mohr, Paula Fragoso, Bianca Beck, Eduarda Fratoni, Laís Theindl, Mariano Felisberto, Julia Salvan, Guilherme Nicácio, Prof^a Ziliani Buss, Prof^a Iara Kretzer e em especial à minha coorientadora, Prof^a Izabel Galhardo Demarchi pela paciência e dedicação em um dos períodos mais difíceis e conturbados da construção do meu conhecimento durante meu doutoramento.

Agradeço ao professor Louis Pergaud Sandjo e ao seu aluno de Doutorado Luiz Pollo do Programa de Pós-graduação em Farmácia (PGFar) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pela colaboração e fornecimento dos compostos e insumos necessários para a realização dos experimentos.

Aos meus amigos, que durante todo esse processo foram meu refúgio e doses de alegria para que a caminhada não fosse tão árdua e ao menos parecesse mais leve. É muito importante saber que posso contar com pessoas tão especiais na minha vida.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, que sempre foram solícitos e forneceram suporte nos momentos em que precisei, serei sempre grato a vocês.

Agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), entidades essenciais para o desenvolvimento da pesquisa e ciência no Brasil.

Por último, agradecer à UFSC, universidade pública, gratuita, inclusiva e de qualidade. Minha casa a praticamente 20 anos, responsável por minha formação desde o

ensino médio até os dias de hoje, onde tenho o prazer de ser servidor público. Local que me transformou no cidadão que sou hoje. Cidadão esse que espera retribuir à sociedade, com trabalho e dedicação, tudo aquilo que obteve em todos esses anos de casa.

Além de um ato de conhecimento, a educação é também um ato político. É por isso que não há pedagogia neutra. (Freire, 1986)

RESUMO

Introdução: O processo inflamatório representa a base fisiopatológica de inúmeras patologias. Trata-se de um mecanismo de defesa do organismo contra agentes infecciosos ou injúria tecidual. Entender os mecanismos subjacentes à inflamação e desenvolver novos agentes terapêuticos que reduzam os danos inflamatórios ainda continuam sendo os pilares de estudos farmacológicos. Derivados dihidropiridínicos apresentam inúmeras atividades biológicas já descritas, podendo ser bons candidatos a novas terapias anti-inflamatórias. **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo investigar a racionalidade da dosagem de diferentes mediadores inflamatórios no modelo de inflamação *in vitro* utilizando células RAW 264.7, através de uma revisão sistemática (RS) e meta-análise, bem como investigar o efeito anti-inflamatório de derivados da 1,4-Dihidropiridina (1,4-DHP) em modelos *in vitro*, utilizando células RAW264.7 induzidas por LPS e *in vivo*, através do modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) em camundongos. **Metodologia:** Realizamos uma RS com meta-análise com base na declaração PRISMA, selecionando a partir de busca em bases de dados, trabalhos científicos específicos que tivessem realizado a dosagem de mediadores inflamatórios utilizando o modelo de células RAW 264.7 induzidas com LPS. Posteriormente os dados foram extraídos e a meta-análise realizada, com o intuito de verificar qual a eficácia da dosagem do TNF- α , IL-6 e IL-1 β como biomarcadores inflamatórios, comparados ao Óxido Nítrico (NO). Na segunda fase do trabalho, quinze compostos derivados da 1,4-DHP foram testados em células RAW 264.7 para avaliar seus efeitos citotóxicos. Posteriormente, foram avaliados quanto seus efeitos sobre fagocitose de macrófagos e na produção de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Por último, verificamos esses efeitos *in vivo*, utilizando o de LPA em camundongos, dosando mediadores inflamatórios (citocinas, NO e Mieloperoxidase (MPO)) e a migração leucocitária e exsudação. **Resultados:** Na primeira etapa da revisão, um total de 17 estudos foram incluídos. Células induzidas por LPS produziram altos níveis de NO em comparação com células não induzidas e essa produção não apresentou relação com a densidade celular utilizada. TNF- α , IL-1 β e IL-6 também apresentaram níveis elevados após as células terem sido estimuladas com LPS; no entanto, parte desses efeitos parecem ter relação com a densidade celular. Todos os estudos foram confiáveis com restrições, tendo em vista que foram identificados problemas quanto a qualidade metodológica e qualidade de relatórios. Em seguida, na realização de experimentos, verificou-se que um dos compostos derivados da 1,4-DHP, foi efetivo em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e do mediador NO em células RAW264.7 induzidas por LPS, além disso, o composto em questão aumentou a fagocitose das células e da produção da citocina IL-10 no sobrenadante das culturas celulares, indicando uma possível polarização de macrófagos para o fenótipo M2. Por fim, no modelo de LPA, o composto selecionado inibiu a migração leucocitária e a exsudação no LBA, além de reduzir a atividade da enzima MPO e a produção de NO e citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α . **Conclusão:** Dosar os níveis de NO é uma opção suficiente e racional para iniciar os ensaios de triagem anti-inflamatória de compostos utilizando células RAW 264.7 como plataforma experimental. Além disso, o composto selecionado derivado da 1,4-DHP apresentou importante atividade anti-inflamatória, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumentando a atividade fagocítica de macrófagos e secreção de IL-10. Esses achados indicam a que a atividade anti-inflamatória do composto deve-se a capacidade de reverter a polarização dos macrófagos para um perfil anti-inflamatório (M2).

Palavras-chave: Inflamação, Revisão sistemática, Óxido Nítrico, RAW 264.7, citocinas, 1,4-Dihidropiridinas.

ABSTRACT

Introduction: Although essential in the innate immune response, the inflammatory process represents the pathophysiological basis of numerous pathologies. It is a defense mechanism of the body against infectious agents or tissue injury. Understanding the mechanisms underlying inflammation and developing new therapeutic agents that reduce inflammatory damage still remain the mainstays of pharmacological studies. Dihydropyridine derivatives have numerous biological activities already described, and may be good candidates for new anti-inflammatory therapies. **Objectives:** This study aimed to investigate the rationality of the dosage of different inflammatory mediators in the in vitro inflammation model using RAW 264.7 cells, through a systematic review (RS) and meta-analysis, as well as to investigate the anti-inflammatory effect of 1,4-Dihydropyridine (1,4-DHP) in in vitro models, using RAW264.7 cells induced by LPS and in vivo, through the model of acute lung injury in mice. **Methodology:** In the first stage of this work, we carried out an SR with meta-analysis based on the PRISMA statement, selecting from a search in databases, specific scientific works that had performed the measurement of inflammatory mediators (NO, TNF-, IL-6 and IL-1 β) using the LPS-induced RAW 264.7 cell model. Subsequently, the data were extracted and the meta-analysis performed, with the aim of verifying the effectiveness of the dosage of TNF- α , IL-6 and IL-1 β as inflammatory biomarkers, compared to Nitric Oxide (NO). In the second phase of the work, fifteen compounds derived from 1,4-DHP were tested in RAW 264.7 cells to evaluate their cytotoxic effects. Subsequently, their effects on macrophage phagocytosis and on the production of pro-inflammatory (NO, TNF- α , INF- γ , IL-12, MCP-1, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10). Finally, we verified whether these effects would be repeated in vivo, using the acute lung injury (ALI) model in mice, measuring inflammatory mediators (cytokines, NO and Myeloperoxidase (MPO)) and leukocyte migration and exudation. **Results:** In the first step of the review, a total of 17 studies were included. As expected, cells induced by LPS produced higher levels of NO compared to non-induced cells and this production was not related to the cell density used. TNF- α , IL-1 β and IL-6 also showed elevated levels after cells were stimulated with LPS; however, part of these effects seem to be related to cell density. All studies were reliable, although with some restrictions, considering that problems were identified regarding methodological quality and quality of reports for specific items, mainly related to compounds and test systems. Then, in carrying out experiments, it was found that one of the compounds derived from 1,4-DHP was effective in inhibiting the production of cytokines IL-12, MCP-1, IFN- γ and IL-6 and the mediator NO in RAW264.7 cells induced by LPS, moreover, the compound in question increased the phagocytosis of the cells and caused an increase in the production of the cytokine IL-10 in the supernatant of cell cultures, indicating a possible polarization of macrophages from the M1 phenotype to M2. Finally, in the ALI model, the selected compound was effective in inhibiting leukocyte migration and exudation in BALF, reducing the activity of the MPO enzyme and the production of NO and pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . **Conclusion:** Measuring NO levels is a sufficient and rational option to start anti-inflammatory compound screening assays using RAW 264.7 cells as an experimental platform. Furthermore, the selected compound derived from 1,4-DHP showed important anti-inflammatory activity, reducing the production of pro-inflammatory mediators and increasing the phagocytic activity of macrophages and IL-10 secretion. These findings indicate that the anti-inflammatory activity of the compound is due to the ability to reverse the polarization of macrophages to an anti-inflammatory profile (M2).

Keywords: Inflammation, Systematic review, Nitric oxide, RAW 264.7, cytokines, 1,4-Dihydropyridines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ativação da via de sinalização intracelular pela ativação do receptor TLR4 por LPS.	30
Figura 2 - Evolução do fenótipo de macrófagos durante o processo de resolução ..	40
Figura 3 - Processo de busca e seleção dos estudos com base na declaração PRISMA.....	64
Figura 4 - Forest plot das diferenças médias de produção de NO e citocinas estudadas entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos	70
Figura 5 - Forest plot das diferenças médias na produção de NO entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular	71
Figura 6 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular	72
Figura 7 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de níveis de produção de Óxido Nítrico.....	73
Figura 8 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-6 entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular	73
Figura 9 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-6 entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de níveis de produção de Óxido Nítrico.....	74
Figura 10 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular	75
Figura 11 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de níveis de produção de Óxido Nítrico.....	76
Figura 12 - Gráficos de funil da relação da diferença média (MD) entre o grupo de intervenção (LPS) e o grupo de controle, e erro padrão [SE (MD)] de cada grupo de dados dos estudos incluídos nesta meta-análise	77

Figura 13 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Qualidade de relatórios	78
Figura 14 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Qualidade metodológica.	79
Figura 15 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Relevância dos estudos	80
Figura 16 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Confiabilidade dos estudos incluídos.....	80
Figura 17 - Estrutura química da 1,4-Dihidropiridina	89
Figura 18 - Estruturas químicas de derivados de 1,4-diidropiridina (1-15)	94
Figura 19 - Efeito dos derivados da 1,4-diidropiridina na produção de IL-6 em células RAW 264.7 induzidas por LPS	104
Figura 20 - Efeito do composto 4 na produção de NOx em células RAW264.7 induzidas por LPS.	106
Figura 21 - Curva sigmóide mostrando a resposta normalizada do composto selecionado sobre os níveis de metabólitos do NO em macrófagos RAW 264.7	106
Figura 22 - Efeito do composto 4 no aumento da atividade fagocítica de células RAW 264.7 induzidas por LPS	107
Figura 23 - Efeito do composto 4 sobre a atividade de MPO lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	108
Figura 24 - Efeito do composto 4 sobre as concentrações de NOx no lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS	109
Figura 25 - Efeito do composto 4 nas concentrações de IL-6 no lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS.....	111
Figura 26 - Efeito do composto 4 nas concentrações de TNF- α no lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS	112
Figura 27 - Resumo dos efeitos anti-inflamatórios do composto 4 em experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estratégia PICOS.....	56
Tabela 2 - Estratégias de busca nas bases de dados	59
Tabela 3 - Síntese de resultados dos trabalhos incluídos.....	66
Tabela 4 - Valores CC ₁₀ de derivados da 1,4-DHP em macrófagos RAW 264.7....	103
Tabela 5 - Efeito do composto 4 nos níveis de citocinas.	110
Tabela 6 - Efeito do composto 4 na migração de Leucócitos, Neutrófilos e concentração de proteínas (exsudação).....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,4-DHP	1,4-Dihidropirina
ANOVA	Análise de variância
Arg-1	Arginase-1
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> (Citometria por matrizes esféricas)
CO ₂	Gás carbônico
COVID-19	<i>Coronavirus disease 19</i> (Doença do coronavírus de 2019)
COX-2	Cicloxygenase 2
CSF	Fatores estimuladores de colônias
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DCs	Células dendríticas
DEXA	Dexametasona
DHP	Dihidropiridina
DMEM	Meio Eagle Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HIF	Fator induzido por hipóxia
IFN- γ	Interferon gama
I κ B	Inibidor do fator nuclear kappa B
IKK	Quinase do Inibidor do fator nuclear kappa B
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10

IL-1 β	Interleucina-1- <i>beta</i>
IL-6R	Receptor de Interleucina-6
iNOS	Óxido Nítrico Síntase induzível
IRAK	Quinases associadas ao receptor de Interleucina-1
IRF1	Fator de resposta de interferon 1
JAK1	Proteínas transdutoras de sinal intracelular Janus Quinase
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
Mesh	<i>Medical Subject Headings</i>
MLKL	Proteína do tipo domínio quinase de linhagem mista
MMP	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NLRP3	Proteína 3 contendo domínio NOD, LRR e pirina
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
OCDE	Organização para cooperação e desenvolvimento econômica
OSF	<i>Open Science Framework</i>
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PBS	Solução de tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
PGFar	Programa de Pós-graduação em Farmácia

PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses</i>
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PTX	Paclitaxel
RNA	Ácido ribonucleico
SARS-CoV-2	Corona vírus 2 causador da síndrome respiratória aguda grave
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
STAT	transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TAK1	Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
Th1	Células CD4+ T-helper 1
Th2	Células CD4+ T-helper 2
Th17	Células CD4+ T-helper 17
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TLR-3	Receptor do tipo <i>toll 3</i>
TLR-4	Receptor do tipo <i>toll 4</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de TNF
TRAF6	Fator associado ao receptor TNF 6
TRIF/TICAM	Proteína indutora de IFN- β contendo domínio TIR
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
Ym1	Proteína semelhante à quitinase 3

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
	CAPÍTULO 1 - BIOMARCADORES DE TRIAGEM INFLAMATÓRIA NO MODELO <i>IN VITRO</i> UTILIZANDO CÉLULAS RAW 264.7 INDUZIDAS POR LPS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE.....	27
2	DESENVOLVIMENTO	28
2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1.1	PROCESSO INFLAMATÓRIO	28
2.1.2	ÓXIDO NÍTRICO.....	42
2.1.3	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO: METODOLOGIA DE GRIESS.....	47
2.1.4	CÉLULAS RAW 264.7: CULTURA E CARACTERÍSTICAS.....	48
2.1.5	REVISÕES SISTEMÁTICAS E META-ANÁLISE	50
3	OBJETIVOS.....	55
3.1	OBJETIVO GERAL	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	57
4.2	SELEÇÃO DE ESTUDOS	57
4.2.1	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	58
4.2.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	60
4.3	EXTRAÇÃO DE DADOS.....	60
4.4	META-ANÁLISE.....	61
4.5	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE	62
5	RESULTADOS	63
5.1	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	77
6	DISCUSSÃO.....	81
7	CONCLUSÃO.....	83
	CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADOS DA 1,4-DIHDROPIRIDINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>.....	86
8	DESENVOLVIMENTO	87
8.1	MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO AGUDA PULMONAR	87

8.2	DIHIDROPIRIDINAS	89
9	OBJETIVOS	93
9.1	OBJETIVOS GERAIS	93
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	93
9.2.1	<i>IN VITRO</i>	93
9.2.2	<i>IN VIVO</i> (MODELO DE LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS).....	93
10	MATERIAIS E MÉTODOS	94
10.1	<i>IN VITRO</i>	94
10.1.1	OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS.....	94
10.1.2	CULTURA CELULAR.....	95
10.1.3	VIABILIDADE CELULAR COM AZUL DE TRIPAN.....	95
10.1.4	ENSAIO DE CITOTOXIDADE.....	95
10.1.5	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-6.....	96
10.1.6	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO	97
10.1.7	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS.....	98
10.1.8	DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DOS MACRÓFAGOS RAW 264.7 (ENSAIO DO VERMELHO NEUTRO)	99
10.2	<i>IN VIVO</i>	100
10.2.1	ANIMAIS	100
10.2.2	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO.....	100
10.2.3	MODELO DE LESÃO AGUDA PULMONAR (ALI) INDUZIDA POR LPS..	100
10.2.4	QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO.....	101
10.2.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO (NO _x).....	101
10.2.6	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS (TNF- α e IL-6)	102
10.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	102
11	RESULTADOS	102
11.1	RESULTADOS <i>IN VITRO</i>	102
11.1.1	CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DA 1,4-DHP	102
11.1.2	EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-6	103

11.1.3	EFEITO DO COMPOSTO SELECIONADO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO E DETERMINAÇÃO DE IC ₅₀	104
11.1.4	EFEITO DO COMPOSTO SELECIONADO NOS NÍVEIS DAS CITOCINAS	105
11.1.5	EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS RAW 264.7	107
11.2	RESULTADOS <i>IN VIVO</i>	107
11.2.1	EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO NA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS.....	107
11.2.2	EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO LBA DE CAMUNDONGOS COM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS.....	108
11.2.3	EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO LBA DE CAMUNDONGOS COM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS.....	111
12	DISCUSSÃO	112
13	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICE A – Artigo publicado referente ao capítulo 1 dessa tese.....	137
	APÊNDICE B – Artigo submetido para publicação referente ao capítulo 2 dessa tese.....	138
	APÊNDICE C – Material suplementar.....	139

1 INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica continua a ser um dos setores econômicos mais poderosos do mundo, sendo altamente dependente de inovação tecnológica e científica, acarretando assim, em altos valores de investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D), com o intuito de potencializar cada vez mais a busca por novas moléculas com potencial terapêutico (SCHUHMACHER et al., 2021). Esses investimentos em pesquisa e desenvolvimento farmacêuticos levam à descoberta de novos candidatos a medicamentos, à progressão de candidatos promissores por meio de desenvolvimento pré-clínico e clínico e, para medicamentos finalmente aprovados, estudos pós-aprovação (RENNANE; BAKER; MULCAHY, 2021).

O setor tem tido grande importância no aumento do bem estar das pessoas nas últimas décadas, com aumento da expectativa de vida global em até 20 anos nas últimas cinco décadas. Além disso, os medicamentos possuem papel indispensável para o bom funcionamento dos sistemas de saúde, pois reduzem custos com outros setores, como a hospitalização de médio e longo prazo (DESTRO; BAROLO, 2022)

Entre 1999 e 2018, os investimentos em P&D das 14 principais empresas farmacêuticas aumentaram de forma constante, indo de US\$ 49,2 bilhões em 1999 para US\$ 87,1 bilhões em 2018. Ainda, se levarmos em consideração os valores em termos relativos, as receitas com P&D dessas empresas saltaram de 14% em 1999 para 19% em 2018 (SCHUHMACHER et al., 2021). Apenas em 2017, o setor farmacêutico gerou por meios diretos e indiretos, cerca de 2,2% do produto interno bruto mundial, que correspondeu à época aproximadamente US\$ 1.838 Bilhão. Sem contar a força de trabalho empregada pela indústria farmacêutica, que em escala global inclui aproximadamente 5,5 milhões de pessoas, podendo chegar a quase 75 milhões de pessoas se levarmos em consideração a cadeia de suprimentos e outros setores (WINFOR, 2020; DESTRO; BAROLO, 2022).

No Brasil, apesar das dificuldades inerentes a países emergentes, o setor farmacêutico também apresenta lugar de destaque no âmbito econômico. De 2000 até 2005, o número de vendas provenientes de empresas nacionais subiu de 28,2% para 40,6% e em 2007 por exemplo, a venda de medicamentos no país atingiu a cifra de R\$ 30 bilhões (SANTOS; PINHO, 2012). Além disso, apesar da importância do setor no Brasil, a indústria farmacêutica brasileira ainda apresenta uma dependência do mercado externo, com um investimento ainda baixo no setor de desenvolvimento

tecnológico com fabricação de produtos de baixo valor agregado, sem contar o fato de que o desenvolvimento científico e tecnológico, bem como a produção de conhecimento, ainda está fortemente atrelado às universidades públicas e aos programas de Pós-Graduação *Stricto sensu* (OLIVEIRA, 2015; PARANHOS et al., 2018).

No âmbito da pesquisa a respeito de novas entidades farmacêuticas, o tratamento de doenças inflamatórias continua a ser um desafio, uma vez que as vias de inflamação sistêmica têm sido reconhecidas como componentes essenciais na patogênese de diferentes doenças multifatoriais que abrangem distúrbios reumáticos inflamatórios crônicos, bem como uma ampla variedade de condições, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, câncer, obesidade, asma e envelhecimento. Sendo que, apesar de vários dos acometimentos citados não serem desencadeados por algum processo infeccioso ou lesão, que são classicamente reconhecidas como os principais ativadores do processo inflamatório, em todos os casos, o desequilíbrio homeostático e o mau funcionamento tecidual parecem ser os principais motivos de perpetuação dessas condições crônicas (MEDZHITOV, 2008; SCRIVO et al., 2011).

A inflamação é um processo extremamente complexo composto por fases diferentes e complementares que envolvem mediadores inflamatórios, citocinas inflamatórias e vias de sinalização intracelulares. Respostas inflamatórias moderadas são razoáveis para ajudar a remover materiais estranhos ou agentes prejudiciais e promover o reparo tecidual, enquanto uma resposta inflamatória excessiva ou desregulada pode resultar na dificuldade de estabelecer um processo de restauração na saúde do tecido (DAI et al., 2018; CHOI; LEE; YU, 2023).

Os eventos moleculares e celulares da resposta inflamatória são bem conhecidos e caracterizados por aumento do fluxo sanguíneo, dilatação capilar, infiltração de leucócitos e produção de mediadores químicos. A inflamação aguda é caracterizada principalmente pela presença de neutrófilos, que são, junto com os macrófagos, os leucócitos de primeira linha de defesa do organismo e capazes de migrar rapidamente para o local da lesão ou infecção. Apesar de os neutrófilos serem essenciais para a eliminação adequada do agente lesivo, o influxo exagerado dessas células pode ser mais deletério do que a própria infecção ou lesão e tem sido considerado um mau marcador da homeostase tecidual. Dessa forma, uma das características histológicas chave na resolução da inflamação aguda é a depleção de

neutrófilos do sítio inflamatório. Isso é alcançado por meio de processos coordenados e programados que ocorrem de maneira sobreposta e são altamente regulados em vários níveis (HEADLAND; NORLING, 2015; SUGIMOTO et al., 2016).

Monócitos/macrófagos, em conjunto com os neutrófilos, também são extremamente importantes nas fases iniciais do processo inflamatório. Além de terem função de fagocitose de agentes estranhos, os macrófagos estão envolvidos em todos os estágios do reparo tecidual. Essas células são extremamente heterogêneas e se diferenciam em uma infinidade de subtipos, dependendo do ambiente tecidual local. Ou seja, seu fenótipo e a função são moldados pela produção local de fatores de crescimento e citocinas, e esses macrófagos “polarizados” secretam vários fatores que podem ajudar a promover ou resolver o processo inflamatório (SMIGIEL; PARKS, 2018).

Esses estímulos alteram a expressão gênica para produzir “macrófagos ativados”, que se moldam para produzir respostas eficazes em eliminar a causa de seu influxo e restaurar a homeostase. Os estados de ativação ou polarização dos macrófagos foram classificados como ativação “clássica” e “alternativa” ou M1 e M2, respectivamente (HUME, 2015). Essa nomenclatura de polarização de macrófagos M1/M2 foi introduzido em 2000, baseado no fato de que macrófagos de camundongos C57BL/6J serem mais facilmente ativados para produzir altos níveis de Óxido nítrico (NO) (polarização M1) do que macrófagos de camundongos Balb/c (polarização M2)(ORECCHIONI et al., 2019). A metabolização diferente de arginina após indução por Lipopolissacarídeo (LPS) provoca diferentes fenótipos de macrófagos em camundongos C57BL/6J e Balb/c comparativamente. Macrófagos peritoneais C57BL/6J induzem Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) resultando em aumento nas produções de NO e uma resposta de células T-helper 1 (Th1)(Células T CD4+), enquanto camundongos Balb/c aumentam a expressão de arginase e consequente aumento da metabolização de arginina para produzir ornitina e uma resposta T-helper 2 (Th2). Em analogia a células Th1 e Th2, esses macrófagos foram então denominados M1 e M2 (MILLS et al., 2017). Posteriormente, outros trabalhos mostraram que os macrófagos M1 apresentam um fenótipo pró-inflamatório com habilidades intrínsecas de eliminar patógenos e os macrófagos M2 de promoverem a proliferação celular e o reparo tecidual (ITALIANI; BORASCHI, 2014; MILLS et al., 2017; SMIGIEL; PARKS, 2018).

A partir dessas informações, acrescido ao fato de que a grande maioria dos tratamentos usuais para diversas condições inflamatórias, seja com uso de anti-inflamatórios não esteroidais ou corticoides, não tem gerado resultados esperados, percebe-se um aumento do interesse de grupos de pesquisa em melhorar o entendimento de como a mudança da polarização de macrófagos pode auxiliar no tratamento de diversas patologias inflamatórias que os tratamentos atuais não conseguem suprir (KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2022).

Já é notório que compostos heterocíclicos são a base da química medicinal e que é muito difícil imaginar qualquer estrutura química de compostos ou drogas com atividade biológica que não estejam inseridos nesse grupo. Dentre a ampla gama de anéis heterocíclicos em que pesquisadores se baseiam para o desenvolvimento de moléculas farmacologicamente importantes, a 1,4-dihidropiridina (1,4-DHP) tem desempenhado um papel importante na química sintética, medicinal e bioorgânica (SHARMA; SINGH, 2017; MISHRA; BAJPAI; RAI, 2019). Já existem diversas atividades biológicas relatadas para compostos derivados dihidropiridínicos como vasodilatadora, broncodilatadora, hepatoprotetora, antiaterosclerose, antidiabético, antitumoral, antioxidante, anticonvulsivante e anti-inflamatório (SAFAK; SIMSEK, 2006; EDRAKI et al., 2009; KOMODA; INOUE; NODE, 2010).

Devido à grande utilização de células RAW 264.7 como plataforma experimental de pesquisa com compostos com possível atividade anti-inflamatória e a necessidade constante de procura de novas terapias anti-inflamatórias, com menos efeitos colaterais e mais eficácia terapêutica, nosso trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro, levando em consideração as questões relacionadas às funções de macrófagos e o destaque que essas células tem recebido na busca de tratamentos alternativos aos acometimentos inflamatórios, foi pensado visando a elaboração de uma revisão sistemática para entender o comportamento de macrófagos na produção de mediadores inflamatórios específicos e conseqüentemente propor uma padronização para pesquisadores que trabalhem com a plataforma experimental *in vitro* utilizando células RAW 264.7. Já o segundo capítulo, será dedicado a apresentação dos resultados de um trabalho experimental, que buscou avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos químicos inéditos derivados da 1,4-DHP, utilizando tanto modelos *in vitro* quanto *in vivo*.

CAPÍTULO 1

BIOMARCADORES DE TRIAGEM INFLAMATÓRIA NO MODELO *IN VITRO* UTILIZANDO CÉLULAS RAW 264.7 INDUZIDAS POR LPS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é visto como pilar ou fator determinante para o desenvolvimento de diversas patologias, incluindo câncer, aterosclerose, doenças autoimunes e infecções. Além disso, a inflamação é um dos principais contribuintes para o aparecimento de condições relacionadas ao avanço da idade (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011; NETEA et al., 2017).

Os eventos que envolvem o sistema imunológico e vascular, culminam em uma série de etapas que desencadeiam essa resposta fisiológica, que tem como objetivo defender o hospedeiro contra agentes lesivos. Esta resposta envolve diversas vias de ativação e modulação celular que dependem do tipo de agente lesivo e do estímulo gerado (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006). Há mais de 2000 anos, as características do processo inflamatório já haviam sido descritas por Celsus, e são até hoje conhecidas como os sinais cardinais clássicos da inflamação: dor, calor, rubor, edema e perda de função (FULLERTON; GILROY, 2016).

A inflamação é um processo que está inserido diretamente no sistema imune e a imunidade é ainda didaticamente dividida em imunidade inata e adaptativa. O processo inicial ou agudo da inflamação é parte da imunidade inata, que se inicia por algumas células do sistema imune e persiste por um curto período de tempo. Uma vez que o processo inflamatório persiste e não ocorre de maneira adequada, sem o devido interrompimento e início do processo de reparo, a lesão tecidual se instaura, com a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, ativação celular e posterior perda da funcionalidade do tecido afetado (DORWARD et al., 2012). As células imunes inatas compreendem os macrófagos, fibroblastos, mastócitos e células dendríticas, bem como leucócitos circulantes, incluindo monócitos e neutrófilos. Essas células reconhecem patógenos ou danos celulares a partir de receptores conhecidos como Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que estão expressos principalmente na superfície da membrana celular, mas também se encontram no espaço intracelular, contribuindo pro processamento de agentes lesivos após fagocitose (NEWTON; DIXIT, 2012).

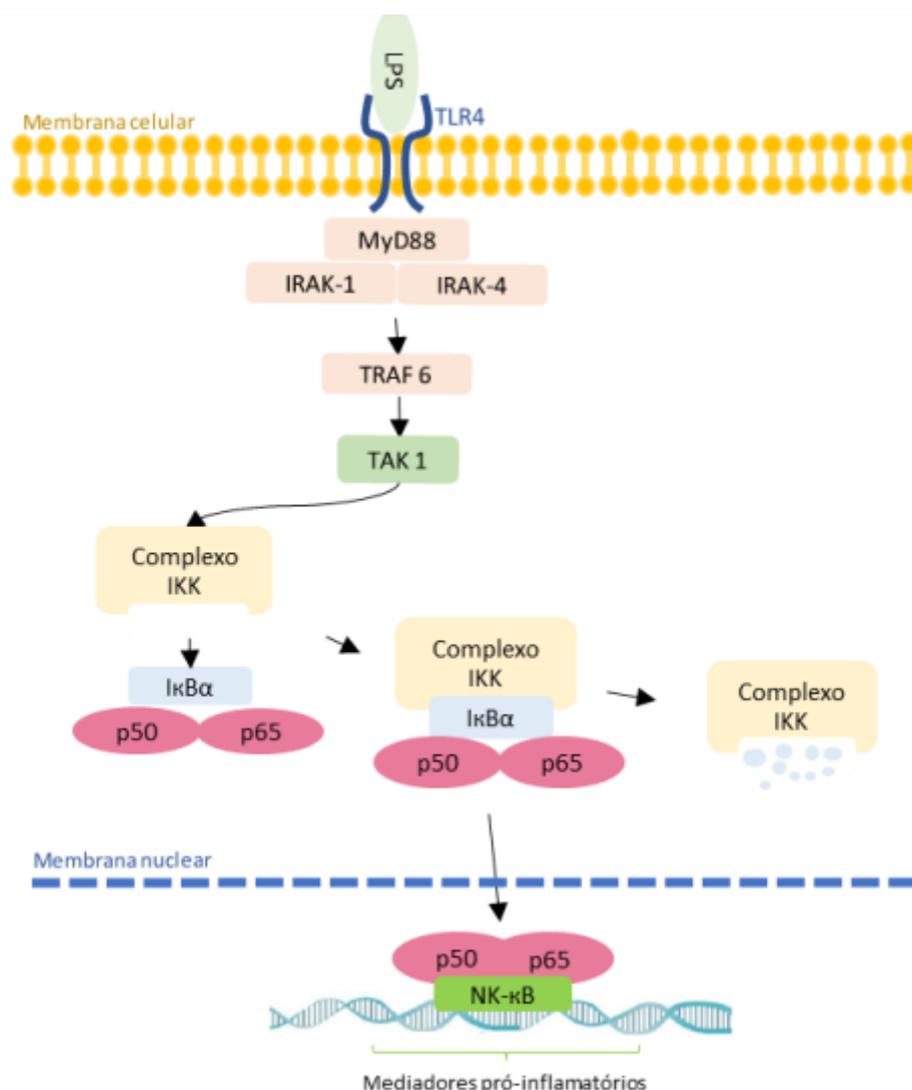
Os PRRs detectam Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a Padrões moleculares associados a dano (DAMPs), provenientes de células lesadas no local da inflamação. Uma vez que esses receptores reconhecem esses padrões, eles passam por um processo de oligomerização, que por fim leva à ativação de grandes complexos proteicos de múltiplas subunidades que iniciam cascatas de sinalização intracelulares, culminando assim na liberação de mediadores inflamatórios que aumentam o recrutamento de células do sistema imune para o sítio inflamatório (NEWTON; DIXIT, 2012).

Os receptores do tipo Toll-like (TLRs) são os principais PRRs nas células do sistema imune e a estimulação do sistema imune inato por meio desses receptores induz a produção de citocinas inflamatórias, ativando assim a resposta adaptativa mais específica e efetiva. TLRs são proteínas transmembrana tipo I, contendo repetições ricas em leucina, que tem por função reconhecer PAMPs e virais no ambiente extracelular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11) e intracelular em endolisossomos (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10)(BOWIE; O'NEILL, 2000; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; BORASCHI et al., 2011). O primeiro membro identificado da família dos receptores do tipo toll-like foi o TLR4. Embora diversos TLRs tenham sido descritos, ainda assim o TLR4 ainda é o mais extensivamente estudado. Ele está bastante expresso em células imunes residentes dos tecidos em condições fisiológicas e serve como o principal receptor responsável por mediar respostas imunes aos efeitos do lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um dos componentes principais da membrana externa de bactérias gram-negativas, contribuindo para a integridade estrutural dessas bactérias e protege sua membrana de certos tipos de ataques químicos. Esse componente tem sido implicado na patogênese diversas doenças de caráter infeccioso, uma vez que essa endotoxina provoca uma resposta celular por parte de macrófagos, monócitos, células dendríticas e linfócitos B, promovendo uma resposta inflamatória com febre, vasodilatação com a produção de óxido nítrico (NO) e secreção de eicosanoides (BOWIE; O'NEILL, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; VALLÉS et al., 2023).

Com exceção do TLR3, todos os outros TLRs tem a capacidade de ativar proteínas intracelulares adaptadoras como o fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) ou a Proteína indutora de IFN- β contendo domínio TIR (TRIF, também conhecido como TICAM1). Por esse motivo as vias de sinalização dos TLRs podem ser amplamente classificadas como via dependente de MyD88, que conduz a indução

de citocinas inflamatórias, ou via dependente de TRIF ou independente de MyD88, que é responsável pela indução de interferon tipo I, bem como a produção de citocinas inflamatórias (Figura 1)(VALLÉS et al., 2023).

Figura 1 - Ativação da via de sinalização intracelular pela ativação do receptor TLR4 por LPS.



O processo de ativação do NF-κB se inicia a partir da ligação do LPS ao receptor TLR4. Essa ligação faz com que um complexo de proteínas acessórias, formadas por MyD88 e IRAK1 e 4 se forme. Posteriormente ocorre uma cascata de fosforilação em cadeia, levando a ativação de TRAF6 e TAK1. TAK1 por sua vez ativa o complexo de IKK que é responsável pela fosforilação e consequente degradação proteossômica de IκBα. Isso permite que o NF-κB migre até o núcleo da célula e exerça seus efeitos transcripcionais, aumentando a expressão de proteínas e mediadores inflamatórios. IKK: proteína inibitória kappa B quinase; IκBα: subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF-κB; LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo Toll-like 4. Fonte: Adaptado de Yang et al. (2016).

O TLR4 é o único TLR que usa todos os adaptadores responsáveis pela ativação das duas vias, dependentes de MyD88 e TRIF. TLR4 inicialmente recruta TIRAP na membrana plasmática e, subsequentemente, facilita o recrutamento de MyD88 para desencadear a ativação inicial das vias do Fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs). A via dependente de MyD88 requer a formação de um midossoma, a partir da ancoragem das proteínas MyD88, e as quinases associadas ao receptor de interleucina-1 (IRAK2 e IRAK4). A formação desse midossomo resulta na ativação de um complexo formado pelo Fator Associado ao Receptor TNF 6 (TRAF6) e Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador β (TAK1). A ativação de TAK1 após a formação desse complexo, ocasiona a fosforilação das Proteínas inibitórias *kappa* B quinase (IKKs) e a consequente degradação proteossômica da Subunidade inibitória do NF- κ B alpha (I κ B α) permitindo a translocação nuclear de NF- κ B, que inicia a síntese transcricional de citocinas pró-inflamatórias seguida pela ativação de NLRP3 e liberação de IL-1 β e IL-18. Da mesma forma que o NF- κ B, a ativação de TAK1 ocasiona cascatas de fosforilação em cadeia das MAPKs, que em último caso leva a transcrição de genes inflamatórios a nível nuclear, aumentando a produção e secreção de mediadores inflamatórios por células do sistema imune (NEWTON; DIXIT, 2012; VALLÉS et al., 2023).

Existem diferentes mediadores inflamatórios produzidos por células do sistema imune após a ativação dessas vias de sinalização intracelulares. Dentre eles, podemos destacar as citocinas. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular (<140kDa) e incluem interleucinas, quimiocinas, interferons, fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento, entre outros. Na maioria das vezes são produzidas e secretadas não só pela ligação de receptores de superfície após o reconhecimento de PAMPs ou DAMPs em células inflamatórias, mas também a partir da sinalização de outras citocinas, que podem ativar diferentes receptores de membrana responsáveis pelo reconhecimento das mesmas (XU; LI; ZHONG, 2015).

Podemos classificar as citocinas com base no tipo ou natureza da resposta imune (adaptativa, pró-inflamatória, anti-inflamatória), com citocinas individuais também desempenhando papéis específicos dependentes do tipo e localização da célula alvo. As principais citocinas pró-inflamatórias incluem interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de necrose tumoral (TNF- α) (TURNER et al., 2014).

A família das citocinas de IL-1 compreende um grupo de moléculas de proteínas que desempenham papel fundamental na indução da resposta imune inata, que como citado anteriormente, é a primeira linha de defesa do organismo frente a infecções causadas por patógenos e agentes lesivos. Dentre as citocinas dessa família, a IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória que foi originalmente identificada como um pirogênio endógeno. Além disso, descobriu-se que a mesma tem efeito estimulador nas células T CD4+ e promove sua diferenciação em linhagens de células T auxiliares, como as células Th1 e Th17 (BORASCHI et al., 2011). As células Th1 produzem altos níveis de IFN- γ e são responsáveis pela ativação dos fagócitos e produção de anticorpos opsonizantes e fixadores do complemento, desempenhando assim um papel importante na proteção contra patógenos intracelulares. Já as células Th17, que são um subconjunto de células T helper identificadas mais recentemente e são caracterizadas pela produção de citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-8, IL-21 e IL-22. Essas células desempenham um papel crítico no recrutamento, ativação e migração de granulócitos do tipo neutrófilos, tanto diretamente, através da produção de IL-8, quanto indiretamente, induzindo, via IL-17, a produção de fatores estimuladores de colônias (CSF) e CXCL8 em células residentes nos tecidos. Devido à sua capacidade única de recrutar neutrófilos, a principal função protetora das células Th17 parece ser a eliminação de patógenos extracelulares, incluindo fungos (SANTARLASCI et al., 2013).

Além da estimulação de células T CD4+, a IL-1 β é uma citocina essencial em infecções por estreptococo do grupo A e B por ser um quimioatraente de neutrófilos. Na resposta antibacteriana, os neutrófilos matam os patógenos por degranulação, fagocitose, produção de citocinas e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (HSU et al., 2011; BIONDO et al., 2014; LAROCK; NIZET, 2015).

Vários tipos celulares são eficazes em sintetizar IL-1 β , incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, hepatócitos e macrófagos teciduais. A produção dessa citocina ocorre principalmente em resposta a moléculas microbianas, mas assim como muitas citocinas pró-inflamatórias, sua produção pode ser induzida inclusive por ação autocrina e parácrina. Essa ação ocorre a partir da ativação de receptores de membrana específicos para IL-1 β (IL-1R), que em suma, leva à ativação da proteína adaptadora MyD88, com cascatas de fosforilação em cadeia e ativação de fatores de transcrição, com indução e secreção de diversos mediadores inflamatórios (AREND; PALMER; GABAY, 2008; TURNER et al., 2014).

O TNF- α é uma citocina membro da superfamília TNF com características pró-inflamatórias, que foi inicialmente identificada como um indutor de morte celular em células tumorais. Macrófagos são os principais produtores dessa citocina, mas outras células, como linfócitos B e T, células natural killer, mastócitos, neutrófilos, fibroblastos e osteoclastos também podem produzir e secretar TNF- α . O TNF- α é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrana (26 kDa), onde permanece até ser clivada por uma metaloproteinase ligada à membrana conhecida como enzima conversora de TNF para produzir a forma solúvel de TNF- α (17 kDa) e após clivagem, o TNF- α é liberado no plasma sanguíneo (GALEONE; GRANO; BRUNETTI, 2023).

O TNF- α , tanto solúvel quanto o ligado a membrana celular, pode se ligar a dois receptores específicos, TNFR1 e TNFR2. O TNFR1 é expresso em todos os tecidos, enquanto o TNFR2 é expresso principalmente em células imunes, células endoteliais e células neuronais. Esses receptores apresentam estruturas intracelulares diferentes, cada qual se ligando diretamente a proteínas adaptadoras específicas, que desencadeiam respostas intracelulares. A ativação do TNFR1 leva à ativação de 4 diferentes complexos proteicos de sinalização intracelular, sendo que o complexo I é principal responsável pela instauração das respostas referentes ao desenvolvimento do processo inflamatório, degeneração tecidual, proliferação celular bem como a defesa do hospedeiro contra patógenos. Esse complexo envolve o domínio de morte (TRADD) intracelular, que resulta na ativação de NF- κ B e MAPK (HSU; XIONG; GOEDDEL, 1995; GALEONE; GRANO; BRUNETTI, 2023).

O complexo IIa, IIb e IIc compreendem outros complexos proteicos que levam a respostas celulares específicas. A formação dos complexos IIa e IIb por exemplo, são conhecidos como apoptossomos, que desencadeiam a ativação de caspase-8 que leva ao processo de apoptose. Já o complexo IIc, é conhecido como necrossoma, que ativa a proteína do tipo domínio quinase de linhagem mista (MLKL), que conduz o processo inflamatório e ativa processos de necroptose (HOLBROOK et al., 2019). Essas diferentes formas de ativação celular pelo TNF- α é o que faz dessa citocina um importante agente pleiotrópico no processo inflamatório, exercendo papel central no sistema imune inato, incluindo indução da produção de citocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão, além de exercer efeitos citolíticos ou citostáticos contra células tumorais, efeitos antivirais e imunorreguladores (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; GUPTA, 2002; GALEONE; GRANO; BRUNETTI, 2023).

Além da IL-1 β e TNF- α , a IL-6 também desempenha um papel crucial no desenvolvimento das respostas inflamatórias. Assim como o TNF- α , a IL-6 é uma citocina pleiotrópica e pode ter funções pró e anti-inflamatórias. As adaptações do organismo, como resultado ao treinamento intenso durante exercícios físicos é resultado da atividade anti-inflamatória e metabólica dessa citocina. Entretanto, a IL-6 pode exercer efeitos pró-inflamatórios quando não há controle sobre sua produção, portanto, um aumento na liberação dessa citocina pode ser fator crucial para o desenvolvimento de doenças de caráter inflamatório (MULLER et al., 2020). A IL-6 é uma citocina de quatro hélices, composta por 184 aminoácidos e produzida principalmente em processos inflamatórios agudos e crônicos, tendo seus efeitos expressos através da ligação ao receptor de Interleucina-6 (IL-6R). No processo inflamatório, exerce funções de diferenciação específica de células T CD4+ virgens na aquisição da resposta imune, atua em células B, células T, hepatócitos, células progenitoras hematopoiéticas e células do sistema nervoso central. Além disso, a IL-6 também é necessária para a geração de células Th17 (COPERCHINI; CHIOVATO; ROTONDI, 2021).

A IL-6 é produzida principalmente por macrófagos e células T ativadas após a infecção por bactérias ou vírus, ou ainda, após a indução dessas células por outros sinais gerados por células do sistema imune. Após ativar seus receptores, a subunidade gp130 do receptor de IL-6 desencadeia a transdução de sinal intracelular, promovendo um aumento da expressão gênica. Apesar da subunidade gp130 não possuir um domínio quinase, as proteínas membros da família Janus quinase (Jak1, Jak2 e Tyk2) estão associados à gp130 de maneira constitutiva. Esses complexos proteicos fosforilam quinases e ativam fatores transcricionais citoplasmáticos como STAT1 e STAT3. O STAT3, após fosforilação, migra até o núcleo da célula e promove a ativação de genes-alvo, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator induzido por hipóxia (HIF)-1 α (KIMURA; KISHIMOTO, 2010; MULLER et al., 2020).

Mais recentemente, foi identificado que o corona vírus 2 causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) interage com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) para entrar no espaço intracelular. O reconhecimento da ECA2 pelo vírus e sua infusão na membrana é mediada pela catepsina L. A IL-6 induz a atividade da ECA2 e da catepsina L, facilitando assim a entrada celular do vírus. Em somatório, a IL-6 pode amplificar essa facilitação do

processo de infecção pelo SARS-CoV-2 uma vez que a ativação de STAT3 leva a indução indireta de NF- κ B, que por sua vez aumenta ainda mais a produção e consequente secreção de IL-6 (MULLER et al., 2020).

Outras citocinas, como Interleucina-12 (IL-12), Interferon-*gama* (IFN- γ) e Proteína quimioatrante de monócitos 1 (MCP-1), também estão envolvidas com o desenvolvimento e progressão do processo inflamatório, cada qual com suas características intrínsecas.

A IL-12 trata-se de uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células dendríticas (DCs) e fagócitos ativados. Tem a capacidade de ativar células Natural Killer (NK), induzir a produção de IFN- γ e é fundamental no processo de transição da imunidade inata para a adaptativa. Além de ativar células NK, a IL-12 pode atuar em outros tipos de linfócitos, principalmente células T CD8+, promovendo sua proliferação e aumentando o poder citotóxico na defesa do hospedeiro. Já na sua ação sobre linfócitos T CD4+, a IL-12 é considerada um potente agente anticancerígeno por aumentar a diferenciação de células Th1, promovendo citólise de células tumorais. Além disso, essa citocina também estimula células Dendríticas, promovendo um aumento no processo de apresentação de antígenos (STERN et al., 1990; ASTE-AMEZAGA et al., 1994; NGUYEN; GUZ-MONTGOMERY; SAHA, 2020; JIA et al., 2022).

O IFN- γ é citocina solúvel, secretada por diferentes células do sistema imune e também por células epiteliais de mucosas. Seus efeitos se dão a partir da ativação dos receptores de IFN- γ 1 e 2 (IFN- γ R1 e IFN- γ R2), e assim como a IL-6, ativa proteínas transdutoras de sinal intracelular Janus Quinase como JAK1 e TyK2 e consequentemente vias STAT (DING et al., 2022). O dímero STAT1, uma vez fosforilado, se transloca para o núcleo e induz a transcrição dos genes estimulados por interferon (ISGs), incluindo vários outros fatores de transcrição, como o fator de resposta de interferon 1 (IRF1). A transcrição desses genes inflamatórios, leva às ações principais dessa citocina, coordenando diferentes funções celulares, como regulação imune, migração leucocitária, proliferação celular, apoptose, efeitos antimicrobianos, antitumorais e pró-tumorais (SCHRODER et al., 2004; BHAT et al., 2018; DING et al., 2022).

A proteína quimioatrante de monócitos (MCP-1), também conhecida como CCL2, é uma citocina essencial na progressão do processo inflamatório e nas doenças associadas à inflamação. Está envolvida na resposta imune inata, recrutando

monócitos para o local da inflamação, podendo ser produzida e secretada por diferentes tipos celulares como células endoteliais, monócitos ativados, fibroblastos, células musculares lisas vasculares (CMLVs), células epiteliais tubulares renais, astrócitos, micróglia e neurônios. A produção dessa citocina ocorre após a ligação de mediadores inflamatórios à receptores de membrana que levam a ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, como as vias das MAPKs e NF- κ B. São inúmeros mediadores que podem levar ao aumento da expressão de MCP-1, como IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ , fatores de crescimento (fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)), lipopolissacarídeos e espécies reativas de oxigênio (EROs). Após sua secreção, a MCP-1 ativa receptores transmembrana de quimiocina acoplados à proteína G do tipo 2 (CCR2) que levam principalmente à migração de células mieloides e linfoides, como monócitos, linfócitos T de memória e células NK (LIN et al., 2023). Os diversos estímulos inflamatórios podem ativar ainda mais a expressão de CCL2, o que leva a sustentação do processo inflamatório, agravando o recrutamento de células Th17 e a produção de citocinas inflamatórias e outras respostas sucessivas (RANJBAR et al., 2022; LIN et al., 2023).

Diferentes estudos sugerem que a MCP-1 também tem papel fundamental no desenvolvimento de tumores, uma vez que a ligação entre MCP-1 e o receptor CCR2 pode ser estimulado por citocinas como TNF- α provenientes das células tumorais e que essa interação ocasiona um aumento de macrófagos associados a tumor (TAMs), que contribuem para que essas células tumorais escapem do sistema imunológico e possam então induzir o desenvolvimento do tumor (ZHANG et al., 2015). Além disso, devido à característica intrínseca dessa citocina em recrutar leucócitos para os tecidos inflamados, embora os macrófagos alveolares residentes sejam benéficos nos estágios iniciais de doenças infecciosas virais ou bacterianas, os monócitos e macrófagos infiltrados que migram para o tecido após o início do processo inflamatório são essenciais na progressão de doenças infecciosas causadas por vírus respiratórios, como o SARS-CoV-2, secretando excessivamente citocinas e quimiocinas no tecido pulmonar, levando à inflamação grave (NICHOLLS et al., 2003; RANJBAR et al., 2022; LIN et al., 2023).

Em contraste as citocinas já citadas, a Interleucina-10 (IL-10) figura entre os principais mediadores de regulação e supressão da resposta inflamatória. Inicialmente, quando descoberta, a IL-10 foi descrita como um fator inibidor da síntese

de proteínas, uma vez que tinha a capacidade de suprimir e conseqüentemente reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por células Th1. Assim que identificada, imaginava-se que essa citocina era da gama de citocinas produzidas por células Th2 e posteriormente verificou-se que a mesma pode ser produzida também por células Th1, células B, plasmablastos malignos e não malignos, células plasmáticas, células T citotóxicas, células NK, células T reguladoras e células dendríticas (BISWAS; BIEBER; MANZ, 2022).

As citocinas pertencentes a família da IL-10 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B e IL-29), são categorizadas em subgrupos com base em suas semelhanças em relação a estrutura e localização genômica de genes, bem como a forma como se ligam aos receptores. O primeiro grupo inclui apenas a IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória e se liga às subunidades do receptor 1 de IL-10 (IL1-10R1) e IL-10R2. A interação da citocina com seus receptores lava a ativação de vias JAK1 e TyK2, com envolvimento de fatores de transcrição STAT (STAT1, STAT3 e STAT5), principalmente STAT3 (XUAN et al., 2022).

A ativação de STAT3 por si só, não é o suficiente para os efeitos anti-inflamatórios da IL-10. O STAT3 exerce seus efeitos a nível nuclear, envolvendo a transcrição de diversos genes efetores da resposta anti-inflamatória. Subseqüentemente, ocorre uma inibição de genes pró-inflamatórios principalmente a nível transcricional (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013). Dentre esses genes, podemos citar àqueles ativados pela sinalização via TLR4 estimulados após a ação do LPS. Incluídos nessa população de genes alvo da IL-10, podemos citar o TNF- α , IL-6, IL-12 e outros mRNAs de diversas quimiocinas (MURRAY, 2005).

Grande parte da resposta anti-inflamatória que vemos em acometimentos inflamatórios se dão por conta da ação dessa citocina. Apesar disso, por ter efeitos imunossupressores potentes, sua atividade necessita ser rigorosamente controlada. Respostas com produção exacerbada de IL-10, podem levar a efeitos imunossupressores indesejados, com ativação imune exagerada, facilitando o aparecimento de doenças graves, como linfomas associados ao Epstein-barr, crescimento tumoral, Lúpus eritematoso e etc (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013).

O sistema imunológico é um componente crítico dos vários processos envolvidos na lesão e reparo tecidual. Após a lesão tecidual, com a presença de quimiocinas e citocinas inflamatórias, em conjunto à presença de restos celulares,

ocorre o recrutamento de células inflamatórias do sistema imune inato para o local da lesão. Essas células migram pelo endotélio, através da parede vascular para diversos tecidos através da barreira mucosa/epitelial. Dentre as células do sistema imune inato que são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e que dão início ao processo de defesa do organismo frente a agentes microbianos, podemos citar principalmente os neutrófilos e macrófagos (SMIGIEL; PARKS, 2018).

Os neutrófilos são formados na medula óssea a partir de precursores mieloides e são, em humanos, os leucócitos mais abundantes na circulação sanguínea. Eles são críticos no processo inflamatório, uma vez que é o primeiro tipo de célula imune recrutada, através de quimiotaxia, para o sítio inflamatório, permanecendo em maior proporção durante a progressão da resposta inflamatória. Em um estado fisiológico normal, neutrófilos possuem uma meia-vida relativamente curta, mas em processos inflamatórios, neutrófilos ativados adquirem um período de vida consideravelmente maior (ARIES; HENSLEY-MCBAIN, 2023).

Sendo uma das células mais importantes do sistema imune, os neutrófilos defendem o organismo de patógenos diretamente por fagocitose ou ainda pela liberação de enzimas granulares, como a mieloperoxidase (MPO), metaloproteinases (MMP), elastase de neutrófilos e também a partir da produção de EROs. Além disso, neutrófilos conseguem formar redes, denominadas “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NETs), que são capazes de aprisionar e eliminar patógenos com grande eficiência (SHAO; XU; LIN, 2023). Esses NETs são estruturas semelhantes a teias, que são produzidas a partir de fibras de cromatina em conjunto com enzimas antimicrobianas e histonas, que servem como uma armadilha que imobiliza e elimina micro-organismos, limitando a sua propagação e aumento do processo infeccioso. A liberação de NETs por neutrófilos ocorre principalmente por meio de um mecanismo de morte celular denominado NETose, que nada mais é que um mecanismo de morte celular programada. Este processo começa com a ativação de neutrófilos por produtos microbianos, incluindo endotoxinas, com o apoio de plaquetas e citocinas pró-inflamatórias. Várias dessas moléculas se ligam a receptores de neutrófilos (como TLRs e receptores de complemento) podendo ativar neutrófilos a desencadear o processo de NETose.

Embora as respostas inflamatórias geradas pelos neutrófilos sejam de extrema importância no controle de processos infecciosos, uma resposta exacerbada pode causar dano tecidual passivo ou não intencional, devido à liberação de peptídeos

microbianos, enzimas líticas que são originalmente destinadas a degradar a matriz extracelular e também pela produção massiva de EROs. Dessa forma, os neutrófilos podem contribuir pro desenvolvimento de diversas doenças de caráter inflamatório, como a doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, diabetes e doenças cardiovasculares (ARIES; HENSLEY-MCBAIN, 2023).

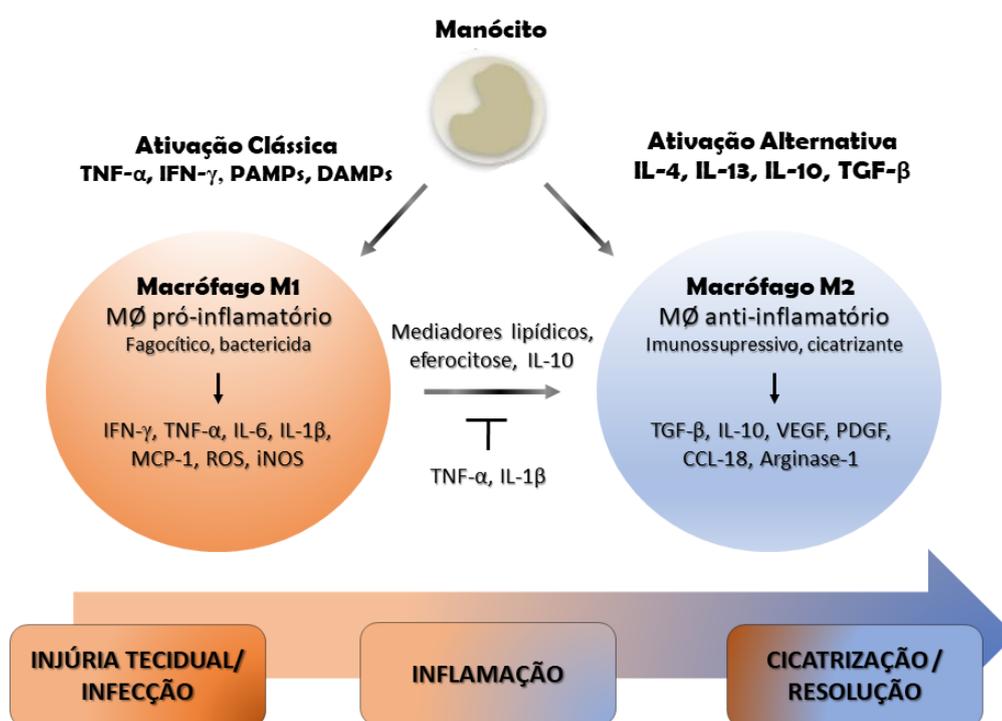
Em conjunto aos neutrófilos, os macrófagos também desempenham papel crucial na resposta inflamatória imune inata. Essas células foram descobertas em 1892 como células que se moviam e tinham a capacidade de englobar microorganismos patogênicos. Essas células são críticas tanto na manutenção da homeostase tecidual quanto na instauração do processo inflamatório, desempenhando funções essenciais específicas do tecido, bem como protegendo o organismo contra infecções (ORECCHIONI et al., 2019; KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2022).

Sua origem tem sido amplamente debatida nos últimos anos. Acredita-se que os monócitos surjam de precursores derivados da medula óssea atingindo o sistema circulatório e migrando para os tecidos periféricos conforme necessário. Essa hipótese tem sido acreditada por muito tempo, mas alguns macrófagos nativos de tecidos tem sido relatados como originários do saco vitelino durante a embriogênese e estão presentes nos tecidos independentemente dos monócitos (KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2022). Os Monócitos correspondem a cerca de 5 a 10% dos glóbulos brancos circulantes no sistema sanguíneo. Eles possuem uma vida útil de aproximadamente dois dias, entretanto esse período pode se estender por meses a partir do momento que eles migram aos tecidos e se transformam em macrófagos. Apesar da importância fisiológica na manutenção da homeostase tecidual dessas células, protegendo o organismo contra microrganismos e exercendo funções imunológicas, essas células possuem uma relação íntima com o desenvolvimento de doenças autoimunes e tumores malignos (SICA et al., 2015; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018; KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2022).

Além das diferentes origens, macrófagos são células extremamente heterogêneas e podem se diferenciar em subtipos a depender do ambiente tecidual. A polarização dos mesmos e o fenótipo que adquirem dependem dos mediadores inflamatórios produzidos no local do tecido lesado e esses macrófagos, uma vez polarizados, podem secretar diferentes fatores que promovem o processo inflamatório ou fatores resolutórios, responsáveis por cessar a inflamação (HALDAR; MURPHY,

2014). Apesar de ainda muito se estudar sobre os diferentes fenótipos de macrófagos, atualmente os debates a respeito dessa polarização são restritos a macrófagos M1 (Ativação clássica) e M2 (Ativação alternativa)(Figura 2). Essa nomenclatura indica seu estado fenotípico e a depender da localização e momento do processo inflamatório, macrófagos M1 podem adquirir fenótipo M2 e vice-versa. Desde que a discussão a respeito de polarização de macrófagos ganhou força no mundo científico, por volta dos anos 2000, entende-se que macrófagos M1 possuem características pró-inflamatórias, enquanto macrófagos M2 são de natureza anti-inflamatória ou pró-resolutória (MILLS et al., 2017; KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2022).

Figura 2 - Evolução do fenótipo de macrófagos durante o processo de resolução



Nos estágios iniciais da resposta do hospedeiro à lesão ou infecção tecidual, os macrófagos respondem à presença de PAMPs, DAMPs e/ou mediadores Th1 e tornam-se células classicamente ativadas (M1), que são caracterizadas pela produção de vários mediadores pró-inflamatórios e com potente atividade antimicrobiana. Posteriormente, o microambiente inflamatório muda, com a presença de IL-10, IL-13 e outros mediadores, e estimula a ativação alternativa de macrófagos (M2). As células M2 liberam vários fatores, como IL-10 e TGF-β, que promovem imunossupressão, cicatrização e resolução do processo inflamatório. Adaptado de Smigiel e Parks (2018).

Componentes microbianos, como o próprio LPS, bem como DAMPs e citocinas inflamatórias, são capazes de direcionar a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, que como já citado anteriormente, adquirem características pró-inflamatórias, com a produção de citocinas como IL-6, IL-12 e TNF- α , além de induzirem o aumento da expressão de enzimas do processo inflamatório, como ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS. Em contraste, a Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-13 (IL-13), IL-10 e o TGF- β , induzem a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, com respostas anti-inflamatórias e de reparo tecidual (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018; SMIGIEL; PARKS, 2018; YUNNA et al., 2020).

Macrófagos M1, em conjunto com outros fagócitos, são extremamente importantes contra infecções, pois além do papel fagocítico de patógenos, sua ação também se dá de forma indireta, com a produção de citocinas e quimiocinas, que recrutam glóbulos brancos e outras células imunes para o local da inflamação. Sem contar o fato de essas células ainda induzirem respostas imunes do tipo Th1, apresentando antígenos pra células T naive, que se diferenciam e passam a produzir IFN- γ em grandes quantidades, que induz ainda mais a atividade fagocítica de macrófagos M1 (KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2022). A atividade fagocítica e consequente remoção de patógenos durante processos infecciosos por macrófagos M1, se dá através da ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e subsequente geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Também por esse motivo, respostas antimicrobianas e antitumorais produzidas por esse tipo celular, causam dano tecidual induzido por EROs e prejudica a regeneração tecidual e a cicatrização de feridas. E justamente com o intuito de proteger o organismo contra o dano tecidual exacerbado, a resposta inflamatória é inibida por mecanismos reguladores a partir da resposta de macrófagos M2 (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018).

Macrófagos M2 são células efetoras chave para a resistência a parasitas e nas respostas Th2 e apresentam um perfil de produção de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10 e TGF- β . Eles têm uma capacidade fagocítica mais acentuada, eliminando detritos e células apoptóticas, promovendo assim o reparo tecidual e cicatrização de feridas devido às suas propriedades pró-angiogênicas e pró-fibróticas. Entretanto, devido suas características de reparo, no contexto de tumores, essas funções tróficas teciduais e a falta de capacidade citotóxica contribuem para promover a progressão de células cancerígenas (SICA et al., 2015). Além das citocinas

características produzidas por macrófagos M2, essas células ainda expressam a enzima Arginase 1 (Arg-1), bem como as moléculas Fizz1 (do inglês, *found in inflammatory zone-1*) e Ym1 (proteína semelhante à quitinase 3) (VERGADI et al., 2017).

A proteína Ym1 foi inicialmente descrita como um fator quimiotático de eosinófilos, mas esses efeitos ainda não são totalmente elucidados. Também parece ter um papel protetor contra fungos e outros patógenos contendo quitina, além de poder mediar interações célula-célula de maneira semelhante às selectinas. Já a Fizz1, parece ter funções ainda menos definidas, mas parece ter envolvimento direto na inflamação do epitélio pulmonar inibindo o fator de crescimento nervoso (FCN), além de inibir a diferenciação de adipócitos. Mais recentemente, essa proteína também foi implicada na mediação da deposição de matriz extracelular em um modelo animal de fibrose pulmonar (NAIR et al., 2005).

No contexto da Arg-1, é importante ressaltar que o metabolismo de aminoácidos está intimamente ligado ao fenótipo dos macrófagos. Macrófagos M1 são caracterizados pela expressão induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS). A produção de NO é um efetor importante para a atividade antimicrobiana dos macrófagos M1, enquanto os macrófagos M2 não produzem NO. Macrófagos M2 expressam altos níveis de Arg-1 que ajudam na produção de poliaminas que são necessárias para a síntese de colágeno, proliferação celular, fibrose e outras funções de remodelação tecidual (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Essas características tonam o metabolismo da arginina um dos fatores chave na diferenciação dos macrófagos. Isso porque a Arg-1, compete com a enzima iNOS na metabolização da arginina, evitando assim o aumento da produção de NO, produção essa característica de macrófagos M1 (MORRIS, 2007; PESCE et al., 2009).

2.1.2 ÓXIDO NÍTRICO

O Óxido nítrico (NO) passou a ter um destaque importante no cenário da imunologia por volta dos anos 80 e seu papel foi inicialmente definido como um mediador inflamatório produzido por macrófagos ativados a partir de citocinas e compostos microbianos. Esse mediador funcionaria como uma molécula tumoricida e antimicrobiana, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa definição ainda é aceita, mas hoje em dia já se sabe que o NO desempenha inúmeras funções não só no sistema imune

mas também em outros sistemas de órgãos, isso porque já é sabido que esse mediador é produzido por um vasto grupo de células e a nível de sistema imunológico, outras células além de macrófagos produzem e respondem ao NO (BOGDAN, 2001, 2015).

O NO é um radical livre muito reativo e lábil, de curta duração, sendo um importante mediador em várias funções biológicas, como a contratilidade cardíaca, regulação do tônus vascular, transcrição genica e outros. Em algumas condições patológicas, com o aumento do estresse oxidativo, a produção e ações do NO são significativamente reduzidas, devido a rápida dissipação de EROs, como o ânion superóxido, que interagem com o NO produzindo espécies reativas de nitrogênio (ERNs), cuja alta concentração contribui para a lesão tecidual, através do processo de peroxidação lipídica, bem como a geração de danos estruturais a proteínas e ao material genético (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; PREDONZANI et al., 2015; LIND et al., 2017).

O NO é um mediador produzido a partir da metabolização do aminoácido L-arginina em L-citrulina, em um processo dependente da atividade da família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que incluem 3 isoformas, a neuronal (nNOS ou NOS1), endotelial (eNOS ou NOS3) e a induzida (iNOS ou NOS2). As isoformas neuronal e endotelial são expressas constitutivamente, entretanto evidências sugerem que a expressão de nNOS e eNOS também pode ser regulada positivamente por estímulos externos, como estrogênios, TGF- β 1 e aumento dos níveis de glicose (MATTILA; THOMAS, 2014; VANINI; KASHFI; NATH, 2015; PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021).

A nNOS é expressa principalmente em neurônios específicos do cérebro mas já foi identificada por imuno-histoquímica na medula espinhal, em gânglios simpáticos e nas glândulas adrenais, em células epiteliais de vários órgãos, no rim, pâncreas e na musculatura lisa vascular (VANINI; KASHFI; NATH, 2015; SOLANKI et al., 2022). O NO produzido a partir da ação da nNOS é um importante neurotransmissor, que tem importância principalmente em eventos de sinalização sináptica. A nNOS tem sido implicada na regulação de processos fisiológicos relacionados a aprendizado, memória e neurogênese. Além disso, a produção de NO pela nNOS no sistema nervoso central (SNC) está envolvido na diretamente na regulação da pressão arterial, tendo em vista que o bloqueio da nNOS na medula e no hipotálamo causam uma hipertensão sistêmica. Essa regulação se dá, porque o óxido nítrico a nível de SNC

diminui a pressão arterial sistêmica através da supressão do impulso simpático central para a periferia (TODA; AYAJIKI; OKAMURA, 2009; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; KOUROSH-ARAMI et al., 2020).

A eNOS, como o próprio nome sugere, está expressa principalmente em células endoteliais. No entanto, essa isoforma já foi identificada em miócitos cardíacos, plaquetas, células neuronais, placenta, células epiteliais tubulares renais, macrófagos alveolares e células musculares lisas vasculares. Essa isoforma é um regulador homeostático de diversas funções cardiovasculares.

O NO produzido pela eNOS, liberado pelo endotélio como um gás ou ligado a outras moléculas, estimula a guanilil ciclase solúvel, produzindo assim concentrações aumentadas de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) intracelular. O cGMP por sua vez, pode interagir com diferentes tipos de proteínas receptoras intracelulares, ocasionando diferentes efeitos biológicos a depender do local e das concentrações do NO. O NO em conjunto com o cGMP, compreendem um sistema de transdução de sinal amplo e complexo, uma vez que o cGMP possui inúmeros papéis na regulação fisiológica como um todo. Dentre esses efeitos, podemos citar, relaxamento da musculatura lisa, transporte iônico intestinal, função plaquetária, entre outros. O relaxamento do músculo liso, por exemplo, que é um dos principais efeitos fisiológicos da produção de NO pela eNOS, ocorre por um aumento de GMP cíclico nas células musculares lisas, decorrentes da ação de NO, esse processo ativa quinases intracelulares que diminuem as concentrações de cálcio intracelular, produzindo assim o relaxamento da musculatura lisa subjacente ao endotélio vascular (RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; TOUSOULIS et al., 2012). Huang e colaboradores (1995) verificaram que a deleção do gene de eNOS leva a um aumento significativo da pressão arterial em camundongos.

Além da ação vasodilatadora, o NO liberado para o lúmen vascular a partir da eNOS é um potente inibidor da agregação plaquetária e de adesão celular a parede vascular. Dessa forma, além de ser um fator preventivo para desenvolvimento de processos trombóticos, também impede a produção local de fatores de crescimento derivados de plaquetas que estimulam a proliferação de musculatura lisa vascular. O NO produzido no endotélio vascular é responsável também pelo controle da expressão de genes que estão envolvidos na aterogênese. Apesar disso, sabe-se que a migração/adesão leucocitária é um dos eventos que antecede o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. O NO diminui a expressão da proteína

quimiotática de monócitos (MCP-1) e também pode inibir a adesão de leucócitos à parede do vaso, seja interferindo na capacidade de adesão de leucócitos em se ligar à superfície das células endoteliais ou até mesmo suprimindo a expressão de moléculas de adesão nos próprios leucócitos (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Em somatório à migração leucocitária, a perda da integridade da monocamada endotelial na íntima dos vasos é um dos eventos que iniciam processos inflamatórios na aterogênese. O NO produzido pelo endotélio produz efeitos anti-inflamatórios ao inibir a apoptose de células endoteliais induzida por citocinas pró-inflamatórias, EROs e angiotensina II (DIMMELER; ZEIHNER, 1999; PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021). Ou seja, o conjunto dos efeitos de reduzir a adesão leucocitária e inibir processos apoptóticos, bem como a inibição da agregação/adesão plaquetária e consequente redução da exposição de células musculares lisas a fatores de crescimento derivados de plaquetas, que previnem a etapa posterior da aterogênese com a formação de placas fibrosas, conferem ao NO produzido por células endoteliais uma ação protetora no desenvolvimento da aterosclerose (FÖRSTERMANN, 2008).

Em contraste às isoformas neuronal e endotelial da NOS, que são expressas de maneira constitutiva. A iNOS é a única isoforma que é expressa quando estimulada. Essa estimulação ocorre principalmente em processos inflamatórios e se dá principalmente por toxinas microbianas e citocinas pró-inflamatórias, ocasionando uma produção exacerbada de NO. Entretanto, algumas evidências sugerem que essa isoforma também é expressa de maneira constitutiva, o que leva a crer que a mesma possa ter papel importante em processos fisiológicos e não apenas em condições patológicas (TSUTSUI et al., 2015).

Com o passar dos anos, o NO tem sido reconhecido como um dos principais atores envolvidos na imunidade e na inflamação. Em condições infecciosas, o NO apresenta atividades antivirais e antimicrobianas, tanto citotóxicas (danificando os tecidos) quanto citoprotetoras (preservando os tecidos), atuando como agente imunoestimulador (pró-inflamatório) ou imunossupressor (anti-inflamatório). O aumento da produção de NO pela iNOS, se dá principalmente pela ativação de genes promotores da enzima, através da ação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas induzem fatores de transcrição que incluem o NF- κ B, AP-1, STAT-1, IRF-1 e o fator nuclear de interleucina-6 (NF-IL-6) (BOGDAN, 2001; PAUTZ et al., 2010).

A depender do tipo celular envolvido e do estímulo, seja ele por algum componente microbiano ou citocina, diferentes vias de sinalização podem promover

ou inibir a expressão de iNOS. Por exemplo, o próprio NO exerce um efeito duplo na transcrição da enzima. Quando ele se encontra em baixas concentrações, como no início da estimulação de macrófagos por citocinas, tem o efeito de regular positivamente a transcrição de iNOS. Enquanto altas concentrações têm o efeito oposto, como um sistema de Feedback negativo, evitando a superprodução de NO (CONNELLY et al., 2001). Nesse processo, o NF- κ B parece ser um alvo principal para ativadores ou inibidores da expressão da iNOS. Produtos microbianos como o LPS e citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β , bem como o estresse oxidativo, induzem a expressão de iNOS em diferentes tipos de células imunes a partir da ativação de NF- κ B, enquanto diferentes agentes anti-inflamatórios, como glicocorticóides, TGF- β e antioxidantes promovem o efeito inverso, reduzindo a expressão de iNOS a partir da inibição do NF- κ B (JEON et al., 1998; PAUTZ et al., 2010).

De uma maneira ampla, ainda é válido o conceito de que o NO é produzido por macrófagos a partir da atividade de iNOS, e que a indução dessa enzima decorre da atividade de diferentes mediadores inflamatórios e produtos microbianos, que levam a ativação de vias de sinalização intracelular, até a transcrição de genes a nível nuclear (PREDONZANI et al., 2015). Esse NO desempenha um papel fundamental em numerosos e diversos processos fisiopatológicos, particularmente como o principal mediador das ações microbicidas e tumorocidas dos macrófagos. Entretanto, os efeitos dicotômicos do NO continuam a ser um ponto de confusão para pesquisadores que dedicam esforços em entender as ações do NO no processo inflamatório. O entendimento de que o NO é sempre produzido em altos níveis no sistema imunológico, que tem efeitos protetores no hospedeiro durante infecções e efeitos prejudiciais em respostas autoimunes, são simplificações que não se enquadram mais nos dias de hoje (BOGDAN, 2001; PREDONZANI et al., 2015).

Outro entendimento consensual em relação ao NO, é o de que as isoformas “constitutivas” da NOS podem apresentar um aumento de sua expressão a depender do estado metabólico, mudando a ideia de que a nNOS e eNOS são expressas meramente para exercer funções fisiológicas habituais. Da mesma maneira, já existem evidências de que a isoforma induzível da NOS não é expressa apenas em processos inflamatórios, mas que também parece exercer efeitos fisiológicos constitutivamente (MATTILA; THOMAS, 2014; PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021).

2.1.3 DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO: METODOLOGIA DE GRIESS

Como abordado no tópico anterior, o NO é um mediador endógeno produzido por um conjunto de enzimas conhecidas como Óxido Nítrico sintase, que participa de processos fisiológicos em diversos tecidos e órgãos do corpo humano, mas principalmente no sistema cardiovascular, sistema nervoso e imune. Com o passar dos anos, apesar das dificuldades inerentes à dosagem desse mediador, a importância e o entendimento do comportamento do NO *in vivo* vem aumentando, dado que a localização e concentração desse mediador determina sua atividade biológica (GIUSTARINI et al., 2004; HUNTER et al., 2013).

O óxido nítrico é um gás solúvel e extremamente reativo, com metabolização rápida, tendo um tempo de vida na ordem de segundos a poucos minutos e seu coeficiente de difusão próximo a $3.300 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ em tampão fisiológico. Por esse motivo, as metodologias para dosagem de NO utilizam na verdade uma dosagem indireta desse mediador, a partir de seus metabólitos. A molécula de óxido nítrico, no organismo, sofre uma oxidação produzindo íons nitrato e nitrito, e a medição dos mesmos que permite avaliar a ação do NO no organismo. Assim, ferramentas analíticas sensíveis para medir NO em diferentes faixas de concentração se tornam cada vez mais necessárias, por isso, diferentes metodologias ou adaptações das mesmas tem sido propostas para determinar as concentrações dos metabólitos do NO em diferentes fluidos biológicos (LANCASTER J. R., 1997; HUNTER et al., 2013).

Métodos de detecção espectrofotométrica e eletroquímica são os mais utilizados, sendo que diversos deles já são executados por sistemas automatizados (KAZEMZADEH; ENSAFI, 2001; CASELLA; GATTA, 2004), métodos de quimiluminescência, absorção atômica, fluorimétricos e a cromatográficos, apesar de menor frequência, também são utilizados (SINGH et al., 1999; MIKUŠKA; VEČEŘA, 2003; FERNÁNDEZ-ARGÜELLES et al., 2004; NOROOZIFAR et al., 2007). Dentre as metodologias citadas, as espectrofotométricas ainda são as mais utilizadas e a reação clássica de Griess (GREEN et al., 1982) é a que mais se destaca, pela fácil execução e boa sensibilidade.

A técnica se baseia com o fato do nitrito reagir com aminas aromáticas primárias para formar o sal de diazônio. Posteriormente, esse sal reage com um composto orgânico aromático contendo grupos amina ou fenol. O produto formado dessa reação possui uma cor que possui absorção máxima em aproximadamente

540nm e é quantificada por espectrometria. No teste de Griess tradicional a formação do sal de diazônio se dá na reação entre nitrito e ácido sulfanílico, e em seguida o azo-acoplamento ocorre com a utilização da 1-naftilamina (GREEN et al., 1982).

Lemos (2008) realizou um levantamento de trabalhos em que diferentes autores utilizaram métodos espectrofotométricos empregando a reação de Griess, obtendo diferentes limites de detecção e faixas de linearidade, o que mostra a versatilidade da técnica e a disseminação de seu emprego. Lapa e colaboradores (2000), por exemplo, ao fazer a determinação simultânea de nitrato/nitrito, sulfato e compostos fenólicos utilizando análise por injeção sequencial (AIS) em efluentes, atingiu um limite de detecção para nitrito de até 0,01 mg.L⁻¹.

Evidentemente, o aumento do interesse de pesquisadores em entender os mecanismos de participação do NO em diferentes condições fisiológicas ocasiona consequentemente uma busca por melhores metodologias de quantificação, que sejam cada vez mais sensíveis e estáveis, permitindo menores variações e aumento da reprodutibilidade de resultados experimentais.

2.1.4 CÉLULAS RAW 264.7: CULTURA E CARACTERÍSTICAS

A cultura de células, a muito tempo, é um método bem estabelecido e uma ferramenta útil de pesquisa básica nos ramos da biologia e medicina. O desenvolvimento de novas metodologias e a descoberta de novos tipos de células para cultivo *in vitro*, abriu e continua a abrir diversas possibilidades no campo da biologia celular e estudos médicos. Entretanto, o principal desafio no desenvolvimento dessas técnicas sempre foi e continua sendo a grande discrepância entre a cinética celular *in vivo* e *in vitro*. A principal razão para essa discrepância é a grande dificuldade em reproduzir um microambiente artificial onde as células se comportem como se estivessem em seu ambiente fisiológico natural (AOKI et al., 2016).

Pensando em um ambiente artificial, vários são os fatores complicadores para reproduzir o comportamento natural das células, semelhantes aos observados fisiologicamente. Dentre eles, padrão de citocinas, material de cultura (meio, suplementação e etc), interações entre células e estresse físico ambiental são exemplos de geradores de discrepância entre esse comportamento celular. Ainda é importante salientar que, células em organismos vivos, em diversas condições

patológicas, são submetidas a uma combinação de condições ainda mais aberrantes e fortes, com presença de toxinas, edema, aumento de temperatura, além de ter produção de citocinas e interações celulares diferentes das observadas em um ambiente artificial (AOKI et al., 2016).

Apesar de técnicas de cultura celular serem extremamente difundidas por laboratórios ao redor do mundo e serem fundamentais para pesquisa biomédica e pré-clínicas, o rápido crescimento em áreas como terapia gênica, genômica e proteômica ocasionou um aumento da utilização desses sistemas com pouco rigor nas boas práticas laboratoriais, impactando diretamente os resultados experimentais, com aumento de dados errôneos e dificuldade na reprodutibilidade dos experimentos (BAUST et al., 2017). Somado a esse fator, diversos autores estão cada vez mais cautelosos quanto à interpretação dos dados obtidos a partir de experimentos conduzidos em linhagens celulares já estabelecidas devido às características inerentes às células e a comparabilidade ou estabilidade entre os laboratórios, principalmente por conta de mudanças genotípicas e fenotípicas que podem ocorrer quando essas são cultivadas por muito tempo. A falta de informações dos autores quanto ao número de passagens utilizadas para a realização dos experimentos, bem como sobre as características fenotípicas encontradas nas células tem sido recorrente, inclusive em trabalhos publicados em periódicos renomados. Evidências sugerem mudanças significativas nas características de morfologia, crescimento e capacidade de diferenciação entre células de passagens inferiores em comparação à células de passagens superiores (BAUST et al., 2017; TACIAK et al., 2018).

As Células RAW 264.7 (ATCC TIB-71) são uma linhagem celular de monócitos/macrófagos que foram estabelecidas a partir de tumores em camundongos BALB/c machos induzido com o vírus da leucemia murina Abelson. No contexto de estudo do processo inflamatório como um todo, células RAW 264.7 são amplamente utilizadas por mais de 40 anos e são descritas como um modelo apropriado de macrófagos por fornecerem informações preliminares importantes, que ajudam a selecionar ou triar produtos naturais e compostos químicos sintéticos quanto a sua bioatividade (anti-inflamatória ou imunomoduladora), permitindo prever seu efeito potencial em experimentos subsequentes utilizando modelos *in vivo* ou células primárias (MERLY; SMITH, 2017; ELISIA et al., 2018; TACIAK et al., 2018).

Por serem uma linhagem celular de macrófagos, essas células produzem uma resposta inflamatória robusta quando desafiadas por um estimulante inflamatório

como o LPS, que como já citado anteriormente, trata-se de um agonista de receptores do tipo Toll-Like, principalmente TLR-4 que ativa vias de sinalização intracelulares com recrutamento de fatores de transcrição nuclear e transcrição de genes inflamatórios, com produção e secreção de mediadores, como citocinas e NO, além de aumentar sua capacidade fagocítica (ELISIA et al., 2018; TACIAK et al., 2018).

A vasta utilização desse modelo, pode ser atribuído à dois fatores principais. O primeiro é que a linhagem de células RAW264.7 está disponível comercialmente em diversos bancos de células e o segundo motivo é o de ser uma célula extremamente fácil de se cultivar, podendo ser rapidamente expandida e utilizada em larga escala, algo que não é inerente a grande maioria dos modelos celulares (ELISIA et al., 2018). Entretanto, as dificuldades decorrentes da falta de padronização de técnicas para a utilização dessas células tornam a interpretação de resultados cada vez mais difíceis e menos reprodutíveis, tornando-se necessário e urgente a elaboração de manuais que alinhem os processos laboratoriais de pesquisadores que trabalhem com essa plataforma experimental.

2.1.5 REVISÕES SISTEMÁTICAS E META-ANÁLISE

As revisões sistemáticas surgiram principalmente como uma ferramenta para obter subsídios ou mais embasamento a respeito de temas em específico, visando aumentar a qualidade de práticas ou ações em saúde. Isso ocorre porque na atualidade, devido ao alto número de publicações científicas sobre temáticas semelhantes, possibilitar a captação e síntese de evidências científicas é essencial pro melhor entendimento de assuntos específicos e melhoria das práticas em saúde (VALENTIM, 2021).

Dessa forma, as revisões sistemáticas nada mais são que uma metodologia que permite englobar um conjunto de estudos, para responder perguntas específicas e dar suporte à pesquisadores e clínicos para que os mesmos entendam melhor e de maneira mais clara e rápida o desfecho a respeito de diferentes estudos. Ou seja, revisões sistemáticas podem gerar e avaliar teorias sobre como ou por que alguns fenômenos ocorrem e, por vezes, ajudar a abordar questões que não podem ser respondidas por estudos individuais e identificar problemas em pesquisas primárias, podendo dessa forma, corrigi-los em estudos futuros (PAGE et al., 2021).

A justificativa e metodologia de toda revisão sistemática, devem ser determinadas antes do início do processo de revisão e a mesma sempre se inicia com uma pergunta de pesquisa bem definida. Isso é essencial para facilitar justamente a sistematização da pesquisa e orientar os autores quanto aos trabalhos que serão incluídos. Por isso a utilização do acrônimo PICO é extremamente difundida por pesquisadores que trabalham na elaboração de revisões sistemáticas, pois leva em consideração pontos chave para a realização do trabalho, que são a população de interesse do estudo (P), qual o tipo de intervenção (I), quais os comparadores a serem utilizados (C) e os resultados de interesse (O, do inglês, *outcome*).

A elaboração de uma pergunta específica, bem como o uso de métodos sistemáticos e critérios de elegibilidade rigorosos para seleção dos estudos que serão incluídos na revisão são fatores preponderantes para que o trabalho seja bem elaborado e forneça segurança e qualidade na tomada de decisões ou mudanças de protocolos. Dessa forma, existem checklists específicos para orientar o processo de elaboração de uma revisão sistemática, esses checklists podem variar bastante nas etapas a serem cumpridas no processo de elaboração da revisão sistemática, entretanto, os itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises (do inglês, *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*), ou declaração PRISMA (PAGE et al., 2021) é o documento mais utilizado por pesquisadores em revisões sistemáticas (OWENS, 2021). A declaração PRISMA surgiu como uma diretriz de relatórios projetada para lidar justamente com a dificuldade de padronização das revisões. Esse documento conta com uma lista de verificação de 27 itens recomendados a serem cumpridos durante o processo da revisão, sendo que o documento fornece orientações específicas de como cada item deve ser contemplado no trabalho (PAGE et al., 2021).

Várias organizações internacionais dedicam seus conhecimentos no desenvolvimento de metodologias e protocolos de revisões sistemáticas para que a síntese da evidência seja válida e confiável. Dentre eles, podemos citar o Campbell Collaboration, Center for Reviews and Dissemination, Cochrane Collaboration, Institute of Medicine e Joanna Briggs Institute. Essas organizações fornecem orientações, treinamentos e software para facilitar a síntese de vários tipos de evidências, incluindo evidências quantitativas, qualitativas e econômicas (BAKER; WEEKS, 2014).

Ainda, as revisões sistemáticas devem ter seus protocolos registrados em base de dados com o intuito de reduzir risco de viés ou duplicidade de publicação sobre um mesmo assunto/tema. Esse registro também permite que outros pesquisadores consigam verificar o andamento de estudos que estão sendo realizados, tendo em vista que por vezes o processo de elaboração de revisões sistemáticas pode ser demorado. Desde 2011 a PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) figura como a principal plataforma de registro de protocolos para revisões sistemáticas.

Uma revisão sistemática deve relatar explicitamente os métodos, ser rigorosa e reproduzível para minimizar o viés de publicação. Além da elaboração da pergunta, como já citado anteriormente, a revisão deve definir critérios específicos de inclusão e exclusão de estudos a serem incluídos na análise e a busca abrangente e exaustiva deve ser realizada utilizando etapas. Para isso a escolha dos “*Medical Subject Headings*” (MeSH terms) a serem utilizados para resgatar o maior número de trabalhos possíveis e o cruzamento de blocos de MeSH terms, tem o intuito de incluir no trabalho artigos que possuem todos os termos de interesse pra responder a questão da pesquisa. O processo de aplicação dos critérios de inclusão ou exclusão é feito na grande maioria em duas etapas, com critérios menos específicos e mais abrangentes na leitura de título e resumo dos trabalhos. Após esse processo, os trabalhos selecionados devem passar para a segunda etapa onde ocorre a leitura dos artigos completos e aplicação de critérios mais específicos (BAKER; WEEKS, 2014).

Sempre após a seleção dos estudos, os autores devem fazer uma análise extremamente minuciosa dos artigos incluídos, buscando extrair os dados da maneira mais fidedigna possível e de maneira padronizada, para possibilitar a análise dos desfechos de maneira conjunta. Essas etapas ocorrem sempre com um par de revisores a cegas, justamente para maior transparência e evitar tendenciosidades no trabalho. Quando ocorre alguma divergência entre os pesquisadores, seja na etapa de seleção e elegibilidade dos trabalhos, quanto na coleta de dados, um terceiro pesquisador é acionado para a resolução da discrepância (BAKER; WEEKS, 2014; HIGGINS et al., 2019; DE LUCA CANTO et al., 2020).

A depender da característica da revisão sistemática é possível realizar uma meta-análise, que nada mais é do que a aplicação de métodos estatísticos que tem por finalidade agrupar resultados de diferentes estudos, aumentando assim o poder estatístico, pois é possível calcular uma estimativa combinada da magnitude e direção

dos efeitos do tratamento. Essa combinação permite que a precisão da estimativa aumente e a amplitude dos intervalos de confiança diminuam (MCKENZIE; BELLER; FORBES, 2016; L FERREYRO; M PATINO; CARVALHO FERREIRA, 2020).

Por esse motivo, a meta-análise é muito utilizada em ensaios clínicos randomizados, pois esses ensaios fornecem um alto nível de evidência se analisados em conjunto. As revisões sistemáticas, combinadas com meta-análises são a base da medicina baseada em evidências, pois oferecem uma estimativa mais precisa do tamanho do efeito de uma determinada intervenção. Entretanto, a qualidade da evidência é diretamente relacionada com a qualidade dos estudos que são incluídos na revisão. Por exemplo, uma característica muito comum em revisões sistemáticas é a inclusão de estudos com características distintas, o que leva à heterogeneidade clínica, metodológica e estatística. Diferenças nos participantes dos estudos ou diferenças na intervenção utilizada e trabalhos com avaliadores cegos ou não, são exemplos de causas de heterogeneidade clínica e metodológica respectivamente (L FERREYRO; M PATINO; CARVALHO FERREIRA, 2020).

Em meta-análises, a heterogeneidade é verificada pela utilização do teste I^2 , a grosso modo, os resultados desse teste variam em uma escala percentual de 0 a 100, sendo que valores acima de 50% indicam alta heterogeneidade. Assim sendo, identificar as possíveis causas de heterogeneidade a partir de testes de meta-regressão e realizar análises estratificadas de subgrupos é essencial para a qualidade do estudo. Ou seja, realizar uma meta-análise por subgrupos permite tirar conclusões válidas de meta-análises em que estudos heterogêneos foram incluídos, pois o reagrupamento de estudos individuais que tenham apresentado resultados semelhantes, retira a heterogeneidade verificada inicialmente (HIGGINS et al., 2019; SANTOS; CARDOSO; APÓSTOLO, 2022)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a racionalidade de medir vários biomarcadores inflamatórios nos estágios iniciais do processo de triagem de atividades anti-inflamatória e imunomoduladora no modelo *in vitro* utilizando células RAW264.7 induzidas por LPS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a pergunta de pesquisa e as palavras-chave de busca nas bases de dados;
- Registrar a revisão sistemática na plataforma colaborativa da Open Science Framework (OSF);
- Realizar busca em bases de dados de artigos com trabalhos realizados *in vitro* utilizando células RAW 264.7 estimuladas com LPS;
- Selecionar os artigos que respondam à pergunta da pesquisa, através da leitura do título, resumo e posteriormente o texto completo, seguindo critérios específicos de elegibilidade;
- Analisar os dados e desfecho dos artigos selecionados;
- Realizar análise da qualidade dos artigos incluídos e risco de viés utilizando como base o Documento de Orientação para Descrever Métodos de Testes *In Vitro* Não padronizados da OCDE e na adaptação da ferramenta SciRAP para avaliação de estudos de toxicidade *in vitro*;
- Propor um checklist de padronização de etapas e itens a serem levados em consideração por pesquisadores que trabalhem com a plataforma experimental *in vitro* utilizando células RAW 264.7.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta revisão sistemática e meta-análise foi conduzida de acordo com o Preferred Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analysis (PAGE et al., 2021) e o Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention (HIGGINS et al., 2019). Esta revisão foi registrada no Open Science Framework (DOI 10.17605/OSF.IO/8C3HT). A questão da revisão foi formulada de acordo com o acrônimo PICOS (população, intervenção, controle, resultados e desenho do estudo): Qual a eficácia da dosagem do Fator de Necrose Tumoral-alfa, Interleucina-1-beta e Interleucina-6, como biomarcadores inflamatórios, comparados ao óxido nítrico (padrão ouro) em células RAW 264.7 induzidas por LPS? (Tabela 1).

Tabela 1 - Estratégia PICOS

PICOS	Descrição
População	Macrófagos RAW 264.7 cultivados em meio DMEM
Intervenção	Indução/estimulação/ativação com lipopolissacarídeo (LPS)
Comparadores	Produção de óxido nítrico ou seus metabólitos
Resultados	Eficácia do TNF-alfa, IL-1-beta e IL-6 (produção) como biomarcadores de ensaio inflamatório <i>in vitro</i> *
Tipos de estudos incluídos	<i>In vitro</i>
Pergunta da revisão:	Qual a eficácia da dosagem do Fator de Necrose Tumoral-alfa, interleucina-1-beta e interleucina-6, como biomarcadores inflamatórios, comparados ao óxido nítrico (padrão ouro) em células RAW 264.7 induzidas por LPS?

Baseado na estratégia PICO para estudos de intervenção (Needleman IG, 2002; Higgins JPT, Green S. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Versão 5.1.0 [atualizado em março de 2011]. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd; 2011). *Parâmetros das citocinas inflamatórias e produção de óxido nítrico/nitrito.

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura foi realizada utilizando as bases de dados PubMed, EMBASE, Scopus e Web of Science (Web of Knowledge) e Google Scholar, recuperando artigos publicados no período que compreendia entre janeiro de 2015 a abril de 2020. A primeira fase estabeleceu uma investigação de acordo com as características e estratégias de cada base de dados eletrônica (Tabela 2). Todos os pesquisadores realizaram buscas independentes para definir termos MeSH (Medical Subject Headings) e estratégias de busca, que foram validadas por três especialistas (IGD, IFK, EMD). Os pesquisadores primeiro examinaram os títulos e depois os resumos (BMF; GOR; ETBM; GNV). Para recuperar as publicações no PubMed, os termos MeSH foram organizados em quatro blocos: Bloco 1 (marcadores de mediadores da inflamação): "Interleukin-1" OR "Interleukin-6" OR "Inflammation" OR "Nitric Oxide" OR " Nitric Oxide Synthase Type II" OR "Nitrites" OR "Tumor Necrosis Factor-alpha"; Bloco 2 (células): "Cells, Cultured" OR "Macrophages" OR "Macrophages, Peritoneal" OR "Mice"; Bloco 3 (lipopolissacarídeo): "Endotoxins"; Bloco 4 (agentes anti-inflamatórios): "Anti-Inflammatory Agents" OR "Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal" OR "Anti-Inflammatory Agents" [Pharmacological Action] OR "Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal" [Pharmacological Action]. Nas demais bases de dados, buscamos os termos que recuperassem potenciais estudos, e utilizamos a estratégia de tópicos para Web of Science (tópico), Scopus (título/palavra-chave/abstract) e bases de dados Embase (termos Emtree), aplicando filtros para idioma (inglês), período de tempo (janeiro de 2015 à Abril de 2020) e apenas artigos científicos. No Google Acadêmico, usamos a seguinte estratégia: "inflammation" OR "cytokines" AND "RAW 264.7" AND "lipopolysaccharide" AND "Agentes anti-inflamatórios" (arquivos em PDF e período 2015-2020). As referências recuperadas das pesquisas foram organizadas no EndNote Reference Manager e no aplicativo Rayyan QCRI web e móvel.

4.2 SELEÇÃO DE ESTUDOS

Os artigos duplicados foram removidos utilizando o EndNote Reference Manager e manualmente no Rayyan QCRI web e móvel. Na primeira fase, quatro autores cegados e independentes (BMF, GOR, ETBM e GNV) selecionaram os artigos

por título e resumo, aplicando os critérios de elegibilidade de acordo com a questão PICOS (acima) (Tabela 1). Qualquer discordância entre os revisores foi resolvida por um revisor especialista (IGD e JSR). Em seguida, os textos completos dos estudos selecionados foram recuperados e avaliados independentemente quanto à elegibilidade por quatro revisores novamente (BMF, GOR, ETBM e GNV). Qualquer desacordância foi resolvido por meio de discussão entre os revisores e um especialista independente (IGD, JSR, IFK e EDM).

4.2.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Aplicamos a estratégia PICOS para estabelecer os critérios de inclusão. População (P): macrófagos RAW 264.7 derivados de murino/*Mus musculus* em meio de cultura celular Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM). A utilização desse meio de cultura celular nos estudos foi escolhida como critério de elegibilidade, de acordo com a recomendação da ATCC para essa linhagem celular (American Type Culture Collection - ATCC, 2018). Intervenção (I)/Exposição: Qualquer forma de intervenção com LPS na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ (indutor inflamatório de macrófagos RAW 264.7), e tempo de exposição entre 12 à 48 horas. Comparador(es)/controle (C): Macrófagos RAW 264.7 não induzidos por LPS (grupo de controle basal). Resultado (O)/medida(s): Níveis ou concentração de NO ou metabólitos (μM) e pelo menos uma das seguintes citocinas: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 (pg.mL^{-1}). Apenas estudos que mostraram produção de NO acima de 20 μM por macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS foram incluídos. Essas condições foram estabelecidas com base em estudos anteriores publicados por nosso laboratório usando esse modelo experimental (DUARTE et al., 2018; MOHR et al., 2019; BILUCA et al., 2020) . Outras referências importantes da área também usaram o mesmo protocolo experimental (YOON et al., 2009; JUNG et al., 2013; ALTAN et al., 2020). Os desenhos de estudo (S) incluíram: Apenas artigos originais de estudos *in vitro* (macrófagos RAW 264.7), com células de controle separadas. Artigos escritos em inglês, publicados nos últimos cinco anos (de 1º de janeiro de 2015 a 31 de maio de 2020).

Tabela 2 - Estratégias de busca nas bases de dados

Search	Pubmed	Web of Science	Scopus	Embase/Emtree
Bloco 1 Mediadores da inflamação #1	("Interleukin-6"[Mesh]) OR 1"[Mesh]) OR "Inflammation"[Mesh]) OR "Tumor Necrosis Factor-alpha"[Mesh]) OR "Nitrites"[Mesh]) OR ("Nitric Oxide"[Mesh] OR "Nitric Oxide Synthase Type II"[Mesh]) OR "Cytokines"[Mesh])	TS=(Interleukin-1 OR Interleukin-6 OR Inflammation OR Nitric Oxide OR Nitric Oxide Synthase Type II OR Nitrite\$ OR Tumor Necrosis Factor- alpha OR Cytokine\$)	TITLE-ABS-KEY("Interleukin-1" OR "Interleukin-6" OR "Inflammation" OR "Nitric Oxide" OR "Nitric Oxide Synthase Type II" OR "Nitrite" OR "Tumor Necrosis Factor-alpha" OR "Cytokine")	'interleukin 1' OR 'interleukin 6'/exp OR 'interleukin 6' OR 'inflammation'/exp OR 'inflammation' OR 'nitric oxide'/exp OR 'nitric oxide' OR 'inducible nitric oxide synthase'/exp OR 'inducible nitric oxide synthase' OR 'nitrite'/exp OR 'nitrite' OR 'tumor necrosis factor'/exp OR 'tumor necrosis factor' OR 'cytokine'/exp OR 'cytokine'
Bloco 2 Células #2	("Mice"[Mesh]) OR "Cells, Cultured"[Mesh]) OR ("Macrophages"[Mesh] OR "Macrophages, Peritoneal"[Mesh])	TS=("Cell\$, cultured" OR RAW 264.7 OR Macrophage\$ OR Peritoneal macrophage\$ OR Mice)	TITLE-ABS-KEY("RAW 264.7" OR "Macrophage" OR "Peritoneal macrophage")	'mouse'/exp OR 'mouse' OR 'cell culture'/exp OR 'cell culture' OR 'macrophage'/exp OR 'macrophage' OR 'peritoneum macrophage'/exp OR 'peritoneum macrophage' OR 'raw 264.7 cell line'
Bloco 3 Lipopolissacá- deo #3	"Endotoxins"[Mesh]	TS=(Lipopolysaccharide\$ OR Endotoxin\$)	TITLE-ABS-KEY(Lipopolysaccharide* or "LPS" OR "Endotoxin")	'lipopolysaccharide'/exp OR 'lipopolysaccharide' OR 'endotoxin'/exp OR 'endotoxin'
Bloco 4 Agentes anti- inflamatórios #4	("Anti-Inflammatory Agents"[Mesh] OR "Anti- Inflammatory Agents, Non-Steroidal"[Mesh] OR "Anti Inflammatory Agents"[Pharmacological Action] OR "Anti Inflammatory Agents, Non-Steroidal" [Pharmacological Action])	TS=(drug effect\$ OR anti- inflammatory effect\$)	TITLE-ABS-KEY("Anti inflammatory effect" OR "Anti inflammatory agent")	'antiinflammatory agent'/exp OR 'antiinflammatory agent' OR 'nonsteroid antiinflammatory agent'/exp OR 'nonsteroid antiinflammatory agent'
Combo #5	(#1 AND #2 AND #3 AND #4)	(#1 AND #2 AND #3 AND #4)	#1 AND #2 AND #3 AND #4	combine AND

Google Scholar (Literatura cinzenta): "inflammation" OR "cytokines" AND "RAW 264.7" AND "lipopolysaccharide" AND "Anti-inflammatory agents" (PDF file and period 2015-2020).

4.2.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Também foram aplicados os critérios de exclusão levando em consideração a estratégia PICOS. Esses critérios foram selecionados com base nas principais diretrizes para cultura de células (American Type Culture Collection - ATCC, 2018). Na primeira fase de elegibilidade, o título e o resumo foram lidos e os seguintes critérios de exclusão foram aplicados: 1) Macrófagos não RAW 264.7; 2) Macrófagos RAW 264.7 não induzidos por LPS; 3) Não informar “óxido nítrico ou nitritos” E “TNF-alfa ou IL-1-beta ou IL-6”; 4) Desenho do estudo: estudos experimentais usando exclusivamente modelos animais, ensaios clínicos ou outros estudos envolvendo humanos, revisões, Diretrizes, Cartas, Editoriais, Comentários, Notícias, resumos de congressos, teses e dissertações; 5) Não escrito no idioma inglês; 6) textos completos indisponíveis. Na segunda fase, o texto completo foi lido e alguns outros critérios de exclusão foram adicionados, além dos já citados na primeira fase: 5) concentração de LPS diferente de 1 µg/mL; Tempo de exposição ao LPS diferente de 12, 24 e/ou 48 horas; 6) “óxido nítrico ou nitritos” e medidas de TNF-alfa e/ou IL-1 beta e/ou IL-6 apresentadas como expressão gênica ou razão de expressão ou outras medidas (% , IC₅₀); 7) Produção de óxido nítrico ou nitrito igual ou menor que 20 µM no grupo controle (LPS); 8) Estudos que não utilizaram grupo controle basal (comparador: macrófagos RAW 264.7 não induzidos por LPS ou induzido por outra substância); 9) DMEM não utilizado como meio de cultura celular; 10) Textos completos indisponíveis; 11) NOx não medido pelo método de Griess; 12) condição atmosférica diferente de 5% de CO₂; 13) Não utilizar 10% de suplementação do meio com Soro Fetal Bovino (SFB); 14) Densidade celular ≠ ~10⁵ mL; 15) NO e citocinas não medidos na mesma condição experimental; 16) Níveis de NO > 300 µM (o limiar de reatividade); 17) Estudos duplicados.

4.3 EXTRAÇÃO DE DADOS

Os artigos foram distribuídos aleatoriamente entre quatro autores, que extraíram os dados de forma independente (BMF, GOR, ETBM e GNV) (URBANIÁK; PLOUS, 2013). Os dados foram extraídos do texto, figuras ou tabelas e inseridos em uma tabela padronizada. Quando apenas o gráfico estava disponível e não os valores totais, os dados foram extraídos usando uma régua de tela digital. Os dados extraídos

foram validados por um par de revisores. Quaisquer discrepâncias foram resolvidas por meio de discussão ou consulta a um terceiro revisor (IGD, IFK, JSR e EMD). Posteriormente, o grupo de especialistas validou os dados extraídos de forma padronizada. Quando os dados não foram bem relatados, ou estavam pouco claros, contatamos os autores por e-mail com o máximo de 3 tentativas.

Dados a serem extraídos: 1º autor, ano de publicação, país, objetivos, células RAW 264.7 cultivadas (macrófago; vírus da leucemia murina Abelson transformado - *Mus musculus*, camundongo), número/densidade de células plaqueadas, suplementação de meio, temperatura de incubação, atmosfera de dióxido de carbono (%), antibióticos, número de passagens celulares, placa utilizada para o teste, confluência celular, número de repetições técnicas e repetição de experimentos independentes. Concentração de LPS (fabricação, 1 µg/mL), veículo utilizado, concentração de dimetilsulfóxido (DMSO), tempo de incubação/exposição (12, 24 ou 48h). Mediadores da produção de inflamação, variáveis contínuas: Óxido nítrico/nitritos (µM, média, DP) e TNF-α, IL-1β ou IL-6 (pg.mL⁻¹, média, DP). Se o tipo de erro não fosse claro, era registrado como Erro Padrão da Média. Esses dados foram convertidos em desvios padrão (25). As conclusões dos autores e os riscos/limitações relatados pelos autores dos estudos originais também foram extraídas. Fornecemos uma síntese narrativa das descobertas dos estudos incluídos, estruturada em torno do tipo de intervenção, características alvo, tipo de resultado, conteúdo da intervenção e células de controle. Resumimos os efeitos da intervenção para cada estudo calculando as diferenças médias padronizadas em uma meta-análise.

4.4 META-ANÁLISE

Um mínimo de 3 estudos foi utilizado para realizar uma meta-análise. Quando os estudos apresentaram o mesmo tipo de intervenção (LPS) e controle, com a mesma medida de resultado, os mesmos foram então agrupados usando uma meta-análise de efeitos aleatórios, com diferenças médias padronizadas para resultados contínuos, calculando os intervalos de confiança de 95% e dois valores de P de dois lados para cada resultado. Nos estudos em que os efeitos do agrupamento não foram levados em consideração, foi feito o ajuste dos desvios padrão para o efeito do desenho.

A significância estatística foi definida como valor de $p < 0,05$ (teste Z). Enquanto o teste Q de Cochran e I^2 foram utilizados para avaliar a heterogeneidade. Um valor p pode ser calculado para o teste Q, indicando se todos os estudos compartilharam um tamanho de efeito comum ($p < 0,05$) ou não ($p > 0,05$), enquanto para o teste I^2 , valores de $I^2 > 50\%$ foram utilizados como ponto de corte para considerar os estudos heterogêneos.

Uma meta-regressão univariada foi realizada onde havia dados suficientes (> 10 comparações por variável). Após a estratificação dos estudos, foi realizada a meta-análise estratificada para explorar as causas de heterogeneidade nas estimativas de efeito de acordo com os subgrupos, enquanto a verificação de presença de viés de publicação foi avaliada utilizando a análise de gráfico de funil.

Para as análises estratificadas, foram realizadas análises de subgrupos. As seguintes características do estudo foram examinadas como fonte potencial de heterogeneidade: tempo de exposição ao LPS (24 horas); intervalo de concentração de óxido nítrico/nitritos em um grupo de controle positivo (20-50 μM / $> 50 \mu\text{M}$) (estudos mostrando mM/mL ou outra escala foram convertidos para μM); e o método usado para determinar a densidade celular (células por poço ou células por mL). Os resultados dos estudos relatados como zero foram usados 0,1 para realizar uma meta-análise. A remoção de outliers foi realizada de acordo com a faixa de ensaio dos kits de ELISA das citocinas estudadas: TNF: 10 - 6.000 pg mL^{-1} , IL-1: 3 - 3.000 pg mL^{-1} e IL-6: 5 - 2.000 pg mL^{-1} .

4.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE

O risco de viés foi avaliado com base no Documento de Orientação para Descrever Métodos de Testes *In Vitro* Não padronizados da OCDE e na ferramenta SciRAP para avaliação de estudos de toxicidade *in vitro* (BERONIUS et al., 2018). Dois revisores avaliaram independentemente a qualidade de cada estudo (BMF e ETBM). Quaisquer discrepâncias foram resolvidas por revisores especialistas (IGD e EMD). Avaliamos os trabalhos em 3 tópicos separadamente: Qualidade dos relatórios, qualidade metodológica e relevância dos estudos. Para a qualidade dos relatórios e qualidade metodológica, as opções de respostas para cada questão aplicada foram “Não determinado, cumpriu parcialmente, cumpriu” ou “Não cumpriu”. Para os critérios

de relevância, as opções de resposta para os itens do relatório foram “Não determinado, Diretamente relevante, Indiretamente relevante ou Não relevante”.

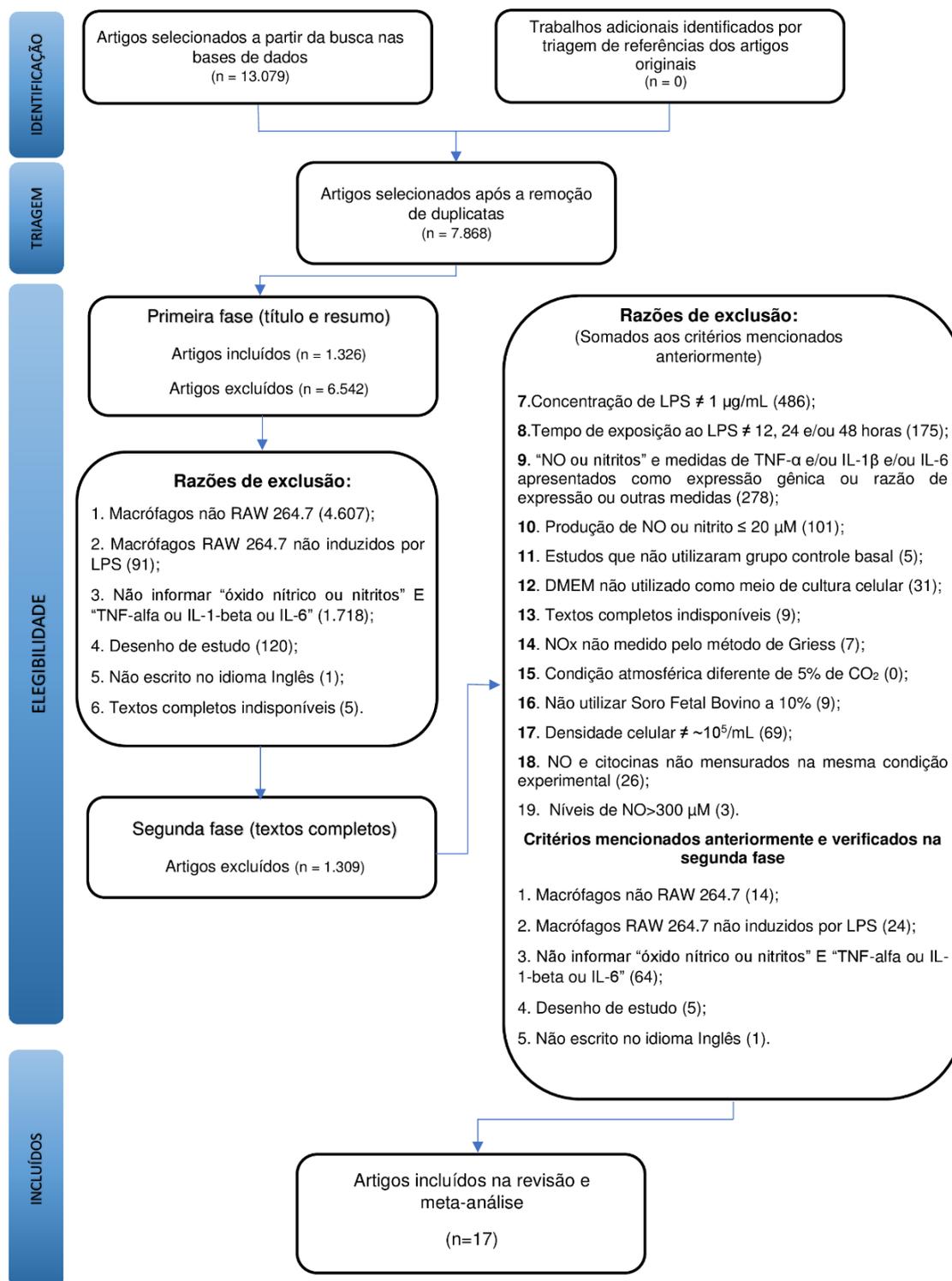
As características dessas respostas foram especificadas por cores em planilhas específicas para cada tópico. Os perfis de cores, facilmente visualizados em planilhas, são especialmente úteis para determinar onde estão os pontos fortes e fracos de um estudo ou de um grupo de estudos em específico. Uma pontuação numérica para a qualidade de relatórios e para a qualidade metodológica foi calculada. O cálculo das pontuações pode ser simplesmente explicado como a pontuação SciRAP: $\{[F + (PF*0,5)]/T\}*100$ (onde F é o número de critérios atendidos multiplicado por seus pesos individuais, PF é o número de critérios parcialmente atendidos multiplicado por seus pesos individuais e T é o número total de critérios multiplicado por seus pesos individuais). Ou seja, a pontuação é a porcentagem de critérios cumpridos e parcialmente cumpridos incluídos na avaliação, tendo em conta o peso dos critérios individuais, sendo que os critérios parcialmente cumpridos (análise subjetiva) contribuem com metade do valor dos critérios cumpridos.

A pontuação SciRAP pode ter um valor que varia de 0 (todos os critérios são julgados como “não cumpridos”) a 100 (todos os critérios são julgados como “cumpridos”). O resultado da avaliação do SciRAP foi baseado na classificação dos estudos de acordo com sua confiabilidade relativa e dividindo os estudos em diferentes categorias de confiabilidade, por exemplo, as categorias Klimisch “confiável sem restrições”, “confiável com restrições” e “não confiável”. A classificação e a categorização são feitas caso a caso. O SciRAP não dita valores de corte ou categorização com base em pontuações SciRAP ou perfis de cores.

5 RESULTADOS

Após uma busca exaustiva nas cinco bases de dados utilizadas, recuperamos um total de 13.073 artigos. Esse número foi reduzido após a aplicação automática de um filtro para remover duplicatas (Endnote) e após a remoção manual utilizando o aplicativo web e móvel Rayyan QCRI (27), restando assim um total de 7.868 artigos a serem submetidos à primeira fase de aplicação dos critérios de elegibilidade (Figura 3). Após a aplicação da primeira rodada de critérios de exclusão (título e resumo), um

Figura 3 - Processo de busca e seleção dos estudos com base na declaração PRISMA



Legenda: PRISMA: itens de relatório preferidos para revisões sistemáticas e meta-análises.

total de 6.542 artigos foram excluídos, restando 1.326 artigos para serem lidos na íntegra (textos completos). Nesta segunda fase de seleção, critérios mais específicos foram aplicados para refinar ainda mais a busca, levando à exclusão de mais de 1.309 artigos. Os 17 artigos restantes foram enviados para extração de dados (Figura 3).

O objetivo da maioria dos estudos (15) foi avaliar a atividade biológica de plantas, extratos ou compostos químicos deles isolados. Um estudo trabalhou com uma fração de levitinas de gema de ovo (MERAM; WU, 2017) e outro com Celecoxib (PANG et al., 2019), um anti-inflamatório não esteroide da classe dos inibidores específicos da enzima ciclooxigenase-2. Treze dos estudos foram realizados na Ásia; cinco na China (ZHANG; YAN; HU, 2015; GUO et al., 2016; SUN et al., 2017; HE et al., 2019; PANG et al., 2019), seis na Coreia do Sul (LIM et al., 2015b, 2015a; KIM; AHN; JE, 2016; LEE et al., 2017a, 2017b; KIM et al., 2019), um na Índia (GHATE et al., 2018) e um na Indonésia (LAKSMITAWATI et al., 2016). Três foram realizados no continente americano, dois no Brasil (DA SILVA et al., 2019; MOHR et al., 2019) e um no Canadá (MERAM; WU, 2017). Apenas um dos estudos incluídos foi realizado na Europa (Turquia) (KARATOPRAK et al., 2019). Ao todo, dez autores realizaram a dosagem de NO mais três das citocinas incluídas em nossa pesquisa (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quatro os autores mediram o NO e duas das citocinas e apenas três estudos incluíram o NO e apenas uma citocina (Tabela 3). Como dito acima, todos os estudos incluídos nesta revisão tiveram como objetivo avaliar a possível atividade anti-inflamatória de compostos isolados, extratos de plantas ou drogas. Em alguns estudos, os autores relacionaram essa atividade não apenas à redução na produção de mediadores pró-inflamatórios, mas também à inibição de fatores de transcrição nuclear como NF- κ B e proteínas quinases ativadas por mitógeno (JNK, ERK e P38 MAPKs).

Todos os estudos incluídos em nossa pesquisa (17) foram considerados para realizar a meta-análise do NO. Em todos os trabalhos, o NO foi produzido significativamente a favor das células induzidas por LPS quando comparado com as células não induzidas (diferença média: 32,22 μ M, IC95%: 25,81-38,63; $p < 0,001$; $i^2 = 100\%$) (Figura 4a). Para avaliar se a diferença entre a densidade celular dos estudos poderia interferir nos níveis de NO, realizamos uma análise de subgrupo. Semelhante aos resultados de NO, a produção dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi significativamente aumentada por células LPS induzidas, em comparação com células não induzidas (Figura 4b, 4c e 4d).

Tabela 3 - Síntese de resultados dos trabalhos incluídos

Autor/Ano/País	Celulas/mL	Citocinas dosadas*	Resumo dos resultados	Conclusões
Da Silva et al., 2019 - Brasil	3.3 x 10 ⁵	IL-6 / IL-1β	O composto 1 de <i>Lepidaploa chamissonis</i> a 1, 3 e 10M inibiu a produção de NOx e a secreção de IL-6 em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.	O Glaucolídeo B foi investigado por suas propriedades anti-inflamatórias, apresentando um efeito inibitório significativo na secreção de NO e IL-6.
Ghate et al., 2018 – Índia	2.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	7-hidroxi-6-metoxiquinolin-2(1H)-ona (SPE2) suprimiu de maneira significativa a superprodução induzida por LPS de mediadores pró-inflamatórios, como NO, TNF-α, IL-6 e IL-1β e ROS. Os níveis de expressão da enzima iNOS, COX-2, TNF-α, IL-6 e IL-1β também retornaram ao valor normal após o tratamento com SPE2.	SPE2 reduziu a secreção e a expressão de NO, COX-2, IL-6, IL-1β e TNF-α em macrófagos RAW264.7 induzidos por LPS, tanto a níveis de proteína quanto de mRNA. Além disso, SPE2 inibiu a translocação nuclear de NF-κB, o que pode regular negativamente genes responsáveis pela resposta inflamatória.
Guo et al., 2016 - China	4.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	Os experimentos <i>in vitro</i> mostraram que o TFA estimulou a produção de NO, TNF-α, IL-1β, IL-6 e IFN-γ em macrófagos RAW 264.7 não estimulados e inibiu a superprodução desses mesmos mediadores inflamatórios em células RAW 264.7 estimuladas com LPS de maneira dose-dependente, sem exercer citotoxicidade.	Os resultados deste estudo indicam que o TFA tem potenciais efeitos imunoestimulantes e anti-inflamatórios.
Karatoprak et al., 2019 - Turquia	5.0 x 10 ⁵	TNF-α	A fração de acetato de etila de <i>Kitaibelia balansae</i> Boiss. inibiu de maneira significativa a produção de NO e TNF-α (37,26 μM e 1781,524 pg/mL, respectivamente, 6 h) em células RAW264.7 induzidas por LPS.	O efeito anti-inflamatório dos extratos investigados está intimamente relacionado à sua composição química. Os compostos responsáveis pelas atividades biológicas relatadas são os polifenóis.
Kim et al., 2019 – Coréia do Sul	2.5 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	GK é um inibidor eficaz da produção de NO induzida por LPS em células RAW 264.7 e citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1β e TNF-α. A produção dessas citocinas pró-inflamatórias foi significativamente reduzida nos intervalos de dose de 0,1-100 μg/mL de tratamento com GK (p <0,05). GK inibiu de forma significativa e dose-dependente da expressão das proteínas iNOS e COX-2. Além disso, foi demonstrado que a GK induz efeitos anti-inflamatórios ao inibir a fosforilação de MAPKs (ERK, JNK e p38) e NF-κB p65.	As propriedades anti-inflamatórias da GK podem ser devidas à inibição das vias do NF-κB e MAPKs, que estão associadas à atenuação da secreção de citocinas. Esses resultados sugerem que a GK possui atividade anti-inflamatória e contribui para o tratamento de doenças inflamatórias.
Laksmiawati et al., 2016 - Indonésia	2.5 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	Tanto o extrato de <i>Gendarusa vulgaris</i> (GVE) quanto o de <i>Annona muricata</i> (AME) de 50 e 10 μg/mL apresentaram alta viabilidade (>90%) e não foram significativamente diferentes em relação ao controle, tornando-os adequados para tratamento. GVE e AME reduziram o nível de TNF-α em RAW264.7, bem	Esta pesquisa revelou que os extratos etanólicos de GVE e AME possuem um potencial efeito anti-inflamatório pela inibição de mediadores inflamatórios, incluindo IL-1β, TNF-α, NO e IL-6.

			como o nível de IL-1 β e IL-6. Além disso, GVE e AME de 75 μ g/mL reduziram os níveis de NO em comparação com células não tratadas.	
Lee et al., 2016 – Coréia do Sul	2.0 x 10 ⁵	IL-6	O extrato de acetato de etila de <i>Asparagus cochinchinensis</i> (EaEAC) suprimiu significativamente as respostas inflamatórias através da inibição da produção de NO, expressão de COX-2 e produção de ROS, bem como regulação diferencial de citocinas inflamatórias e ciclo celular em células RAW264.7.	EaEAC pode suprimir respostas inflamatórias em macrófagos através da estimulação de efeitos anti-inflamatórios, diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e inibição da produção de ROS.
Lim et al., 2015a – Coréia do Sul	5.0 x 10 ⁵	TNF- α / IL-6 / IL-1 β	No estudo <i>in vitro</i> , a <i>Sceptridium ternatum</i> (ST) inibiu significativamente a produção de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de NF-kB, um fator de transcrição que regula a produção de mediadores inflamatórios, em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.	Este estudo confirmou que ST reduz os níveis de mediadores inflamatórios, como NO e citocinas pró-inflamatórias, via inibição da expressão de NF-kB em células RAW 264.7 estimuladas por LPS, e que ST aumenta a produção de IFN- γ e diminui a produção de IL-4 em esplenócitos de camundongos estimulados com conA. Além disso, este estudo demonstrou que ST reduziu a hiperplasia da pele causada por respostas inflamatórias alérgicas, regulando os níveis séricos de IgE e a produção de citocinas relacionadas a respostas inflamatórias do tipo Th2.
Lim et al., 2015b – Coréia do Sul	5.0 x 10 ⁵	TNF- α / IL-6 / IL-1 β	O tratamento com extrato de <i>Stemona tuberosa</i> (ST) reduziu a produção de NO por meio do bloqueio da expressão da proteína COX-2 e iNOS em macrófagos RAW 264.7. Além disso, o tratamento com extrato de ST diminuiu as secreções de citocinas inflamatórias e regulou a ativação de NF-kB inibindo a fosforilação de I κ B e a via da proteína quinase ativada por mitógeno.	O extrato de ST reduziu a produção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e suprimiu a inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro em modelos de camundongos. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de distinguir o composto mais importante no extrato aquoso ST, o que levaria a descobrir novos agentes terapêuticos para a inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro, como câncer de pulmão, DPOC e enfisema.
Meran and Wu, 2017 - Canadá	2.0 x 10 ⁵	TNF- α / IL-6 / IL-1 β	Os resultados revelaram que o tratamento com livetinas e seus hidrolisados (peptídeos) reduziu significativamente as respostas inflamatórias, evidenciadas pela inibição da produção de NO e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6.	As livetinas de gema de ovo e seus hidrolisados com atividade anti-inflamatória podem ser potencialmente utilizadas na indústria de alimentos saudáveis/nutracêuticos/farmacêuticos para diversas aplicações.

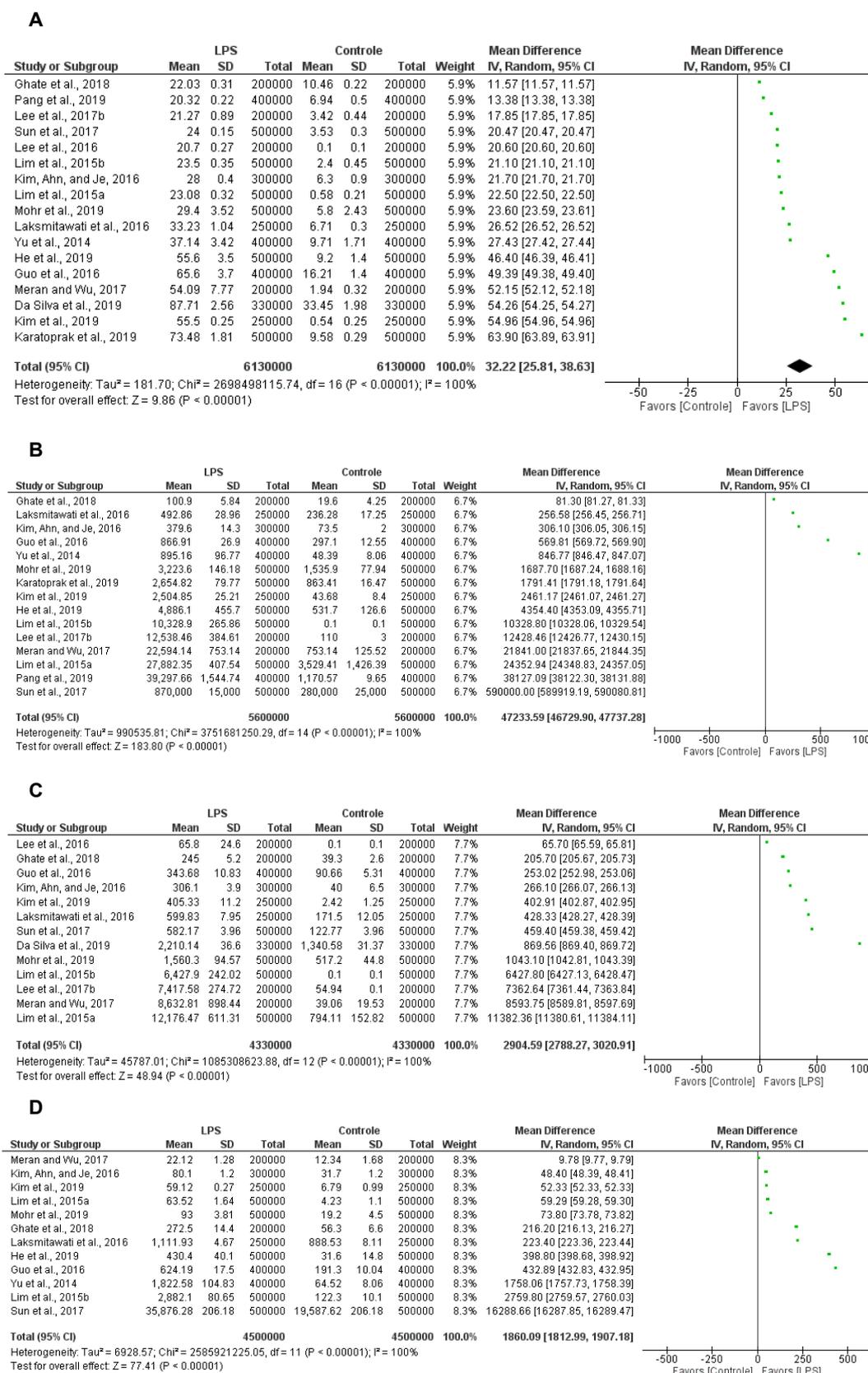
He et al., 2019 - China	5.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-1β	Macrófagos RAW 264.7 foram ativados por PH-EPS, com efeito ligeiramente inferior ao LPS, evidenciado pela secreção de IL-1β, TNF-α e NO, e por fagocitose significativamente aumentada nas células tratadas com PH-EPS. O fator nuclear NF-κB p65 foi significativamente translocado para o núcleo nas células tratadas com PH-EPS. Além disso, a expressão de iNOS e a degradação de IκB-α foram aumentadas em células tratadas com PH-EPS. Os níveis de fosforilação de p38, JNK e ERK também aumentaram significativamente nas células tratadas com PH-EPS. Além disso, a produção de IL-1β e TNF-α diminuiu acentuadamente nas células tratadas com PH-EPS quando as vias MAPK foram bloqueadas pelo inibidor Dectina-1 e por anticorpos anti-TLR4.	PH-EPS possui capacidade imunoestimulante de ativar células RAW 264.7, conforme evidenciado pela expressão aumentada de NO, IL-1β e TNF-α, e pela capacidade aumentada de fagocitose. Além disso, os resultados indicaram que a Dectina-1 e TLR4 podem ser dois potenciais receptores em que o PH-EPS pode se ligar diretamente, ativando assim as vias de sinalização NF-κB e MAPK. O presente estudo demonstrou que o PH-EPS pode ser um promissor agente adjuvante ou antitumoral com atividade imunomoduladora.
Kim, Ahn, and Je, 2016 – Coreia do Sul	3.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	A fração peptídica >5 kDa de <i>Mytilus edulis</i> exerceu a maior atividade inibitória sob o NO e inibiu a secreção de PGE2 em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS. O pré-tratamento com a fração peptídica >5 kDa inibiu marcadamente a iNOS estimulada por LPS e a expressão gênica e da proteína COX-2. A estimulação por LPS induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α, IL-6 e IL-1β, enquanto o co-tratamento com a fração peptídica >5 kDa suprimiu a produção de citocinas pró-inflamatórias. A fração peptídica >5 kDa inibiu a translocação de NF-κB através da prevenção da fosforilação e degradação de IκB-α e também inibiu a via de sinalização MAPK em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS.	A fração peptídica de alto peso molecular (>5 kDa) dos hidrolisados de <i>Mytilus edulis</i> obtida por hidrólise péptica exibiu ação anti-inflamatória em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS através da modulação de mediadores pró-inflamatórios. Os efeitos da modulação são atribuídos à sua inibição da expressão de genes inflamatórios por meio do bloqueio das vias de sinalização de NF-κB e MAPK.
Mohr et al., 2019 - Brasil	5.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	A rubiadin-1-metil éter inibiu os parâmetros pró-inflamatórios estudados nos ensaios <i>in vitro</i> (NOx, IL-6 e IL-1β) e, ao mesmo tempo, aumentou a taxa de apoptose dos macrófagos. Nos experimentos <i>in vivo</i> , esse composto foi capaz de diminuir a infiltração de leucócitos; exsudação; NOx; níveis de IL-6, IL-12p70, IFN-γ, TNF-α e MCP-1; e atividade da mieloperoxidase. Além disso, Rubiadin-1-metil éter aumentou os níveis de IL-10 no BALF.	O composto rubiadin-1-metil éter possui significativa atividade anti-inflamatória, apresentando perfil imunomodulador. Este composto pode, portanto, ser um potencial candidato para o desenvolvimento de tratamentos para condições inflamatórias nas quais o LPS está intimamente relacionado, como a lesão pulmonar aguda (LPA).
Pang et al., 2019 - China	4.0 x 10 ⁵	TNF-α	Em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS, o pré-tratamento com 8 μmol/L de celecoxib por 1 h reduziu significativamente os níveis de TNF-α, NO e PGE2, mas aumentou os níveis de LTB4 e CysLTs.	O inibidor seletivo da COX-2, celecoxib, pode agravar a aterogênese, um efeito que pode estar relacionado à regulação positiva de LTs por meio de um desvio da via 5-Lipooxigenase.

Sun et al., 2017 - China	5.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6 / IL-1β	Neste estudo, demonstramos que a <i>Vaccaria hypaphorine</i> reduziu drasticamente a liberação de óxido nítrico (NO) induzida por LPS e a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 e PGE2 em células RAW 264.7.	Pela primeira vez, a <i>Vaccaria hypaphorine</i> desempenhou um papel essencial na resposta de ação antiinflamatória ao LPS através da inibição das vias NFκB e ERK, o que pode fornecer uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de doenças associadas à inflamação.
Yu et al., 2014 – China	4.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-1β	O pré-tratamento com OMT inibiu significativamente a secreção de NO, IL-1β e TNF-α, atenuou os níveis de mRNA de iNOS, IL-1β, TNF-α e receptor toll-like 4 (TLR4), fosforilação de inibidor de kappa B-alfa (p-IκBα) no citosol, e diminuiu o nível nuclear de NF-κB p65 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.	A OMT exerce propriedade anti-inflamatória em macrófagos estimulados por LPS, regulando negativamente a via TLR4/NF-κB.
Lee et al., 2017 – Coréia do Sul	2.0 x 10 ⁵	TNF-α / IL-6	A xantotoxina inibiu a produção de NO, PGE2, TNF-α e IL-6 pelos macrófagos induzidos por LPS de maneira dependente da concentração.	A xantotoxina exerce efeitos antiinflamatórios suprimindo a expressão de iNOS, COX-2, IL-6 e TNF-α em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Esses efeitos inibitórios são mediados em parte pela inibição cooperativa de fatores de transcrição, AP-1, NF-κB e STAT1/3, juntamente com a inativação da via ERK e p38 MAPK.

Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1-beta (IL-1β), Óxido Nítrico (NO) Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), Lipopolissacarídeo (LPS), Interferon gama (IFN-γ), ciclooxigenase-2 (COX-2), proteína quinase ativada por mitogeno (MAPK), fator nuclear kappa B (NF-κB), 7-hidroxi-6-metoxiquinolin-2(1H)-ona. (SPE2), flavonoides totais de Astragalus (TFA), gafanhoto cetona (GK), Gendarussa vulgaris ness (GVE), Annona muricata L. (AME), fumaça de cigarro (CS), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), exopolissacarídeos de *Paecilomyces lilacinus* (PH-EPS), Toll-like receptor 4 (TLR4), Prostaglandina E2 (PGE2), Interleucina-12p70 (IL-12p70), Proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), Mieloperoxidase (MPO), fluido de lavagem broncoalveolar (BALF), Interleucina 10 (IL-10), Leucotrieno B4 (LTB4), Cisteinil LTs (CysLTs), Leucotrienos (LTs), Lipoxigenase (5-LO), Oximatrina (OMT), Proteína ativadora 1 (AP-1), Sinal transdutor e ativador de transcrição 1/3 (STAT1/3),

*Todos os estudos realizaram a medição de NO.

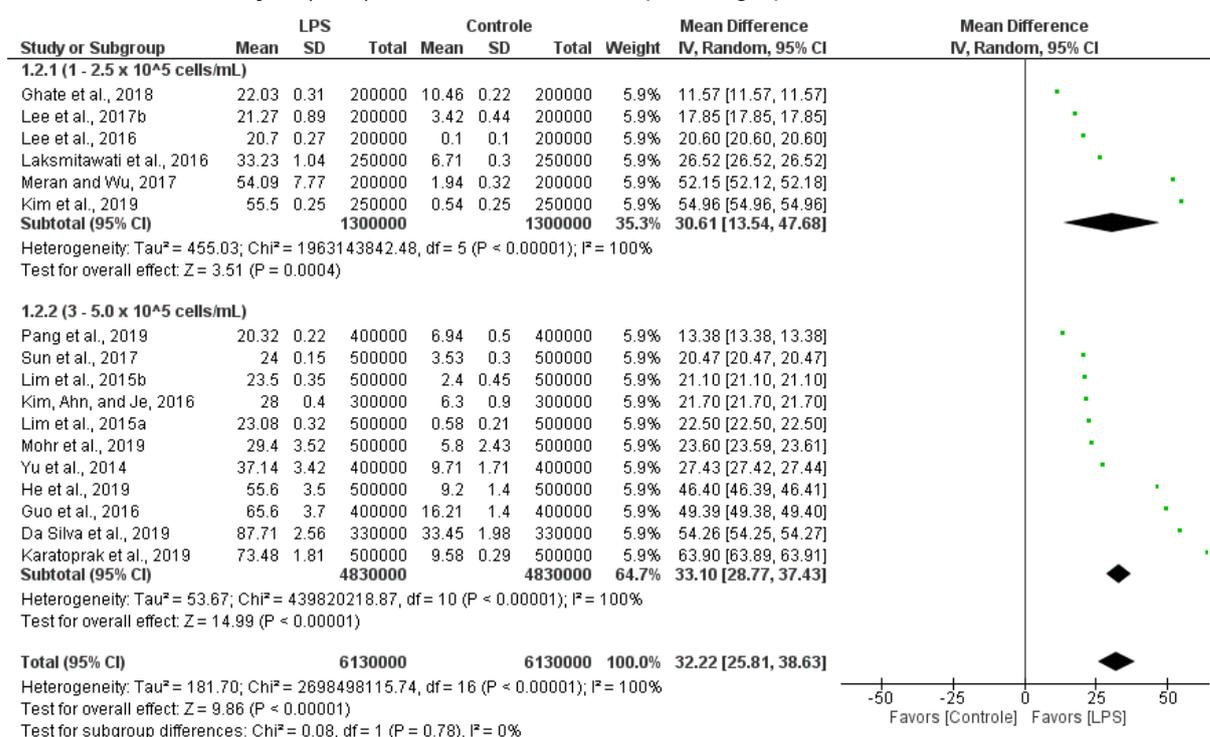
Figura 4 - Forest plot das diferenças médias de produção de NO e citocinas estudadas entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos



Legenda: A) NO, B) TNF- α , C) IL-6, D) IL-1 β . IC, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Verificou-se que a densidade celular não contribuiu para o aumento ou diminuição dos níveis de NO produzidos pelas células RAW 264.7 induzidas por LPS (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 30,61 µM; IC95%: 13,54 -47,68; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 33,10 µM; CI95%: 28,77 - 37,43; p>0,05, i²=0%) (Figura 5). Como o intervalo de colocação é de 10⁵ células.mL⁻¹, independentemente da placa utilizada (6-96 poços), os níveis de NO aumentaram significativamente quando induzidos por 1 µg mL⁻¹ de LPS em comparação com células não induzidas.

Figura 5 - Forest plot das diferenças médias na produção de NO entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular

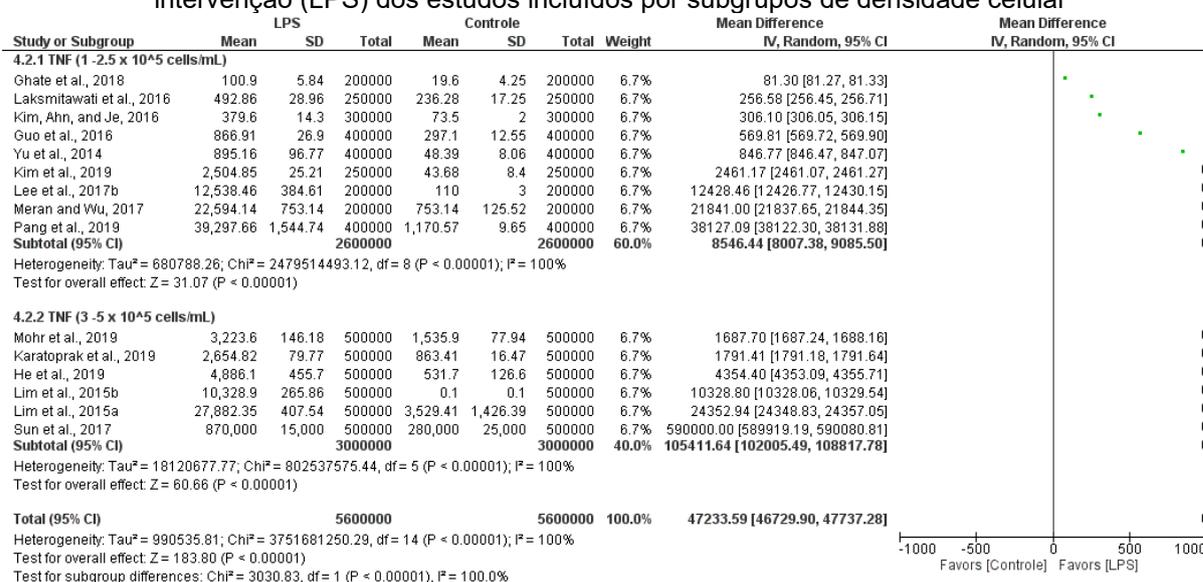


Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

O TNF-α foi a citocina com o maior número de estudos incluídos para meta-análise, 15 no total. Os níveis de TNF-α foram significativamente maiores nas células RAW 264.7 induzidas por LPS em comparação às células não induzidas (diferença média: 47233 pg.mL⁻¹, IC95% 46729-47737; p<0,001, i²=100%)(Figura 4b). Removendo os resultados outliers (que excedem os limites de detecção dos testes), ainda assim a produção de TNF-α foi maior nas células induzidas por LPS em comparação às células não induzidas (diferença média: 1373 pg mL⁻¹, CI95% 884-1862; valor p:<0,001, i²=100%) (Figura Suplementar 1a).

Na meta-análise de subgrupos, buscando avaliar o efeito da densidade celular nesse parâmetro, a produção de TNF- α foi favorecida pelo aumento da densidade celular (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 8546 pg mL⁻¹; IC95%: 8007-9086; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 105412 pg.mL⁻¹; IC95%: 102006 - 108818; p<0,001, I²=100%) (Figura 6). Esse comportamento também foi observado ao remover os outliers (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 754 pg.mL⁻¹; IC95%: 178 - 1329; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 2611 pg.mL⁻¹; IC95% : 1856 - 3367; p<0,001, I²=93,2%) (Figura Suplementar 2a).

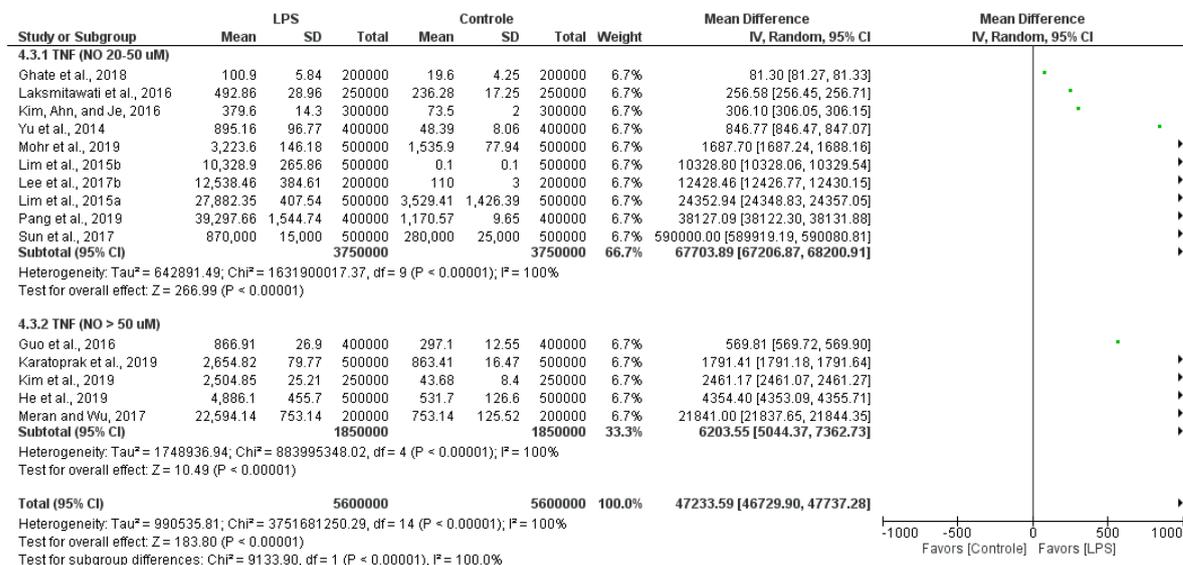
Figura 6 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular



Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Na análise da relação dos níveis de NO com o aumento ou diminuição dos níveis das citocinas, o grupo com produção de NO entre 20-50 μ M apresentou uma maior produção de TNF- α (67704 pg.mL⁻¹; IC95%: 67207 – 68201; p<0,001; I²=100%) quando comparados ao grupo com produção de NO acima de 50 μ M (6204 pg.mL⁻¹; IC95%: 5045-7363; p<0,001, I²=100%) (subgrupo: p<0,001, I²=100%) (Figura 7). Apesar disso, ao remover os outliers, a produção de TNF- α foi maior nas células com produção de NO acima de 50 μ M (20-50 μ M: 636 pg.mL⁻¹; IC95%: 445-826; >50 μ M: 1373 pg.mL⁻¹; IC95%: 884-1862; p<0,01, I²=86,3%) (Figura Suplementar 3a).

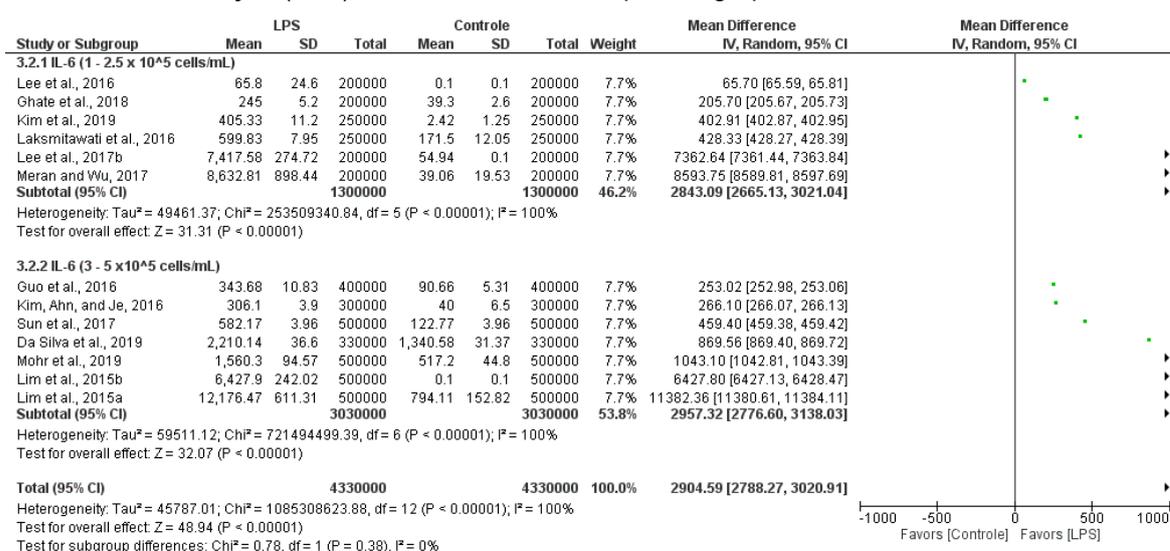
Figura 7 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de níveis de produção de Óxido Nítrico



Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Para a análise da correlação entre os níveis de NO e a IL-6, um total de 13 estudos foram incluídos na meta-análise. Inicialmente, observamos que a produção de IL-6 foi significativamente maior nas células induzidas por LPS (diferença média: 2.905 pg.mL⁻¹; IC95%: 2788-3021; p<0,001; i²=100%) (Figura 4c). O mesmo foi

Figura 8 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-6 entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular

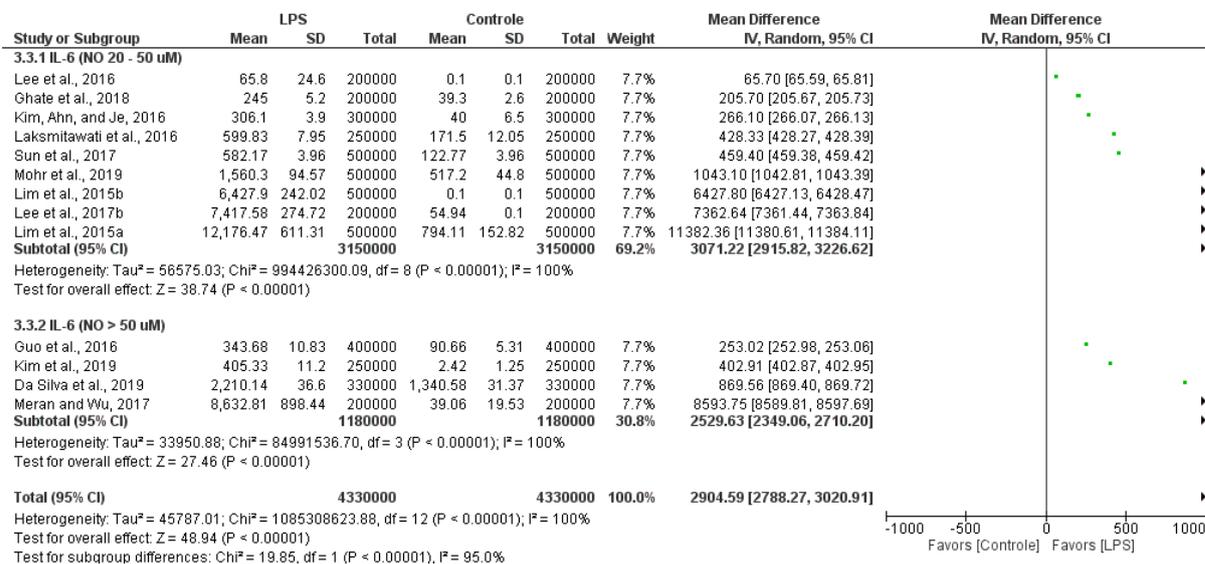


Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

observado com a remoção dos outliers (diferença média: 391 pg.mL⁻¹; IC95%: 296-485; p<0,001; i²=100%) (Figura Suplementar 1b). Em relação à densidade celular, não houve diferença entre os subgrupos (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 2843 pg.mL⁻¹; IC95%: 2665 -3021; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 2957 pg.mL⁻¹ ; IC95%: 2777-3138; p>0,05, i²=0%) (Figura 8).

Removendo outliers, o aumento da densidade celular acarretou em um aumento na produção de IL-6 (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 276 pg.mL⁻¹; IC95%: 137-415; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 505 pg.mL⁻¹; IC95%: 370-641; p<0,05, i²=81,4%) (Figura Suplementar 2b). Em relação aos subgrupos de NO, a produção de IL-6 foi maior no grupo 20-50 µM (3071 pg.mL⁻¹; IC95%: 2916-3227; p<0,001, I²=100%) quando comparado ao grupo com produção de NO acima de 50 µM (2530 pg.mL⁻¹; IC95%: 2349-2710; p<0,001, I²=100%) (Figura 9), mas com a remoção dos outliers não houve diferença significativa entre os grupos (subgrupo: p=0,39, I²=0%) (Figura Suplementar 3b).

Figura 9 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-6 entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de níveis de produção de Óxido Nítrico



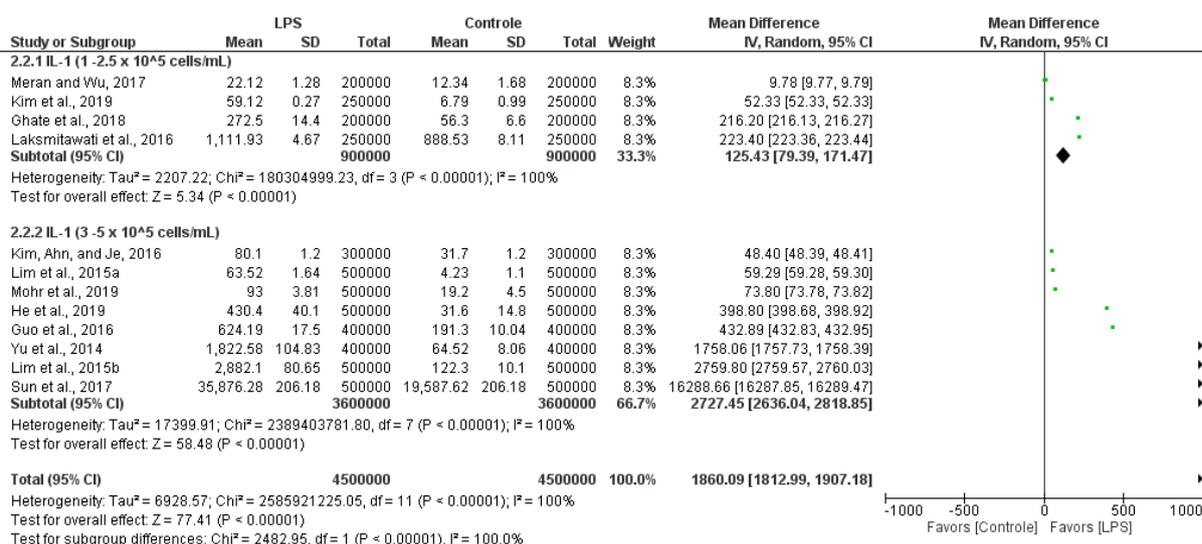
Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade

Para a meta-análise da IL-1β, 12 estudos foram inicialmente incluídos. Como mencionado anteriormente, a produção de IL-1β foi significativamente maior nas células induzidas por LPS em comparação com as células não induzidas (diferença média: 1860 pg.mL⁻¹; IC95%: 1813-1907; p<0,001; i²=100%) (Figura 4d). Após a remoção de outliers, ainda assim os níveis de IL-1β aumentaram a favor das células

induzidas por LPS (diferença média: 548 pg.mL⁻¹; IC95%: 517-580; p<0,001; i² = 100%) (Figura Suplementar 1c).

Na análise por subgrupos de densidade celular, a produção de IL-1 β foi maior no grupo com maior densidade celular (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 125 pg.mL⁻¹; IC95%: 79- 172; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 2727 pg.mL⁻¹; IC95%: 2636 - 2819; p<0,001, i²=100%) (Figura 10). Mesmo com a remoção dos outliers, os níveis de IL-1 β aumentaram significativamente com o aumento da densidade celular (1 - 2,5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 125 pg.mL⁻¹; IC95%: 79 - 172; 3 - 5 x 10⁵ células.mL⁻¹: 790 pg.mL⁻¹; IC95%: 732 - 848; p<0,001, i²=99,7%) (Figura Suplementar 2c).

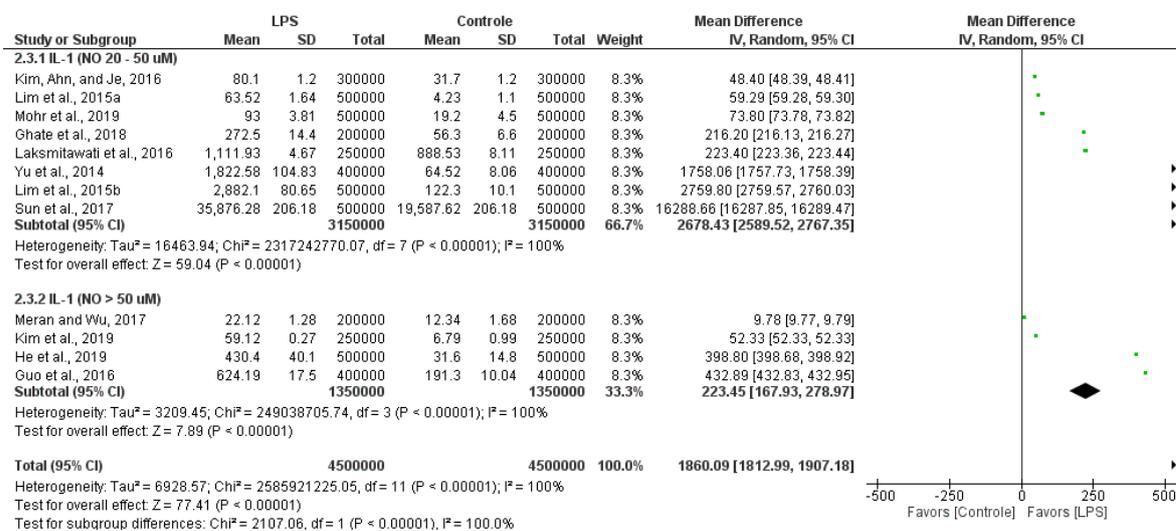
Figura 10 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular



Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Para a análise de subgrupo dos níveis de NO, a produção de IL-1 β foi maior nas células que produziram menos NO (20-50 μ M) (2678 pg.mL⁻¹; IC95%: 2590-2767; p<0,001; i²=100%) em comparação ao grupo com produção de NO acima de 50 μ M (223 pg.mL⁻¹; IC95%: 168 - 279; p<0,001; i²=100%) (Figura 11). Observamos que um estudo com produção de IL-1 β acima de 3.000 pg.mL⁻¹ (SUN et al., 2017) foi o responsável por essa diferença. Este estudo foi, portanto, tratado como um outlier e removido da análise.

Figura 11 - Forest plot das diferenças médias na produção de IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de níveis de produção de Óxido Nítrico

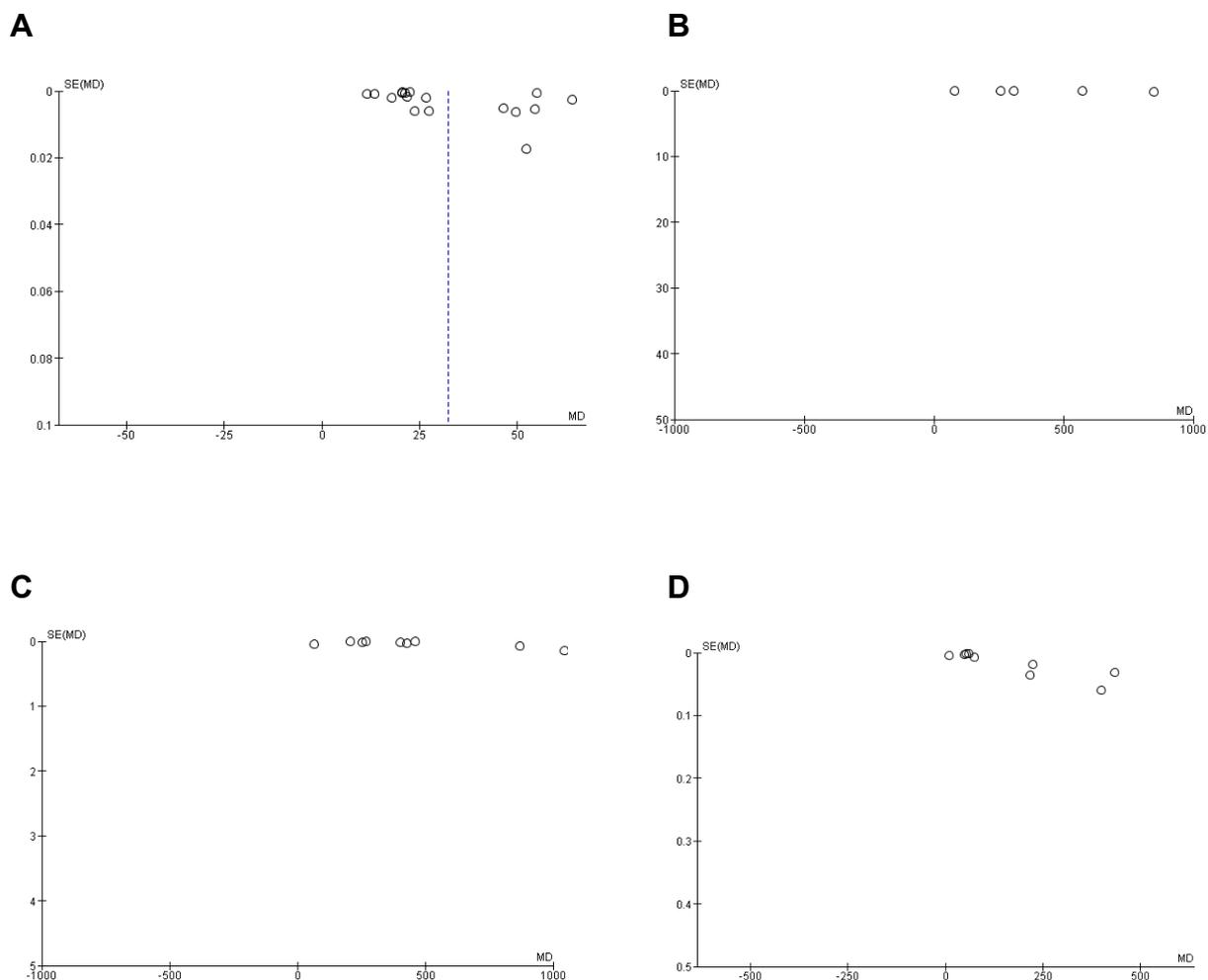


Legenda: CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade

Observamos que um estudo com produção de IL-1 β acima de 3.000 pg.mL⁻¹ (SUN et al., 2017) foi o responsável por essa diferença. Este estudo foi, portanto, tratado como um outlier e removido da análise. Apesar disso, ainda assim os níveis de IL-1 β foram maiores no grupo com produção de NO entre 20-50 μ M (20-50 μ M: 734 pg.mL⁻¹; IC95%: 679-789; >50 μ M: 223 pg.mL⁻¹; IC95%: 168 - 279; p<0,01, i²=100%) (Figura Suplementar 3c).

Nossa seleção de estudos envolveu critérios de inclusão rígidos, pois resultados específicos dos marcadores estudados foram necessários para a inclusão ou exclusão dos estudos nesta revisão. Por esse motivo, e como esperado, as análises tanto para o NO quanto para as citocinas estudadas, apresentaram viés de publicação de forma não heterogênea (assimétrica), conforme demonstrado pela análise dos gráficos de funil (Figura 12).

Figura 12 - Gráficos de funil da relação da diferença média (MD) entre o grupo de intervenção (LPS) e o grupo de controle, e erro padrão [SE (MD)] de cada grupo de dados dos estudos incluídos nesta meta-análise



Legenda: A) Óxido Nítrico (NO); B) Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α); C) Interleucina-6 (IL-6); D) Interleucina-1-beta (IL-1 β). Diferença média: MD; Erro padrão: SE(MD) Lipopolissacarídeo: LPS.

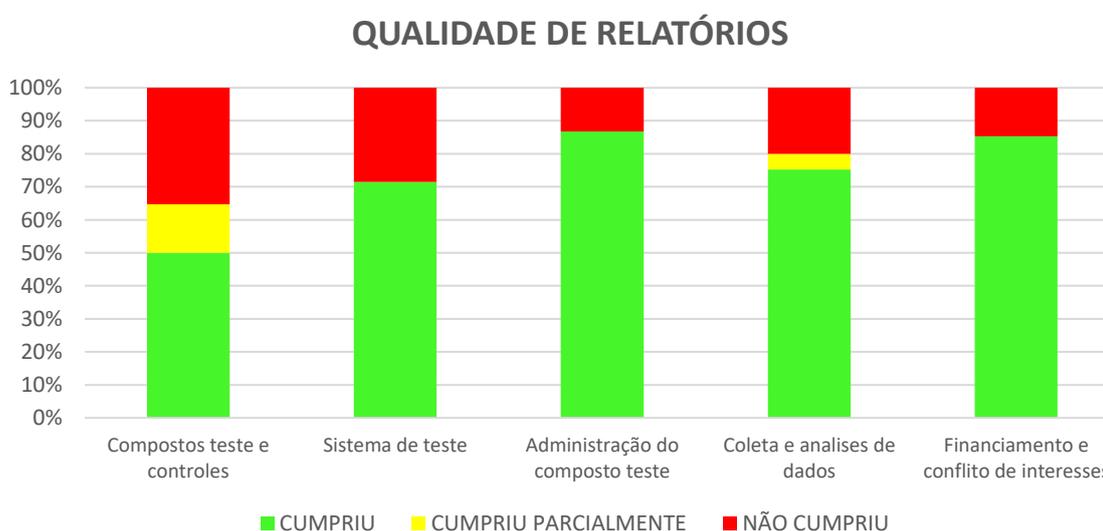
5.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

A concordância entre os revisores quanto à Qualidade de relatórios e Qualidade Metodológica foi de 82,35% e 94,12%, respectivamente. Todas as discrepâncias foram removidas por dois especialistas. Em relação à qualidade metodológica, a maioria dos estudos (15) apresentou baixo risco de viés e dois tiveram risco moderado de viés. Nenhum estudo teve um alto risco de viés. Em relação à qualidade dos

relatórios, oito dos 17 estudos tiveram risco moderado, enquanto 9 tiveram baixo risco de viés (Planilha 1 – Material Suplementar).

Em todos os critérios de avaliação do SCIRAP, houve um item que não foi contemplado por quase nenhum dos estudos, mas que consideramos fundamental para a qualidade dos artigos. Por exemplo, na sessão de compostos de teste e controles, apenas um autor (LEE et al., 2017a) descreveu o veículo usado para diluir os compostos. Da mesma forma, na sessão do sistema de teste, apenas dois autores (KIM et al., 2019; MOHR et al., 2019) relataram o número de passagens celulares utilizadas para realizar os experimentos e nenhum autor forneceu informações sobre as medidas tomadas para rastrear ou evitar contaminações por micoplasma, bactérias, fungos ou vírus. Além disso, apenas dois autores (GUO et al., 2016; LEE et al., 2017a) forneceram informações completas sobre a toxicidade do composto de teste, bem como do agente flogístico (LPS), que foi o principal motivo de redução da qualidade dos relatórios dos estudos incluídos na sessão de coleta e análises dos dados. (Figura 13).

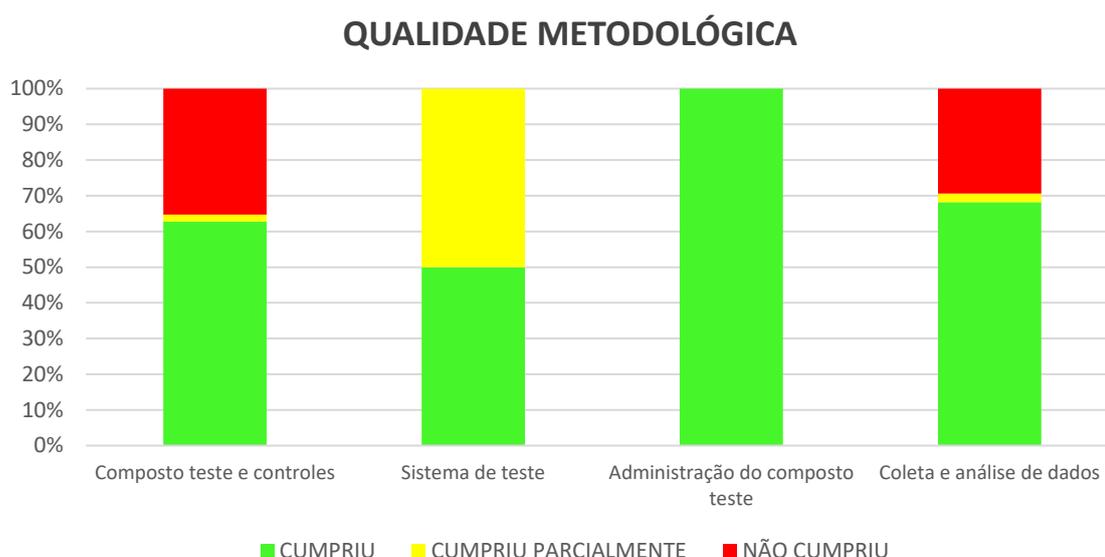
Figura 13 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Qualidade de relatórios



Na qualidade metodológica, a falta de informações sobre o veículo utilizado, bem como a falta de testes para verificar a interferência de possível citotoxicidade dos compostos nos resultados, foram os aspectos negativos que estiveram presentes em praticamente todos os estudos. Além disso, nove estudos não forneceram informações sobre réplicas ou repetições dos experimentos para verificar a

reprodutibilidade/confiabilidade dos resultados, fator que reduziu o cumprimento de critérios na qualidade metodológica no quesito de coleta e análise de dados. É importante notar que todos os estudos forneceram informações completas e foram extremamente confiáveis em relação à administração do composto de teste. Isso era esperado, dado o rigor dos critérios de elegibilidade pré-estabelecidos (Figura 14).

Figura 14 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Qualidade metodológica.



Em relação ao agente flogístico (LPS), consideramos os efeitos do LPS com relevância indireta para todos os estudos que não forneceram informações sobre os fabricantes ou fontes das cepas de LPS utilizadas. Os demais itens (sistemas de teste, endpoint e concentrações) foram considerados de relevância direta. Para o sistema testado, como esperado, todos os estudos tiveram relevância direta, pois o modelo experimental em células RAW 264.7 induzidas por LPS foi o mais utilizado para mimetizar o processo inflamatório *in vitro*, e foi um dos critérios de elegibilidade utilizados para a inclusão de estudos. Da mesma forma, em termos de endpoint e concentração, todos os artigos também tiveram relevância direta, pois os estudos deveriam atender a critérios de elegibilidade específicos no momento da coleta/tratamento e uma determinada concentração de LPS (Figura 15).

Todos os estudos foram considerados confiáveis, com restrições (Figura 16), pois nenhum atendeu totalmente às diretrizes quanto à qualidade de relatórios e qualidade metodológica. Em resumo, os estudos apresentaram algumas restrições quanto à origem das cepas celulares, número de passagens realizadas no experimento, bem como o controle microbiológico (Todos os estudos). Além disso, a falta de informações sobre testes de toxicidade, bem como de réplica e repetições experimentais, foi observado na grande maioria dos trabalhos.

Figura 15 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Relevância dos estudos

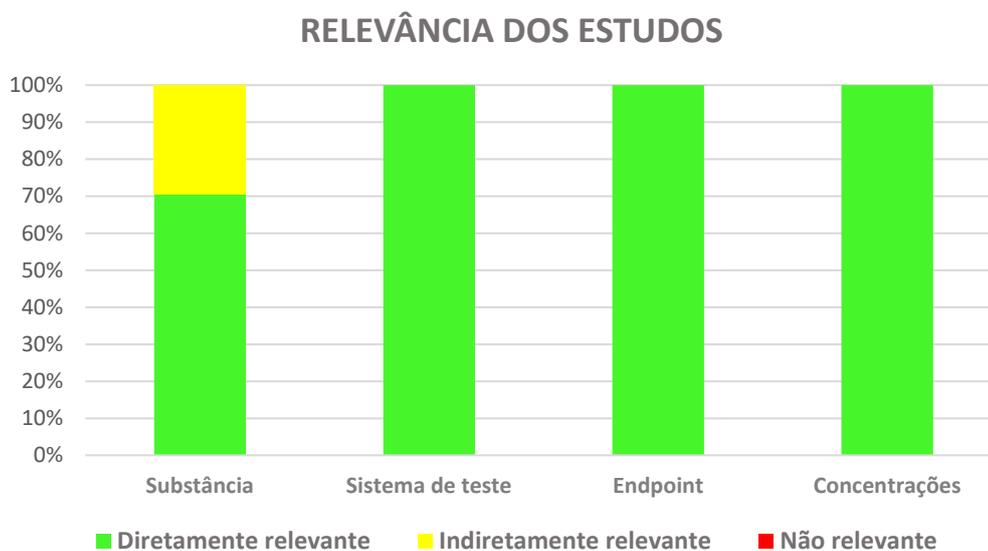


Figura 16 - Resumo do risco de viés dos estudos incluídos – Confiabilidade dos estudos incluídos



6 DISCUSSÃO

Nesta revisão sistemática e meta-análise, conseguimos demonstrar a eficácia da utilização das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 como biomarcadores inflamatórios *in vitro* no modelo celular RAW 264.7 induzido por LPS, além disso foi demonstrado que a dosagem dos níveis de NO ainda pode ser considerado o ensaio padrão para testar agentes anti-inflamatórios.

Como esperado, os níveis de NO aumentaram significativamente quando as células RAW 264.7 foram inflamadas a partir da indução com LPS em comparação com células não inflamadas, isso ocorreu independentemente da densidade celular, porém os níveis de citocinas demonstraram uma mudança de acordo com a variabilidade da densidade celular nesses experimentos.

Após essa triagem inicial, constatou-se que todas as citocinas estudadas são excelentes biomarcadores inflamatórios, tendo em vista que em todos os estudos onde os níveis de NO produzido pelas células RAW 264.7 induzidas por LPS foram superiores a 20 μ M, as citocinas também estavam significativamente aumentadas em relação ao grupo controle. Além disso, todos os níveis de citocinas apresentaram correlação positiva com a densidade celular utilizada nos experimentos. No entanto, uma significativa heterogeneidade foi encontrada entre os estudos, principalmente devido às diferentes metodologias apresentadas pelos autores. Portanto, é essencial padronizar o modelo de inflamação em células RAW 264.7, seguindo algumas diretrizes específicas para experimentação *in vitro*.

Considerando nossos resultados, é importante destacar que devido ao modelo escolhido para a revisão e às características dos estudos incluídos, uma meta-análise pôde ser realizada. O modelo de estudo, utiliza o LPS como agente flogístico, que é um dos principais componentes da membrana de bactérias gram-negativas (ROMERIO; PERI, 2020). Esse agente tem como característica, ativar os receptores Toll-like, principalmente o receptor Toll-like 4, presentes nas células do sistema imunológico, incluindo os macrófagos. Dessa forma, nas infecções por bactérias Gram-negativas, nas fases iniciais do processo de sepse, essa interação entre o LPS e os receptores celulares leva à ativação de cascatas de sinalização intracelular, ativando diversos fatores de transcrição nuclear. Isso resulta em secreção maciça de vários mediadores pró-inflamatórios, como NOx, TNF- α , IL-1 β e IL-6, marcadores foco de nossa pesquisa (POLTORAK et al., 1998; CIESIELSKA; MATYJEK;

KWIATKOWSKA, 2021). Por esta razão, já é esperado que ocorra um aumento paralelo de NO e as citocinas estudadas quando as células em cultura são estimuladas com LPS (DAI et al., 2018). Porém, um detalhe técnico importante na cultura de células RAW 264.7 deve ser levado em consideração, que é o tempo de incubação das células após a indução com LPS. Isso por que embora a ação do TLR4 pelo LPS culmine na produção de diversos mediadores inflamatórios, sua liberação pelas células apresenta um tempo de secreção diferente (HOBBS et al., 2018). Esse fato pode produzir resultados diferentes nas dosagens dos níveis desses mediadores inflamatórios, inviabilizando a comparação direta entre eles (RAHMAN; MCFADDEN, 2011; LIU et al., 2017).

Conforme comentado anteriormente na seção de introdução, esse modelo é amplamente difundido entre os laboratórios de pesquisa em todo o mundo, pois fornece informações ricas sobre a resposta inflamatória e ajuda a iniciar a busca por novos agentes anti-inflamatórios e imunomoduladores (ELISIA et al., 2018; TACIAK et al., 2018). No entanto, ainda há falta de padronização em relação às doses de LPS, tempo de indução celular, densidade celular utilizada, entre outros. Para resolver essas deficiências na padronização desse modelo inflamatório, a revisão sistemática foi extremamente rigorosa e criteriosa na aplicação dos critérios de elegibilidade e na extração dos dados, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Nossos resultados demonstram, como esperado, que há um aumento na produção de NO quando células RAW 264.7 são induzidas por LPS (MOORE et al., 2019; RANAWEERA et al., 2020). Assim, considerando as características dos estudos incluídos na meta-análise, é plausível afirmar que a dosagem de NO no modelo em questão é suficiente para fins de triagem inflamatória inicial, considerando que a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β acompanha o mesmo comportamento observado com a determinação dos níveis de NO, pelo menos, quando o tempo de incubação celular após estimulação com LPS está entre 12 e 24 horas. Esse dado é importante porque, até onde se sabe, não há padronização entre os pesquisadores quanto à escolha dos mediadores inflamatórios iniciais a serem medidos nesse modelo, na triagem de uma possível atividade anti-inflamatória ou imunomoduladora de compostos provenientes de síntese, semi-síntese ou extratos de produtos naturais. Além disso, também constatamos que não há consenso entre os pesquisadores quanto aos biomarcadores inflamatórios utilizados para essas triagens,

bem como a densidade celular a ser utilizada, concentração de LPS, tempo de indução e uso de suplementação do meio de cultura.

Assim, levando em consideração as informações coletadas, aconselhamos fortemente que a utilização das dosagens de NO seja padronizada quando utilizadas para triagem de possíveis compostos com atividade anti-inflamatória. Obviamente, levar em consideração as particularidades de cada laboratório é extremamente importante, porém, o uso de LPS na dose de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, densidade celular entre 1 e $9,9 \times 10^5 \text{ células.mL}^{-1}$ e tempo de incubação entre 12 e 24 horas a 37°C , parecem ser os requisitos mínimos para esta padronização.

Finalmente, em relação ao risco de viés e heterogeneidade dos estudos incluídos nesta meta-análise, é plausível afirmar que, justamente devido a essa falta de padronização, os pesquisadores selecionaram uma variedade diferente de marcadores para seus experimentos individualmente. Além disso, pontos bem específicos tiveram destaque em relação a avaliação da qualidade dos estudos incluídos em nosso trabalho. Apesar da grande maioria dos trabalhos apresentarem informações bem completas, alguns quesitos importantes como veículo utilizado e testes de citotoxicidade, foram fatores bastante negligenciados por quase todos os autores e que consideramos que sejam cruciais para qualquer estudo que utilize cultura de células como plataforma experimental.

Por fim, em nosso estudo foi demonstrado que, quando utiliza-se o cultivo de células RAW 264.7 induzido por LPS como plataforma experimental inicial, apenas a medição dos níveis de NO são suficientes para tirar as conclusões iniciais quando se busca determinar se algum composto deve ou não ser submetido às próximas etapas de experimentação para avaliação das suas atividades anti-inflamatórias. Ainda é importante salientar que, a utilização de um único marcador é extremamente interessante, tendo em vista a viabilidade econômica, uma vez que a técnica é de fácil execução, com boa reprodutibilidade e com baixo custo, além de ser mais rápida do que a utilização de vários marcadores em conjunto.

7 CONCLUSÃO

A medição dos níveis de NO é uma opção suficiente e racional para iniciar ensaios de triagem no intuito de verificar a ação anti-inflamatória e imunomoduladora de qualquer composto ou produto utilizando o modelo *in vivo* com células RAW 264.7

induzidas por LPS como plataforma experimental. No entanto, experimentos futuros precisam seguir algumas regras de padronização, buscando evitar essas diferentes abordagens experimentais, facilitando o entendimento e interpretação de resultados, bem como a comparação entre trabalhos de diferentes autores. Nesse contexto, nosso estudo sugere um checklist básico de 30 itens a serem contemplados por pesquisadores em futuros experimentos com NO e citocinas utilizando macrófagos RAW 264.7, que podem ajudar a prevenir o uso desnecessário de animais e o desperdício de tempo e recursos (Material Suplementar - Tabela Suplementar 1).

CAPÍTULO 2

ESTUDO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE DERIVADOS DA 1,4-DIHIDROPIRIDINA EM MODELOS EXPERIMENTAIS IN VITRO E IN VIVO.

8 DESENVOLVIMENTO

8.1 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO AGUDA PULMONAR

A síndrome do desconforto respiratório (SDRA) foi descrita pela primeira vez em 1967 e trata-se de um processo complexo que normalmente se desenvolve após uma injúria tecidual, que nesse caso é referida como lesão pulmonar aguda (LPA). Essa condição possui diversas etiologias, podendo evoluir para insuficiência respiratória e em muitos casos à morte. O tratamento é focado em suporte, com ajuda de ventilação mecânica e uso de corticosteroides (ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK, 2000; BUTT; KURDOWSKA; ALLEN, 2016).

As pesquisas atuais tem o enfoque em entender os biomarcadores plasmáticos causadores da SDRA e que ajudem também no prognóstico, tendo como objetivo diagnosticar a LPA antes que a mesma evolua para o desenvolvimento de SDRA. Isso porque na maioria dos casos, a SDRA se desenvolve cerca de 2 a 5 dias após a hospitalização e desenvolver terapias que interrompam a progressão da LPA pode contribuir pra diminuição da mortalidade desses pacientes (RUTHMAN; FESTIC, 2015).

A evolução clínica da LPA/SDRA se divide didaticamente em dois estágios. O primeiro é caracterizado por exsudação, com aumento da permeabilidade vascular e aumento de fluído pulmonar após um dano excessivo à células endoteliais e comprometimento da função tecidual. Posteriormente, ocorre uma fase de regeneração tecidual, com proliferação de fibroblastos e aumento da capacidade fagocítica de macrófagos, com o intuito de remover restos celulares e demais células inflamatórias. Nesse momento se inicia a restauração do tônus vascular e o tecido reestabelece a capacidade de oxigenação. Em algumas situações, esse estágio de deposição de tecido fibrótico pode persistir, o que leva a um aumento de deposição de colágeno e aumento de fibrose no tecido pulmonar (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; MOKRA, 2020).

Ao longo das últimas décadas, muitos esforços e recursos foram investidos no entendimento da LPA em experimentos, mas apesar disso, não existe ainda um consenso universal quanto as características do desenvolvimento da LPA em modelos experimentais animais. Isso se deve em parte ao fato de não existir um único marcador ou parâmetro que tenha sensibilidade e especificidade para identificar a ocorrência e

gravidade da LPA, o que torna muito difícil para pesquisadores entender se atingiram ou preveniram a lesão pulmonar em modelos experimentais. Além disso, os critérios utilizados para a definição de LPA em humanos dificilmente podem ser traduzidos diretamente para animais em modelos experimentais. (MATUTE-BELLO et al., 2011).

Entretanto, os modelos experimentais em animais que visam mimetizar a LPA de humanos, são ferramentas extraordinárias para entender os diferentes mecanismos da doença e conseguem em parte reproduzir os eventos celulares e moleculares que ocorrem em humanos, permitindo uma análise, mesmo que preliminar, a respeito de candidatos a agente anti-inflamatórios que possam ajudar no controle da doença (DOMSCHEIT et al., 2020). Dentre esses modelos animais, aqueles que utilizam LPS em roedores, têm sido amplamente utilizados, por conta da fácil disponibilidade, logística e custos relativamente baixos. Entretanto, pouco volume de sangue e sensibilidade mais baixa a endotoxemia, são algumas desvantagens quando comparado a outras espécies. O uso de carneiros, por exemplo, é destaque em estudos envolvendo fisiopatologia microvascular e permeabilidade pulmonar devido ao fácil acesso ao sistema linfático pulmonar e aumento do fluxo linfático em resposta a pequenas doses de endotoxinas. Enquanto o uso de suínos apresenta algumas vantagens por ser uma espécie que possui semelhanças no que diz respeito à anatomia, genética e fisiologia em relação a humanos (WIENER-KRONISH et al., 1991; WYNS et al., 2015; DOMSCHEIT et al., 2020).

A LPA induzida por LPS em camundongos é um dos modelos mais utilizados e difundidos para o entendimento da SDRA, principalmente por mimetizar muito bem a resposta neutrofílica aguda apresentada por humanos. Essa lesão pode ser induzida a partir de instilação traqueal ou por inalação, onde o epitélio alveolar é a principal estrutura danificada. Ocorre uma migração excessiva de células inflamatórias para o tecido pulmonar, que tende a cessar após 72 horas, apresentando posteriormente uma fase de fibrose (MENEZES et al., 2005; MATUTE-BELLO et al., 2011; DOMSCHEIT et al., 2020).

Os modelos experimentais de LPA utilizando LPS costumam ser de fácil padronização e execução. Além disso, são extremamente eficientes para avaliar a atividade farmacológica de compostos sobre as vias intracelulares que envolvem a ativação do TLR-4 e seus respectivos mediadores (CHEN; BAI; WANG, 2010). Como já abordado no capítulo anterior, a resposta inflamatória ao LPS se inicia após a ligação ao receptor TLR-4 e em decorrência, proteínas adaptadoras intracelulares se

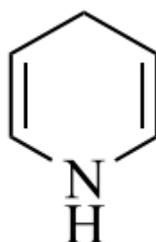
ancoram ao receptor e ativam cascatas de sinalização intracelular, como a via das MAPKs e NF- κ B, regulando a expressão de diversos genes envolvidos no processo inflamatório. Por esse motivo, a utilização do LPS como agente flogístico em modelos de LPA é extremamente difundido, pois ativa de maneira significativa o sistema imune inato, estimulando a migração de leucócitos, com pico de migração de neutrófilos em 24 horas após a indução, e produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e NO (MATUTE-BELLO et al., 2011; ALTEMEIER; HUNG; MATUTE-BELLO, 2017; DOMSCHEIT et al., 2020).

8.2 DIHIDROPIRIDINAS

A química heterocíclica é e continuará sendo por muito tempo a espinha dorsal da química medicinal. É difícil pensar em estruturas químicas de drogas, sejam elas de origem sintética ou de fontes naturais, que não estejam ancoradas nessas estruturas. Dentre essa gama de compostos heterocíclicos, a 1,4-Dihidropiridina (1,4-DHP) tem desempenhado um papel importante na química sintética, medicinal e bioorgânica para o desenvolvimento de novas moléculas com atividades biológicas importantes (MISHRA; BAJPAI; RAI, 2019).

O químico alemão Arthur Hantzsch, descreveu a preparação da 1,4-Dihidropiridina (figura X) há mais de um século. Os derivados dihidropiridínicos (DHPs) representam um grupo de pequenos compostos orgânicos baseados em um núcleo de piridina. A principal característica da 1,4-dihidropiridina é que um ou mais dos seus 6 átomos podem ser substituídos para obter diferentes derivados (KHEDKAR; AUTI, 2014).

Figura 17 - Estrutura química da 1,4-Dihidropiridina



Fonte: Adaptado de Mishra et al., 2019

As DHPs representam um grupo de pequenos compostos orgânicos baseados em um núcleo de piridinico. Teoricamente, podem existir cinco isômeros de DHPs, entretanto, a maioria dos DHPs reconhecidos tem a sua estrutura baseada na 1,2-dihidro ou 1,4-dihidropiridina. Esses compostos possuem uma gama de ações farmacológicas já descritas, como vasodilatadores, broncodilatadores, hepatoprotetores, neuro protetores, anti-ateroscleróticos, antidiabéticos, antitumorais, antimutagênicos, antioxidantes, antimicrobianos, anti-hipertensivo, antimalárico, anticonvulsivantes e anticoagulantes (SAFAK; SIMSEK, 2006; EDRAKI et al., 2009; KHEDKAR; AUTI, 2014).

No corpo humano o cálcio é um segundo mensageiro em diversos tecidos e desempenha papel chave em diversas funções fisiológicas. Esses efeitos se dão a partir da sua entrada nas células por meio dos canais de cálcio, produzindo diferentes efeitos fisiológicos a depender do tipo de canal envolvido na resposta. Esses canais são importantes não só no funcionamento normal de diversos tecidos, mas também em patologias que afetam diretamente células neuronais, neuro-secretoras e células musculares. Esses canais foram classificados como N, L, P, Q e R. Canais do tipo L, estão presentes na musculatura lisa dos vasos coronarianos, no coração e nos vasos arteriais periféricos. Medicamentos derivados da 1,4-DHP, como o nifedipino e o amlodipino, tem sido utilizado para tratamento de angina miocárdica e hipertensão, devido à sua capacidade de bloquear esses canais de cálcio tipo L. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da corrente desses canais no músculo liso, diminuindo assim a concentração de cálcio intracelular e induzindo o relaxamento do músculo liso, causando assim, proteção vascular tanto no músculo liso quanto no endotélio (CRESPI, 2005; EDRAKI et al., 2009).

Além da sua conhecida ação vasodilatadora, recentemente, compostos ou medicamentos derivados da 1,4-DHP tem apresentado significativa atividade anti-inflamatória em diversos estudos, e tem se mostrado importante no manejo de algumas doenças. A exemplo disso, é evidente o efeito pleiotrópico do nifedipino, que além de exercer seus efeitos vasodilatadores no tratamento da hipertensão arterial, ainda apresenta efeito na inibição da inflamação vascular e subsequentemente melhora da função endotelial em doenças cardiovasculares, retardando o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (TOYODA et al., 2018).

Outros estudos, também demonstraram que o azelnidipino reduz a inflamação no endotélio a partir de suas propriedades antioxidantes, além de inibir a produção de

IL-8, uma citocina com papel importante na quimiotaxia de neutrófilos e conseqüentemente nas respostas inflamatórias agudas. Somado a isso, o azelnidipino também inibe a proliferação de células musculares lisas vasculares, etapa importante no desenvolvimento de placas ateroscleróticas (YAMAGISHI et al., 2004). O azelnidipino também parece ter um efeito anti-aterosclerótico devido a sua capacidade de inibir a expressão de receptores de LDL e moléculas de adesão em monócitos humanos (THP-1), desempenhando um papel importante na redução da aterosclerose, não apenas pela regulação da pressão sanguínea, mas também pela prevenção da ativação/diferenciação de monócitos/macrófagos humanos (KOMODA et al., 2018).

Devido o constante aumento do interesse nas atividades anti-inflamatórias de derivados da 1,4-DHP, alguns mecanismos estão sendo sugeridos para esses efeitos. Em alguns modelos experimentais, a inibição de vias que ativam fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B, parece estar diretamente relacionado a atividade desses compostos, ocasionando uma redução da produção de EROs, inibindo fatores quimiotáticos de monócitos e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (MATSUMORI; NUNOKAWA; SASAYAMA, 2000; SARADA et al., 2012).

Como citado no início desse tópico, a 1,4-DHP é uma molécula versátil, que pode gerar inúmeros derivados e conseqüentemente compostos que podem apresentar diferentes características quanto à sua atividade biológica. Devido justamente a essa versatilidade, além dos medicamentos existentes no mercado baseados na sua estrutura, as DHPs continuam e provavelmente continuarão sendo compostos extremamente estudados, o que pode gerar a médio e longo prazo, novas opções terapêuticas de interesse para a indústria farmacêutica na produção de novos medicamentos.

9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito anti-inflamatório dos compostos derivados da 1,4-dihidropiridina (1,4-DHP) selecionados, através de estudos *in vitro* e *in vivo*.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9.2.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO* (CÉLULAS RAW 264.7 INDUZIDAS POR LPS)

- Avaliar a citotoxicidade dos derivados da 1,4-DHP selecionados sobre macrófagos RAW 264.7;
- Investigar ação dos compostos selecionados sobre a produção de óxido nítrico (NOx) por macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS;
- Investigar a ação dos compostos selecionados sobre a produção das citocinas: Interleucina-12p70 (IL-12p70), Fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon-gamma (INF- γ), Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-10 (IL-10) por macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS;
- Investigar a ação dos compostos selecionados sobre o aumento/redução da atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7.

9.2.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO* (MODELO DE LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS EM CAMUNDONGOS)

- Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre a migração de leucócitos e exsudação no lavado bronco alveolar dos camundongos;
- Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e concentrações dos metabólitos do Óxido Nítrico (NOx);
- Investigar o efeito dos compostos selecionados sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

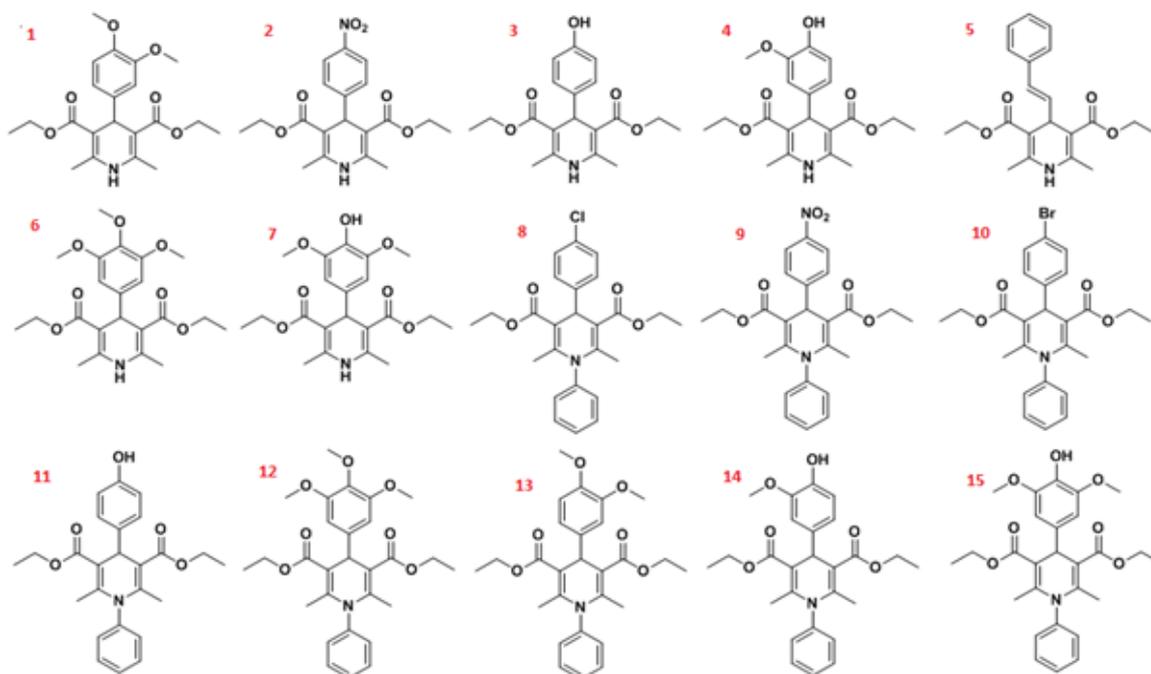
10.1 IN VITRO

10.1.1 OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS

Os derivados da 1,4-DHP utilizados neste estudo foram produzidos e fornecidos pelo aluno de Doutorado Luiz Antonio Escorteganha Pollo 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 Pollo *et al.*, (2017). A partir da molécula de 1,4-DHP, outros 15 novos compostos foram sintetizados. Todos eles foram utilizados neste estudo para avaliação das suas propriedades anti-inflamatórias/imunomodulatórias (Figura 18).

Figura 18 - Estruturas químicas de derivados de 1,4-diidropiridina (1-15)



10.1.2 CULTURA CELULAR

Para os experimentos *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7. As células foram cedidas pela Professora Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As células foram mantidas em estufa à 5% de CO₂ com umidade e temperatura (37°C) controladas. O meio de cultura utilizado foi preparado com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com Soro Fetal Bovino (10%) e Penicilina à 1%. Todos os experimentos foram realizados entre a 3^a e a 8^a passagem celular e com confluência de aproximadamente 80%. Todo o material utilizado foi devidamente esterilizado e utilizado em local apropriado e isento de microrganismos contaminantes.

10.1.3 VIABILIDADE CELULAR COM AZUL DE TRIPAN

Os experimentos foram conduzidos após verificação prévia da viabilidade celular. A verificação se realizou pela quantificação das células viáveis através da técnica de azul de Tripán. Essa técnica se baseia na capacidade que o corante apresenta em atravessar o citoplasma de células mortas (não viáveis), corando-as de azul. Sendo assim, antes de cada experimento, as células foram descoladas das garrafas, centrifugadas e ressuspendidas em 5mL de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada em um eppendorf, onde foi acrescentado o corante azul de Tripán, em uma diluição 1:2. Após homogeneização, 10µL foram transferidos para uma câmara de Neubauer. Todas as células não coradas (viáveis) foram contadas nos 4 quadrantes com o auxílio de um microscópio óptico comum (aumento de 400x). O número obtido foi utilizado para realização dos plaqueamentos em placas de 96 poços nas concentrações necessárias.

10.1.4 ENSAIO DE CITOTOXIDADE

Os compostos derivados da 1,4-DHP em estudo passaram pela avaliação do potencial de citotoxicidade. Nesse caso, a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 foi mensurada após o tratamento dos mesmos com as diferentes concentrações

dos compostos estudados (10-1000 μM). Para isto, utilizou-se o teste de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]). O ensaio baseia-se em um composto amarelo que, ao entrar em contato com mitocôndrias ativas tem seu anel tetrazólico clivado, transformando-se em um composto de coloração azul escuro, denominado formazan {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}. Sendo assim, este teste colorimétrico mensura a quantidade de células viáveis a partir da formação de cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais.

Em uma placa de 96 poços, macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em uma concentração estimada de 5×10^4 células/poço. Após o plaqueamento, as células foram incubadas durante 24 horas (temperatura 37°C e CO_2 à 5%) para a adesão e proliferação das mesmas. Posteriormente, cada poço foi tratado com as concentrações estipuladas para os compostos (1000, 300, 100, 30, e 10 μM). A placa contendo as células com os compostos em diferentes concentrações passou novamente por um período de incubação de 24 horas e após esse período o sobrenadante foi descartado e substituído pela solução de MTT. Decorridas duas horas, o MTT foi retirado e os cristais ressuspensos com DMSO, para a leitura da densidade óptica em 540nm em leitor de microplacas, modelo ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN).

A partir deste teste, foi possível determinar as concentrações de CC_{10} de cada composto, ou seja, a concentração do composto que mata 10% das células, e conseqüentemente mantém uma viabilidade celular de 90%. Estas concentrações foram calculadas por regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular). Estes cálculos foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

10.1.5 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-6

Para análise das concentrações de IL-6, macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em uma concentração estimada de 5×10^4 células/poço. Após o plaqueamento, as células foram incubadas durante 24 horas (temperatura 37°C e CO_2 à 5%) para a adesão e proliferação das mesmas. Posteriormente as células foram tratadas com derivados da 1,4-DHP em suas respectivas CC_{10} (Apenas compostos com $\text{CC}_{10} > 60 \mu\text{M}$) e após 1 hora todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados

com LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$), por mais 24 horas. Os grupos foram divididos em: Controle negativo (branco/veículo), controle positivo (LPS $1\mu\text{g}/\text{mL}$), controle de referência (Dexametasona $7\mu\text{M}$) e tratamento com os compostos. Após o período de tratamento, alíquotas do sobrenadante das culturas celulares foram coletadas para determinação das concentrações de IL-6. Neste protocolo foi utilizado um kit comercial com anticorpos monoclonais específicos para IL-6. Uma curva-padrão com concentrações conhecidas de IL-6 foi utilizada para a quantificação dos valores desconhecidos com auxílio da equação da reta. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (IL-6, eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA, Cat 13-7062-81). As leituras da citocina nas amostras e suas respectivas curvas-padrão foram estimadas por meio de suas medidas colorimétricas (450 nm), realizadas em leitor de placas de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/ml.

10.1.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO

A partir da dosagem de IL-6, foi selecionado o composto que apresentou a melhor taxa de inibição dessa citocina. Esse composto foi então utilizado para experimentos subsequentes. Nesse caso, a dosagem de NO foi realizada para estabelecer a IC_{50} desse composto, ou seja, a menor dose necessária para inibir em até 50% a produção desse mediador em comparação ao grupo de controle positivo (Células induzidas apenas com LPS).

A produção de NO, foi mensurada indiretamente, sendo quantificada pela formação de seus metabólitos em nitrito (NO_2^-), através da reação de Griess (GREEN et al., 1982).

Para o experimento, foram utilizadas placas de 96 poços com concentração celular de 5×10^4 células/poço e incubação por 24 horas até que as placas apresentassem confluência celular adequada, de aproximadamente 80%. Posteriormente, os macrófagos foram pré-tratados com as doses de 0.3, 1, 3, 10 e 30 μM do compostos selecionado a partir dos ensaios de viabilidade celular e dosagem de IL-6, e após 1 hora, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) por mais 24 horas. Os grupos foram divididos em: Branco (veículo), controle

positivo (LPS 1µg/mL), controle de referência (Dexametasona 7µM) e tratamento com os compostos (0.3, 1, 3, 10 e 30µM).

Após a incubação de 24 horas em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), o sobrenadante foi coletado para a realização da dosagem dos metabólitos do NOx. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 50 µl do sobrenadante coletado e 50µl do reagente de Griess, seguido por incubação durante 40 minutos (em temperatura ambiente e ao abrigo de luz). Os reagentes empregados na reação apresentam a capacidade de reduzir nitrito, produzindo um composto de tonalidade rósea que representa a soma de todos os metabólitos presentes na amostra, quantificada através de densidade óptica à 540nm (DIRSCH et al., 1998). A leitura da densidade óptica foi realizada com o auxílio do leitor de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZX, CN).

10.1.7 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS

Para a quantificação de citocinas por citometria de fluxo, foram utilizadas placas de 96 poços em uma concentração celular de 5x10⁴ células/poço e incubadas durante 24 horas para confluência celular adequada. Posteriormente, os macrófagos foram tratados previamente com a IC₅₀ do composto selecionado e após uma espera de 1 hora, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS (1µg/mL), pelo período de 24 horas. Os grupos foram divididos em: Controle negativo (branco/veículo), controle positivo (LPS 1µg/mL), controle de referência (Dexametasona 7µM) e grupo de tratamento (composto selecionado na sua melhor concentração (IC₅₀)). Após a incubação de 24 horas em estufa (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), todo o sobrenadante foi coletado para a determinação das concentrações das citocinas pesquisadas.

As citocinas Interleucina-12p70 (IL-12p70), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), interferon-gama (INF-γ), proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-10 (IL-10) foram dosadas utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA)–Cell Inflammation (BD) (Biosciences, San Diego, CA, EUA), usando o FACSVerse® Flow Cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA).

Esta metodologia demonstra a captura de um ou mais analitos solúveis, com tamanho e fluorescência conhecida, podendo ser utilizado em citometria de fluxo,

sendo que a fluorescência varia de acordo com cada citocina marcada e pesquisada. O kit utilizado neste estudo, apresenta seis beads (esferas marcadas) de populações diferentes e com diferentes intensidades de fluorescência que estão marcadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina a ser pesquisada.

A intensidade da fluorescência formada ao longo do processo de conjugação da amostra com o anticorpo, revela a concentração final de cada citocina pesquisada. Para a quantificação de cada uma das citocinas foi utilizado o software FCAP Array® (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e, os valores foram expressos em pg/mL.

10.1.8 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO COMPOSTO SOBRE A ATIVIDADE FAGOCÍTICA DOS MACRÓFAGOS RAW 264.7 (ENSAIO DO VERMELHO NEUTRO)

O ensaio do vermelho neutro é um teste colorimétrico, que se baseia na capacidade dos macrófagos fagocitarem o corante após tratamento com Dexametasona ou compostos de escolha. Macrófagos com fenótipo M2 apresentam maior capacidade de fagocitar o corante, apresentando maior coloração após a lise celular.

Para o teste de fagocitose por vermelho neutro, foram utilizadas placas de 96 poços em uma concentração celular de 1×10^4 células/poço e incubadas durante 24 horas para confluência celular adequada. Posteriormente, os macrófagos foram pré-tratados com melhor concentração do composto selecionado e após uma espera de 1 hora, todos os grupos (exceto o branco) foram estimulados com LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$), pelo período de 24 horas. Os grupos foram divididos em: Controle negativo (Branco/veículo), controle positivo (LPS $1 \mu\text{g}/\text{mL}$), controle de referência (Dexametasona $7 \mu\text{M}$) e grupo tratamento (composto selecionado na sua melhor concentração (IC_{50})).

Após a incubação de 24 horas em estufa (5% de CO_2 e temperatura de 37°C), adicionou-se $100 \mu\text{L}/\text{poço}$ da solução corante de vermelho neutro (0,075%) e incubou-se a placa por mais 1 hora (37°C). Em seguida, as células foram lavadas com solução de PBS. Adicionou-se $100 \mu\text{L}/\text{poço}$ do tampão de lise celular (1% de ácido acético glacial: etanol; 1:1) e incubou-se a placa por mais 1 hora (temperatura ambiente). A leitura da absorbância foi realizada em leitor ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road,

SZN, CN) a 540nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento dos níveis de fagocitose celular.

10.2 IN VIVO

10.2.1 ANIMAIS

Para os experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, com um mês de idade (18 e 25g), do tipo albinos Swiss, todos fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais receberam alimentação adequada e foram acomodados em gaiolas plásticas com serragem em ambiente apropriado (temperatura: 20 ± 2 °C; ciclos de luz/escuro: 12/12 horas). Os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolos Nº 6363260718/CEUA e Nº 6118110417/CEUA).

10.2.2 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

Os animais foram anestesiados com xilasina (15 mg/kg) e cetamina (75 mg/kg), administrado por via intraperitoneal. Para posterior avaliação dos parâmetros inflamatórios os animais foram submetidos a morte indolor assistida utilizando novamente de xilasina e cetamina, nas doses de 45 mg/kg e 225 mg/kg, respectivamente.

10.2.3 MODELO DE LESÃO AGUDA PULMONAR (ALI) INDUZIDA POR LPS

O modelo se baseia nos protocolos descritos por ALTEMEIER; HUNG; MATUTE-BELLO (2017). Os animais receberam tratamento prévio com o composto testado e os controles para o teste. O tratamento foi realizado via oral (gavagem) e após uma hora os animais foram anestesiados para a instilação de LPS via intranasal (5 mg/kg em 50 µL de PBS). Após 12 horas, os camundongos sofreram eutanásia por overdose de cetamina e xilasina para a coleta de lavado bronco-alveolar (LBA).

10.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO

Após a morte indolor assistida dos animais, o líquido do lavado bronco-alveolar foi coletado para mensuração da contagem total e diferencial de leucócitos e concentração proteica do exsudato. A contagem total de leucócitos foi realizada por microscopia em câmara de Neubauer, na diluição 1:4 das amostras em líquido de Turk e contagem dos 4 quadrantes. Para a contagem diferencial dos leucócitos, 50 μL das alíquotas dos LBAs foram centrifugados em citocentrífuga (Cytopro® cytocentrifuge Wescor, modelo: 7620 EUA) e as lâminas foram coradas utilizando corante Panótico (Laborclin). A contagem celular diferencial (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. O grau de extravasamento de proteína (exsudação) nas amostras de LBA foi determinado utilizando a metodologia de Lowry (LOWRY; RANDALL, 1951) (18). Para tanto, foi utilizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina. As contagens de leucócitos totais e diferenciais foram expressas como células $\times 10^5/\text{mL}$, e a exsudação foi expressa em $\mu\text{g}/\text{mL}$.

10.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) E CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO (NO_x)

Para a determinação da atividade da MPO, foram realizados ensaios de acordo com metodologia já descrita na literatura (RAO et al., 1993). A determinação da atividade enzimática foi realizada em um leitor de placas de ELISA, utilizando para isso uma curva padrão de MPO (0.7 – 140 mU/mL) para a interpolação dos resultados. Os resultados foram expressos em mU/mL. A determinação das concentrações de NO_x presente em cada amostra foi mensurada pela presença de seus metabólitos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), seguindo a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Da mesma forma que a determinação da atividade da MPO, para a determinação das concentrações de NO , também foi realizada uma curva-padrão com concentrações conhecidas de NO_2^- (0 -150 μM), permitindo a determinação dos valores de NO_x (μM) a partir da interpolação dos resultados.

10.2.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS (TNF- α e IL-6)

Para determinar as concentrações de TNF- α e IL-6, foram utilizados kits ELISA. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (TNF- α , eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA, Cat 88-7342-29; IL-6, eBioscience, Inc., San Diego, CA, EUA, Cat 13-7062-81). As leituras das citocinas nas amostras e suas respectivas curvas-padrão foram estimadas por meio de suas medidas colorimétricas (450 nm), realizadas em leitor de placas de ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA). Os valores foram expressos em pg/ml.

10.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism® versão 8.0 (San Diego, CA, EUA). Os resultados das avaliações biológicas foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M). Todos os dados foram considerados homocedásticos paramétricos e foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste *post hoc* de Tukey. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$. Os valores de IC₅₀ para NOx foram calculados por análise de regressão não linear usando o logaritmo da concentração versus resposta normalizada (porcentagem de inibição de NOx), com o auxílio do programa de software GraphPad Prism®, versão 9.1.1 (San Diego, CA, EUA).

11 RESULTADOS

11.1 RESULTADOS *IN VITRO*

11.1.1 CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DA 1,4-DHP

Todos os 15 compostos derivados da 1,4-DHP foram avaliados quanto à sua citotoxicidade utilizando cultura de células RAW264.7. A partir de uma curva de viabilidade celular, foi possível determinar os valores de concentração (μ M) de cada composto capaz de matar apenas 10% das células viáveis nas placas de cultura (CHAN et al., 2017). Avaliando a viabilidade celular de cada um dos 15 compostos testados individualmente, verificou-se que apenas 6 destes apresentaram alto índice

de viabilidade celular, quando comparados ao grupo controle negativo (grupo não tratado - veículo) (Tabela 4). A concentração de 60 μ M foi utilizada como ponto de corte para definir a toxicidade máxima significativa e para garantir a viabilidade das células nos experimentos seguintes, os compostos que apresentaram IC₁₀ abaixo desta concentração foram eliminados dos experimentos subsequentes. Assim, apenas quatro moléculas, denominadas 1, 4, 6, 7, 12 e 13 apresentaram baixa toxicidade aos macrófagos RAW 264.7, apresentando CC₁₀>60 μ M. Dessa forma, estes compostos foram selecionados para os experimentos subsequentes.

Tabela 4 - Valores CC₁₀ de derivados da 1,4-DHP em macrófagos RAW 264.7.

Composto	CC₁₀(μM)	Decisão
1	<i>61.94</i>	Selecionado
2	<i>8.23</i>	Eliminado
3	<i>26.88</i>	Eliminado
4	<i>82.00</i>	Selecionado
5	<i>15.01</i>	Eliminado
6	<i>60.62</i>	Selecionado
7	<i>61.88</i>	Selecionado
8	<i>18.93</i>	Eliminado
9	<i>31.61</i>	Eliminado
10	<i>43.21</i>	Eliminado
11	<i>10.45</i>	Eliminado
12	<i>198.73</i>	Selecionado
13	<i>104.76</i>	Selecionado
14	<i>12.18</i>	Eliminado
15	<i>16.89</i>	Eliminado

Os valores de CC₁₀ foram calculados por análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração versus a resposta normalizada (percentagem de viabilidade celular). Realizado com o programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

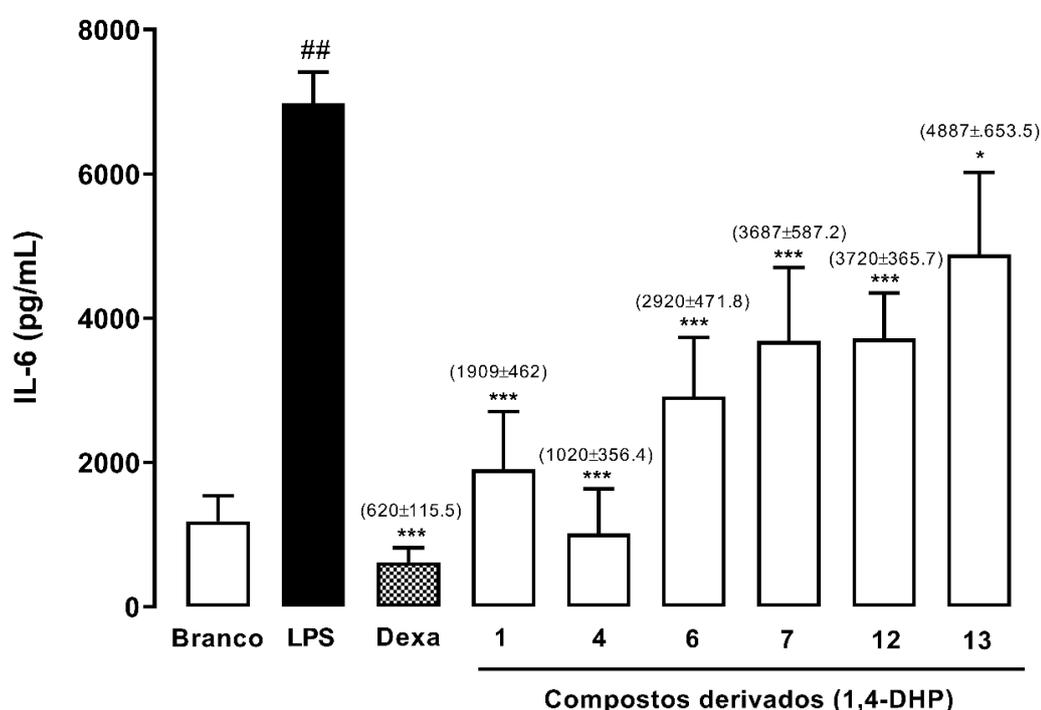
11.1.2 EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE INTERLEUCINA-6

Nestes experimentos, os compostos selecionados a partir da triagem nos experimentos prévios (CC₁₀>60 μ M - Composto: 1 (61,94 μ M), 4 (82,00 μ M), 6 (60,62 μ M), 7 (61,88 μ M), 12 (198,73 μ M) , 13 (104,76 μ M)) foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a produção de IL-6 no sobrenadante das culturas celulares. Para

esses experimentos as células RAW 264.7 foram tratadas com esses compostos em suas respectivas CC₁₀ nas mesmas condições experimentais.

Observou-se que todos os compostos selecionados foram capazes de inibir a produção de IL-6 pelas células RAW264.7, quando comparados ao grupo controle positivo (% de inibição: 1: 72,6 ± 6,6%; 4: 85,4 ± 5,1%; 6: 58,2 ± 6,7%; 7: 47,2 ± 8,4%; 12: 46,8 ± 5,2%; 13: 30,0 ± 9,3; Dex: 91,1 ± 1,6%) (P<0,05) (Figura 19).

Figura 19 - Efeito dos derivados da 1,4-diidropiridina na produção de IL-6 em células RAW 264.7 induzidas por LPS



O branco representa o controle negativo: células RAW264.7 tratadas apenas com solução salina estéril; LPS representa o controle positivo: Células RAW 264.7 tratadas apenas com LPS (1µg/mL); Dexa representa o controle de referência: Células RAW 264.7 tratadas com Dexametasona (7µM) 1 hora antes da indução com LPS; Os derivados da 1,4-DHP representam os compostos testados em suas respectivas CC₁₀: Células RAW 264.7 tratadas com os compostos 1, 4, 6, 7, 12 e 13, 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão *p <0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

Ao observar os resultados anteriores, vê-se que o Composto 4 apresentou a melhor taxa de inibição de IL-6 (85,4 ± 5,1%). Este composto foi, portanto, selecionado para os experimentos subsequentes.

11.1.3 EFEITO DO COMPOSTO SELECIONADO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE ÓXIDO NÍTRICO E DETERMINAÇÃO DE IC₅₀

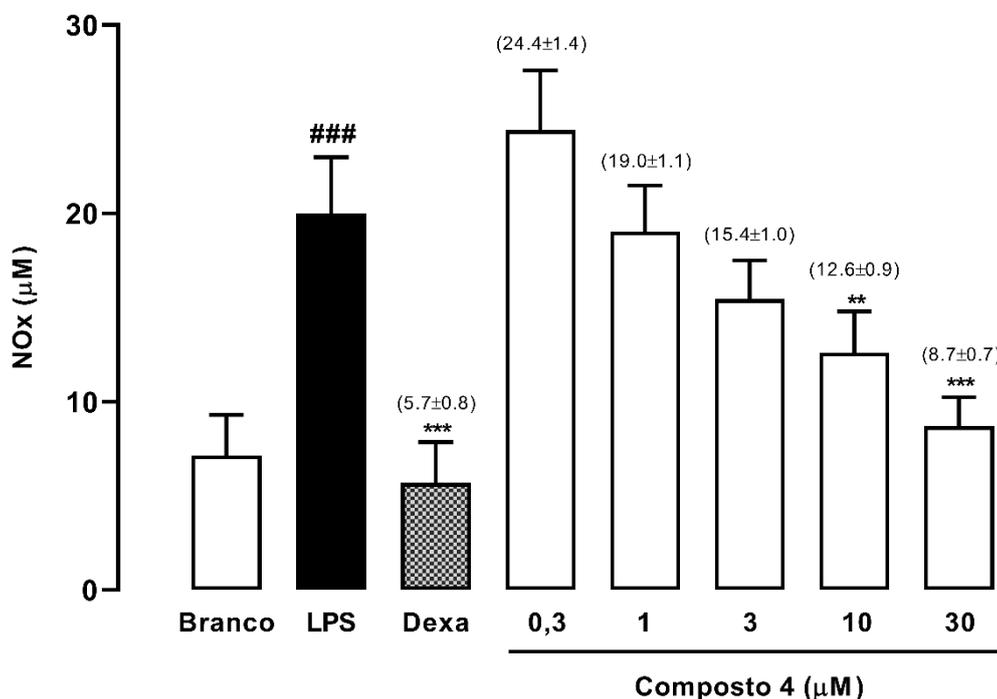
O desenho dos experimentos subsequentes foi pensado para definir o perfil do composto na inibição dos níveis de NO. Nestes experimentos, o Composto 4 selecionado foi testado em diferentes concentrações (0,3, 1, 3, 10 e 30 μM) para determinar sua IC_{50} . Nesses experimentos, o composto não foi capaz de inibir a produção de NOx nas concentrações 0,3, 1 e 3 μM ($p < 0,05$) (Figura 20). Nas doses de 10 e 30 μM , o composto inibiu significativamente a produção de NOx nas culturas celulares (% de inibição: 10 μM : $31,05 \pm 11,98\%$; 30 μM : $52,39 \pm 8,37\%$) ($P < 0,001$) (Figura 19). A partir desses resultados, foi possível calcular o IC_{50} do Composto 4, que foi de aproximadamente 9 μM (Figura 21). Portanto, esta foi a concentração utilizada para os experimentos subsequentes, com o objetivo de avaliar os efeitos do composto na produção de citocinas, bem como no aumento ou redução da taxa de fagocitose de macrófagos.

11.1.4 EFEITO DO COMPOSTO SELECIONADO NOS NÍVEIS DAS CITOCINAS

Utilizando o Composto 4 na concentração de 9 μM (IC_{50} para NO), observou-se que o composto foi capaz de inibir os níveis das citocinas IL-12p70, IFN- γ , MCP-1 e IL-6 (% de inibição: IL-12p70: $36,10 \pm 4,39$; IFN- γ : $91,84 \pm 4,99$; MCP-1: $58,41 \pm 12,69$; e IL-6: $95,30 \pm 1,03$) ($p < 0,05$). No entanto, este composto não foi eficaz na inibição dos níveis de TNF-alfa nos sobrenadantes da cultura celular ($p > 0,05$) (Tabela 5).

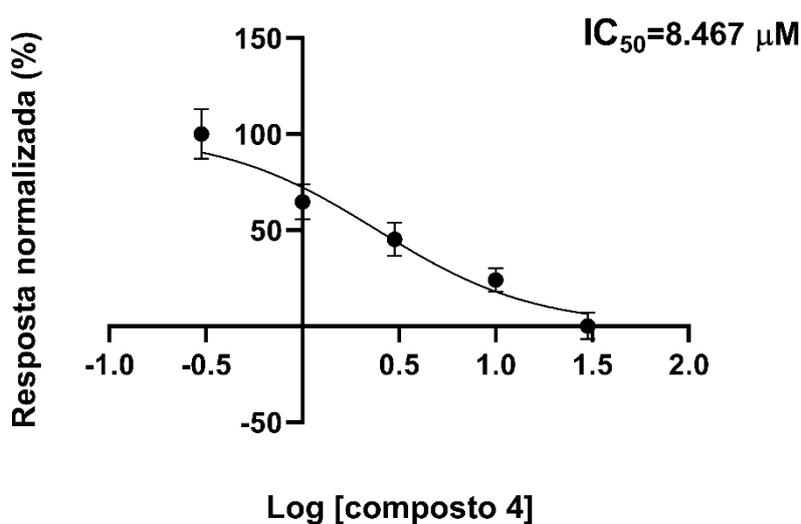
Outro resultado interessante observado foi a capacidade do Composto 4 em aumentar os níveis de interleucina IL-10, uma interleucina com perfil anti-inflamatório (% de aumento: $147,2 \pm 67,16$) ($P < 0,05$) (Tabela 5).

Figura 20 - Efeito do composto 4 na produção de NOx em células RAW264.7 induzidas por LPS.



O branco representa o controle negativo: células RAW264.7 tratadas apenas com solução salina estéril; LPS representa o controle positivo: Células RAW264.7 tratadas apenas com LPS (1µg/mL); Dexa representa o controle de referência: células RAW264.7 tratadas apenas com Dexametasona (7µM) 1 hora antes da indução com LPS; composto 4: células tratadas com composto 4 em diferentes concentrações (0,3, 1, 3, 10 e 30 uM) 1 hora antes da indução por LPS. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 21 - Curva sigmóide mostrando a resposta normalizada do composto selecionado sobre os níveis de metabólitos do NO em macrófagos RAW 264.7

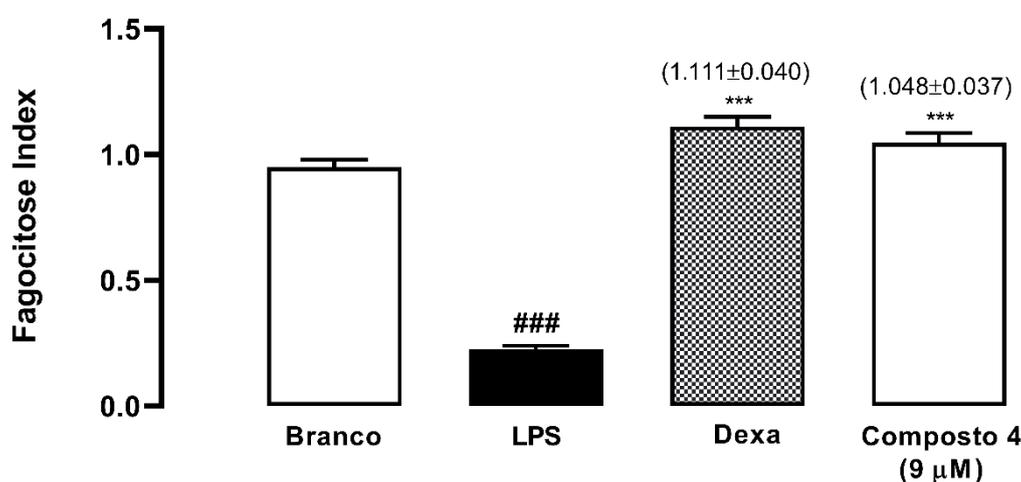


O eixo X representa, em escala logarítmica, as concentrações do composto 4 utilizadas nos experimentos (0,3, 1, 3, 10 e 30 µM) e o eixo Y a resposta normalizada de NOx. Os resultados de IC₅₀ para o composto testado foram calculados por análise de regressão não linear usando o logaritmo de concentração versus resposta normalizada.

11.1.5 EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS RAW 264.7

Para avaliar o efeito do composto 4 sobre a atividade fagocítica dos macrófagos, realizamos o teste do vermelho neutro. Neste experimento, observamos que a atividade fagocítica dos macrófagos após o tratamento com o Composto 4 aumentou significativamente (% de aumento: $14,84 \pm 4,24$) ($p < 0,01$) (Figura 22).

Figura 22 - Efeito do composto 4 no aumento da atividade fagocítica de células RAW 264.7 induzidas por LPS



O Branco representa o controle negativo: células RAW264.7 tratadas apenas com solução salina estéril; LPS representa o controle positivo: Células RAW264.7 tratadas apenas com LPS (1µg/mL); Dexa representa o controle de referência: células RAW264.7 tratadas com Dexametasona (7µM) 1 hora antes da indução com LPS; Composto 4: células tratadas com composto 4 (9 µM) 1 hora antes da indução por LPS. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. *** $p < 0,001$.

11.2 RESULTADOS *IN VIVO*

11.2.1 EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A INFILTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS E EXSUDAÇÃO NA LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR LPS

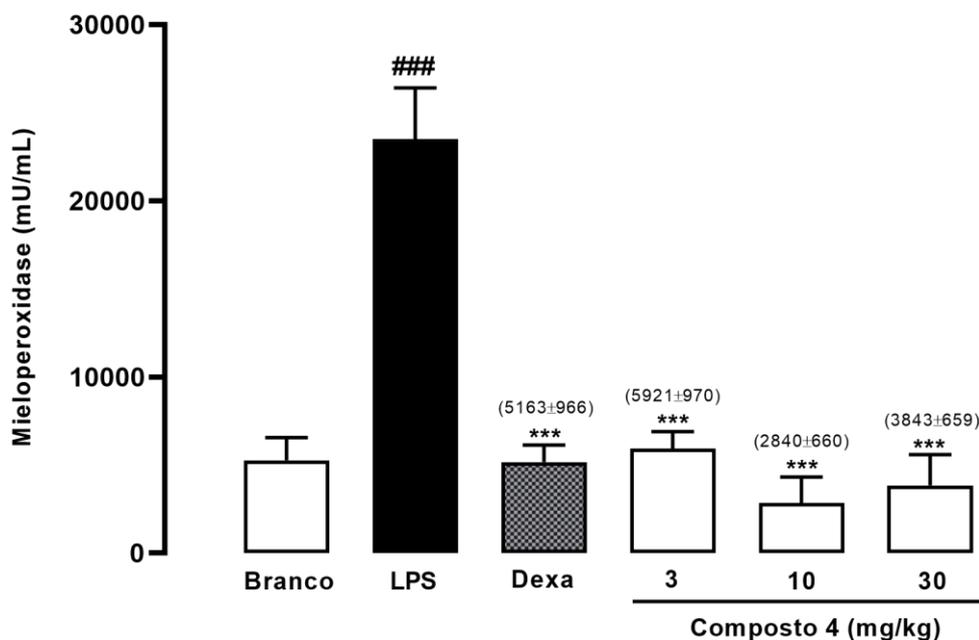
Os resultados dos experimentos mostram que o tratamento prévio dos animais com doses de 10 e 30 mg/kg do Composto 4, inibiu significativamente a migração de leucócitos para o tecido pulmonar, em $70,13 \pm 10,14\%$ e $63,04 \pm 12,44\%$, respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 6). Essa inibição foi associada diretamente a reduções significativas na migração de neutrófilos, em $54,1 \pm 32,65\%$ e $22,06 \pm 19,56\%$, respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 6).

Embora o Composto 4 na dose de 3mg/kg não tenha sido eficaz na inibição da migração de leucócitos ($p > 0,05$) (Tabela 6), esta dose ainda assim foi capaz de inibir a exsudação (% de inibição: 3mg/kg: $48,96 \pm 8,51$) ($P < 0,001$) (Tabela 6). As doses de 10 e 30mg/kg também inibiram esse parâmetro inflamatório (10mg/kg: $48,30 \pm 7,75$ e 30mg/kg: $51,04 \pm 5,59$) ($p < 0,001$) (Tabela 6).

11.2.2 EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO LBA DE CAMUNDONGOS COM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

Da mesma forma que os achados para migração leucocitária e exsudação, o composto 4 foi eficaz em inibir significativamente a atividade da MPO no LBA dos animais, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg (% de inibição: 3mg/kg: $65,51 \pm 5,65$; 10mg/kg: $83,46 \pm 8,60$; 30mg/kg: $77,62 \pm 10,17$) ($p < 0,001$) (Figura 23). Da mesma forma, o

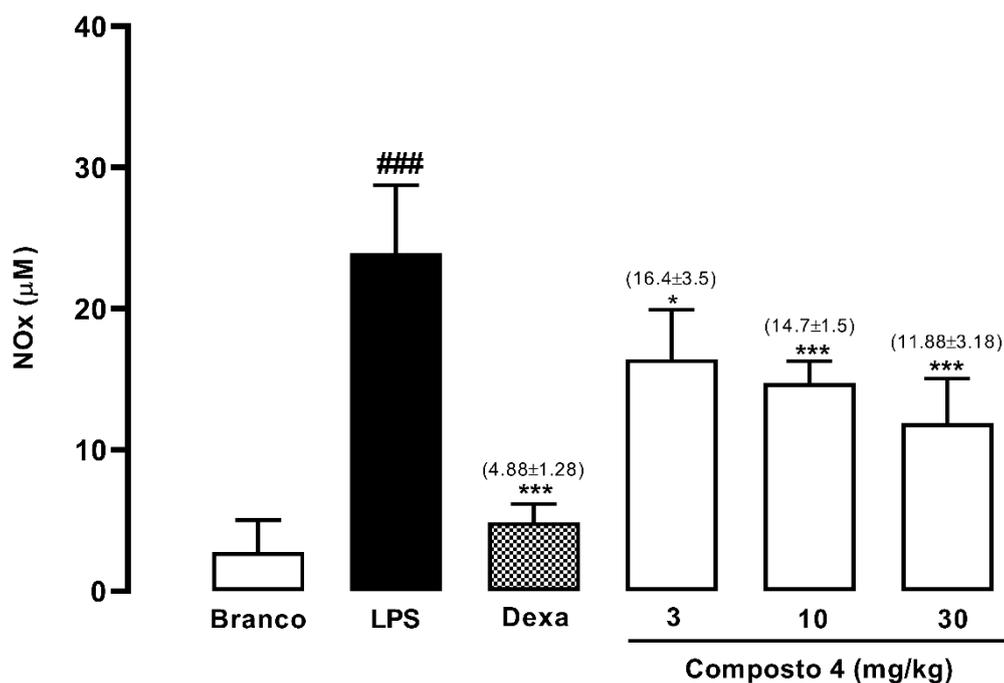
Figura 23 - Efeito do composto 4 sobre a atividade de MPO lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS



O branco representa o grupo controle negativo: animais tratados apenas com solução salina estéril; LPS representa o grupo controle positivo: animais induzidos apenas com LPS (5mg/kg); Dexa representa o grupo controle de referência: animais tratados com Dexametasona (5mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS; O composto 4 representa o grupo testado com diferentes doses: animais tratados com o composto 4 (3, 10 e 30 mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; n=6. *** $p < 0,001$.

tratamento prévio dos animais com o composto 4, nas mesmas doses, foi capaz de inibir significativamente a produção de NO no LBA (% de inibição: 3mg/kg: $31,41 \pm 14,73$; 10mg/kg: $38,42 \pm 6,43$; 30mg/kg: $50,38 \pm 13,30$) ($P < 0,05$) (Figura 24).

Figura 24 - Efeito do composto 4 sobre as concentrações de NOx no lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS



O branco representa o grupo controle negativo: animais tratados apenas com solução salina estéril; LPS representa o grupo controle positivo: animais induzidos apenas com LPS (5mg/kg); Dexa representa o grupo controle de referência: animais tratados com Dexametasona (5mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS; O composto 4 representa o grupo testado com diferentes doses: animais tratados com o composto 4 (3, 10 e 30 mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão; n=6. *p<0,05 ***p<0,001.

Tabela 5 -Efeito do composto 4 nos níveis de citocinas.

Grupo	Concentração	IL-12p70	TNF- α	IFN- γ	MCP-1	IL-6	IL-10
<i>In vitro</i>							
Veículo	-	10,8 \pm 2,9	1878 \pm 360	6,45 \pm 0,74	491,1 \pm 29,47	117,7 \pm 17,03	8,98 \pm 4,07
LPS	1 μ g/mL	23,19 \pm 3,95	14747 \pm 1100	9,55 \pm 0,45	7203 \pm 1347	28560 \pm 4518	6,55 \pm 1,94
Dexa	7 μ M	12,15 \pm 0,61**	23016 \pm 2928	6,85 \pm 1,4***	5279 \pm 816,3*	4842 \pm 2554***	30,99 \pm 5,1***
C4	9 μ M	14,82 \pm 1,02**	14690 \pm 888,1	< 2,5***	2889 \pm 881,7***	1320 \pm 290,5***	16,2 \pm 4,4*

Valores absolutos (média \pm erro padrão) do composto 4 nos níveis das citocinas IL-12p70, TNF- α , IFN- γ MCP-1, IL-6 e IL-10 (pg/mL). O veículo representa o controle negativo: células RAW264.7 tratadas apenas com solução salina estéril; LPS representa o controle positivo: Células RAW264.7 tratadas apenas com LPS (1 μ g/mL); Dexa representa o controle de referência: células RAW264.7 tratadas com Dexametasona (7 μ M) 1 hora antes da indução com LPS; C4 representa o composto 4 testado na melhor concentração: células RAW264.7 tratadas com composto 4 (9 μ M) 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

Tabela 6 - Efeito do composto 4 na migração de Leucócitos, Neutrófilos e concentração de proteínas (exsudação)

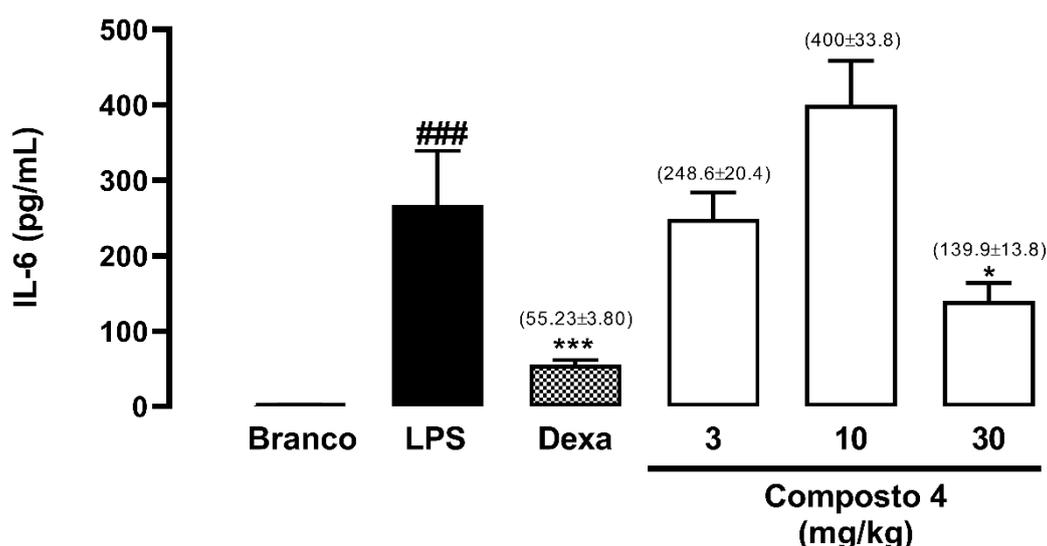
Grupo	Concentração	Leucócitos (x10 ⁵ /mL)	Neutrófilos (x10 ⁵ /mL)	Proteínas (μ g/mL)
Veículo	-	0,36 \pm 0,13	0,003 \pm 0,001	3,41 \pm 0,41
LPS	5mg/kg	5,59 \pm 2,3	3,68 \pm 0,55	10,11 \pm 1,69
Dexa	5mg/kg	1,28 \pm 0,41***	0,55 \pm 0,23***	5,31 \pm 0,43***
C4	3mg/kg	4,20 \pm 0,59	3,52 \pm 0,58	5,15 \pm 0,86***
	10mg/kg	1,11 \pm 0,37***	0,55 \pm 0,35***	5,22 \pm 0,78***
	30mg/kg	1,25 \pm 0,32***	0,97 \pm 0,37***	4,94 \pm 0,56***

Valores absolutos (média \pm erro padrão) de compostos na migração de leucócitos, neutrófilos e concentração de proteínas (exsudação). O veículo representa o grupo de controle negativo: animais tratados apenas com solução salina estéril; LPS representa o grupo controle positivo: animais induzidos apenas com LPS (5mg/kg); Dexa representa o grupo controle de referência: animais tratados com Dexametasona (5mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS; C4 representa o grupo composto 4 testado com diferentes doses: animais tratados com composto 4 (3, 10 e 30 mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; n=6. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

11.2.3 EFEITO DO COMPOSTO 4 SOBRE A SECREÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO LBA DE CAMUNDONGOS COM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

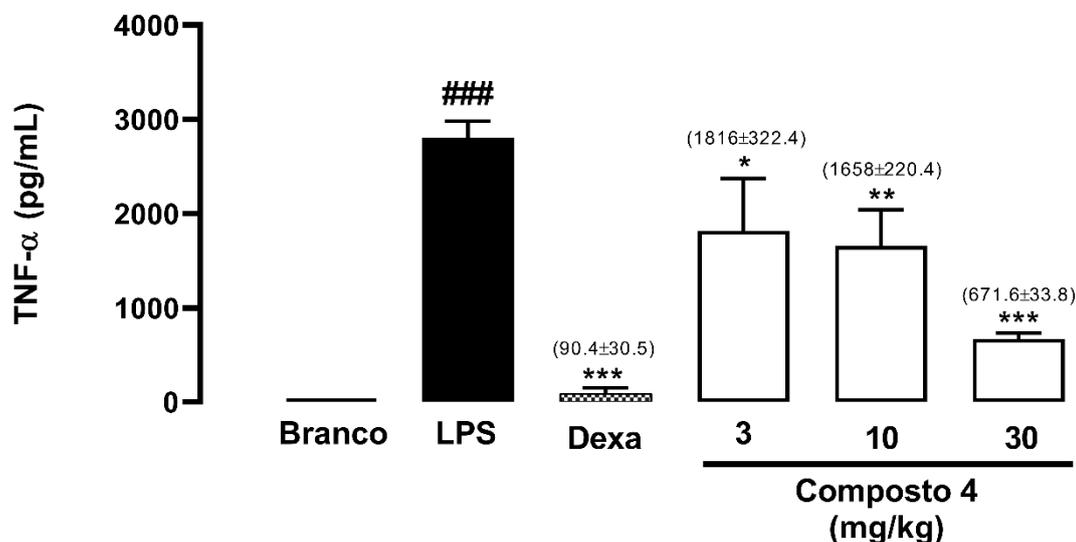
O composto 4 foi capaz de reduzir significativamente a secreção de IL-6 apenas na dose de 30mg/kg, (% de inibição: 30mg/kg: $47,71 \pm 8,93$)($p < 0,05$)(Figura 25), enquanto as concentrações de TNF- α foram significativamente reduzidas nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg (% de inibição: 3mg/kg: $35,30 \pm 19,90$; 10mg/kg: $40,93 \pm 13,61$; 30mg/kg: $76,07 \pm 2,08$)(Figura 26)($p < 0,05$).

Figura 25 - Efeito do composto 4 nas concentrações de IL-6 no lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS



branco representa o grupo controle negativo: animais tratados apenas com solução salina estéril; LPS representa o grupo controle positivo: animais induzidos apenas com LPS (5mg/kg); Dexa representa o grupo controle de referência: animais tratados com Dexametasona (5mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS; O composto 4 representa o grupo testado com diferentes doses: animais tratados com o composto 4 (3, 10 e 30 mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; n=6. * $p < 0,05$.

Figura 26 - Efeito do composto 4 nas concentrações de TNF- α no lavado bronco-alveolar de animais com lesão pulmonar aguda induzida por LPS



O branco representa o grupo controle negativo: animais tratados apenas com solução salina estéril; LPS representa o grupo controle positivo: animais induzidos apenas com LPS (5mg/kg); Dexa representa o grupo controle de referência: animais tratados com Dexametasona (5mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS; O composto 4 representa o grupo testado com diferentes doses: animais tratados com o composto 4 (3, 10 e 30 mg/kg) 1 hora antes da indução com LPS. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão; n=6. *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

12 DISCUSSÃO

Nosso estudo confirmou um importante efeito anti-inflamatório dos compostos derivados da 1,4-DHP, tanto nos experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. Dois resultados de nossos experimentos *in vitro* merecem destaque, levando em consideração as características das células utilizadas para os experimentos. Primeiramente, foi verificado que o composto 4 (dietil 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina-3,5dicarboxilato), selecionado a partir de triagens iniciais, foi capaz de aumentar a atividade fagocítica dos macrófagos, esse achado é característico de macrófagos M2, fenótipo de caráter anti-inflamatório e resolutório que macrófagos adquirem de acordo com o ambiente no qual estão inseridos. Em somatório a esse resultado, o tratamento das células com esse composto também foi capaz de induzir um aumento significativo na secreção de IL-10 pelas células RAW264.7, uma importante citocina anti-inflamatória, que é outra característica comum em macrófagos M2. Sirmagul e colaboradores (2006) verificaram que o nifedipino reduziu os níveis de IL-10 no soro de animais em um modelo de choque séptico induzido por LPS em ratos (SIRMAGUL et al., 2006). De maneira semelhante, o amlodipino, foi eficaz em inibir

os níveis de IL-10 no soro de pacientes com hipertensão arterial, e esse efeito foi melhorado na terapia combinada com a olmesartana, um antagonista dos receptores de angiotensina (DEROSA et al., 2013). Isso reforça a hipótese de que essa classe de compostos realmente favorece a mudança da polarização dos macrófagos de M1 para M2 em modelos inflamatórios induzidos por LPS (YUNNA et al., 2020; CHOE et al., 2021).

Inicialmente, após selecionarmos o composto 4, que se mostrou extremamente seguro para experimentos subsequentes, foi possível verificar seu efeito inibitório marcante na produção de IL-6 pelas células RAW 264.7, uma importante citocina pró-inflamatória (HOGE et al., 2013). Resultados semelhantes foram demonstrados por Klegeris e colaboradores (2002), que verificaram em células monocíticas humanas (THP-1) induzidas por LPS, uma redução significativa na secreção de IL-1 β e IL-6, após o tratamento prévio dessas células com Cerebrocrast, um derivado da 1,4-DHP (KLEGERIS et al., 2002). Também em monócitos THP-1 induzidos por PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate), o azelnidipino foi capaz de inibir a ativação/diferenciação dessas células, bem como reduzir a expressão de moléculas de adesão, diminuindo assim a deposição de células inflamatórias nas placas ateroscleróticas, mostrando que os efeitos desse medicamento na aterosclerose se dão não apenas pela redução da pressão sanguínea, mas também pelos seus efeitos anti-inflamatórios diretos (KOMODA et al., 2018).

Em nosso estudo, o Óxido Nítrico, outro importante mediador inflamatório, também foi inibido pelo composto 4 no modelo experimental *in vitro*. O NO possui inúmeros efeitos biológicos importantes nas respostas imunes, que incluem o controle de processos infecciosos, regulação de fatores de transcrição, migração de leucócitos e estimulação da produção de citocinas (MAO et al., 2013). Em um estudo recente, o nifedipino, um bloqueador dos canais de cálcio, importante representante dessa classe de compostos, também demonstrou atividade semelhante, inibindo a produção de NO em células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais derivados de camundongos BALB/c estimulados por LPS (CHOE et al., 2021). Da mesma forma, Chen e Kitts (2015) demonstraram que derivados dihidropiridínicos possuem a capacidade de inibir a produção intracelular de NO em cultura de células RAW 264.7 (CHEN; KITTS, 2015).

Nos experimentos seguintes, foi possível observar a capacidade do composto selecionado em inibir a produção de diferentes citocinas pró-inflamatórias, como IL-12p70, MCP-1, IFN- γ e IL-6. Por outro lado, o composto não foi capaz de reduzir a

secreção de TNF- α , importante citocina envolvida no início da resposta imune inata contra invasores ao hospedeiro (BABU et al., 2011; YANG et al., 2023). A gama de citocinas inibidas em nossos experimentos, são responsáveis por diferentes efeitos biológicos no organismo, contribuindo para o desenvolvimento e progressão das respostas inflamatórias, aumentando a resposta das células envolvidas no sistema imune a partir da ativação de vias de sinalização intracelular, bem como no aumento do recrutamento celular (HOGE et al., 2013; DING et al., 2022; JIA et al., 2022; LIN et al., 2023). Outros estudos já demonstraram a capacidade de diferentes derivados da 1,4-DHP em inibir a produção dessas mesmas citocinas pró-inflamatórias em diferentes modelos experimentais. A MCP-1, por exemplo, teve seus níveis reduzidos em pacientes que iniciaram o tratamento para hipertensão com lercanidipina. Entretanto, nesses mesmos pacientes, os níveis de TNF- α não foram reduzidos. Apesar das particularidades do modelo experimental, esses achados guardam certa semelhança com nossos resultados, uma vez que o tratamento dos macrófagos RAW 264.7 com os derivados de 1,4-DHP também não foi eficaz em reduzir os níveis de TNF- α (KOMODA; INOUE; NODE, 2010; MATSUMORI; NISHIO; NOSE, 2010; CIUCEIS et al., 2016).

Recentemente, uma nova estratégia para o tratamento de doenças inflamatórias ganhou importância na comunidade científica, que é a tentativa de mudar a polarização dos macrófagos no sítio inflamatório (SMIGIEL; PARKS, 2018; ORECCHIONI et al., 2019). Nesse sentido, já está bem estabelecido a “digital” de produção de citocinas de cada fenótipo de macrófagos, com os macrófagos de fenótipo M1 (pró-inflamatório) tendo a característica de aumentar a produção de TNF- α , IL-6 e IL-12 além de apresentar uma redução paralela da atividade fagocitária. Em contraste, os macrófagos de fenótipo M2 são eficazes na produção de respostas anti-inflamatórias, aumentando a produção de IL-10, CCL17 e CCL22 com aumento da atividade fagocítica, que está diretamente relacionada às características de reparo tecidual e angiogênese (GHAHREMANI PIRAGHAJ et al., 2018; YUNNA et al., 2020). Choe et al., (2021), verificaram que macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com nifedipino, apresentaram um aumento significativo na expressão de mRNA de Arg-1, Ym-1, FIZZ1 e TGF- β , marcadores característicos de polarização de macrófagos do tipo M2 (CHOE et al., 2021). Nossos resultados mostram, além da diminuição dos níveis de citocinas características das respostas M1, aumento da atividade fagocítica das células, bem como aumento da produção de IL-10, citocina

anti-inflamatória característica de respostas M2, como já citado anteriormente. Dois achados que apontam para uma possível polarização da resposta dessas células para um fenótipo anti-inflamatório (DOS REIS et al., 2022; MOHR et al., 2022).

Além dos importantes achados *in vitro* que mostram a potencial atividade anti-inflamatória do composto 4, também avaliamos a atividade do composto selecionado no contexto de um modelo *in vivo*, utilizando o modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS. Esse modelo, por característica, causa uma inflamação pulmonar aguda, resultando em aumento do influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar, além de edema e espessamento do septo alveolar (SZARKA et al., 1997). Nossos resultados mostram que o composto 4 reduz o influxo de leucócitos para o tecido pulmonar inflamado e que essa redução é devida principalmente à diminuição do recrutamento de neutrófilos. A redução da atividade da enzima mieloperoxidase pode ser um indício da diminuição da atividade dos neutrófilos no tecido inflamado, uma vez que esta enzima está presente nos grânulos primários dos neutrófilos e é parcialmente responsável pela atividade fagocítica dessas células (BORREGAARD, 2010; OLZA et al., 2012). Nossos achados também mostram a capacidade do composto 4 em reduzir os níveis de NO no LBA de animais inflamados. Leonova et al., (2016) também descobriram que diferentes derivados dihidropiridínicos reduziram a super-expressão de NO nos rins de ratos com Diabetes mellitus e que essa diminuição foi devido a uma diminuição na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é expressa principalmente em processos inflamatórios (TSUTSUI et al., 2015; VANINI; KASHFI; NATH, 2015; LEONOVA et al., 2016).

Os efeitos inibitórios sobre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 também foram observados em nossos experimentos. Outros estudos já observaram em diferentes modelos experimentais o efeito de derivados dihidropiridínicos na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em um modelo de hepatotoxicidade induzida por paracetamol em ratos, o amlodipino, um derivado dihidropiridínico, reduziu a expressão do mRNA do TNF- α no soro dos animais, além da verificação por imuno-histoquímica da redução da expressão do TNF- α no citoplasma dos hepatócitos (KAYA et al., 2018). Outro estudo também mostrou que o nifedipino reduz os níveis de TNF- α e IL-6 no soro de animais em um modelo de frieira, esse modelo causa uma inflamação localizada pela exposição da pele a baixas temperaturas e alta temperatura ambiente (ZHOU et al., 2022). Além disso, a intervenção com amlodipina em conjunto com atorvastatina mostrou uma redução significativa nos níveis de TNF-

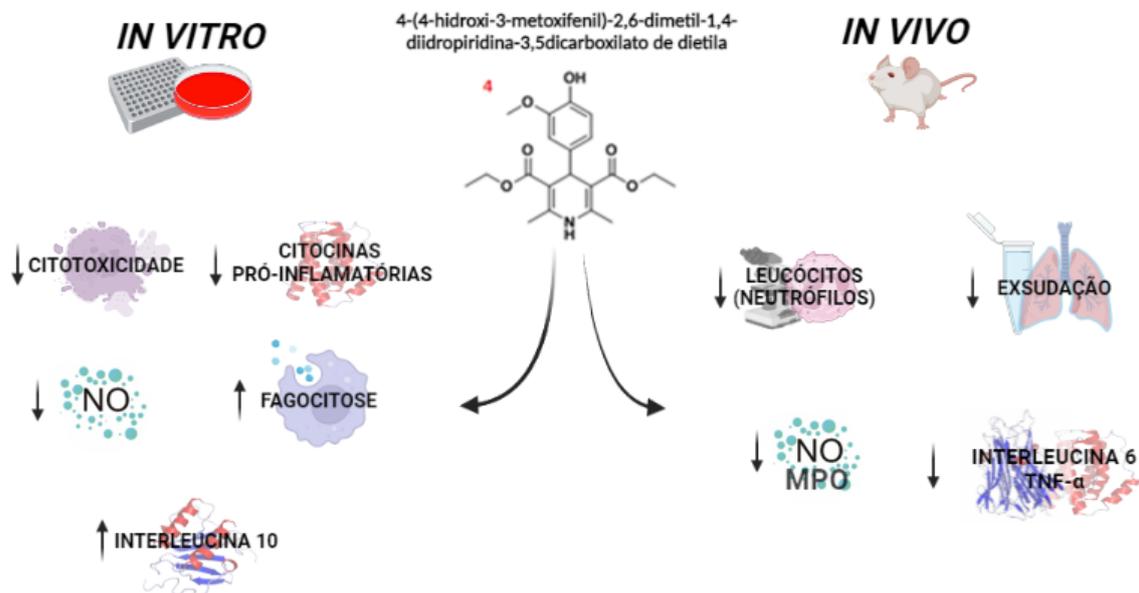
α e IL-1 β no miocárdio de ratos hipertensos e que essa redução se deu a partir da capacidade do tratamento em inibir a ativação do NF- κ B, via de sinalização que funciona como um “interruptor” na cascata da resposta inflamatória e regula a expressão de diversas citocinas (LU et al., 2016). Anteriormente, outro estudo já havia observado a capacidade do nifedipino, em inibir a via do NF- κ B em células A549, uma linhagem celular de carcinoma pulmonar semelhante ao epitélio humano (MATSUMORI; NUNOKAWA; SASAYAMA, 2000)(MATSUMORI; NUNOKAWA; SASAYAMA, 2000). Da mesma forma, observaram que o nifedipino reduz significativamente o extravasamento transvascular e estresse oxidativo no pulmão de ratos submetidos a hipóxia e que esse efeito foi devido a capacidade do mesmo em inibir a regulação positiva do NF- κ B no tecido pulmonar dos animais (SARADA et al., 2012).

13 CONCLUSÃO

Em conclusão, é possível afirmar que o composto 4 (4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2,6-dimetil-1,4-diidropiridina-3,5dicarboxilato de dietila) apresentou importante atividade anti-inflamatória nos modelos experimentais avaliados. Os achados reforçam estudos prévios de verificaram que o efeito anti-inflamatório dessa classe de compostos é possivelmente mediado pela sua capacidade de alterar a polarização de macrófagos, alterando-os do fenótipo M1 para M2.

Além disso, é importante que estudos futuros avaliem a capacidade desse composto em inibir a ativação de vias de sinalização intracelular e fatores de transcrição nuclear envolvidos no processo inflamatório, a fim de melhor entender os mecanismos responsáveis por sua atividade anti-inflamatória/imunomoduladora.

Figura 27 - Resumo dos efeitos anti-inflamatórios do composto 4 em experimentos *in vitro* e *in vivo*



NO: Óxido Nítrico; MPO: Mieloperoxidase.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System*. 6th. ed. [s.l.] Elsevier, 2019.
- ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME NETWORK. Ventilation with Lower Tidal Volumes as Compared with Traditional Tidal Volumes for Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, v. 342, n. 18, p. 1301–1308, 4 maio 2000. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00132586-200102000-00017>>.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ALTAN, A. et al. Free and liposome form of gallic acid improves calvarial bone wound healing in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 10, n. 4, p. 156–163, 2020. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85082821467&doi=10.4103%2F2221-1691.280297&partnerID=40&md5=276ab92945ffa8b6630ea0ccc384717d>>.
- ALTEMEIER, W. A.; HUNG, C. F.; MATUTE-BELLO, G. Mouse Models of Acute Lung Injury. In: [s.l.: s.n.]p. 5–23.
- AOKI, S. et al. Progress in cell culture systems for pathological research. *Pathology International*, v. 66, n. 10, p. 554–562, 31 out. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pin.12443>>.
- AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological Reviews*, v. 223, n. 1, p. 20–38, 2008.
- ARIES, M. L.; HENSLEY-MCBAIN, T. Neutrophils as a potential therapeutic target in Alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology*, v. 14, n. March, p. 1–8, 2023.
- ASTE-AMEZAGA, M. et al. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cellular Immunology*, v. 156, n. 2, p. 480–492, 1994.
- BABU, S. K. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) autoregulates its expression and induces adhesion molecule expression in asthma. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 140, n. 1, p. 18–25, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459047>>.
- BAKER, K. A.; WEEKS, S. M. An overview of systematic review. *Journal of*

Perianesthesia Nursing, v. 29, n. 6, p. 454–458, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jopan.2014.07.002>>.

BAUST, J. M. et al. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v. 53, n. 8, p. 669–672, 14 set. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11626-017-0177-7>>.

BERONIUS, A. et al. Testing and refining the Science in Risk Assessment and Policy (SciRAP) web-based platform for evaluating the reliability and relevance of in vivo toxicity studies. *Journal of Applied Toxicology*, v. 38, n. 12, p. 1460–1470, dez. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jat.3648>>.

BHAT, M. Y. et al. Comprehensive network map of interferon gamma signaling. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 12, n. 4, p. 745–751, 2018.

BILUCA, F. C. et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, v. 129, 2020. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85076113286&doi=10.1016%2Fj.foodres.2019.108756&partnerID=40&md5=532c50458a5140f6e7c1726ebc103f8f>>.

BIONDO, C. et al. Essential role of interleukin-1 signaling in host defenses against group B streptococcus. *mBio*, v. 5, n. 5, p. 1–11, 2014.

BISWAS, S.; BIEBER, K.; MANZ, R. A. IL-10 revisited in systemic lupus erythematosus. *Frontiers in Immunology*, v. 13, n. August, p. 1–6, 2022.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature*, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in Immunology*, v. 36, n. 3, p. 161–178, fev. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490615000149>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

BORASCHI, D. et al. IL-37: A new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *European Cytokine Network*, v. 22, n. 3, p. 127–147, 2011.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.

BOWIE, A.; O'NEILL, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, n. 4, p. 508–514, 2000.

- BUTT, Y.; KURDOWSKA, A.; ALLEN, T. C. Acute lung injury: A clinical and molecular review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 140, n. 4, p. 345–350, 2016.
- CASELLA, I. G.; GATTA, M. Electrochemical reduction of NO₃⁻ and NO₂⁻ on a composite copper thallium electrode in alkaline solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 568, p. 183–188, jul. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022072804000567>>.
- CHAN, C. et al. Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. *Pharmacology Research and Perspectives*, v. 5, n. 5, p. 1–12, 2017.
- CHEN, H.; BAI, C.; WANG, X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. *Expert Review of Respiratory Medicine*, v. 4, n. 6, p. 773–783, 2010.
- CHEN, X.-M.; KITTS, D. D. Evidence for inhibition of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in Caco-2 and RAW 264.7 cells by a Maillard reaction product [5-(5,6-dihydro-4H-pyridin-3-ylidenemethyl)furan-2-yl]-methanol. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 406, n. 1–2, p. 205–215, 17 ago. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-015-2438-7>>.
- CHOE, S. et al. Effect of nifedipine , a calcium channel blocker , on the generation of nitric oxide and interleukin-1 β by murine macrophages activated by lipopolysaccharide from *Prevotella intermedia*. p. 59–71, 2021.
- CHOI, B.; LEE, C.; YU, J. W. Distinctive role of inflammation in tissue repair and regeneration. *Archives of Pharmacal Research*, n. 0123456789, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12272-023-01428-3>>.
- CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 78, n. 4, p. 1233–1261, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>>.
- CIUCEIS, C. De et al. Effect of antihypertensive treatment with lercanidipine on endothelial progenitor cells and inflammation in patients with mild to moderate essential hypertension. v. 7051, 2016.
- CONNELLY, L. et al. Biphasic Regulation of NF- κ B Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 6, p. 3873–3881, 15 mar. 2001. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/166/6/3873/70451/Biphasic-Regulation-of->

NF-B-Activity-Underlies-the>.

COPERCHINI, F.; CHIOVATO, L.; ROTONDI, M. Interleukin-6, CXCL10 and Infiltrating Macrophages in COVID-19-Related Cytokine Storm: Not One for All But All for One! *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. April, p. 1–8, 2021.

CRESPI, F. Dihydropyridines, Nitric Oxide and Vascular Protection. *Current Vascular Pharmacology*, v. 3, n. 2, p. 195–205, 2005.

DA SILVA, L. A. L. et al. A single-step isolation by centrifugal partition chromatography of the potential anti-inflammatory glaucolide B from *Lepidaploa chamissonis*. *Journal of Chromatography A*, v. 1605, p. 460362, nov. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967319307460>>.

DAI, B. et al. Coccomyxa Gloeobotrydiformis Polysaccharide Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 51, n. 6, p. 2523–2535, 2018. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/495922>>.

DE LUCA CANTO, G. et al. *Revisões sistemáticas da literatura: guia prático*. [s.l.] Brazil Publishing, 2020.

DEROSA, G. et al. Evaluation of safety and efficacy of a fixed olmesartan/amlodipine combination therapy compared to single monotherapies. *Expert Opinion on Drug Safety*, v. 12, n. 5, p. 621–629, 2013.

DESTRO, F.; BAROLO, M. A review on the modernization of pharmaceutical development and manufacturing – Trends, perspectives, and the role of mathematical modeling. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 620, n. February, p. 121715, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121715>>.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. Nitric oxide - An endothelial cell survival factor. *Cell Death and Differentiation*, v. 6, n. 10, p. 964–968, 1999.

DING, H. et al. Role of interferon-gamma (IFN- γ) and IFN- γ receptor 1/2 (IFN γ R1/2) in regulation of immunity, infection, and cancer development: IFN- γ -dependent or independent pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 155, n. August, p. 113683, 2022.

DOMSCHEIT, H. et al. Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. *Frontiers in Physiology*, v. 11, n. February, 2020.

DORWARD, D. A. et al. Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 135, n. 2, p. 182–199, 2012.

- DOS REIS, G. O. et al. Evidence that the anti-inflammatory effect of 4-aryl-4H-chromenes is linked to macrophage repolarization. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 36, n. 6, p. 1020–1030, 2022.
- DUARTE, L. J. et al. Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3- O -glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. *Food Chemistry*, v. 247, p. 56–65, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617319544>>.
- EDRAKI, N. et al. Dihydropyridines: evaluation of their current and future pharmacological applications. *Drug Discovery Today*, v. 14, n. 21–22, p. 1058–1066, 2009.
- ELISIA, I. et al. Comparison of RAW264.7, human whole blood and PBMC assays to screen for immunomodulators. *Journal of Immunological Methods*, v. 452, p. 26–31, 2018. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85031664464&doi=10.1016%2Fj.jim.2017.10.004&partnerID=40&md5=00ac5160d32a7297d3898e2807a5bb86>>.
- ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and Inflammation HYPOXIA-INDUCED INFLAMMATION. *N Engl J Med*, v. 364, n. 7, p. 656–665, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21323543>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3930928>%0A<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930928/pdf/nihms544226.pdf>>.
- FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute respiratory distress syndrome advances in diagnosis and treatment. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 319, n. 7, p. 698–710, 2018.
- FERNÁNDEZ-ARGÜELLES, M. T. et al. Flow injection determination of nitrite by fluorescence quenching. *Talanta*, v. 62, n. 5, p. 991–995, 2004.
- FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: Causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v. 5, n. 6, p. 338–349, 2008.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.
- FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 15, n. 8, p. 551–567, 29 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd.2016.39>>.
- GALEONE, A.; GRANO, M.; BRUNETTI, G. Tumor Necrosis Factor Family Members

and Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: State of the Art and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, 2023.

GHAHREMANI PIRAGHAJ, M. et al. Effect of efferocytosis of apoptotic mesenchymal stem cells (MSCs) on C57BL/6 peritoneal macrophages function. *Life Sciences*, v. 212, n. July, p. 203–212, 2018.

GHATE, N. B. et al. In Vitro Mechanistic Study of the Anti-inflammatory Activity of a Quinoline Isolated from *Spondias pinnata* Bark. *Journal of Natural Products*, v. 81, n. 9, p. 1956–1961, 28 set. 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.8b00036>>.

GIUSTARINI, D. et al. Adaptation of the Griess Reaction for Detection of Nitrite in Human Plasma. *Free Radical Research*, v. 38, n. 11, p. 1235–1240, 7 jan. 2004.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, v. 126, p. 131–138, 1982.

GUO, Z. et al. In vivo and in vitro immunomodulatory and anti-inflammatory effects of total flavonoids of *Astragalus*. *Africa Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n. 4, p. 60–73, 23 jul. 2016. Disponível em: <<http://journals.sfu.ca/africanem/index.php/ajtcam/article/view/3461/pdf>>.

GUPTA, S. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in T cells from aged humans: A role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Experimental Gerontology*, v. 37, n. 2–3, p. 293–299, 2002.

HALDAR, M.; MURPHY, K. M. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunological Reviews*, v. 262, n. 1, p. 25–35, nov. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12215>>.

HE, C. et al. Exopolysaccharide from *Paecilomyces lilacinus* modulates macrophage activities through the TLR4/NF- κ B/MAPK pathway. *Molecular Medicine Reports*, v. 20, p. 4943–4952, 15 out. 2019. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2019.10746>>.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>>.

HIGGINS, J. P. T. et al. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention*. 2nd editio ed. [s.l: s.n.]

HOBBS, S. et al. LPS-stimulated NF κ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages.

- Physiological Reports*, v. 6, n. 21, 13 nov. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.14814/phy2.13914>>.
- HOGGE, J. et al. IL-6 Controls the Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes* via Classical IL-6 Signaling. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 2, p. 703–711, 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1201044>>.
- HOLBROOK, J. et al. Tumour necrosis factor signalling in health and disease [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, v. 8, p. 1–12, 2019.
- HSU, H.; XIONG, J.; GOEDDEL, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, v. 81, n. 4, p. 495–504, 1995.
- HSU, L.-C. et al. IL-1 β -driven neutrophilia preserves antibacterial defense in the absence of the kinase IKK β . *Nature Immunology*, v. 12, n. 2, p. 144–150, 19 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.1976>>.
- HUANG, P. L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, v. 377, n. 6546, p. 239–242, set. 1995. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/377239a0>>.
- HUME, D. A. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 370, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4510422/>&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 11 ago. 2015.
- HUNTER, R. A. et al. Inaccuracies of Nitric Oxide Measurement Methods in Biological Media. *Analytical Chemistry*, v. 85, n. 3, p. 1957–1963, 5 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10715760400017327>>.
- HUTCHINS, A. P.; DIEZ, D.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges. *Briefings in Functional Genomics*, v. 12, n. 6, p. 489–498, 2013.
- ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. OCT, p. 1–22, 2014.
- JEON, Y. J. et al. Inhibition of NF- κ B/Rel nuclear translocation by dexamethasone: Mechanism for the inhibition of iNOS gene expression. *IUBMB Life*, v. 45, n. 3, p. 435–441, jul. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216549800202822>>.
- JIA, Z. et al. IL12 immune therapy clinical trial review: Novel strategies for avoiding CRS-associated cytokines. *Frontiers in Immunology*, v. 13, n. September, p. 1–12, 2022.

- JUNG, H. A. et al. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 199–206, set. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151300375X>>.
- KADOMOTO, S.; IZUMI, K.; MIZOKAMI, A. Macrophage Polarity and Disease Control. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 1, 2022.
- KARATOPRAK, G. S. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of *Kitaibelia balansae* BOISS. *FARMACIA*, v. 67, n. 6, p. 1054–1059, 20 dez. 2019. Disponível em: <<http://farmaciajournal.com/issue-articles/chemical-composition-and-anti-inflammatory-activity-of-kitaibelia-balansae-boiss/>>.
- KAYA, H. et al. Protective effect of an L-type calcium channel blocker, amlodipine, on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Human and Experimental Toxicology*, v. 37, n. 11, p. 1169–1179, 2018.
- KAZEMZADEH, A.; ENSAFI, A. A. Sequential flow injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in various samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 442, n. 2, p. 319–326, 2001.
- KHEDKAR, S. A.; AUTI, P. B. Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net 1, 4-Dihydropyridines: A Class of Pharmacologically Important Molecules. *Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 282–290, 2014.
- KIM, M.-J. et al. Anti-Inflammatory Effects of Grasshopper Ketone from *Sargassum fulvellum* Ethanol Extract on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 5, p. 820–826, 28 maio 2019. Disponível em: <<http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1901.01027>>.
- KIM, Y. S.; AHN, C. B.; JE, J. Y. Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF-kappa B and MAPK pathways. *Food Chemistry*, v. 202, p. 9–14, 2016.
- KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 7, p. 1830–1835, 2010.
- KLEGERIS, A. et al. Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 441, n. 3, p. 203–208, 2002.
- KOMODA, H. et al. Azelnidipine inhibits the differentiation and activation of THP-1 macrophages through the L-type calcium channel. *Journal of Atherosclerosis and*

Thrombosis, v. 25, n. 8, p. 690–697, 2018.

KOMODA, H.; INOUE, T.; NODE, K. Anti-Inflammatory Properties of Azelnidipine, a Dihydropyridine-Based Calcium Channel Blocker. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 32, n. 2, p. 121–128, 8 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10641960903254414>>.

KOUROSH-ARAMI, M. et al. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase. *Reviews in the Neurosciences*, v. 31, n. 6, p. 617–636, 2020.

L FERREYRO, B.; M PATINO, C.; CARVALHO FERREIRA, J. Meta-analyses: a primer for clinicians. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 46, n. 6, p. e20200609–e20200609, 2020. Disponível em: <http://www.jornaldepneumologia.com.br/detalhe_artigo.asp?id=3464>.

LAKSMITAWATI, D. R. et al. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). *Journal of Natural Remedies*, v. 16, n. 2, p. 73, 18 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.informaticsjournals.com/index.php/jnr/article/view/5367>>.

LANCASTER J. R., J. A Tutorial on the Diffusibility and Reactivity of Free Nitric Oxide. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 18–30, 1997.

LAPA, S.; LIMA, C.; PINTO, S. Simultaneous determination of nitrite , nitrate , sulphate and phenolic compounds , by sequential injection analysis , in wastewaters. p. 295–301, 2000.

LAROCK, C. N.; NIZET, V. Inflammasome/IL-1 β responses to streptococcal pathogens. *Frontiers in Immunology*, v. 6, n. 518, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00518/abstract>>.

LEE, H. A. et al. Ethyl acetate extract from *Asparagus cochinchinensis* exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells by regulating COX-2/iNOS, inflammatory cytokine expression, MAP kinase pathways, the cell cycle and anti-oxidant activity. *Molecular Medicine Reports*, v. 15, n. 4, p. 1613–1623, mar. 2017a. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.6166>>.

LEE, S.-B. et al. Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 via AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*, v. 49, p. 21–29, ago. 2017b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576917301947>>.

LEMOS, S. C. *PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA Desenvolvimento de metodologia alternativa limpa para análise de nitrito*. 2008. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2008.

LEONOVA, E. et al. New 1,4-Dihydropyridines Down-regulate Nitric Oxide in Animals with Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus and Protect Deoxyribonucleic Acid against Peroxynitrite Action. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, v. 119, n. 1, p. 19–31, 2016.

LIM, D. et al. *Stemona tuberosa* prevented inflammation by suppressing the recruitment and the activation of macrophages in vivo and in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 160, p. 41–51, fev. 2015a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874114008162>>.

LIM, D. et al. *Sceptridium ternatum* attenuates allergic contact dermatitis-like skin lesions by inhibiting T helper 2-type immune responses and inflammatory responses in a mouse model. *Journal of Dermatological Science*, v. 79, n. 3, p. 288–297, set. 2015b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181115300165>>.

LIN, Z. et al. CCL2: An important cytokine in normal and pathological pregnancies: A review. *Frontiers in Immunology*, v. 13, n. January, p. 40–45, 2023.

LIND, M. et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 93, p. 370–375, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217313562>>.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 2, n. 1, p. 17023, 14 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/sigtrans201723>>.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001.

LOWRY, O. H.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Readings*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: <http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf>.

LU, J. et al. Amlodipine and atorvastatin improve ventricular hypertrophy and diastolic function via inhibiting TNF- α , IL-1 β and NF- κ B inflammatory cytokine networks in elderly spontaneously hypertensive rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 83, p. 330–339, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.034>>.

MAO, K. et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects

against LPS-induced septic shock. *Cell research*, v. 23, n. 2, p. 201–212, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3567828&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MATSUMORI, A.; NISHIO, R.; NOSE, Y. Calcium Channel Blockers Differentially Modulate Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Circulation Journal*, v. 74, n. 3, p. 567–571, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B012369400000171X>>.

MATSUMORI, A.; NUNOKAWA, Y.; SASAYAMA, S. Nifedipine inhibits activation of transcription factor NF- κ B. *Life Sciences*, v. 67, n. 21, p. 2655–2661, out. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320500008493>>.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Frontiers in immunology*, v. 5, n. 478, p. 270, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4191211&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24 ago. 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*, v. 44, n. 5, p. 725–738, 2011.

MCKENZIE, J. E.; BELLER, E. M.; FORBES, A. B. Introduction to systematic reviews and meta-analysis. *Respirology*, v. 21, n. 4, p. 626–637, 2016.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MENEZES, S. L. S. et al. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: Inflammatory and ultrastructural analyses. *Journal of Applied Physiology*, v. 98, n. 5, p. 1777–1783, 2005.

MERAM, C.; WU, J. Anti-inflammatory effects of egg yolk livetins (α , β , and γ -livetins) fraction and its enzymatic hydrolysates in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Food Research International*, v. 100, p. 449–459, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917303563>>.

MERLY, L.; SMITH, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 39, n. 2, p. 55–58, 4 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08923973.2017.1282511>>.

MIKUŠKA, P.; VEČEŘA, Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in water

by chemiluminescent flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 495, n. 1–2, p. 225–232, 2003.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *Journal of Immunology*, v. 199, n. 7, p. 2194–2201, 2017. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L618434294>>.

MISHRA, A. P.; BAJPAI, A.; RAI, A. K. 1,4-Dihydropyridine: A Dependable Heterocyclic Ring with the Promising and the Most Anticipable Therapeutic Effects. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 15, p. 1219–1254, 2019.

MOHR, E. T. B. et al. Evidence That the Anti-Inflammatory Effect of Rubiadin-1-methyl Ether Has an Immunomodulatory Context. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, p. 1–12, 3 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2019/6474168/>>.

MOHR, E. T. B. et al. The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization. *Inflammopharmacology*, v. 30, n. 6, p. 2427–2439, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10787-022-01084-x>>.

MOKRA, D. Acute Lung Injury – From Pathophysiology to Treatment Department of Physiology , Jessenius Faculty of Medicine in Martin , Comenius University in. v. 69, 2020.

MOORE, K. et al. Inhibitory effects of cranberry polyphenol and volatile extracts on nitric oxide production in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food & Function*, v. 10, n. 11, p. 7091–7102, 2019. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C9FO01500K>>.

MORRIS, S. M. Arginine metabolism: Boundaries of our knowledge. *Journal of Nutrition*, v. 137, n. 6, 2007.

MULLER, J. E. et al. Interleukin-6 in SARS-CoV-2 induced disease: Interactions and therapeutic applications. *Psychiatry Research*, v. 14(4), n. January, p. 293, 2020.

MURRAY, P. J. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 24, p. 8686–8691, 2005.

NAIR, M. G. et al. Chitinase and Fizz Family Members Are a Generalized Feature of Nematode Infection with Selective Upregulation of Ym1 and Fizz1 by Antigen-Presenting Cells. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 1, p. 385–394, 2005.

NETEA, M. G. et al. A guiding map for inflammation. *Nature Immunology*, v. 18, n. 8,

- p. 826–831, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ni.3790>>.
- NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.
- NGUYEN, H.; GUZ-MONTGOMERY, K.; SAHA, D. Oncolytic Virus Encoding a Master Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin 12 in Cancer Immunotherapy. *Cells*, v. 9, n. 2, p. 400, 10 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/400>>.
- NICHOLLS, J. M. et al. Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, v. 361, n. 9371, p. 1773–1778, maio 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673603134137>>.
- NOROOZIFAR, M. et al. Application of manganese(IV) dioxide microcolumn for determination and speciation of nitrite and nitrate using a flow injection analysis–flame atomic absorption spectrometry system. *Talanta*, v. 71, n. 1, p. 359–364, 15 jan. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006002712>>.
- OLIVEIRA, J. F. de. A Pós-Graduação e a pesquisa no Brasil: processos de regulação e de reconfiguração da formação e da produção do trabalho acadêmico. *Praxis Educativa*, v. 10, n. 2, p. 343–363, 2015.
- OLZA, J. et al. Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. *Diabetes Care*, v. 35, n. 11, p. 2373–2376, 2012.
- ORECCHIONI, M. et al. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.
- OWENS, J. K. Systematic reviews: Brief overview of methods, limitations, and resources. *Nurse Author & Editor*, v. 31, n. 3–4, p. 69–72, 2021.
- PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, p. n71, 29 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.n71>>.
- PANG, Y. et al. Celecoxib aggravates atherogenesis and upregulates leukotrienes in ApoE mice and lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Atherosclerosis*, v. 284, p. 50–58, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915019301030>>.
- PARANHOS, J. et al. *ESTRATÉGIAS DAS GRANDES EMPRESAS FARMACÊUTICAS NACIONAIS NA INTERAÇÃO EMPRESA-ICTANAIS DO III Encontro Nacional de Economia Industrial e Inovação*, 2018. .

- PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 23, n. 2, p. 75–93, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2010.04.007>>.
- PAUTZ, A.; LI, H.; KLEINERT, H. Regulation of NOS expression in vascular diseases. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, v. 26, n. 5, p. 85–101, 2021.
- PESCE, J. T. et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 4, 2009.
- POLLO, L. A. E. et al. Synthesis and in vitro evaluation of Ca²⁺ channel blockers 1,4-dihydropyridines analogues against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*: SAR analysis. *Parasitology International*, v. 66, n. 6, p. 789–797, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2017.08.005>>.
- POLTORAK, A. et al. Genetic and Physical Mapping of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 240, n. 170, p. 340–355, 1998.
- PREDONZANI, A. et al. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. *World Journal of Experimental Medicine*, v. 5, n. 2, p. 64–77, 2015.
- RAHMAN, M. M.; MCFADDEN, G. Modulation of NF-κB signalling by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 291–306, 8 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro2539>>.
- RANAWEERA, S. S. et al. Anti-inflammatory effect of sulforaphane on LPS-stimulated RAW 264.7 cells and ob/ob mice. *Journal of Veterinary Science*, v. 21, n. 6, 2020. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C9FO01500K>>.
- RANJBAR, M. et al. Role of CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of COVID-19 and possible Treatments: All options on the Table. *International Immunopharmacology*, v. 113, n. January, p. 109325, dez. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576922008098>>.
- RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993.
- RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, v. 306, n. 5939, p. 174–176, nov. 1983. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/306174a0>>.

- RENNANE, S.; BAKER, L.; MULCAHY, A. Estimating the Cost of Industry Investment in Drug Research and Development: A Review of Methods and Results. *Inquiry (United States)*, v. 58, p. 1–11, 2021.
- ROMERIO, A.; PERI, F. Increasing the Chemical Variety of Small-Molecule-Based TLR4 Modulators: An Overview. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 10 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01210/full>>.
- RUTHMAN, C. A.; FESTIC, E. Emerging therapies for the prevention of acute respiratory distress syndrome. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, v. 9, n. 4, p. 173–187, 22 ago. 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753465815585716>>.
- SAFAK, C.; SIMSEK, R. Fused 1,4-Dihydropyridines as Potential Calcium Modulatory Compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 6, n. 7, p. 747–755, 1 jul. 2006. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=6&issue=7&spage=747>>.
- SANTARLASCI, V. et al. IL-1 and T helper immune responses. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. JUL, p. 1–7, 2013.
- SANTOS, E.; CARDOSO, D.; APÓSTOLO, J. Como medir e explorar a heterogeneidade de uma meta-análise: Estratégias metodológicas fundamentais. *Revista de Enfermagem Referência*, v. VI Série, n. Nº 1, p. 1–8, 2022.
- SANTOS, M. C. B. G.; PINHO, M. Estratégias tecnológicas em transformação : um estudo da indústria farmacêutica brasileira. *Gestão & Produção*, v. 19, n. 2, p. 405–418, 2012.
- SARADA, S. K. S. et al. Nifedipine inhibits hypoxia induced transvascular leakage through down regulation of NFkB. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 183, n. 1, p. 26–34, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.05.016>>.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, n. 1, p. 93–151, 2006. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708>>.
- SCHRODER, K. et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.
- SCHUHMACHER, A. et al. R&D efficiency of leading pharmaceutical companies – A 20-year analysis. *Drug Discovery Today*, v. 26, n. 8, p. 1784–1789, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.005>>.

- SCRIVO, R. et al. Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 10, n. 7, p. 369–374, 2011.
- SHAO, Y. R.; XU, D. Y.; LIN, J. Nutrients and rheumatoid arthritis: From the perspective of neutrophils. *Frontiers in Immunology*, v. 14, n. February, p. 1–7, 2023.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018.
- SHARMA, V. K.; SINGH, S. K. Synthesis, utility and medicinal importance of 1,2- & 1,4-dihydropyridines. *RSC Advances*, v. 7, n. 5, p. 2682–2732, 2017.
- SICA, A. et al. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, n. 21, p. 4111–4126, 2015.
- SINGH, J. et al. The measurement of nitrite in adulterated urine samples by high-performance ion chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 23, n. 3, p. 137–140, 1999.
- SIRMAGUL, B. et al. Effects of verapamil and nifedipine on different parameters in lipopolysaccharide-induced septic shock. *Heart and Vessels*, v. 21, n. 3, p. 162–168, 2006.
- SMIGIEL, K. S.; PARKS, W. C. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. *Current Rheumatology Reports*, v. 20, n. 4, p. 17, 17 abr. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11926-018-0725-5>>.
- SOLANKI, K. et al. The expanding roles of neuronal nitric oxide synthase (NOS1). *PeerJ*, v. 10, p. 1–31, 2022.
- STERN, A. S. et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 17, p. 6808–6812, 1990.
- SUGIMOTO, M. A. et al. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Frontiers in Immunology*, v. 7, n. APR, 26 abr. 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00160/abstract>>.
- SUN, H. et al. Vaccaria hypaphorine alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation via inactivation of NFκB and ERK pathways in Raw 264.7 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 17, n. 1, p. 120, 20 dez. 2017. Disponível em: <<http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-1635-1>>.
- SZARKA, R. J. et al. A murine model of pulmonary damage induced by

- lipopolysaccharide via intranasal instillation. *Journal of Immunological Methods*, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.
- TACIAK, B. et al. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLOS ONE*, v. 13, n. 6, p. e0198943, 11 jun. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0198943>>.
- TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *Journal of Hypertension*, v. 27, n. 10, p. 1929–1940, 2009.
- TOUSOULIS, D. et al. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology*, v. 10, n. 1, p. 4–18, 2012.
- TOYODA, S. et al. Pleiotropic effects of calcium channel blockers. *Hypertension Research*, v. 41, n. 4, p. 230–233, 15 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41440-018-0014-8>>.
- TSUTSUI, M. et al. Significance of nitric oxide synthases : Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 127, n. 1, p. 42–52, 2015.
- TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines : At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *BBA - Molecular Cell Research*, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>>.
- URBANIAK, G. C.; PLOUS, S. *Research Randomizer (Version 4.0)*, 2013. .
- VALENTIM, M. L. P. Conceitos sobre Gestão do Conhecimento: uma revisão sistemática da literatura brasileira. *Informação & Sociedade: Estudos*, v. 30, n. 4, p. 1–34, 12 jan. 2021. Disponível em: <<https://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/ies/article/view/57186>>.
- VALLÉS, P. G. et al. Toll-like Receptor 4 in Acute Kidney Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 2, 2023.
- VANINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox biology*, v. 6, p. 334–343, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26335399>>. Acesso em: 11 set. 2015.
- VERGADI, E. et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *The Journal of Immunology*, v. 198, n. 3, p. 1006–1014, 2017.
- WIENER-KRONISH, J. P. et al. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. *Journal of Clinical Investigation*, v. 88, n. 3, p. 864–875, 1991.

WINFOR. *The Global Economic Impact of the Pharmaceutical Industry*, 2020. .
Disponível em:

<https://www.wifor.com/uploads/2021/06/WifOR_Global_Economic_Footprint_Study_September_2020.pdf>.

WYNS, H. et al. In vivo porcine lipopolysaccharide inflammation models to study immunomodulation of drugs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 166, n. 3–4, p. 58–69, ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242715001270>>.

XU, N.; LI, X.; ZHONG, Y. Inflammatory Cytokines: Potential Biomarkers of Immunologic Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Mediators of Inflammation*, v. 2015, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4333561&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

XUAN, L. et al. IL-10 family cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: From experiments to the clinic. *Frontiers in Immunology*, v. 13, n. August, p. 1–9, 2022.

YAMAGISHI, S. et al. Azelnidipine, A Newly Developed Long-Acting Calcium Antagonist, Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8 Expression in Endothelial Cells through its Anti-Oxidative Properties. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 43, n. 5, p. 724–730, maio 2004. Disponível em: <<http://journals.lww.com/00005344-200405000-00016>>.

YANG, S. et al. The role of TNF- α in the phagocytosis of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 132, n. November 2022, p. 108488, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.108488>>.

YOON, S.-B. et al. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, n. 2, p. 286–290, set. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874109004024>>.

YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, v. 877, n. November 2019, p. 173090, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>>.

ZHANG, L. et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*, v. 527, n. 7576, p. 100–104, 19 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature15376>>.

ZHANG, Y.; YAN, R.; HU, Y. Oxymatrine inhibits lipopolysaccharide-induced

inflammation by down-regulating Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B in macrophages. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 93, n. 4, p. 253–260, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2014-0362>>.

ZHOU, Y. et al. New use of old medicine: Nifedipine acts on the TRP family and inflammatory proteins in the treatment of chilblain. *Burns*, v. 48, n. 2, p. 372–380, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.burns.2021.05.005>>.

APÊNDICE A – Artigo publicado referente ao capítulo 1 dessa tese

Inflammation Research (2022) 71:741–758
<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 / Published online: 25 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

APÊNDICE B - Artigo submetido para publicação referente ao capítulo 2 dessa tese



Eduardo Dalmarco <edalmarco@gmail.com>

"Fundamental & Clinical Pharmacology" - Manuscript ID FCP-FUND-OA-02-23-0076

1 mensagem

Denise Jung <onbehalf@manuscriptcentral.com>

22 de fevereiro de 2023 às 15:05

Responder a: Denise.Jung@unistra.fr

Para: edalmarco@gmail.com, eduardo.dalmarco@ufsc.br

Cc: brunomatheusfacchin@gmail.com, tainalubschinski@gmail.com, yeojim@hotmail.com, paula.fragoso@ufsc.br, biancakbeck@gmail.com, ziliani.buss@ufsc.br, luizpollo2@gmail.com, p.l.sandjo@ufsc.br, edalmarco@gmail.com, eduardo.dalmarco@ufsc.br

22-Feb-2023

Dear Dr. Dalmarco:

Your manuscript entitled "Evaluation of the anti-inflammatory effect of 1,4-dihydropyridine derivatives" by Facchin, Bruno; Lubschinski, Tainá; Moon, Yeo Jim; de Oliveira, Paula; Beck, Bianca; Buss, Ziliani; Pollo, Luiz Antonio ; Sandjo, Louis; Dalmarco, Eduardo, has been successfully submitted online to the journal "Fundamental & Clinical Pharmacology".

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

Your manuscript ID is FCP-FUND-OA-02-23-0076.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when contacting the office for questions.

If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/fcp> and edit your user information as appropriate.

Thank you for submitting your manuscript to "Fundamental & Clinical Pharmacology".

Sincerely,

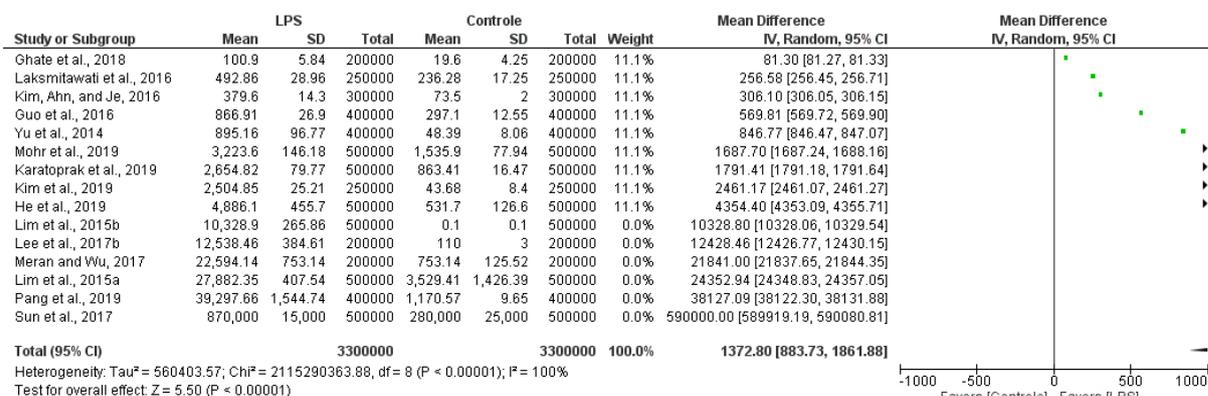
"Fundamental & Clinical Pharmacology"

Editorial Office contact - Denise.Jung@unistra.fr

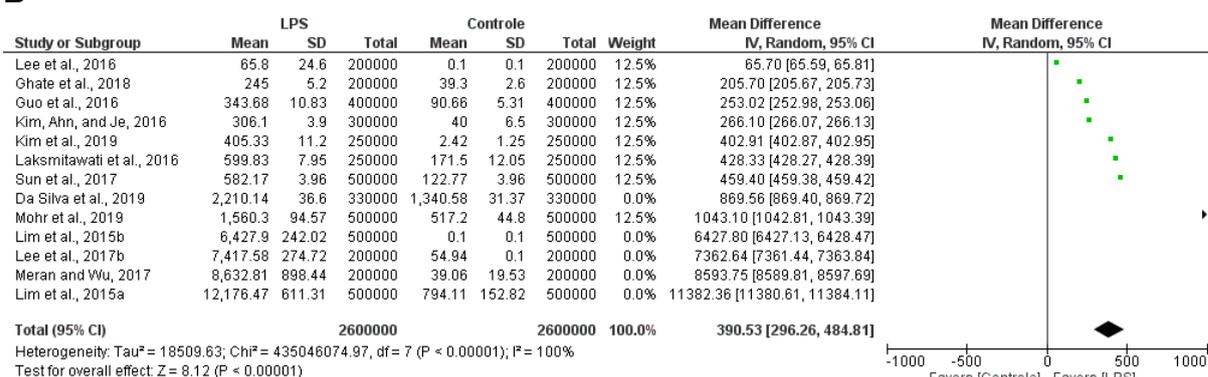
APÊNDICE C - Material suplementar

Figura Suplementar 1 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos após a retirada de outliers.

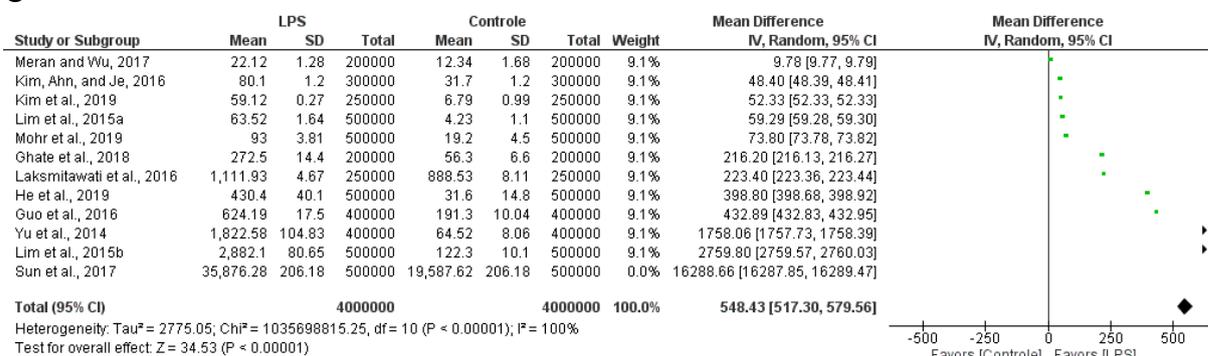
A



B

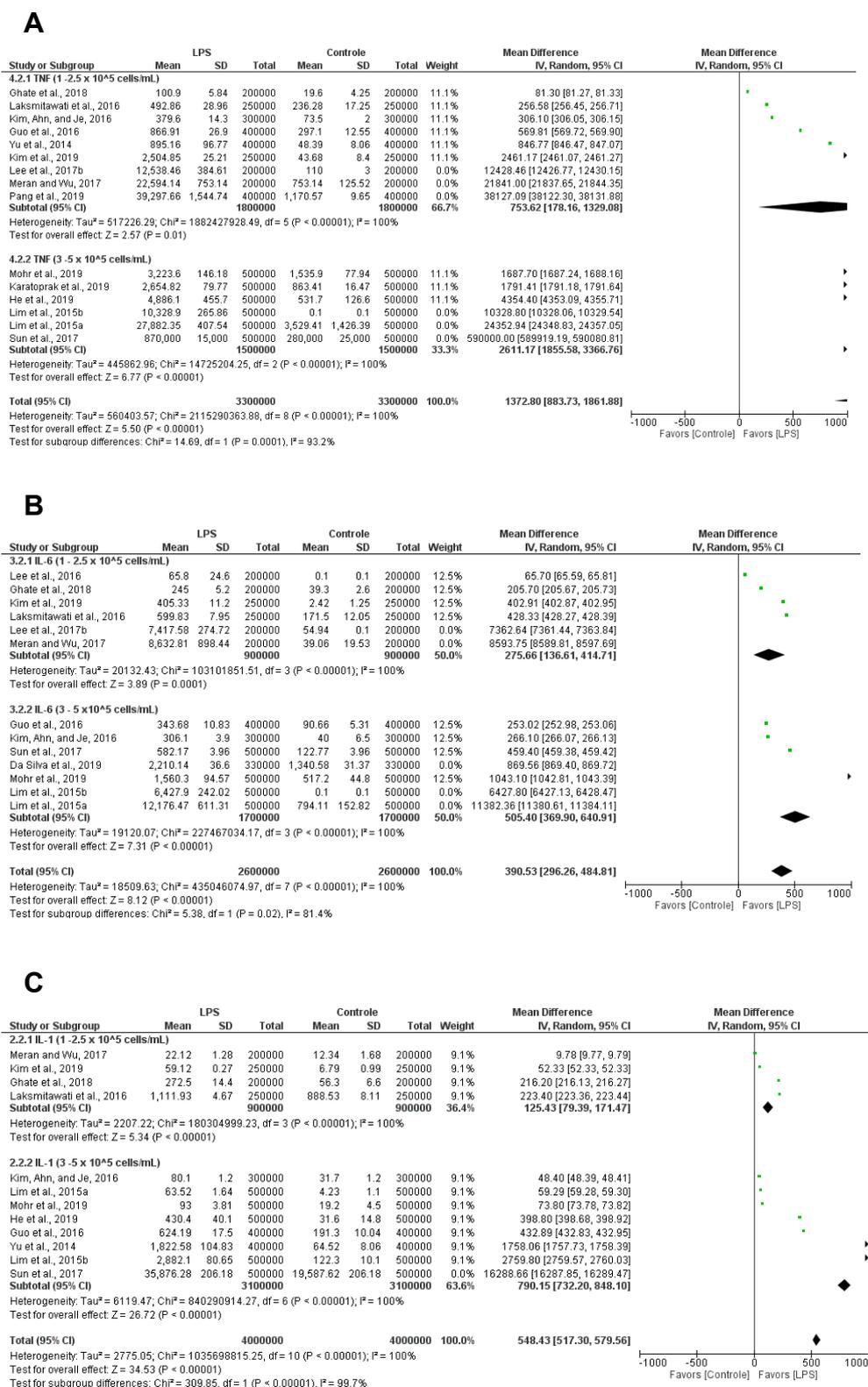


C



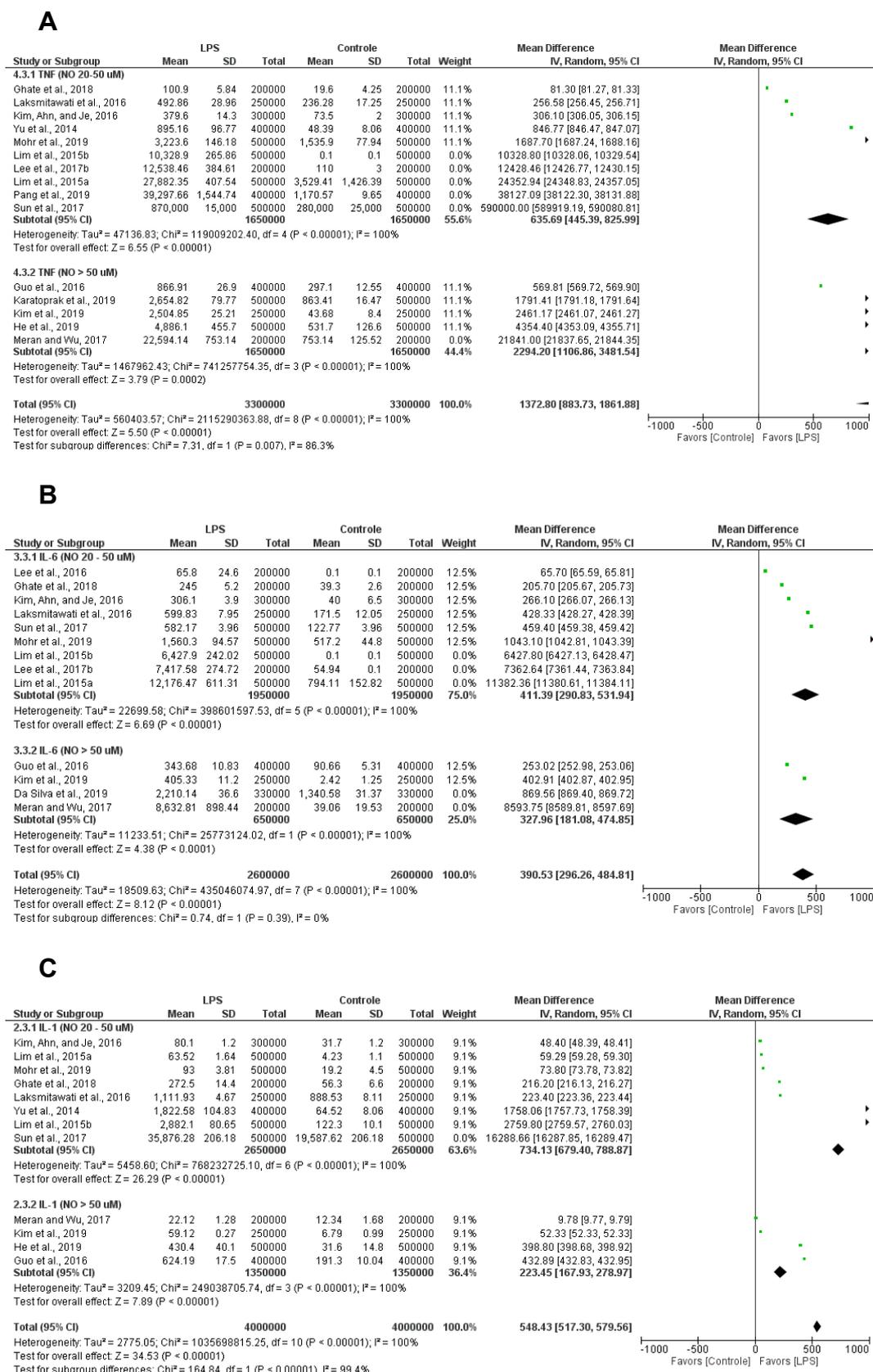
Legenda: A) TNF- α ; B) IL-6; C) IL-1 β . CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Figura Suplementar 2 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos de densidade celular, após a retirada de outliers.



Legenda: A) TNF- α ; B) IL-6; C) IL-1 β . CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Figura Suplementar 3 - Forest plot das diferenças médias na produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β entre o grupo controle e o grupo intervenção (LPS) dos estudos incluídos por subgrupos produção de óxido Nítrico, após a retirada de outliers.



Legenda: A) TNF- α ; B) IL-6; C) IL-1 β . CI 95%, intervalo de confiança de 95%; Tau², coeficiente de correlação Tau de Kendall; I², Teste I²; df, graus de liberdade.

Tabela Suplementar 1. Checklist of 30 items - Inflammation model in RAW 264.7.

Items	Criteria	
7	Cell culture	Reported in page:
1	The test system (cell line) was described/ Cellular density ~10 ⁵ cells mL ⁻¹	
2	The source of the test system was stated.	
3	Cell viability of the test system was described.	
4	The number of cell passages of the cell line used, was stated.	
5	Composition of media was described, including use of serum, antibiotics, etc.	
6	Incubation temperature, humidity, and CO ₂ concentration were described.	
7	Measures taken for avoiding or screening for contamination by mycoplasma, bacteria, fungi and virus were described.	
7	LPS intervention	
8	The microorganism name, ID or CAS-number of the LPS was given.	
9	The purity of the test compound was stated or is traceable according to information given regarding manufacturer and lot/batch number.	
10	The administered dose levels or concentrations were stated (LPS: 1 µg/mL and drugs)	
11	The vehicle was described (saline, e.g.)	
12	It was stated that an untreated or vehicle control was included.	
13	Incubation time (12-48h)	
14	Stock solution preparation was described.	

6	NO assay	
15	Sample volume	
16	Cell density or number of cells used during treatment was described.	
17	The duration of treatment was stated.	
18	The number of replicates per dose level/concentration or the number of times the experiment was repeated was stated.	
19	Outcome levels (μM , minimum - maximum)	
20	Statistical analysis	
10	Cytokines assay	
21	Volume sample	
22	Reagents / Kit (manufacture)	
23	Plate	
24	Cell density	
25	Unit measurement described (e.g. pg mL ⁻¹)	
26	Kit limits/assay range was described, Min-Max (e.g. pg mL ⁻¹)	
27	Incubation time	
28	Microplate type (wells)	
29	Outomes (level)	
30	Statistical analysis	

Hiperlink Planilha 1 – Material suplementar:

https://drive.google.com/drive/folders/17FlzW4C_vOxY0TJlz2AV5hEYyGAZA4DE?usp=sharing