



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

Eduarda Talita Bramorski Mohr

**Avaliação do efeito anti-inflamatório de derivados das tiazolidinas**

Florianópolis

2024

Eduarda Talita Bramorski Mohr

**Avaliação do efeito anti-inflamatório de derivados das tiazolidinas**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco

Florianópolis

2024

Mohr, Eduarda Talita Bramorski

Avaliação do efeito anti-inflamatório de derivados das tiazolidinas / Eduarda Talita Bramorski Mohr ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2024.

170 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. tiazolidinas. 3. agente anti-inflamatório. 4. ativação de macrófagos. I. Dalmarco, Eduardo Monguilhott. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Eduarda Talita Bramorski Mohr

Avaliação do efeito anti-inflamatório de derivados das tiazolidinas

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 29 de fevereiro de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>. Dirleise Colle  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>., Dr<sup>a</sup>. Tatiana Herrerias  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof., Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco  
Orientador

Florianópolis, 2024

Aos meus pais Raquel Amélia Bramorski Mohr e Valdir Mohr

Aos meus guias e mentores espirituais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus guias e mentores espirituais por toda a caminhada e proteção.

Aos meus pais, Raquel Amélia Bramorski Mohr e Valdir Mohr, pelo suporte ao longo dos anos, pela paciência e por todo o incentivo. Esse título também pertence a vocês.

Ao meu filho, Antônio Mohr Danguí, minha luz e inspiração.

Ao meu marido Hiago Antônio Sirino Danguí, pelo apoio, paciência, amor e companheirismo.

Ao meu avô, Hilario Bramorski, que me chamou de “doutora” desde o meu primeiro dia de graduação; e à minha avó Maria Alice Pasold Alves Bramorski, por ter me ajudado a escolher esta profissão.

À Thayse Teixeira, por ser uma excelente ouvinte.

Agradeço, em especial, ao meu orientador Eduardo Monguilhott Dalmarco, pelos anos de parceria e orientação; pelos trabalhos publicados e pelos ensinamentos compartilhados. Agradeço ainda, às professoras Iara Fabrícia Kretzer e Izabel Galhardo Demarchi, pela ajuda e suporte acadêmico.

Agradeço à Taina Larissa Lubschinski pela amizade, parceria e confiança. Muito obrigada por tudo, minha jovem aprendiz de bancada.

Meu muito obrigada também à Julia Salvan da Rosa e Julia Meller Dias de Oliveira. Graças a vocês, este caminho foi mais fácil.

Por fim, agradeço a todos os colegas do LAPI que, de alguma maneira, fizeram parte desta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Adorei as almas, as almas me atenderam; eram santas almas, lá do cruzeiro*  
(Filhas de Iemanjá/Nelson Mateus)

## RESUMO

**Introdução:** A inflamação é uma resposta protetora contra diversos fatores que desequilibram a homeostasia do hospedeiro. Seu curso normal tem como objetivo proteger os tecidos contra infecções, estresse tecidual e injúrias diversas. Dentro desse processo, os macrófagos são reconhecidos como células-alvo em diversas condições inflamatórias. As tiazolidinas, por sua vez, são uma classe de moléculas que apresentam uma grande diversidade de atividades biológicas, com estruturas farmacologicamente ativas, servindo como base para o desenvolvimento de novos medicamentos com possível ação anti-inflamatória. **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo 1) responder sistematicamente à pergunta de pesquisa “Os derivados das tiazolidinas apresentam atividade anti-inflamatória em modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?” e 2) avaliar o efeito anti-inflamatório de 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas e sua possível atividade sobre a polarização de macrófagos. **Metodologia:** Para responder à pergunta de pesquisa realizamos uma revisão sistemática com meta-análise seguindo a declaração PRISMA e o *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention*, elencando apenas trabalhos científicos que mensuraram a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. A segunda parte desta tese avaliou o efeito anti-inflamatório de 28 compostos derivados da 2-iminotiazolidinas. Esses compostos passaram por uma triagem *in vitro* utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7 induzidos por LPS. Os compostos com melhor resultado seguiram para testes *in vivo* utilizando modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS, com posterior experimentos *in vitro* para elucidação do seu mecanismo de ação. **Resultados:** Durante a revisão sistemática, um total de 13 estudos foram incluídos. A meta-análise demonstrou que macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS produziram altos níveis de NO em comparação com macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS e tratados com derivados das tiazolidinas. Além disso, a certeza na evidência cumulativa foi considerada moderada para o desfecho primário (NO) e secundário (iNOS e NF-κB). Com relação a qualidade metodológica, 7 estudos foram relevantes sem restrições (53.8%) e 6 estudos foram relevantes com restrições (46.2%). Na segunda parte dessa tese, dos 28 derivados das tiazolidinas triados, apenas 3 compostos tiveram sua atividade anti-inflamatória testada *in vivo*, onde o composto [metil 2-(benzoilimino)-3-metil-4-(nitrobenzil)-1, 3-tiazolidina-4-carboxilato] (**13**) foi o único capaz de inibir a migração leucocitária e exsudação em camundongos induzidos por LPS. Durante os experimentos *in vitro* para a elucidação de mecanismo de ação, o composto **13** foi capaz de atuar no aumento da fagocitose, da expressão de Arginase-1, produção de IL-10 e na expressão de CD206. Concomitantemente, este composto diminuiu os níveis de biomarcadores anti-inflamatórios (citocinas, iNOS e COX-2), com declínio na ativação de NF-κB. **Conclusão:** Considerando todas as evidências encontradas, podemos considerar que 1) a revisão sistemática mostrou que os derivados das tiazolidinas são capazes de diminuir a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS, contribuindo para a redução da expressão da iNOS e regulação da via de sinalização do NF-κB, e 2) que derivados das 2-iminotiazolidinas (composto **13**) apresentam atividade anti-inflamatória com mecanismo de ação intimamente relacionado a polarização de macrófagos (M1/M2), em modelos *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** tiazolidinas; agente anti-inflamatório; ativação de macrófagos.



## ABSTRACT

**Introduction:** Inflammation is a protective response against several factors that unbalance host homeostasis. Its normal course aims to protect tissues against infections, stress and other injuries. In this process, macrophages are recognized as important cells, involved in several inflammatory conditions. In this scenario, thiazolidine derivatives are a class of molecules with pharmacological privileged structures that can be used for the development of new drugs with possible anti-inflammatory activity. **Objectives:** This study aimed to 1) systematically answer the research question “Do thiazolidine derivatives exhibit anti-inflammatory activity in LPS-induced RAW 264.7 macrophages?” and 2) evaluate the anti-inflammatory activity of 28 compounds derivatives from 2-iminothiazolidines and their possible activity on macrophages polarization. **Methodology:** To answer the research question, we conducted a systematic review with meta-analysis following the PRISMA statement and the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention, listing only scientific studies that measured the production of nitric oxide (NO) in LPS-induced RAW 264.7 macrophages treated with thiazolidine derivatives. The second part of this thesis evaluated the anti-inflammatory effect of 28 compounds derived from 2-iminothiazolidines. These compounds were screened *in vitro* using LPS-induced RAW 264.7 macrophages model. The compounds with the best results were tested *in vivo* using LPS-induced acute lung injury model, with subsequent *in vitro* experiments to elucidate their mechanism of action. **Results:** During the systematic review, a total of 13 studies were included. The meta-analysis demonstrated that LPS-induced RAW 264.7 macrophages produced high levels of NO compared to LPS-induced RAW 264.7 macrophages treated with thiazolidine derivatives. Furthermore, the certainty of cumulative evidence was considered moderate for the primary (NO) and secondary (iNOS and NF- $\kappa$ B) outcomes. Regarding methodological quality, 7 studies were relevant without restrictions (53.8%) and 6 studies were relevant with restrictions (46.2%). In the second part of this thesis, after the *in vitro* screening, only 3 compounds had their anti-inflammatory activity tested *in vivo*, where compound [methyl 2-(benzoylimino)-3-methyl-4-(nitrobenzyl)-1, 3 -thiazolidine-4-carboxylate] (**13**) was the only one capable of inhibiting leukocyte migration and exudation in LPS-induced mice. During *in vitro* experiments to elucidate the mechanism of action, compound **13** was able to increase phagocytosis, Arginase-1 expression, IL-10 production and CD206 expression. Concomitantly, this compound decreased the levels of anti-inflammatory biomarkers (cytokines, iNOS and COX-2), with a decline in NF- $\kappa$ B activation. **Conclusion:** Considering all these evidences together, we can hipotetize that 1) the systematic review showed that thiazolidine derivatives are capable of reducing NO production in LPS-induced RAW 264.7 macrophages, contributing to the reduction of iNOS expression and regulation of NF- $\kappa$ B signaling pathway, and 2) that derivatives of 2-iminothiazolidines (compound **13**) present anti-inflammatory activity with a mechanism of action closely related to macrophage polarization (M1/M2) when tested using LPS *in vitro* and *in vivo* models.

**Keywords:** thiazolidines; anti-inflammatory agents; Macrophage activation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Esquema da via de sinalização do NF-κB a partir da ativação do TLR4 .....	23
Figura 2 – Apresentação das isoformas de NOS e ativação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) durante o processo inflamatório.....	27
Figura 3 – Polarização de macrófagos em seus fenótipos M1/M2. ....	34
Figura 4 – Principais anéis heterocíclicos derivados dos tiazóis .....	35
Figura 5– Derivados das 2-iminotiazolidinas com atividade biológica estudada .....	38
Figura 6 – Processo de busca e seleção dos estudos com base na declaração PRISMA.....	53
Figura 7 – Resumo da avaliação da qualidade (confiabilidade) dos estudos incluídos (n = 13).....	58
Figura 8 – Resumo da relevância dos estudos incluídos (n = 13) .....	59
Figura 9 – <i>Forest plot</i> das médias na produção de NO entre o grupo controle (LPS) e o grupo intervenção (derivados das tiazolidinas) dos estudos incluídos. ....	64
Figura 10 – Representação simplificada da síntese dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas.....	77
Figura 11 – Desenho experimental realizado durante a avaliação da atividade anti-inflamatória dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas .....	81
Figura 12 – Modelo de inflamação <i>in vitro</i> utilizado na linhagem de macrófagos RAW 264.7 .....	85
Figura 13 – Representação do modelo <i>in vivo</i> de lesão aguda pulmonar induzida por LPS utilizado em camundongos murinos.....	95
Figura 14 – Efeito dos <b>3</b> compostos derivados das 2-iminotiazolidinas ( <b>13</b> , <b>21</b> e <b>22</b> ) (30 mg/kg) na contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos com ALI induzida por LPS.....	105
Figura 15 – Efeito da 2-iminotiazolidina <b>13</b> (3, 10 e 30 mg/kg) na contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos com ALI induzida por LPS.....	106
Figura 16 – Efeito da 2-iminotiazolidina <b>13</b> na exsudação (3, 10 e 30 mg/kg) de camundongos com ALI induzida por LPS .....	107
Figura 17 – Efeito da 2-iminotiazolidina <b>13</b> (30 μM) sobre a fosforilação da subunidade p65 da via NF-κB em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	108

Figura 18 – Efeito da 2-iminotiazolidina <b>13</b> sobre a expressão de mRNA da iNOS, COX-2 e Arginase-1 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	110
Figura 19 – Efeito do composto <b>13</b> em citocinas pró- (IL-12p70 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	111
Figura 20 – Efeito da 2-iminotiazolidina <b>13</b> sobre a atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	112
Figura 21 – Efeito da 2-iminotiazolidina <b>13</b> sobre a expressão do receptor de manose (CD206) na superfície de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	113
Figura 22 – Resumo dos resultados obtidos durante a avaliação da atividade anti-inflamatória dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas .....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Principais características da inflamação crônica ou aguda.....	19
Tabela 2 – Estratégia PICOS .....	47
Tabela 3 – Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n = 13).....	56
Tabela 4 – Resumo das características anti-inflamatórias dos estudos incluídos (n = 13).....	61
Tabela 5 – Sumário da certeza da evidência cumulativa baseado na abordagem GRADE .....	62
Tabela 6 – Correlação dos <b>28</b> compostos derivados das 2-iminotiazolidinas .....	78
Tabela 7 – Concentrações de células e volumes de meio de cultura utilizados no plaqueamento da linhagem de macrófagos RAW 264.7 durante os experimentos <i>in vitro</i> . .....	83
Tabela 8 – Relação dos reagentes empregados durante a reação de RT-qPCR em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	91
Tabela 9 – Iniciadores ( <i>primers sense</i> e <i>anti-sense</i> ) utilizados nas reações de RT-qPCR em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	92
Tabela 10 – Valores de viabilidade celular (citotoxicidade) dos <b>28</b> compostos derivados das 2-iminotiazolidinas.....	99
Tabela 11 – Efeito inibitório dos <b>20</b> compostos derivados das 2-iminotiazolidinas sobre a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	101
Tabela 12 – Efeito dos <b>5</b> compostos derivados das 2-iminotiazolidinas ( <b>8, 13, 17, 21</b> e <b>22</b> ) na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	103
Tabela 13 – Característica e estrutura química dos <b>3</b> compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados após triagem <i>in vitro</i> utilizando modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS ( <b>13, 21</b> e <b>22</b> ).....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LO	5-lipoxigenase
12-LO	12-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
ALI	Lesão aguda pulmonar
ALRs	Receptores ausentes do tipo melanoma-2
ANOVA	Análise de variância
ARG-1	Arginase-1
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Trifosfato de adenosina
BALF	Lavado broncoalveolar
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CC <sub>10</sub>	Concentração mínima necessária para matar 10% da população celular
MCP-1	Receptor da proteína quimioatraente para monócitos 1
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD206	Receptor de manose
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
cDNA	DNA complementar
Células B	Linfócitos do tipo B
Células T	Linfócitos do tipo T (CD4, CD8, reguladoras)
Células Th	Células T <i>helper</i> (Th-1, Th-2, Th17)
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CLRs	Receptor de lectina tipo C
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CSFs	Fatores estimuladores de colônias
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DEPC	Dietilpirocarbonato
DEXA	Dexametasona
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DNase	desoxirribonuclease I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	Óxido nítrico conversor endotelial
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Fizz-1	Resistina tipo alfa
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GRADE	<i>The grading of recommendations assessment, development and evaluation</i>
HUVECs	Linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana
I $\kappa$ B $\alpha$	Subunidade inibitória $\alpha$ do fator de transcrição nuclear $\kappa$ B
IC <sub>50</sub>	Concentração do produto capaz de inibir em 50% os níveis de NOx
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IKK	Complexo de proteínas inibitórias kappa B quinase
IL	Interleucina (IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13)
IL-6R	Receptor de interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.n.	Via intranasal
i.p.	Via intraperitoneal
IP	Índice fagocítico
IRAK1	Quinase 1 ao receptor de interleucina-1
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1
J774	Linhagem de macrófagos murinos
LBP	Proteína de ligação ao LPS
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
M0	Macrófagos naïve
M1	Macrófagos pró-inflamatórios
M2	Macrófagos anti-inflamatórios
MAPK	Proteínas kinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína de quimiotração para Monócitos

MD-2	Diferenciador mielóide 2
MDSCs	Células supressoras derivadas de mieloides
MeSH	<i>Medical subject headings</i>
MHC-II	Complexo maior de histocompatibilidade II
MMP9	Metaloproteinase 9
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88	Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dicucleotídeo reduzido
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NLRs	Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos
nNOS	Óxido nítrico conversor neuronal
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOD	Domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos
NOS	Óxido nítrico sintases
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
NK	Células <i>natural killers</i>
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
O-PS	Polissacarídeo O-antigênico
OSF	<i>Open science framework</i>
P50	Subunidade do fator nuclear NF-κB
P65/RelA	Subunidade do fator nuclear NF-κB
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução de tampão fosfato salino
PGs	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostagandina E2
PGH2	Prostaglandina H2
PGZ	Pioglitazona
PLA <sub>2</sub>	Enzima fosfolipase A2
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PRISMA	<i>Preferred reporting of systematic reviews and meta-analysis</i>

p/v	Peso/volume
R/R <sup>1</sup> /R <sup>2</sup>	Radical (e seu local de substituição)
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos
RGZ	Rosiglitazona
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RIG	Gene indutível por retinóides
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RT-qPCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
S	Salina
SciRAP	<i>Science in risk assessment and policy</i>
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
S.E.M.	Erro padrão da média
S.D.	Erro padrão
SFB	Soro fetal bovino
TAMs	Macrófagos associados a tumores
TAK1	Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador- $\beta$
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
TGZ	Troglitazona
Th1	Células T <i>helper</i> 1
TLR	Receptores do tipo toll
TLR4	Receptor do tipo Toll-like 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
p55/p60	Receptor de fator de necrose tumoral alfa 1
p75/p80	Receptor de fator de necrose tumoral alfa 2
TRAF6	Fator associado ao receptor de necrose tumoral
TxA2	Tromboxano A2
TZD	Tiazolidine-dionas
Ym1	Quitinase-3 tipo 3



## SUMÁRIO

<b>PRÓLOGO</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA LITERATURA REFERENTE AOS DERIVADOS DAS TIAZOLIDINAS E AO PROCESSO INFLAMATÓRIO</b> .....	<b>17</b>
<b>1</b> <b>PROCESSO INFLAMATÓRIO</b> .....	<b>18</b>
1.1      INDUTORES (PAMPS E DAMPS).....	19
1.1.1 <b>Lipopolissacarídeo (LPS)</b> .....	<b>20</b>
1.2      SENSORES .....	20
1.2.1 <b>Receptores do tipo Toll-like (TLR)</b> .....	<b>21</b>
1.3      MEDIADORES.....	23
1.3.1 <b>Prostaglandinas e Leucotrienos</b> .....	<b>24</b>
1.3.2 <b>Espécies reativas de nitrogênio</b> .....	<b>25</b>
1.3.3 <b>Citocinas</b> .....	<b>27</b>
1.4      EFETORES.....	30
1.4.1 <b>Neutrófilos</b> .....	<b>30</b>
1.4.2 <b>Macrófagos</b> .....	<b>31</b>
<b>2</b> <b>TIAZÓIS E SEUS DERIVADOS</b> .....	<b>34</b>
2.1      TIAZOLIDINAS E SEUS DERIVADOS .....	35
2.2      2-IMINOTIAZOLIDINAS .....	37
<b>3</b> <b>MODELOS DE INFLAMAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> INDUZIDOS POR LPS</b> <b>38</b>	
3.1      MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i> PARA TRIAGEM E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA UTILIZANDO MACRÓFAGOS RAW 264.7 INDUZIDOS POR LPS .....	39
3.2      MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> DE LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS (ALI) .....	40
<b>CAPÍTULO 2- RELEVÂNCIA DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS DAS TIAZOLIDINAS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 INDUZIDOS POR LPS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE</b> .....	<b>42</b>
<b>4</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b> <b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
5.1      OBJETIVO GERAL .....	45
5.2      OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45

<b>6</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>46</b>
6.1	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	46
<b>6.1.1</b>	<b>Critérios de inclusão</b> .....	<b>46</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Critérios de exclusão</b> .....	<b>46</b>
6.2	FONTES DE INFORMAÇÃO E ESTRATÉGIAS DE BUSCAS .....	47
6.3	SELEÇÃO DOS ESTUDOS .....	48
6.4	COLETA DE DADOS E ITENS ANALISADOS .....	49
6.5	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA.....	49
6.6	AVALIAÇÃO DA CERTEZA DA EVIDENCIA.....	50
6.7	MEDIDAS DE EFEITO E MÉTODOS DE SÍNTESE .....	51
6.8	MEDIDAS ANALISADAS .....	52
<b>7</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
7.1	SELEÇÃO DOS ESTUDOS .....	52
7.2	CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS .....	53
7.3	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA.....	57
7.4	RESULTADO INDIVIDUAL DOS ESTUDOS.....	59
7.5	RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS (ABORDAGEM GRADE) .....	62
7.6	SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	62
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
8.1	RESUMO DAS EVIDÊNCIAS .....	65
8.2	LIMITAÇÕES .....	69
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE</b>		<b>28</b>
<b>COMPOSTOS DERIVADOS DAS 2-IMINOTIAZOLIDINAS</b> .....		<b>71</b>
<b>10</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>72</b>
10.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	72
<b>11</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>74</b>
11.1	OBJETIVO GERAL .....	74
11.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
<b>11.2.1</b>	<b><i>In vitro</i> (Macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS)</b> .....	<b>74</b>
<b>11.2.2</b>	<b><i>In vivo</i> (Modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS)</b> .....	<b>75</b>
<b>12</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>76</b>
12.1	COMPOSTOS.....	76
<b>12.1.1</b>	<b>Compostos derivados da 2-iminotiazolidinas</b> .....	<b>76</b>

12.1.2	Preparo dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas .....	79
12.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	79
12.2.1	Triagem <i>in vitro</i> dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas 79	
12.2.2	Confirmação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas .....	80
12.2.3	Investigação <i>in vitro</i> do mecanismo de ação anti-inflamatório dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas .....	80
12.3	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	81
12.3.1	Cultura de macrófagos RAW 264.7.....	81
12.3.2	Determinação prévia da densidade celular de macrófagos RAW 264.7 utilizando azul de Tripan.....	82
12.3.3	Viabilidade celular (citotoxicidade) dos 28 compostos derivados das 2- iminotiazolidonas perante macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	83
12.3.4	Modelo de inflamação <i>in vitro</i> utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	84
12.3.5	Mensuração dos metabólitos do óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	85
12.3.6	Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias por ELISA (IL-6, IL- 1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-13) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	86
12.3.7	Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias por citometria de fluxo (IL-12p70, MPC-1 e IL-10) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS	87
12.3.8	Determinação da fosforilação da subunidade p65 da via NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	87
12.3.9	Avaliação da atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS	88
12.3.10	Quantificação de mRNA por RT-qPCR para a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e Arginase (ARG-1) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	89
12.3.10.1	Extração e quantificação do RNA.....	89
12.3.10.2	Protocolo de eliminação de DNA residual com DNase .....	89
12.3.10.3	Protocolo para a obtenção de cDNA (RT-qPCR) .....	90
12.3.10.4	Protocolo RT-qPCR Quantitativo-Comparativo ( $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ) .....	90

12.3.11	Determinação da expressão do receptor de manose (CD206) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	92
12.4	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....	93
12.4.1	Animais utilizados no modelo de ALI induzida por LPS .....	93
12.4.2	Anestesia e morte indolor assistida dos animais utilizados durante o modelo de ALI induzida por LPS .....	93
12.4.3	Modelo de ALI induzida por LPS e obtenção do lavado bronco-alveolar (BALF) .....	94
12.4.4	Contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos com ALI induzida por LPS .....	95
12.4.5	Determinação da exsudação em camundongos com ALI induzida por LPS .....	96
12.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	96
13	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>98</b>
13.1	TRIAGEM <i>IN VITRO</i> DOS 28 COMPOSTOS DERIVADOS DAS 2-IMINOTIAZOLIDINAS .....	98
13.1.1	Viabilidade celular (citotoxicidade) dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidonas perante macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	98
13.1.2	Efeito dos 20 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas nos níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	100
13.1.3	Efeito dos 5 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-13) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	101
13.2	CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i> DOS COMPOSTOS DERIVADOS DAS 2-IMINOTIAZOLIDINAS (13, 21 E 22) .....	104
13.2.1	Efeito dos 3 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas na migração leucocitária (contagem total e diferencial de leucócitos) de camundongos com ALI induzida por LPS .....	104
13.2.2	Efeito da 2-iminotiazolidina 13 na exsudação em camundongos com ALI induzida por LPS .....	106
13.3	INVESTIGAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DA 2-IMINOTIAZOLIDINA 13 .....	107
13.3.1	Efeito da 2-iminotiazolidina 13 na quantificação da proteína p65 fosforilada (NF- $\kappa$ B) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	108

13.3.2	Efeito da 2-iminotiazolidina 13 na quantificação por RT-qPCR da expressão de mRNA de iNOS, COX-2 e Arginase-1 de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.....	109
13.3.3	Efeito da 2-iminotiazolidina 13 na quantificação de citocinas por citometria de fluxo em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	110
13.3.4	Avaliação da 2-iminotiazolidina 12 na atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS .....	112
13.3.5	Avaliação do efeito da 2-iminotiazolidina 13 da expressão de receptores de manose (CD206) na superfície de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS	113
13.4	RESULTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL .....	114
14	DISCUSSÃO.....	115
15	CONCLUSÃO .....	121
	EPÍLOGO.....	122
	REFERÊNCIAS .....	123
	APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2.....	144
	APÊNDICE B – REFERÊNCIAS SUPLEMENTARES DO CAPÍTULO 2.....	153
	ANEXO A – SUBMISSÃO DO ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 2.....	161
	ANEXO B – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 3 .....	162
	ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO .....	163

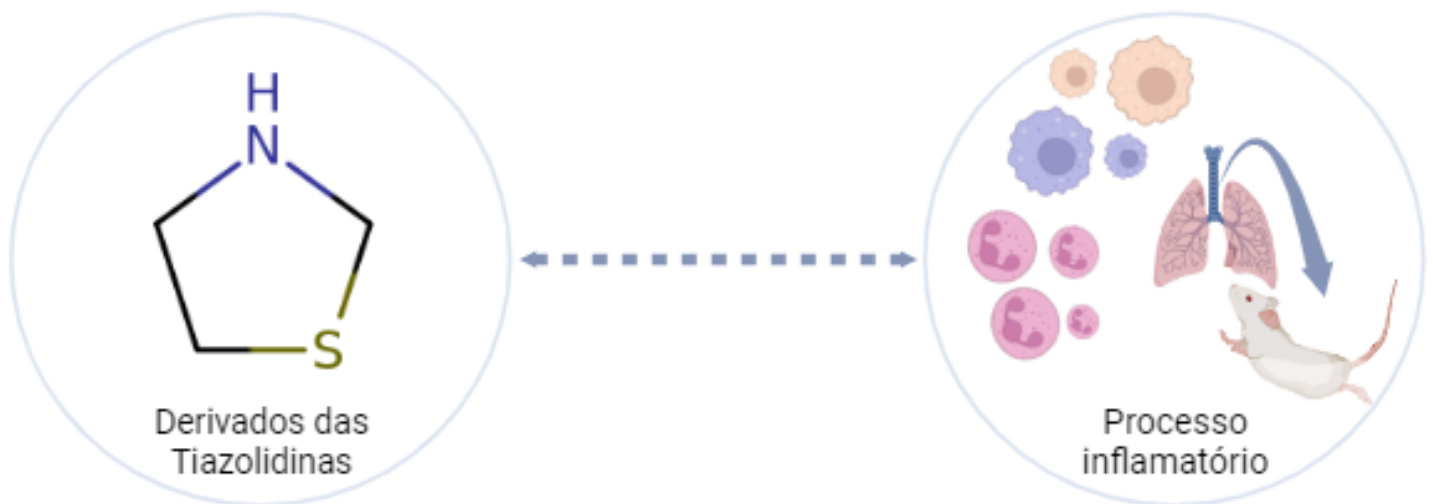
## PRÓLOGO

Esta obra é dividida em 3 capítulos que refletem aspectos diferentes e complementares do trabalho realizado. O **primeiro capítulo** apresenta uma revisão bibliográfica abordando os principais temas discutidos nesta obra. Este capítulo serviu como base para o delineamento das atividades realizadas ao longo da tese.

Diante da complexidade e heterogeneidade dos resultados encontrados na literatura, o **segundo capítulo** desta tese foi destinado à elaboração de uma revisão sistemática focada na determinação da atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas em modelo *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Neste capítulo, tentamos responder à pergunta de pesquisa: “*os derivados das tiazolidinas apresentam atividade anti-inflamatória em modelo in vitro de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?*”.

O **terceiro capítulo** descreve a triagem e avaliação da atividade anti-inflamatória e de imunomodulação de 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas. A triagem *in vitro* foi realizada utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS, com posterior avaliação dos melhores compostos em modelo *in vivo* de lesão aguda pulmonar induzida por LPS. Em um terceiro momento, o melhor composto teve seu mecanismo de ação e sua atividade imunomodulatória avaliada *in vitro*, seguindo novamente o modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.

## CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DA LITERATURA REFERENTE AOS DERIVADOS DAS TIAZOLIDINAS E AO PROCESSO INFLAMATÓRIO



## 1 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta do sistema imune decorrente de estímulos nocivos dos mais variados como patógenos, células danificadas, radiação e compostos tóxicos. Após iniciado, o processo inflamatório busca remover esses estímulos lesivos, promovendo a reparação e cicatrização tecidual (Chen *et al.*, 2017; Kotas; Medzhitov, 2015). Os eventos celulares que precedem a resposta inflamatória são caracterizados pelo aumento do fluxo sanguíneo, dilatação dos vasos, infiltração leucocitária (rica em neutrófilos) e produção de mediadores pró-inflamatórios. Esses eventos são bem caracterizados pelo que chamamos de sinais cardinais da inflamação: calor, dor, inchaço e vermelhidão. Sua não resolução pode levar ao estágio final que culmina na perda de função do órgão afetado, gerando quadros de inflamação crônica, com a presença de dano tecidual irreversível e desregulação da capacidade cicatricial do tecido (Nathan; Ding, 2010; Sugimoto *et al.*, 2019) (Tabela 1).

Sendo assim, a inflamação pode ser considerada como um sistema clássico de estímulo-resposta, onde um microrganismo invasor (estímulo) ativa o sistema imune inato que, juntamente com o apoio do sistema imune adaptativo, agem em sintonia para eliminar (resposta) invasores indesejados. Os sinais modulatórios deste processo incluem produção de citocinas, quemocinas e eicosanoides que induzem uma miríade de acontecimentos biológicos (Panigrahy *et al.*, 2021). Inflamações agudas são breves, agindo com alta magnitude durando algumas horas ou dias. Seu mecanismo é acionado pela identificação de patógenos, moléculas exógenas, restos celulares e demais componentes endógenos, liberando biomarcadores específicos de fase aguda (Tabela 1) (Furman *et al.*, 2019).



Tabela 1– Principais características da inflamação crônica ou aguda

Fatores	Inflamação aguda	Inflamação Crônica
Gatilho	PAMPs (infecção) DAMPs (estresse celular, trauma)	DAMPs (dano tecidual, disfunção metabólica)
Duração	Curto-prazo (dias)	Persistente, sem resolução
Magnitude	Alta (horas/dias)	Baixa (duração prolongada)
Desfecho	Reparo tecidual, remoção do patógeno, restauração da função	Danos colaterais (perda de função do tecido)
Relação com idade	Não	Sim
Biomarcadores	IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO	Silenciosa (presença de biomarcadores não canônicos)

Tabela 1. Resumo das principais características e diferenças entre inflamação aguda e inflamação crônica (sistêmica). PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos; DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos; IL- interleucina; NO (metabólitos do óxido nítrico); TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa. Fonte: adaptado de Furman *et al.*, 2019.

De maneira genérica, podemos dizer que a inflamação apresenta 4 componentes-chave, divididos em indutores, sensores, mediadores e efetores. Os indutores são organismos infecciosos ou estímulos não infecciosos (toxinas, corpos estranhos, células em processo de necrose e tecido danificado), responsáveis pelo início da resposta imune, ou seja, são os gatilhos que iniciam o processo inflamatório. Os sensores, por sua vez, são moléculas especializadas que, quando ativadas pelos indutores, desencadeiam a produção de mediadores. Esses mediadores são substâncias químicas endógenas responsáveis pela sensação de dor, que promovem ou inibem a inflamação, geram reparo tecidual e ativam células efetoras (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas) (Furman *et al.*, 2019; Medzhitov, 2010).

### 1.1 INDUTORES (PAMPS E DAMPS)

Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são derivados de microrganismos, sendo representados por restos de ácidos nucleicos de bactérias e vírus, flagelinas e restos de parede celular contendo lipopolissacarídeo (LPS). Eles estão presentes em diversos organismos e fornecem os sinais exógenos que alertam o sistema imunológico para a presença de potenciais patógenos. Em contraste, os padrões moleculares associados a dano (DAMPs), são moléculas endógenas normalmente liberadas de células em processo de necrose, incluindo ATP (Trifosfato de adenosina), IL-1 $\alpha$  (Interleucina 1-alfa), ácido úrico e proteínas citoplasmáticas (Nardo, 2015; Newton; Dixit, 2012; Zindel; Kubes, 2020).

### 1.1.1 Lipopolissacarídeo (LPS)

O Lipopolissacarídeo (LPS) é um importante componente imunomodulador estrutural encontrado na membrana externa de bactérias Gram-negativas, ajudando esses microrganismos a se protegerem de antibióticos e outros ataques ambientais. O LPS é composto basicamente por 3 substâncias: lipídio A, polissacarídeo O-antigênico (O-PS) e por um oligossacarídeo central. O lipídio A aparece conservado em todas as bactérias Gram-negativas, sendo o principal componente externo da parede celular. É sintetizado no citoplasma e é responsável pela ativação da resposta imune inata nos hospedeiros. Bactérias como *Escherichia coli* e *Salmonella* ssp. apresentam lipídios A hexa-acilados altamente imunoestimulantes, sendo que quantidades mínimas de LPS são capazes de iniciar essa potente resposta do sistema imune do hospedeiro (Mazgaeen; Gurung, 2020; Sweeney; Lowary, 2019).

## 1.2 SENSORES

A resposta da imunidade inata pode ocorrer de duas maneiras distintas. A primeira delas envolve a fagocitose do agente lesivo por células apresentadoras de antígenos (APCs), com posterior processamento do mesmo, gerando peptídeos que serão expostos via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) II. Esse processo é de vital importância para o reconhecimento deste patógeno pelas células do sistema imune adaptativo. O segundo tipo de resposta inata ocorre por meio do reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs regulam processos biológicos, induzindo a expressão de genes da resposta inata, incluindo os que codificam citocinas e quimocinas pró-inflamatórias que alteram localmente o tecido e recrutam leucócitos para eliminar o invasor e outras células infectadas (Gasteiger *et al.*, 2016; Li; Wu, 2021).

Os PRRs são expressos principalmente por células mieloides como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Entretanto, muitos tecidos que apresentam células sentinelas não imunes, como linfócitos, fibroblastos e células epiteliais também exibem esse tipo de receptor (Nardo, 2015; Zindel; Kubes, 2020). Os PRRs podem ser divididos em 5 categorias, sendo eles: receptores do tipo *Toll-like* (TLR), do tipo NOD (domínio de ligação e oligomerização de nucleotídeos), do

tipo RIG (gene induzível por resinoídes), receptores de lectina do tipo C (CLRs) e receptores ausentes do tipo melanoma-2 (ALRs) (Li; Wu, 2021).

### 1.2.1 Receptores do tipo Toll-like (TLR)

A família dos receptores do tipo Toll-like (TLR) foi uma das primeiras a serem catalogadas e, desde a descoberta do TLR4, muitos de seus ligantes correspondentes foram descritos. Os TLRs são importantes receptores de sinal ligados à membrana celular, sendo uma das principais famílias de PRRs do sistema imune inato dos vertebrados. Esses receptores apresentam uma função primordial pois, unem-se especificamente ao seus ligantes, transmitindo sinais. A transdução desse sinal será responsável pela ativação e consequente migração de diversas células para o local da infecção, dando início ao processo de inflamação e cura tecidual. Macrófagos classicamente ativados (fenótipo M1) são estimulados via TLRs e passam a expressar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, além de iniciar a produção de grandes quantidades de óxido nítrico (Asami; Shimizu, 2021; Li; Wu, 2021; Yang *et al.*, 2016).

Até agora, 10 tipos funcionais de TLRs (TLR1-10) foram encontrados em humanos. Suas localizações determinam os tipos de ligantes e o mecanismo de reconhecimento dos mesmos. A maioria dos TLRs (TLR1, 2, 4, 6 e 10) são expressos na superfície de células imunes, na forma de heterodímeros ou homodímeros, reconhecendo principalmente os componentes da membrana de microrganismos patogênicos (lipídios, lipoproteínas e proteínas). Além disso, muitos TLRs podem ser expressos constitutivamente em órgãos sólidos, como rins, fígado e coração. Dentre os representantes desta família, TLR4 é o mais estudado, sendo expresso principalmente em monócitos, macrófagos e células dendríticas. Este receptor responde prontamente à presença de LPS em tecidos e na corrente sanguínea, desencadeando reações que facilitam a erradicação das bactérias invasoras (Behzadi *et al.*, 2021; Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2020).

Os TLR4 reconhecem especificamente a fração de lipídio A do LPS, sendo assim, o principal desencadeador de respostas inatas precoces e depuração de organismos Gram-negativos não flagelados. O padrão estrutural do LPS é reconhecido por meio de uma cascata de receptores, proteínas acessórias e de ligações, que guiam nosso sistema imunológico para diferenciar o LPS de demais moléculas estruturalmente semelhantes. O LPS é inicialmente extraído da membrana

das bactérias pela ação da proteína de ligação ao LPS (LBP), com posterior ativação da proteína CD14 que pode ser encontrada em sua forma solúvel ou ligada à superfície de células por uma âncora glicosilfosftidilinositol. O CD14 facilita a transferência do LPS para o complexo TLR4/MD-2, modulando seu reconhecimento. O diferenciador mieloide 2 (MD-2), por sua vez, é uma proteína solúvel que pode se associar de forma não covalente ao TLR4. Após este reconhecimento, a presença de LPS ativa diversas vias, incluindo a proteína de resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e membros da família IL-1, culminando na migração do NF- $\kappa$ B (fator de transcrição kappa B) para o núcleo das células (Yuki; Koutsogiannaki, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

O NF- $\kappa$ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (RelA) e p50. Sua ativação canônica ocorre a partir de produtos microbianos (como o LPS) e em resposta às citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A estimulação de TLR4 desencadeia a ativação da Myd88, recrutando IRAK4 (quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1) e induzindo a fosforilação da IRAK1 (quinase 1 associada ao receptor de interleucina-1). TRAF6 (fator associado ao receptor de necrose tumoral) também é recrutado durante esse processo, associando-se a IRAK1 já fosforilada. TRAF6 e IRAK1 se desprendem do receptor, formando um complexo. Posteriormente, IRAK1 é degradada e o complexo restante é translocado para o citosol, onde se associam com diversas ligases. Esse processo leva a ubiquitilação do TRAF6, induzindo a ativação de TAK1 (Quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador- $\beta$ ). A TAK1, por sua vez, atua ativamente sobre o complexo IKK (proteína inibitória kappa B quinase) que é formado por IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  e IKK- $\gamma$  (Capece *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2021).

Quando não estimulado, o NF- $\kappa$ B encontra-se inibido no citoplasma por proteínas da família I $\kappa$ B, sendo I $\kappa$ B $\alpha$  (subunidade inibitória  $\alpha$  do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B) a mais bem caracterizada dentre elas. Sendo assim, a degradação ativa de I $\kappa$ B $\alpha$  é necessária para que o NF- $\kappa$ B migre para o núcleo celular e inicie a transcrição de mediadores pró-inflamatórios. Partindo desta degradação, mediada pela fosforilação desencadeada pelo complexo IKK, ocorre a subsequente liberação e fosforilação da subunidade p65, permitindo o transporte do NF- $\kappa$ B para o núcleo, com consequente ligação aos genes alvos, ocasionando a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e demais mediadores responsáveis por iniciar e manter o processo inflamatório ativo (Capece *et al.*, 2022; Miller; Ernst; Bader, 2005; Zhang;

Lenardo; Baltimore, 2017). A via de sinalização do NF- $\kappa$ B e seus principais mediadores podem ser observados na Figura 1.

Figura 1– Esquema da via de sinalização do NF- $\kappa$ B a partir da ativação do TLR4

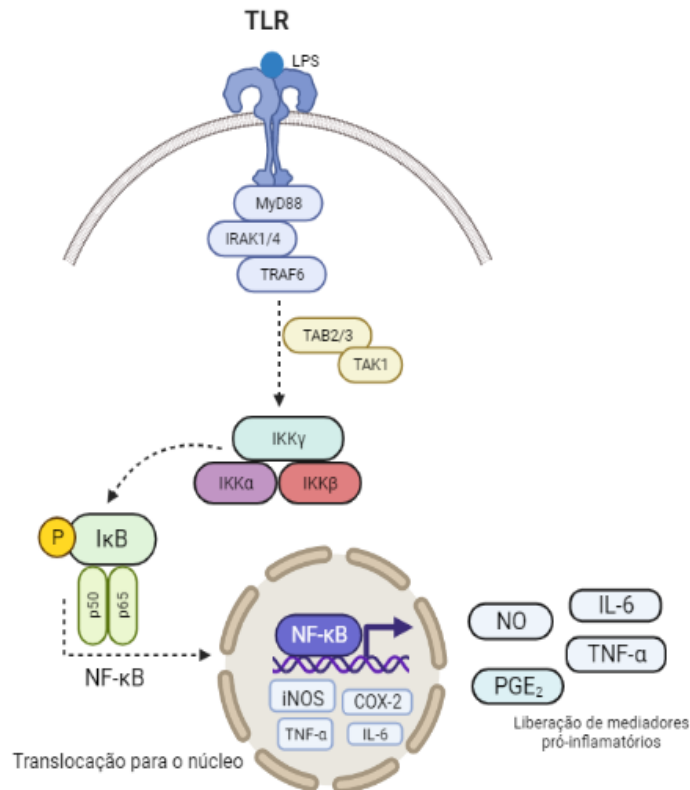


Figura 1. Esquema simplificado da via de sinalização canônica do NF- $\kappa$ B a partir da ativação de TLR4 por LPS. O receptor reconhece o PAMP, desencadeando a ativação da Myd88 que culmina na fosforilação de I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) e migração do NF- $\kappa$ B (p65/p50) para o núcleo. LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo Toll-like 4; MyD88: proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88; NF- $\kappa$ B: fator de transcrição kappa B; IRAK4: quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1; IRAK1: quinase 1 ao receptor de interleucina-1; TRAF6: fator associado ao receptor de necrose tumoral; TAK1: quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador- $\beta$ . Fonte: Elaborada pela autora, adaptado de Miller, Ernst, Bader, 2005.

### 1.3 MEDIADORES

Após sofrer lesão estéril (causas físicas ou estresse) ou desencadeada por patógenos, as vias bioquímicas ativadas pela resposta inflamatória geram o aumento local na concentração de mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos, fatores de ativação plaquetária e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) e mediadores

proteicos (citocinas, receptores de adenosina e moléculas de adesão). Os mediadores lipídicos são sintetizados majoritariamente no local da infecção, por meio de uma complexa cascata que envolve a ativação de receptores, expressão gênica e reações enzimáticas. Em contrapartida, os mediadores proteicos, são liberados a partir de estoques intracelulares. Essa resposta complexa envolve a participação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos que são responsáveis por liberar essas substâncias. A busca por uma resolução neste processo inflamatório envolve a presença simultânea de mediadores pró- e anti-inflamatórios que juntos, levam a cura tecidual e a eliminação do patógeno (Maddipati, 2020; Sugimoto *et al.*, 2019).

### 1.3.1 Prostaglandinas e Leucotrienos

Vários mediadores inflamatórios produzidos durante este processo derivam da oxidação do ácido araquidônico (AA) pela enzima fosfolipase A2 (PLA2) e são classificados como eicosanoides. Os derivados do AA compreendem prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas, que apresentam uma variedade de funções fisiológicas, agindo como reguladores da pressão arterial, da função renal, da reprodução e da defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores. A produção dessas moléculas, produzidas principalmente pela COX-2, desencadeiam quadros de febre, dor e reações inflamatórias diversas. As prostaglandinas e os leucotrienos, por exemplo, quando produzidos rapidamente após o início da inflamação promovem a indução precoce da vasodilatação e, conseqüentemente, do edema e da migração leucocitária (Araújo; Wheelock; Haeggström, 2018; Dennis; Norris, 2015; Wautier; Wautier, 2023).

Os prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) são sintetizados pela via da ciclooxygenase (COX), enquanto que os leucotrienos derivam da via da 5-lipoxigenase (5-LO) e as lipoxinas são resultado da interação entre 5-LO, lipoxigenase -12 (12-LO) e lipoxigenase -15 (15-LO). A via da COX foi a primeira via metabólica do AA descoberta e conta com duas isoformas distintas (Araújo; Wheelock; Haeggström, 2018; Capra *et al.*, 2015).

A COX-1 é um gene constitutivo, expresso pela maioria das células e está intimamente envolvida no controle da homeostasia vascular, proteção da mucosa gástrica e regulação das funções renais. Enquanto que, a isoforma COX-2, pode ter caráter constitutivo ou induzível, sendo expressa principalmente em resposta a

estímulos inflamatórios. A dupla atividade catalítica da COX leva a produção de um endoperóxido intermediário e altamente instável, conhecido como Prostaglandina H2 (PGH2), que é posteriormente metabolizado por enzimas específicas, produzindo outras prostaglandinas (PGs) (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e TxA<sub>2</sub>). Sua expressão pode ser regulada em diferentes níveis transcricionais, pós-transcricionais ou pós-traducionais (Kaur; Balijit, 2022; Rumzhum; Ammit, 2016).

### 1.3.2 Espécies reativas de nitrogênio

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são parte integrante do metabolismo dos humanos e estão presentes em diversas atividades biológicas incluindo vasodilatação, relaxamento da musculatura lisa, neurotransmissão e resposta imune. Uma das principais ERNs estudadas é o óxido nítrico (NO) que se apresenta como um radical gasoso altamente reativo ao oxigênio, sendo produzido por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). O NO é uma importante molécula de caráter tóxico que age contra organismos invasores. Além disso, regula a atividade funcional, de crescimento e morte de diversas células imunes, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células *natural killer* (NK) (Andrabi *et al.*, 2023; Cinelli *et al.*, 2019).

Existem 3 tipos diferentes de NOS catalogadas em mamíferos. As isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) são constitutivamente expressas e sua atividade depende da presença de cálcio (Ca<sup>2+</sup>). A expressão dessas 2 enzimas conversoras produz quantidades baixas e contínuas de NO no organismo e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos. A terceira isoforma, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é induzível e independe de Ca<sup>2+</sup>, sendo capaz de produzir uma grande quantidade de NO em resposta às injúrias teciduais causadas por microrganismos. Essa produção excessiva pode ocasionar um fenômeno análogo ao estresse oxidativo, denominado estresse nitrosativo (Król; Kepinski, 2020; Lind *et al.*, 2017; Spiller *et al.*, 2019).

Todas as isoformas de NOS utilizam L-arginina como substrato, juntamente com oxigênio e NADPH (fosfato de nicotinamida-adenina-dicucleotídeo reduzido) como co-substratos. Em uma primeira etapa, NOS hidroxila a L-arginina, formando o N-hidroxi-L-arginina que será posteriormente oxidado em L-citrulina. A expressão e

transcrição da iNOS é induzida por estímulos externos, como patógenos e outros gatilhos inflamatórios, ativando a expressão da iNOS principalmente por meio das MAPKs (proteínas kinases ativadas por mitógenos) e da via do NF- $\kappa$ B, mediadas pela identificação de moléculas de LPS. As citocinas liberadas das células hospedeiras como resultado da ativação dessas vias, também contribuem para o aumento da expressão da iNOS. Quanto maior a concentração de NO, maior são suas chances de reagir com  $O_2$  ou  $O_2^-$ , formando nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ) e ERNs como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Sendo assim, a inibição da iNOS pode ser uma estratégia eficaz para controlar a inflamação em diversas condições patológicas. (Anavi; Tirosh, 2020; Minhas; Bansal; Bansal, 2019).

Além de participar da resposta inflamatória por meio da produção de NO, a arginina pode ter um destino metabólico totalmente diferente. A presença de interleucina-10 (IL-10), por exemplo, desencadeia o aumento da expressão de arginase em macrófagos, modulando a resposta inflamatória ao hidrolisar competitivamente a L-arginina em L-ornitina e ureia, favorecendo a regeneração celular, cicatrização e reparo de feridas. Além disso, a ação da arginase regula a produção de poliaminas, que agem diretamente nos macrófagos, regulando a disponibilidade de arginina e, conseqüentemente, diminuindo a produção de óxido nítrico e demais processos mediados pela presença de arginina como substrato (Berg; Meurs; Gosens, 2018; Minhas; Bansal; Bansal, 2019). As principais características da ativação da iNOS e sua regulação competitiva com a Arginase está resumida na Figura 2.



Figura 2 – Apresentação das isoformas de NOS e ativação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) durante o processo inflamatório

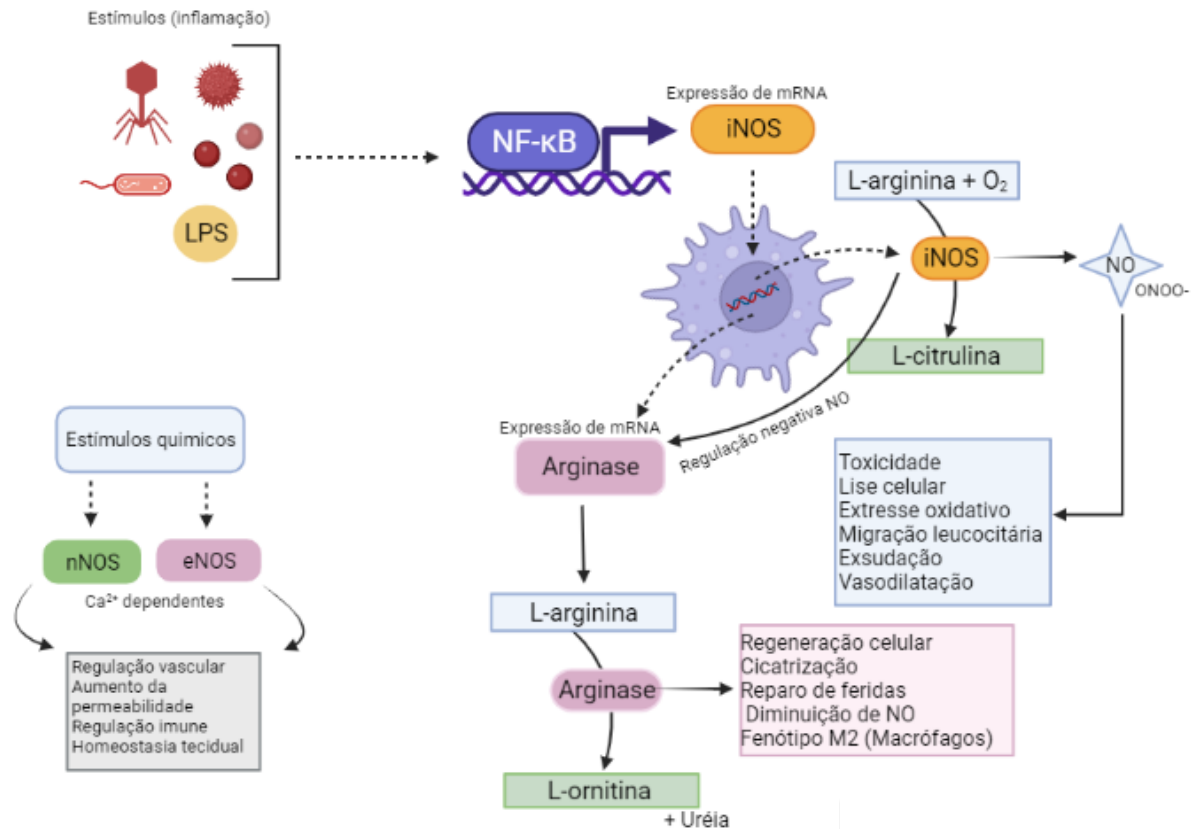


Figura 2. Esquema simplificado da ativação da iNOS durante o processo inflamatório, seus principais efeitos e a regulação competitiva gerada pela presença de arginase. NF-κB: fator de transcrição kappa B; NO: óxido nítrico; iNOS: óxido nítrico sintase induzida; nNOS: óxido nítrico-sintase neuronal; eNOS: o nítrico-sintase endotelial. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de Cinelli *et al.*, 2019; Minhas; Bansal; Bansal, 2019.

### 1.3.3 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas (15-20 kDa) de vida curta produzidas por diversas células e servem para regular e influenciar a resposta imune. Existem mais de 35 citocinas que respondem ao nome de interleucina (IL), enquanto outras mantêm sua descrição biológica original como o TNF-α (fator de necrose tumoral alfa). Além disso, todos os interferons (IFN) e muitos fatores estimuladores de colônias (CSFs) pertencem a essa classe, contabilizando assim, mais de 60 membros. Além disso, as quimocinas também podem ser classificadas como uma classe de citocinas de baixo

peso molecular que controlam a migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos para o local da infecção (Kany; Vollrath; Relja, 2019; Liu *et al.*, 2021).

As proteínas de quimioatração de monócitos (MCP-1) são um exemplo de quimocinas intimamente ligadas ao processo inflamatório. São membros da subfamília CC e apresentam potente ação quimiotática para monócitos. Grandes quantidades de estresse oxidativo, fatores de crescimento e citocinas (especialmente IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-13) desencadeiam o aumento da liberação de MCP-1 em diversas condições alérgicas, doenças autoimunes, aterosclerose, nefropatias e tumores (Singh; Anshita; Ravichandiran, 2021).

A família de citocinas IL-1 também possuem uma infinidade de atividades dentro do sistema imune, principalmente durante a inflamação. Muitos membros desta família apresentam caráter pró-inflamatório como a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sendo expressas citosolicamente e requerendo clivagem para assumir suas formas ativas. A maturação da IL-1 $\beta$ , por exemplo, é mediada pela presença de caspases dentro de complexos de sinalização denominados inflamassomas. Sendo assim, a IL-1 $\beta$  é uma citocina induzível e geralmente não é expressa em tecidos saudáveis, acumulando-se no citosol das células até que essas recebam um sinal específico para sua liberação. A IL-1 $\beta$  ativa diversas células do sistema imune inato e adaptativo, exercendo uma ampla gama de atividades biológicas durante infecções, promovendo febre, vasodilatação, hematopoese, atração e extravasamento de leucócitos, ativação de linfócitos e síntese de anticorpos (Chan; Schoroder, 2019; Mantovani *et al.*, 2019).

Outra importante família de interleucinas é representada pelo grupo das IL-12 (IL-12p70, IL-23, IL-27, IL-35 e IL-39), estruturalmente compostas por uma glicoproteína heterodímera com duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , ligadas covalentemente. A IL-12 é constituída pelas subunidades IL-12p35 e IL-12p40 que juntas dão origem a forma ativa desta citocina (IL-12p70). Entre suas diversas funções, a IL-12 é um potente modulador da resposta de células T *helper* tipo 1 (Th1), além de aumentar a ativação de células T e NK. Pode promover a reprogramação de macrófagos associados a tumores (TAMs) e de células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs). Além disso, induz a produção de IFN- $\gamma$  em células NK, macrófagos, células dendríticas e células T, promovendo a diferenciação de células *naïve* CD4<sup>+</sup> em células Th1 (Nguyen *et al.*, 2020; Thompson; Orr, 2018).

A IL-6, por sua vez, é uma citocina pleiotrópica envolvida na resposta imune, inflamação, hematopoiese, metabolismo ósseo, desenvolvimento embrionário e

outros processos fundamentais, sendo expressa constitutivamente em pequenas quantidades. É um membro prototípico da família das IL-6 que utiliza a glicoproteína gp130 durante seu processo de sinalização e ativação de seu receptor (IL-6R). Embora sua produção seja estritamente controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, a síntese contínua e desregulada de IL-6 assume um caráter patológico durante processos inflamatórios, desencadeando problemas de coagulação, trombose e aumento da proliferação de células cancerígenas e metástase. Assim como as IL-1 e TNF- $\alpha$ , a produção de IL-6 pode ser induzida pela presença de LPS e seu consequente aumento na corrente sanguínea pode servir como marcador para a ativação sistêmica de demais citocinas pró-inflamatórias (Hirano, 2020; Uciechowski; Dempke, 2020).

Dentre essas citocinas, destaca-se ainda o TNF- $\alpha$ , que assim como as IL-1 e IL-6, utiliza a via do NF- $\kappa$ B como principal agente de sinalização e produção. Na realidade, os principais efeitos pró-inflamatórios do TNF- $\alpha$  estão relacionados a sua capacidade de ativar diretamente a via do NF- $\kappa$ B. Sendo assim, altos níveis de TNF- $\alpha$  podem representar o aumento contínuo da ativação de NF- $\kappa$ B, levando à expressão de outros genes inflamatórios e retroalimentando a liberação de mais TNF- $\alpha$  no meio. Esta citocina medeia seus efeitos por meio de dois receptores diferentes, sendo eles o receptor de TNF- $\alpha$  I (também chamado de p55 ou p60) e o receptor de TNF- $\alpha$  (conhecido como p75 ou p80). Sua participação no desenvolvimento de diversas patologias de ordem autoimune e inflamatória inclui artrite reumatóide, sepse, lúpus, esclerose múltipla, psoríase, vasculite, câncer, inflamações intestinais e distúrbios respiratórios (Brenner; Blaser; Mak, 2015; Van Loo; Bertrand, 2022).

Entretanto, outras citocinas apresentam papel antagonista, ajudando a mitigar processos inflamatórios. IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  (fator de crescimento beta) são exemplos de citocinas capazes de suprimir a produção maciça de IL-1, TNF- $\alpha$ , quimiocinas e diversas moléculas de adesão, gerando um equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias. É esse equilíbrio que irá determinar o curso de diversas doenças a curto e longo prazo. Nesse contexto, cada citocina irá se ligar a receptores específicos, gerando uma cascata de sinalizações que afetam e alteram a função celular, regulando positiva e negativamente diversos genes e seus fatores de transcrição (Kang *et al.*, 2020; Kany; Vollrath; Relja, 2019)

A IL-4 é expressa principalmente por células T *helper* tipo 2 (Th2), mastócitos, células B e células estromais, promovendo o desenvolvimento e amadurecimento de

linfócitos e inibindo diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS (Heeb; Egholm; Boyman, 2020). A IL-10, por sua vez, é expressa por monócitos, macrófagos, células B e Th2, agindo prontamente na produção de citocinas liberadas por neutrófilos e macrófagos no local da inflamação (Steen *et al.*, 2020). Já a IL-13 é expressa majoritariamente por células Th2, atenuando a ação de monócitos e macrófagos durante o processo inflamatório (Heeb; Egholm; Boyman, 2020). Sendo assim, essas citocinas são as principais responsáveis pela polarização de macrófagos em direção a fenótipos imunorreguladores do tipo M2, visando a cura e reestabelecimento das funções teciduais e buscando uma ação pró-resolutiva dentro do processo inflamatório (Chen *et al.*, 2010).

#### 1.4 EFETORES

Após o reconhecimento de patógenos indutores por meio de sensores que desencadeiam a liberação de diversos mediadores pró- e anti-inflamatórios, podemos observar a formação de infiltrados compostos por diversas células do sistema imune inato que, juntamente com as demais células sentinelas residentes, tem como objetivo primordial reconhecer, conter e eliminar os microrganismos invasores e macromoléculas nocivas ao organismo. Esse objetivo é complexo e envolve diversos fatores que culminam na ação ativa das células efetoras que incluem neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (Serhan *et al.*, 2020).

##### 1.4.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares com capacidade fagocítica que compõem a primeira linha de defesa da resposta imune contra patógenos. São células efetoras importantes durante o processo de inflamação induzida por lesão tecidual, apresentando alta eficiência em detectar e erradicar infecções microbianas. Representam a maior população de leucócitos circulantes (50-70%), sendo produzidos em escala de  $10^{11}$  por dia, sobrevivendo por algumas horas ou dias na corrente sanguínea (Burn *et al.*, 2021; Mortaz *et al.*, 2018).

Quando ativados por PAMPs ou DAMPs contribuem para a eliminação de patógenos por meio da fagocitose, degranulação, liberação de EROs e formação das chamadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Além disso, os neutrófilos

recrutam e ativam leucócitos adicionais pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, promovendo a remodelação tecidual e evitando a disseminação do agente agressor. Diante de um processo inflamatório, os neutrófilos presentes na circulação, passam pelo endotélio, migrando para o tecido lesionado através de gradientes quimiotáticos (Brostjan; Oehler, 2020).

Quando chegam no foco da inflamação geram espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o processo de fagocitose e eliminação do patógeno. Durante o seu processo de maturação, os neutrófilos produzem 3 tipos de grânulos preenchidos com proteínas pró-inflamatórias: grânulos primários (azurófilos), contendo Mieloperoxidase (MPO); grânulos secundários (específicos), ricos em lactoferrina; e grânulos terciários (gelatinase), que carregam matriz metaloproteinase 9 (MMP9). Ao serem ativados, liberam grandes quantidades dessas proteínas, em especial, de MPO (Brostjan; Oehler, 2020; Burn *et al.*, 2021).

Sendo assim, o número de neutrófilos circulantes é fortemente regulado, tendo sua eliminação na medula óssea, baço e fígado. Entretanto, o aumento descontrolado de sua população durante processos inflamatórios mau-orquestrados pode gerar lesões teciduais graves no hospedeiro, devido ao seu caráter tóxico. Além disso, são reconhecidas como células complexas transcricionalmente ativas, que produzem e secretam diversas citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), modulando a atividade de células vizinhas, regulando macrófagos para respostas imunes a longo prazo e participando ativamente da memória imune inata (Rosales, 2018).

#### **1.4.2 Macrófagos**

Os macrófagos são células representadas por populações residentes no tecido ou provenientes de infiltrados, geralmente de origem inflamatória. São células primordiais para o desenvolvimento, homeostase e reparação tecidual, sendo que suas funções dependem de sua ontogênese, ambiente, local em que residem, tipo de lesão e tipo de patógenos aos quais foram expostos. São células extremamente heterogêneas com plasticidade elevada, desempenhando funções importantes dentro de condições fisiológicas e patológicas. São indispensáveis durante a inflamação, tanto no início quanto para a resolução da mesma. (Funes *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2019).

Na década de 1990, dois fenótipos diferentes de macrófagos foram descritos: os classicamente ativados (de caráter inflamatório) (M1) e os alternativamente ativados (caráter anti-inflamatório) (M2). Sabe-se que essa é uma descrição simplificada perante a heterogeneidade dessas células, visto que sua polarização representa um processo multifatorial. Mesmo que um macrófago adote um fenótipo específico ele poderá alterá-lo novamente em resposta as influências presentes no meio. Essa reversibilidade tem um valor terapêutico crítico, especialmente em doenças que ocasionam desequilíbrios entre populações M1/M2, como na sepse e na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Funes *et al.*, 2018; Ross; Devitt; Jonhson, 2021)

Macrófagos de fenótipo M1, expressam numerosos mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6), prostaglandinas (COX-2), EROs e ERNs. São tipicamente induzidos por citocinas Th1, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , ou por reconhecimento de LPS pelo TLR4. Sua ativação promove o recrutamento adicional de outras células imunes para o local da lesão, fornecendo uma grande resistência inicial contra patógenos e provocando uma resposta pró-inflamatória dependente do tecido aonde residem ou atuam (Murray, 2017; Yunna *et al.*, 2020). Macrófagos de fenótipo M1 participam ativamente da remoção de patógenos durante infecções, conferindo alta atividade antimicrobiana e antitumoral. De maneira compensatória e visando a regeneração e cicatrização tecidual, essa resposta inflamatória pode ser inibida por mecanismos reguladores impulsionados pela função resolutória de macrófagos M2 (Parisi *et al.*, 2018).

O fenótipo M2 é induzido em resposta a estímulos Th2, sendo que IL-4, IL-10 e IL-13 são as principais citocinas capazes de realizar esse tipo de polarização. Além disso, estão diretamente envolvidos em processos infecciosos causados por parasitas, helmintos e fungos. Ao polarizarem, expressam diferentes genes, incluindo FIZZ-1 (resistina tipo alfa), Arginase-1 (ARG-1), quitinase-3 tipo 3 (Ym1) e CD206 (receptores de manose). Na realidade, a ativação alternativa de macrófagos para o fenótipo M2 foi proposta em 1991 com a descoberta da regulação positiva de CD206 como um marcador específico para M2 (Atri; Guerfali; Dhafer, 2018; Lee *et al.*, 2021).

Quando ativado, esse fenótipo apresenta um papel central no processo de reparação e cicatrização do tecido, sendo gerado durante a fase final de resolução do processo inflamatório ou em resposta a presença de IL-4 e IL-13 no meio. Sua ativação é caracterizada pela baixa produção de IL-12 e aumento significativo na

produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (Fator de crescimento transformador beta), potencializando a fagocitose, limpando detritos celulares e desempenhando ações pró-angiogênica e pró-fibrótica. (Lee *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2020).

Essa polarização dicotômica de M1/M2 observada nos macrófagos pode ser replicada em laboratório, utilizando diversas linhagens células durante experimentos *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. Essa plasticidade é alcançada por gatilhos que geram a polarização proposital para M1 (LPS e IFN- $\gamma$ ) ou M2 (IL-4 e IL-13), gerando populações específicas que podem ser estudadas na busca de novos tratamentos e cura de diversas doenças (Atri; Guerfali; Dhafer, 2018; Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2020). As principais diferenças entre fenótipos M1/M2 podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Polarização de macrófagos em seus fenótipos M1/M2.

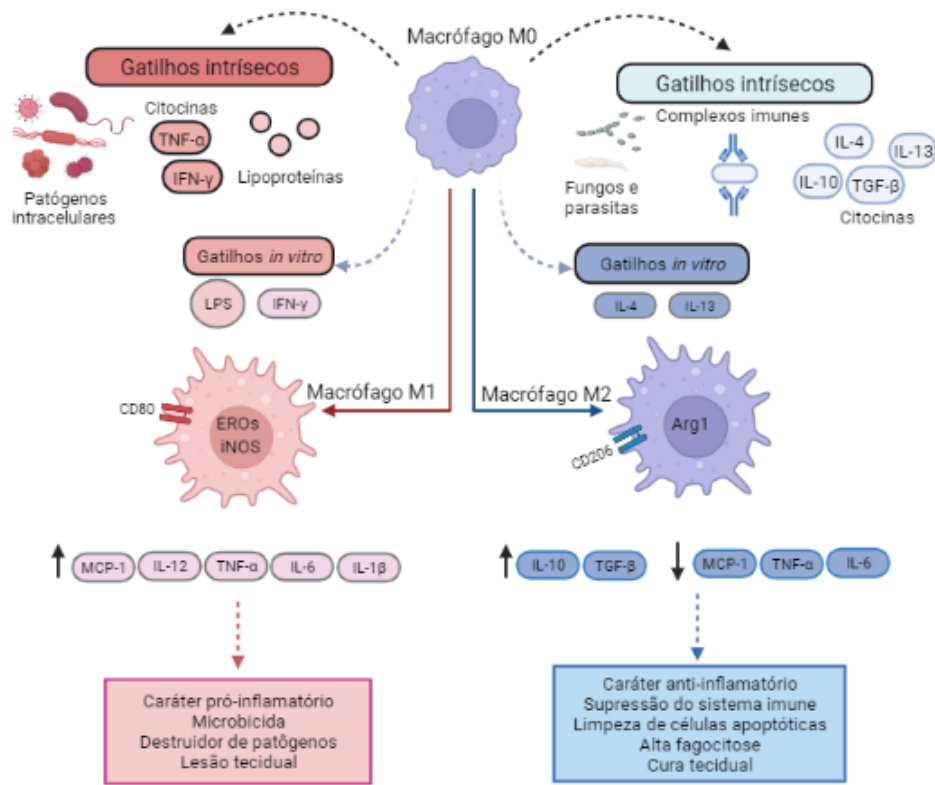


Figura 3. Resumo dos principais estados de polarização de macrófagos ativados, perante diferentes estímulos. Essa dicotomia compreende os fenótipos M1/M2 onde, M1 é ativado classicamente para um estado pró-inflamatório, enquanto M2 é ativado alternativamente em um fenótipo anti-inflamatório, compreendendo um estado de supressão do sistema imune ou de pró-resolução com alta capacidade de reparo tecidual. TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa; IFN- $\gamma$ : Interferon gamma; LPS: Lipopolissacarídeo; EROs: espécies reativas de oxigênio; iNOS: Óxido nítrico sintase induzida; MCP-1: proteínas de quimioatração de monócitos; IL: interleucina; TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformador beta; ARG-1: Arginase-1. Fonte: Elaborado pela autora, adaptado de Atri; Guerfali; Dhafer, 2018.

## 2 TIAZÓIS E SEUS DERIVADOS

Os tiazóis são compostos que apresentam um anel heterocíclico de 5 membros, com fórmula molecular simplificada ( $C_3H_3NS$ ), contendo sempre um átomo de enxofre e outro de nitrogênio nas posições 1 e 3, respectivamente. Dos tiazóis derivam-se vários grupos heterocíclicos como os di-hidrotiazóis (tiazolinas), representadas pelas: 2-tiazolina, 3-tiazolina, 4-tiazolina e a tetra-hidrotiazol, também conhecida como tiazolidina (Figura 4) (Zahinos, 2007). Os tiazóis e seus derivados



apresentam uma grande diversidade de atividades biológicas, com ação anti-inflamatória, antitumoral, antituberculosa, antiparasitária, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e atividade protetora do sistema nervoso central (Chen *et al.*, 2020; Maghraby *et al.*, 2020; Mishra; Kumari; Tiwari, 2015).

A penicilina, antibiótico amplamente utilizado na clínica, apresenta um anel tiazol fundido ao seu anel  $\beta$ -lactâmico com um grupo R variável ligado a este último por meio de uma ligação peptídica. Derivados das cefalosporinas, outro grupo conhecido de antibióticos, contendo 2-aminotiazol foram encontrados. A ceftarolina, cefalosporina de 5<sup>a</sup> geração, apresenta substituição na posição 4 do anel tiazol, conferindo ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Su *et al.*, 2017). Existe uma grande lista de medicamentos comercializados que contem anéis tiazóis em sua conformação incluindo, anti-helmínticos (Tiabendazol), antibacterianos (Sulfatiazol), anticonvulsivantes (Riluzol), antiviral (Ritonavir) e anti-inflamatório (Meloxicam) (Liaras; Fesatidou; Geronikaki, 2018).

Figura 4 – Principais anéis heterocíclicos derivados dos tiazóis



Figura 4. Principais derivados do tiazol, sendo eles: (A) tiazol; (B) 2-tiazolina; (C) 3-tiazolina; (D) 4-tiazolina; (E) tiazolidina. Fonte: Zahínos, 2007.

## 2.1 TIAZOLIDINAS E SEUS DERIVADOS

As tiazolidinas apresentam um anel de cinco membros saturado, que conferem uma estrutura heterocíclica propícia para diversas substituições e modelagem de novas moléculas análogas. A atividade biológica apresentada por numerosas substâncias naturais derivadas das tiazolinas levou a síntese de compostos similares cuja utilidade tem sido aplicada nos campos médico e farmacológico (Anitha; Swamy, 2018; Prabhakar *et al.*, 2006). Projetos de novas moléculas baseadas na estrutura da tiazolidina (4-tiazolidinona) e estudos de estruturas sintéticas com conformação pirazole-tiazolidinonas/tiazóis geraram diversas patentes ao longo dos anos, envolvendo moléculas inibidoras de necrose e

compostos com atividade pró-apoptótica (Havrylyuk; Roman; Lesyk, 2016). Fármacos sensibilizadores de insulina, representados pelas tiazolidinedionas (TZD, glitazonas) representam uma classe de fármacos utilizados no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2. Variações nos substituintes dessas moléculas deram origem a diversas glitazonas como a Pioglitazona (PGZ), Rosiglitazona (RGZ), Englitazona e Troglitazona (TGZ). Destas, a Pioglitazona é atualmente comercializada para o tratamento de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (Jain; Vora; Ramaa, 2013; Nanjan *et al.*, 2018).

Compostos naturais com anéis de tiazolidina ou tiazolidinona apresentam atividade citotóxica, antiviral e anticancerígena. Latrunculina A, micacocidina e hectocloria são exemplos de produtos naturais com atividade anticancerígena. As latrunculinas A e seus análogos são toxinas extraídas da esponja do mar *Negombata magnifica*, sendo os primeiros macrolídeos contendo 2-tiazolidinonas em sua estrutura (Zhang *et al.*, 2010). Tiazolidinas e alguns de seus derivados encontram-se em fase de estudo pré-clínico, com potencial efeito tripanocida contra a forma amastigota do *Trypanosoma cruzi* e representam uma alternativa aos medicamentos convencionais utilizados durante o tratamento da doença de Chagas (Silva Junior *et al.*, 2022). Estudos *in vitro* demonstram que derivados das tiazolidinas promovem a lise de tripomastigotas e, conseqüentemente, morte de amastigotas, por meio da interferência na biossíntese de poliaminas (tripanotona) (Mazzeti *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2013). Diversos derivados das tiazolidin-4-onas demonstraram atividade promissora, com baixa citotoxicidade, e em concentrações micromolares contra a transcriptase de diversos vírus, sendo considerados como modelo para otimização de farmacóforos com alta atividade anti-HIV. Além disso, seus efeitos inibitórios contra a protease de vírus da hepatite C também foram confirmados (Chitre *et al.*, 2021; Sudo *et al.*, 1997).

Moléculas derivadas das tiazolidinonas apresentam ação seletiva em COX-1 e COX-2, diminuindo significativamente sua expressão em diversos modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, servindo assim, como protótipos para novos medicamentos com ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética (Ashour, El-Ashmawy; Bayad, 2015; Ottaná *et al.*, 2002; Vigorita *et al.*, 2003). Esta afinidade seletiva sobre ciclooxygenases (COX-) e lipoxigenases (LOX-) encontra-se bem descrita na literatura, com diversos tiazóis e tiazolidinonas já em fases avançadas de testes (Abdelall; Kamel, 2016; Liaras; Fesatidou; Geronikaki, 2018; Santin *et al.*, 2013; Santin *et al.*, 2018). Além disso,

tiazolidinas e seus derivados apresentam ação bem catalogada sobre a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), inibindo significativamente sua expressão e, conseqüentemente, diminuindo a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO) (Rezaie *et al.*, 2019; Shankaran *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2004).

## 2.2 2-IMINOTIAZOLIDINAS

A síntese de 2-iminotiazolidinas foi estudada extensivamente no passado, originando uma grande variedade de protocolos sintéticos para formação de 2-iminotiazolidinas funcionais e compostos relacionados, sendo que até hoje os químicos se esforçam para criar e aprimorar esses compostos e suas substituições (Bhattacharyya; Kavitha; Ghorai, 2016; D'hooghe; Kimpe, 2006; Ferreira *et al.*, 2022). Uma das estratégias atualmente pesquisada, relata o uso de reação tipo dominó para a síntese de 2-iminotiazolidinas a partir de aciltioureas e brometos alílicos contendo grupos retiradores de elétrons por meio de cicloadição [3+2] mediada por bases. A busca por novas maneiras de sintetizar derivados das 2-iminotiazolidinas visa principalmente criar uma maneira mais fácil e rápida de acrescentar grupos substituintes diferentes ao anel heterocíclico característico das tiazolidinas (Ferreira *et al.*, 2022; Ferreira; Sá, 2015).

Esses derivados, apresentam uma ampla gama de atividades biológicas que incluem compostos com ação antitumoral, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, anti-Alzheimer, antidepressiva e radioprotetora (Figura 5). Como exemplo, podemos citar o desenvolvimento de medicamentos como o 2-tetrahidronaptalen-1-il (antidepressivo) e os  $\beta$ (hidroximetil) tiazolidinas (anti-hipertensivo), que surgiram a partir do desenvolvimento de novas 2-iminotiazolidinas (Bhandari; Sakla; Shankaraiah, 2020; Coin *et al.*, 2020; Dahiya; Sahiba; Patel, 2018). Esses derivados também estão catalogados como precursores sintéticos, sendo potenciais biomarcadores para o estresse oxidativo e exposição ao formaldeído, catalisadores heterogêneos de radicais livres, de ânion e superóxido, inibidores da síntese do óxido nítrico (iNOS) e sequestradores de radicais hidroxila (Sahiba *et al.*, 2020).

Figura 5– Derivados das 2-iminotiazolidinas com atividade biológica estudada

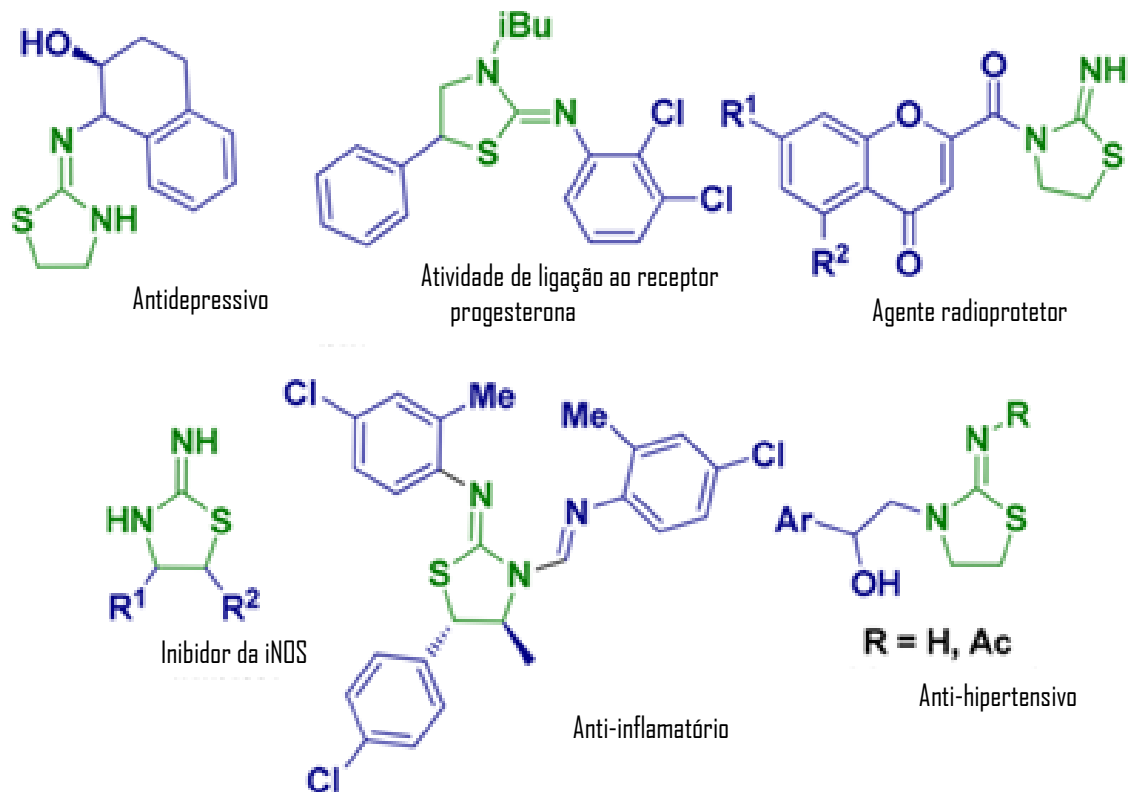


Figura 5. Exemplos de 2-iminotiazolidinas biologicamente ativas, com ação antidepressiva, atividade direta em receptores de progesterona, efeito radioprotetor, inibição de iNOS, ação anti-inflamatória e anti-hipertensiva. Fonte: Dahiya, Sahiba, Patel, 2018.

### 3 MODELOS DE INFLAMAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* INDUZIDOS POR LPS

O LPS é um componente bem conhecido da parede de bactérias Gram-negativas e um potente desencadeador da resposta inflamatória em modelos *in vitro* e *in vivo*. Modelos *in vitro* que utilizam linhagens de macrófagos imortalizados como, RAW 264.7 ou J774, são amplamente utilizados e representam o início do desenvolvimento e pesquisa da atividade biológica de diversos compostos e candidatos à fármaco, conferindo uma triagem rápida e confiável. Além disso, visam otimizar drasticamente o uso de animais durante as experimentações. Em contrapartida, modelos *in vivo* que utilizam injeções intravenosas, intraperitoneais e até mesmo instilação de LPS, visam mimetizar de maneira mais complexa quadros agudos e crônicos de inflamação, induzindo a produção de diversos mediadores e acionando

populações celulares de neutrófilos e macrófagos (Facchin *et al.*, 2022; Muñoz *et al.*, 2020).

Modelos que utilizam LPS como agente indutor são mais facilmente padronizados, reprodutíveis, acessíveis e relativamente mais baratos. Além disso, o LPS é uma molécula estável e purificada, que pode ser facilmente armazenada em sua forma liofilizada até o uso. Múltiplos TLR, em especial TLR2 e TLR4, tem sido implicados na regulação das vias aéreas durante processos alérgicos e inflamatórios. A administração de grandes doses de LPS promove uma produção exacerbada de citocinas, desencadeando quadros de inflamação aguda, enquanto que doses mais baixas (que mimetizam alérgenos comuns como ácaros e poeira doméstica), podem potencializar quadros de asma em modelos murinos (Kovach; Standiford, 2011).

Além disso, moléculas de LPS do tipo hexa-acilados e difosforilados, como as provenientes da bactéria *Escherichia coli* (O111:B4) são um dos agonistas de TLR4 mais potentes utilizados em modelos *in vitro* e *in vivo*, mimetizando quadros de inflamação aguda e consequente ativação de diversos marcadores e células efetoras responsáveis por iniciar o processo de inflamação no tecido ou na linhagem de células pesquisadas (Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2020).

### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* PARA TRIAGEM E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA UTILIZANDO MACRÓFAGOS RAW 264.7 INDUZIDOS POR LPS

Embora modelos *in vitro* não sejam suficientes para abranger a resposta complexa que ocorre dentro dos órgãos, esses modelos tornam-se úteis para compreender a contribuição de populações isoladas de células e seus mecanismos de ação perante doenças. Linhagens celulares são amplamente utilizadas em todo o mundo para análise *in vitro* por serem uma fonte ilimitada de células com genótipos e fenótipos semelhantes. Deste ponto de vista, as linhagens de macrófagos são particularmente interessantes ao apresentarem plasticidade, possibilitando fenômenos como polarização e diferenciação (para osteoclastos, células de Kupffer ou células dendríticas) (Atri; Guerfali; Laouini, 2018; Knapp, 2009; Taciak *et al.*, 2018).

Sabe-se que uma ampla variedade de marcadores é expressa durante a polarização M1/M2 de macrófagos, sendo dependentes dos estímulos, substratos e do ambiente. Em experimentos *in vitro* e *in vivo* que utilizam macrófagos de linhagens

murinas, esses subconjuntos tornam-se mais fáceis de serem distinguidos, principalmente pela ativação da iNOS (M1) e ARG-1 (M2) que podem ser mensurados por diversas técnicas laboratoriais, representando o início da distinção fenotípica desses macrófagos (Atri; Guerfali; Laouini, 2018).

Modelos *in vitro* que utilizam macrófagos da linhagem RAW 264.7 são comumente aplicados na triagem de compostos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Esta linhagem, proveniente de tumor induzido pelo vírus da leucemia murina Abelson em camundongos machos *Mus musculus*, é capaz de produzir uma resposta inflamatória robusta e bem conhecida, com a liberação de diversos mediadores pró- e anti-inflamatórios. Quando estimulados com LPS, a ativação do TLR4 aciona uma cascata de sinalizações intracelulares, mobilizando a transcrição nuclear do NF- $\kappa$ B, liberando grandes quantidade de NO, prostaglandinas e citocinas (Facchin *et al.*, 2022; Merly; Smith, 2017).

Em modelos de estudo para doenças respiratórias, os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram considerados eficientes na propagação do agente causador de pneumonias e para medir infecções correlacionando sua intensidade e a quantidade de mediadores pró-inflamatórios produzidos. Além disso, sua sensibilidade a interferência de RNA e a grande gama de receptores para diversos ligantes fez com que essa linhagem fosse escolhida pela *Alliance for Cellular Signalling* como o principal sistema experimental para estudo de vias de sinalização em macrófagos (Facchin *et al.*, 2022; Hartley *et al.*, 2008).

### 3.2 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO* DE LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS (ALI)

A lesão aguda pulmonar (ALI) e sua forma mais severa denominada síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), são síndromes clínicas caracterizadas por lesões severas nas membranas alveolares, com apresentação de edema pulmonar não cardiogênico que culmina em hipoxemia refratária e alta taxa de mortalidade. Existe uma variedade de fatores que desencadeiam quadros de ALI incluindo infecções como pneumonia, sepse e demais insultos pulmonares não infecciosos. Em modelos animais que mimetizam ALI, a ativação de TLR tem sido associada à processos inflamatórios e de imunomodulação (Chen; Bai; Wang, 2010). Sendo assim, o LPS é responsável por mimetizar principalmente, quadros de choque séptico

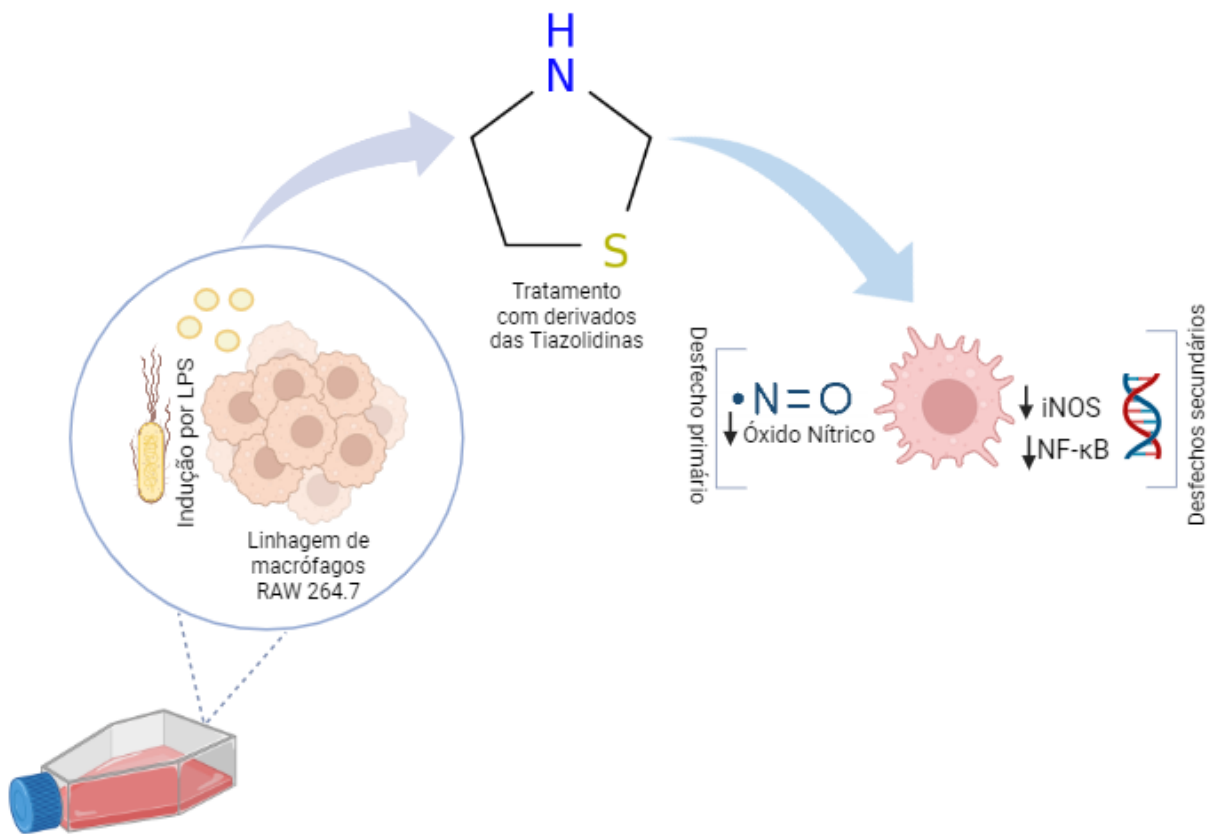
e ALI/SDRA. Nesses modelos, os principais animais de escolha são roedores, como ratos e camundongos (Abedi *et al.*, 2020).

Esses modelos de lesão aguda são definitivamente a melhor ferramenta disponível para estudar o papel biológico de patógenos como o LPS. Nenhuma outra abordagem permitirá a investigação simultânea da interação de diversas populações celulares e seus respectivos produtos e mediadores. Esses modelos, em geral, mimetizam quadros de pneumonia com pico de inflamação e edema pulmonar grave entre 24 a 48 horas após a indução, com um período auto limitante de até 7 dias (Knapp, 2009; Sipahi; Atalay; 2014).

Em camundongos, a instilação intranasal de LPS causa dano pulmonar agudo em 24 horas, caracterizado pelo aumento de polimorfonucleares em todo o espaço aéreo pulmonar e alterações na permeabilidade epitelial, representando um bom modelo para mimetizar o acúmulo de neutrófilos. As alterações pulmonares tornam-se significativas dentro de 2-4h e quadros de hipóxia podem ser observados. Achados histopatológicos demonstram que as lesões nos pulmões são caracterizadas por edema intersticial difuso e formação de exsudato alveolar (Sipahi; Atalay; 2014).

Sendo assim, o parênquima pulmonar é danificado pela liberação de proteases, pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos ativados e neutrófilos que migram para os compartimentos intersticiais e alveolares. Os resultados envolvem lesões microvasculares e dano alveolar difuso com hemorragia intrapulmonar, edema e deposição de fibrinas (Matute-Bello; Frevert; Martin, 2008; Rittirsch *et al.*, 2008).

**CAPÍTULO 2- RELEVÂNCIA DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS DAS TIAZOLIDINAS EM MACRÓFAGOS RAW 264.7 INDUZIDOS POR LPS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE**





## 4 INTRODUÇÃO

Derivados das tiazolidinas são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas, onde sua estrutura química caracterizada pela presença de anel heterocíclico, serve como base para o desenvolvimento de novas moléculas, com diversas atividades farmacológicas (Coin *et al.*, 2021). Dentre estas atividades, destaca-se sua ação anti-inflamatória em diversos marcadores, diminuindo parâmetros como o óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) e citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) (Havrylyuk; Roman; Lesyk, 2016). Esta atividade apresenta estreita correlação com a inibição da via do NF- $\kappa$ B, contribuindo drasticamente na ativação e regulação da iNOS e COX-2, responsáveis por criar e manter um ambiente propício para o desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório (Bhatnagar; Pemawat, 2023; Jain; Vora; Ramaa, 2013).

Dentre estes marcadores, o NO é reconhecido como um dos principais percursores da resposta inflamatória, sendo considerado como *gold standard* durante a avaliação e triagem de novos compostos com potencial ação anti-inflamatória e antitumoral (Varela *et al.*, 2018). Sua produção é dependente da ativação da iNOS, muitas vezes desencadeada pela via do NF- $\kappa$ B (Tu *et al.*, 2022). Neste contexto, macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS são amplamente utilizados para investigar e elucidar propriedades anti-inflamatórias de novos compostos (Facchin *et al.*, 2022; Hartley *et al.*, 2008). Esta linhagem, quando estimulada com LPS, é considerada ideal para mimetizar ambientes pró-inflamatórios, sendo descrita como um dos modelos mais apropriados para a triagem biológica e elucidação de mecanismos de ação (Taciak *et al.*, 2018).

Neste cenário, estudos *in vitro* se tornam indispensáveis para a compreensão da atividade anti-inflamatória de novos compostos naturais e sintéticos, contribuindo de forma direta para a triagem e descoberta de medicamentos e candidatos à fármacos (Benam *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2022). Diversos estudos relatam as propriedades anti-inflamatórias de derivados das tiazolidinas, entretanto, nenhuma revisão sistemática foi realizada para determinar o grau de evidencia destes achados em estudos pré-clínicos. Sendo assim, o principal objetivo deste capítulo é determinar se os derivados das tiazolidinas são capazes de diminuir a produção de NO utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Seguindo este raciocínio, resultados

envolvendo a inibição da iNOS e ativação da via do NF- $\kappa$ B foram considerados como desfechos secundários.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Responder sistematicamente à pergunta de pesquisa: “*Os derivados das tiazolidinas apresentam atividade anti-inflamatória em modelo in vitro de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?*”.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a capacidade de derivados das tiazolidinas em inibir a produção de NO (desfecho primário), diminuir a produção da iNOS e regular a ativação da via do NF- $\kappa$ B (desfechos secundários).

## 6 METODOLOGIA

Esta revisão sistemática e meta-análise foi conduzida de acordo com o *Preferred Reporting of Systematic Reviews and Meta-Analysis* (PRISMA) (Page *et al.*, 2021) e o *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Intervention* (Higgins *et al.*, 2023). Esta revisão foi registrada no *Open Science Framework* (OSF) (DOI: 10.17605/OSF.IO/Q9HZP).

### 6.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

#### 6.1.1 Critérios de inclusão

A pergunta de pesquisa foi formulada de acordo com o acrônimo PICOS (*Population, Intervention, Comparison, Outcome, Study design*): “Os derivados das tiazolidinas apresentam atividade anti-inflamatória em modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?” (Tabela 2). O acrônimo PICOS foi aplicado para estabelecer os critérios de inclusão, onde População (*Population*): macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS; Intervenção (*Intervention*): macrófagos RAW 264.7 tratados com derivados das tiazolidinas; Comparação (*Comparison*): Utilização de grupo controle inflamado com LPS; Desfecho (*Outcome*) (O): mensuração da produção de NO; Tipo de estudo (*Study design*): estudos experimentais *in vitro*. Para garantir um efeito anti-inflamatório mensurável, apenas estudos que utilizaram e descreveram a utilização de grupo controle LPS durante os experimentos foram considerados (Tabela 2).

#### 6.1.2 Critérios de exclusão

Estudos que não apresentaram uma das características listadas nesta sessão, foram excluídos da revisão sistemática. Para esta exclusão, respeitou-se a ordem de cada fator, onde (1): Estudos *in vitro* que não utilizaram macrófagos da linhagem RAW 264.7 induzidos por LPS; (2): Estudos que não avaliaram a atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas; (3): Estudos sem grupo controle inflamado por LPS; (4): Estudos que não realizaram a mensuração de NO; (5):

Revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livro, conferências, teses e dissertações, estudos *in vivo*, *in silico* ou estudos clínicos; (6): artigos completos não disponíveis.

Tabela 2 – Estratégia PICOS

PICOS	Crítérios de inclusão	Crítérios de exclusão
<b>População</b>	- Estudos experimentais <i>in vitro</i> - Modelo de macrófago RAW 264.7 induzido por LPS	- Modelos de estudos <i>in vitro</i> sem a utilização de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS
<b>Intervenção</b>	- Tratamentos com qualquer derivado das tiazolidinas (sintético, semissintético ou natural) - Proveniente de fontes sintéticas ou naturais	- Qualquer outro tratamento que não envolva compostos isolados e derivados das tiazolidinas - Tratamento com extratos ou mistura de compostos (tiazolidina + molécula de classe diferente)
<b>Comparador</b>	- Uso de grupo controle com fármaco de referência (qualquer medicamento) ou controle padrão - Uso de controle inflamado (LPS)	- Sem controle inflamado (LPS)
<b>Desfechos (Outcomes)</b>	- Mensuração de óxido nítrico (NO) ou seus metabólitos (nitrito, nitrato)	- Sem avaliação do biomarcador inflamatório NO
<b>Tipo de estudo (Study design)</b>	- Estudos experimentais <i>in vitro</i> - Estudos híbridos que contenham uma sessão <i>in vitro</i> para a avaliação da atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas	- Resumos, meta-análises, editoriais, teses e/ou dissertações, cartas, correspondências, artigos de opinião, congressos/eventos, diretrizes - Manuscrito não disponível
<b>Pergunta</b>	“Os derivados das tiazolidinas apresentam atividade anti-inflamatória em modelo <i>in vitro</i> de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?”.	

Tabela 2. Baseada na estratégia (acrônimo) PICOS para estudos de intervenção (Page *et al.*, 2021).

## 6.2 FONTES DE INFORMAÇÃO E ESTRATÉGIAS DE BUSCAS

ETBM e TLL realizaram buscas independentes para definir termos MeSH (*Medical Subject Headings*) e estratégias de busca, que foram validadas por um especialista (EMD). Além disso, uma busca manual em cada base de dados foi realizada, assegurando a inclusão de estudos potencialmente relevantes. Para esta revisão sistemática, 7 bases de dados indexadas foram pesquisadas, sendo elas: Cochrane Library, Embase, LILACS, Livivo, PubMed/MEDLINE, Scopus e Web of

Science. Uma pesquisa parcial em bases de dados não indexadas (Google Scholar), foi conduzida, onde os 100 primeiros artigos recuperados foram selecionados. A estratégia de busca foi conduzida individualmente para cada base de dados, seguindo o modelo pré-determinado para o PubMed/MEDLINE (Apêndice A, Tabela suplementar 1). Para recuperar as publicações no PubMed/MEDLINE, os descritores foram organizados em 2 blocos: Bloco 1 (tiazolidinas) e Bloco 2 (cultura celular) (Apêndice A, Tabela suplementar 1).

A busca incluiu todos os artigos publicados até 13 de março de 2023, sem restrição de tempo ou idioma. Todas as referências recuperadas foram importadas e organizadas utilizando um software gerenciador de referências *on-line* (EndNote online; Thomson Reuters, Philadelphia, PA, USA). Os artigos duplicados foram removidos utilizando o *software* gerenciador EndNote, com posterior verificação e remoção manual pela plataforma *on-line* Rayyan QCRIAs (Qatar Computing Research Institute - Data Analytics, Doha, Qatar).

### 6.3 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

A seleção dos estudos foi realizada em 2 fases distintas de elegibilidade. Na fase 1, dois autores (ETBM e TLL) avaliaram independentemente o título e resumo de todas as referências recuperadas, selecionando todos os estudos que pareciam atender aos critérios de inclusão previamente definidos. Quaisquer inconsistências referentes aos estudos incluídos foram resolvidas por meio de reunião de consenso entre os autores (ETBM e TLL). Em caso de discordância, um terceiro autor (EMD) foi consultado. Na fase 2 de seleção, os textos completos (PDF) dos artigos incluídos após a fase 1 de elegibilidade foram revisados de forma independente por 2 autores (ETBM e TLL). Novamente, qualquer desacordo com relação a inclusão ou exclusão de algum trabalho, foi resolvido em reuniões de consenso com acordo mútuo entre os autores. Em caso de discordância um terceiro autor (EMD) foi consultado para avaliação. Esta seleção de estudos foi realizada utilizando a plataforma *on-line* Rayyan QCRIAs (Qatar Computing Research Institute - Data Analytics, Doha, Qatar) para organização e seleção dos artigos avaliados.

#### 6.4 COLETA DE DADOS E ITENS ANALISADOS

Após as fases de elegibilidade, todos os artigos selecionados foram analisados para a coleta de dados pertinentes ao tema da revisão, sendo dispostos em uma tabela padronizada. 2 autores independentes (TLL e PGFO) coletaram as informações enquanto, outros 2 autores (ETBM e BGMB) verificaram as tabelas de extração, buscando por divergências ou inconsistências nas informações coletadas. A extração foi realizada em planilha Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA), elaborada por 2 autores (ETBM e TLL) e validada por especialistas (EMD e BGMB). Os dados extraídos incluíram: 1º autor, ano de publicação, país, comparação com grupo controle LPS, presença de controle positivo, efeito anti-inflamatório das tiazolidinas testadas, desfechos primários e secundários, conclusão, análise estatística, dentre outras informações.

#### 6.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA

A avaliação da qualidade metodológica foi realizada utilizando o “Documento de Orientação para Descrever Métodos de Testes *In Vitro* Não padronizados da OCDE” e a ferramenta *Science in Risk Assessment and Policy* (SciRAP) para avaliação de estudos de toxicidade *in vitro* (Roth; Zilliacus; Beronius, 2021). É válido ressaltar que estas ferramentas foram previamente adaptadas para modelos de estudo *in vitro* de inflamação (Facchin *et al.*, 2022). 2 autores (ETBM e TLL) avaliaram independentemente a qualidade dos estudos incluídos. Após reunião de consenso, qualquer divergência foi resolvida por um terceiro autor (JMDO). Os artigos incluídos foram avaliados em 3 tópicos, sendo eles: 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” e “não cumpriu”. As características dessas respostas foram representadas por cores em planilhas específicas para cada tópico. Os perfis de cores, facilmente visualizados, são especialmente úteis para determinar onde estão os pontos fortes e fracos de cada estudo. Uma pontuação numérica para a qualidade de relatórios e para a qualidade metodológica foi calculada. O cálculo das pontuações foi determinado a partir da 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) (Roth; Zilliacus; Beronius, 2021).

A pontuação SciRAP apresenta valores que variam de 0 (todos os critérios são julgados como “não cumpridos”) a 100 (todos os critérios são julgados como “cumpridos”). Os resultados da avaliação foram baseados na classificação dos estudos de acordo com sua confiabilidade relativa, dividindo os estudos em diferentes categorias de confiabilidade (Facchin *et al.*, 2022; Roth; Zilliacus; Beronius, 2021). Essas categorias de confiabilidade são definidas por “alta”, “moderada” ou “baixa” para qualidade de relatórios e qualidade metodológica.

Para a análise de relevância dos estudos, as opções de resposta para os itens do relatório foram “não determinado”, “relevante sem restrições”, “relevante com restrições” ou “não relevante”, seguindo o modelo de categorias e avaliação propostas por Klimish e colaboradores (Klimisch; Andreae; Tillmann, 1997). Novamente, as características dessas respostas foram representadas por cores em planilhas específicas para cada tópico, facilitando a visualização dos resultados obtidos. Este eixo conta com 4 domínios distintos, separados em 1) identificação da substância testada, 2) sistema de teste, 3) desfechos (*endpoints*) estudados e 4) concentrações utilizadas.

## 6.6 AVALIAÇÃO DA CERTEZA DA EVIDENCIA

A força da evidência cumulativa foi avaliada de acordo com a abordagem GRADE (*The Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation*) (Guyatt *et al.*, 2011; Santesso *et al.*, 2020). A abordagem GRADE foi adaptada para estudos *in vitro* seguindo metodologia já descrita (Borges *et al.*, 2016; Pavan *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2017). Todas as análises foram realizadas utilizando a plataforma *online* GRADEpro GDT (McMaster University, Evidence Prime Inc., Hamilton, Ontario). Dado que nenhum método específico de avaliação da certeza da evidência foi desenvolvido para estudos *in vitro*, ETBM e TLL pontuaram cada item como ‘alto’, ‘moderado’, ‘baixo’ ou ‘muito baixo’ (Souza *et al.*, 2017). Após reunião de consenso, as divergências foram resolvidas e validadas por 2 revisores/especialistas (JMDO e IGD). Os critérios para avaliação das limitações do estudo, inconsistência,



indiretividade, imprecisão e viés de publicação foram determinados seguindo metodologia já descrita (Borges *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017).

Por se tratar de uma adaptação para estudo *in vitro* de inflamação, cada critério foi analisado seguindo pontos específicos e bem delimitados pelos autores. As limitações do estudo, levaram em consideração a presença de relatos seletivos e a interrupção do estudo (tempo de incubação para o doseamento do NO); o critério de inconsistência considerou a falta de valores de  $p$  durante as análises estatísticas realizadas por cada estudo; a indiretividade considerou estudos sem a presença de grupo LPS para comparação; o critério de imprecisão considerou ensaios sem a definição do número de replicatas ( $n=3$ ) e a falta de densidade celular (número de células por poço); por fim, o viés de publicação levou em consideração o financiamento do estudo por empresas privadas.

## 6.7 MEDIDAS DE EFEITO E MÉTODOS DE SÍNTESE

Os artigos foram distribuídos entre dois autores (ETBM e TLL), que extraíram os dados de forma independente. Esses dados foram retirados do texto, figuras ou tabelas. As informações foram padronizadas como média e desvio padrão (DP). Se apenas um gráfico estivesse disponível, os dados destes foram extraídos utilizando uma régua digital (Hirst *et al.*, 2016; Risio *et al.*, 2020). Apenas os dados referentes ao NO (desfecho primário) foram coletados, convertidos e expressos em  $\mu\text{M}$ . As estruturas químicas de cada derivado das tiazolidinas foram analisadas por um expert (BGMB) e, se necessário, subgrupos foram considerados para a análise quantitativa. Sendo assim, durante a meta-análise, a avaliação da atividade anti-inflamatória dos derivados das tiazolidinas foi conduzida também por subgrupos, dependendo da necessidade e dos compostos elencados.

A análise foi realizada utilizando a diferença entre a média padronizada como medida de desfecho. Um modelo de efeitos aleatórios foi ajustado e a heterogeneidade ( $\tau^2$ ) foi estimada usando o estimador de máxima verossimilhança restrita (Viechtbauer, 2010). O teste Q para heterogeneidade (Cochran, 1954) e a estatística  $I^2$  também foram relatados. Diante de qualquer heterogeneidade, um intervalo de predição para os resultados verdadeiros também foi fornecido. Os resíduos estudantis e as distâncias de Cook foram utilizados para examinar se os

estudos eram discrepantes e/ou influentes no contexto do modelo. A meta-análise foi realizada utilizando o *software* Jamovi (versão 2.3, Sydney, Austrália).

## 6.8 MEDIDAS ANALISADAS

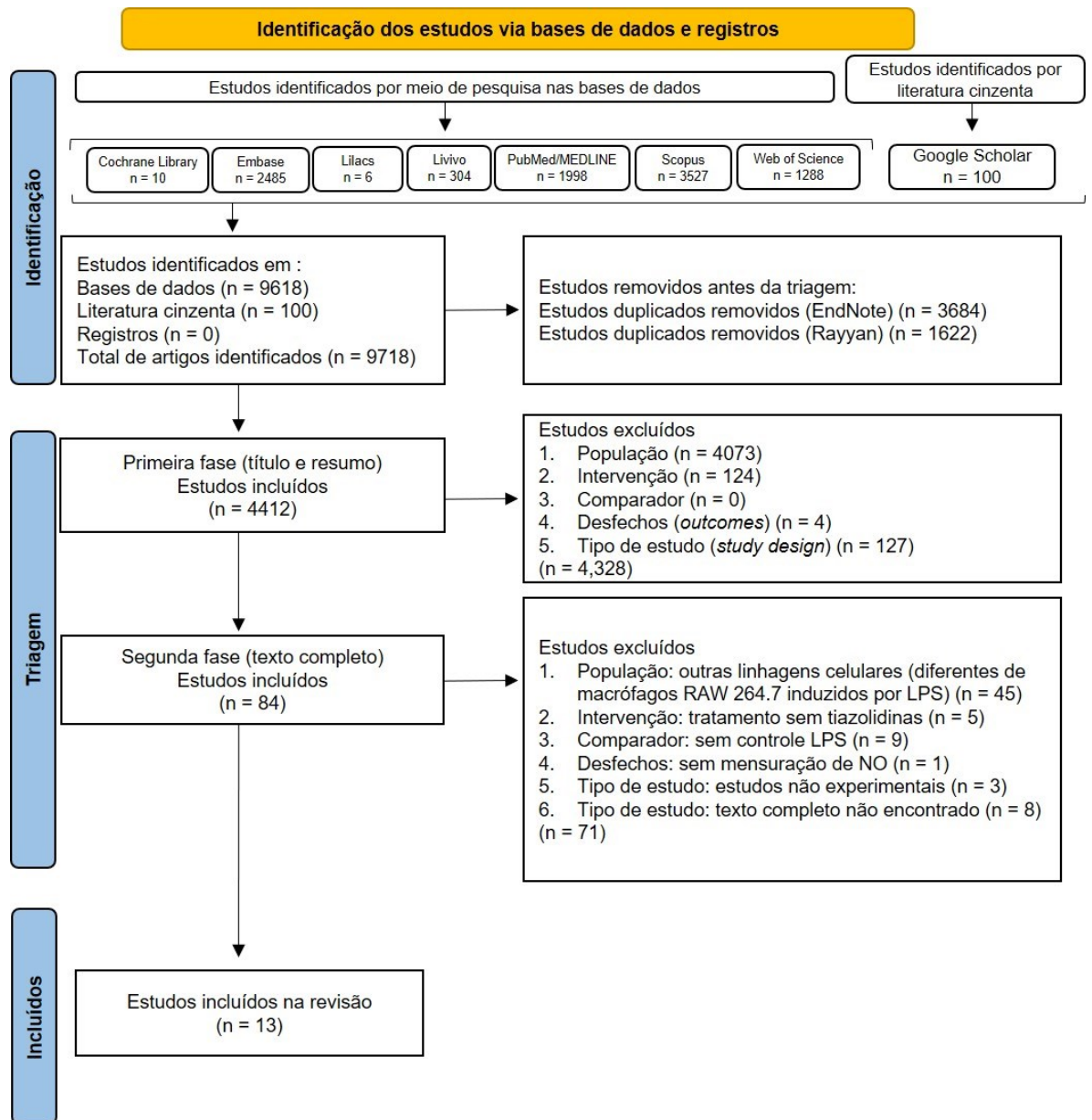
A mensuração de óxido nítrico (NO) e seus metabólitos (nitrito, nitrato) foram os principais desfechos avaliados (desfechos primários), enquanto que, iNOS e NF- $\kappa$ B foram considerados como desfechos secundários para este estudo.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Durante a fase 1 de seleção, foram identificadas 9618 citações nas 7 bases de dados indexadas, juntamente aos 100 artigos recuperados pelo Google Acadêmico (*Google Scholar*) ( $n = 9718$ ). Após a remoção das duplicatas, realizadas em 2 etapas, restaram 4412 artigos para análise do título e resumo. Após esta avaliação, 4328 artigos foram excluídos, restando 84 artigos para a fase 2 de seleção (revisão do texto completo). Durante esse processo, 71 artigos foram excluídos e listados de acordo com o motivo de sua exclusão (Apêndice A, Tabela suplementar 2) (Apêndice B, Referências suplementares). Ao final, foram selecionados 13 artigos para extração de dados (Alleva *et al.*, 2002; César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Elkamhawy *et al.*, 2020; Faine *et al.*, 2011; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Rezaei *et al.*, 2019; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014). Este processo é descrito no diagrama de fluxo para os critérios de busca e seleção de literatura adaptado do PRISMA (Page *et al.*, 2021) (Figura 6). Este fluxograma detalha o processo de identificação, inclusão e exclusão dos estudos analisados ao longo da revisão.

Figura 6 – Processo de busca e seleção dos estudos com base na declaração PRISMA

Figura 6. PRISMA: itens de relatório pré-definidos para revisões sistemáticas e meta-análises (Page *et al.*, 2021).

## 7.2 CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

Os estudos incluídos foram realizados em 6 países diferentes: 2 no Brasil (César *et al.*, 2015; Faine *et al.*, 2011), 5 na China (Deng *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014), 2 no Irã (Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Rezaei *et al.*, 2019), 1 no Japão (Sato; Tatsunami; Wakame, 2021), 1 na República da Coreia (Elkamhawy *et al.*, 2020) e 1 nos Estados Unidos da América (Alleva *et al.*, 2002). Dentre esses estudos, apenas 1 foi publicado

em 2002 (Alleva *et al.*, 2002), sendo que os demais tiveram sua publicação entre 2010 e 2021. Além disso todos os estudos incluídos foram escritos em inglês, independentemente do país de origem dos pesquisadores.

O objetivo da maioria dos estudos foi avaliar a atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas. Para tanto, 2 estudos realizaram experimentos *in vitro* e *ex vivo* (Alleva *et al.*, 2002; Faine *et al.*, 2011), 4 estudos descreveram a atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas apenas em modelo de inflamação *in vitro* (Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Rezaei *et al.*, 2019; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021) e 7 estudos analisaram a atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas *in vitro*, com posterior avaliação *in vivo* (César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Elkamhawy *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014). Além disso, 4 estudos (Elkamhawy *et al.*, 2020; Faine *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019) realizaram avaliação *in silico* das moléculas selecionadas.

Além disso, 11 estudos optaram por determinar a atividade anti-inflamatória de tiazolidinonas (Alleva *et al.*, 2002; César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Elkamhawy *et al.*, 2020; Faine *et al.*, 2011; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Rezaei *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2014). Após avaliação do *expert* (BGMB), as moléculas avaliadas por Ghafoori, Rezaei, Mohammadi (2017) foram classificadas como derivados das tiazolidinonas, pois apresentaram um anel tiazolidina de cinco membros com grupos carbonila nas posições 2 e 4 em sua estrutura.

Todos os estudos incluídos nesta revisão respeitaram os critérios de inclusão, utilizando modelo *in vitro* de inflamação com macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS para quantificar a produção de NO após o tratamento com os derivados das tiazolidinas selecionadas. Com relação ao LPS utilizado, apenas 6 estudos (Alleva *et al.*, 2002; César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2014) descreveram a *Escherichia coli* responsável pela produção do agente flogístico (LPS). Dentre eles, o sorotipo 0111:B4 foi o mais utilizado, sendo citado por 4 autores (Alleva *et al.*, 2002; César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015). Com relação a análise estatística, apenas 3 estudos não reportaram de maneira satisfatória (programa utilizado, teste estatístico, pós-teste aplicado) o tipo de análise realizada para quantificar os dados encontrados (Alleva *et al.*, 2002; Elkamhawy *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2011). Esses e demais resultados coletados sobre as

características dos estudos incluídos podem ser observados, de forma simplificada, na Tabela 3.

Tabela 3 – Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n = 13)

Autor, Ano, País	Tiazolidina testada	LPS (Concentração, sorotipo, origem)	Objetivo do estudo	Análise estatística
Alleva <i>et al.</i> , (2002), Estados Unidos da América	BRL49653 (Rosiglitazona)	100 ng/mL ( <i>Escherichia coli</i> , sorotipo 0111:B4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA)	Elucidar a atividade anti-inflamatória de 15d-PGJ2 e BRL49653, investigando se estes ligantes PPAR- $\gamma$ regulam citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas por macrófagos murinos M0 e RAW 264.7 induzidos por LPS.	Não reportado
César <i>et al.</i> , (2015), Brasil	5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-3-(4-clorobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (LYSO-7)	1 $\mu$ g/mL ( <i>Escherichia coli</i> , sorotipo 0111:B4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Determine se a indol-tiazolidina, LYSO-7, pode afetar a aterogênese e a inflamação. Para este propósito, empregamos abordagens <i>in vitro</i> usando cultura de células de macrófagos, e modelo de aterosclerose em camundongos LDLr-/-.	ANOVA unidirecional seguida pelo <i>post hoc</i> de Dunnett ou pelo teste de Tukey
Deng <i>et al.</i> , (2012), China	(E)-5-(2,4-di-terc-butil-6-((2,4-dioxotiazolidin-5-ilideno)metil)fenil)-5'-metil-7,7'-dimetoxi-4, 4'-bibenzo[d][1,3]dioxol-5,5'-dicarboxilato (7k)	1 $\mu$ g/mL ( <i>Escherichia coli</i> , sorotipo 0111:B4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Explorar a ação do composto 7k em citocinas pró-inflamatórias em macrófagos induzidos por LPS e em modelo de rato ALF induzido por GalN/LPS.	Teste t de amostras independentes
Elkamhawy <i>et al.</i> , (2020), República da Coreia	Derivados de tiazolidina-2,4-diona	10 ng/mL	Investigar a otimização do composto principal 6 em um inibidor alostérico irreversível de IKK- $\beta$ mais potente com potencial atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> .	Não reportado
Faine <i>et al.</i> , (2011), Brasil	5-(4-metanossulfonil-benzilideno)-3-(4-nitrobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (SF23)	0.5 $\mu$ g/mL	Investigar as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de um novo TZD quimicamente modificado, a arilideno-tiazolidinediona 5-(4-metanossulfonil-benzilideno)-3-(4-nitrobenzil)-tiazolidina-2,4-diona (SF23).	ANOVA unidirecional seguida pelo <i>post hoc</i> de Tukey e testes t pareados ou não pareados
Ghafoori, Rezaei, Mohammadi, (2017), Irã	Derivados de tiazolidinona	1 $\mu$ g/mL	Investigar os efeitos de novos derivados das tiazolidinonas nos sinais relacionados à inflamação (óxido nítrico, NF- $\kappa$ B, COX-2 e iNOS) em macrófagos RAW 264.7.	ANOVA seguido por testes de múltiplos intervalos de Duncan
Li <i>et al.</i> , (2013), China	Anel tiazolidin-4-ona (CH1b e CH2b)	1 $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Confirmar o efeito dos novos imunoestimuladores CH1b e CH2b com anel tiazolidin-4-ona na função e atividade de macrófagos.	ANOVA. As médias individuais pareadas foram comparadas por teste t.
Ma <i>et al.</i> , (2015), China	Derivados de 5-benzilidenotiazolidina-2,4-diona	1 $\mu$ g/mL ( <i>Escherichia coli</i> , sorotipo 0111:B4) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Sintetizar 59 derivados e bioisómeros com base em 3I por condensação de Knoevenagel e realizar a avaliação biológica e estudo da relação estrutura-atividade (SAR).	Teste t não pareado com correção de Welch
Ma <i>et al.</i> , (2010), China	(Z)-5-(4-metoxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona (SKLB010)	1 $\mu$ g/mL	Investigar os efeitos do SKLB010 na geração de NO <i>in vitro</i> e avaliar os efeitos <i>in vivo</i> do SKLB010 na artrite induzida por adjuvante.	ANOVA unidirecional
Rezaei <i>et al.</i> , 2019, Irã	2,4bis-[(4-etoxifenil)azo]5-(3-hidroxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona (TZD-OCH2CH3)	1 $\mu$ g/mL ( <i>Escherichia coli</i> , sorotipo 0127:E8) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Investigar o efeito inibitório do composto TZDOCH2CH3 na síntese da ciclooxigenase-2 (COX-2) e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), utilizando macrófagos RAW 264.7.	Análise ANOVA unidirecional com <i>post hoc</i> de Newman – Keuls
Sato, Tatsunami, Wakame, (2021), Japão	(5-[(1Z,2E)-2-metil-3-fenilpropenilideno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidina ácido acético (Epalrestat)	100 ng/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Determinar se EPS é capaz de suprimir a resposta inflamatória em células RAW264.7 estimuladas por LPS.	ANOVA bidirecional com teste de comparação múltipla de Tukey
Wang <i>et al.</i> , (2011), China	Dimetil [1,1'-bifenil]-2,2' -derivados de dicarboxilato contendo tiazolidina-2,4-diona	1 $\mu$ g/mL	Relatar a síntese de derivados de bifendato e avaliar a atividade anti-inflamatória por meio da detecção da produção de óxido nítrico (NO) na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 estimuladas por LPS.	Não reportado
Xie <i>et al.</i> , (2014), China	(Z)-5-(4-metoxibenzilideno)tiazolidina-2,4-diona (SKLB010)	100 ng/mL ( <i>Salmonella abortus equi</i> ) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)	Avaliar se o composto SKLB010 pode prevenir lesão hepática aguda causada por D-galactosamina/lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos e investigar os mecanismos subjacentes.	Teste t de amostras independentes

Tabela 3. Principais características descritivas coletadas dos artigos incluídos na revisão sistemática

### 7.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE METODOLÓGICA

Como descrito anteriormente, os critérios de avaliação do SCIRAP são divididos em três eixos: qualidade de relatórios, qualidade metodológica e relevância dos estudos. Em cada eixo, os estudos são avaliados individualmente, buscando uma pontuação final que expresse a qualidade e relevância dos estudos selecionados. Para determinar a qualidade dos relatórios, 5 critérios de avaliação foram analisados para cada estudo (Apêndice A, Tabela suplementar 3). A maioria dos estudos (n = 9) (César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Elkamhawy *et al.*, 2020; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Rezaei *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2014) apresentaram alta qualidade de relatórios. Em contrapartida, apenas 2 foram classificados com baixa qualidade de relatórios (Alleva *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011) (Figura 7A). Da mesma forma, a qualidade metodológica foi avaliada seguindo os critérios do SciRAP (Apêndice A, Tabela suplementar 4). Nesse cenário, 9 artigos (César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Faine *et al.*, 2011; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Rezaei *et al.*, 2019; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021; Xie *et al.*, 2014) apresentaram alta qualidade metodológica, enquanto os demais (n = 4) (Alleva *et al.*, 2002; Elkamhawy *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011) apresentaram qualidade metodológica moderada (Figura 7B).

Figura 7 – Resumo da avaliação da qualidade (confiabilidade) dos estudos incluídos (n = 13)

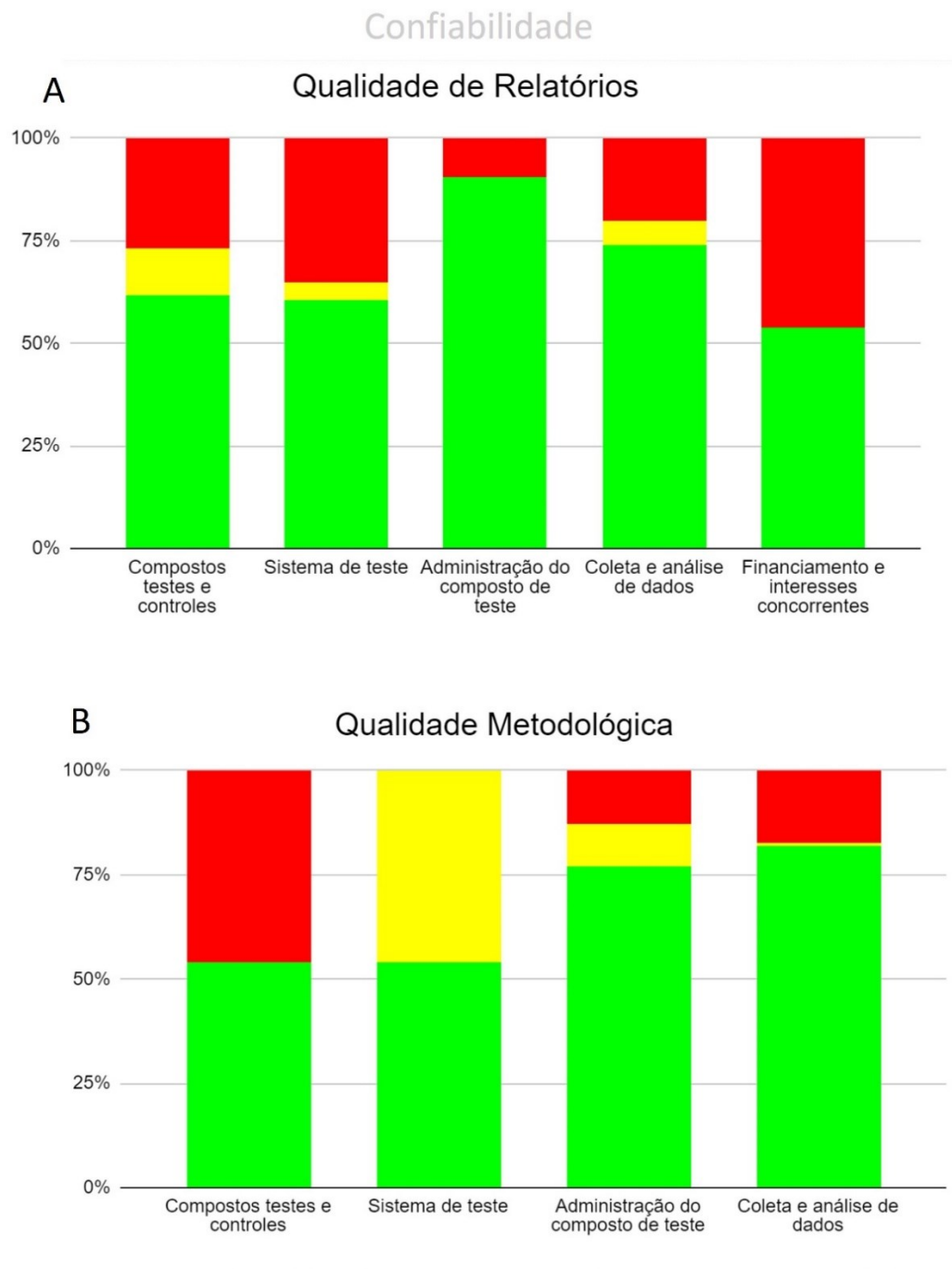


Figura 7. Resumo da confiabilidade representado por: (A) Qualidade do relatório; (B) Qualidade metodológica; (n = 13). Verde: Cumpriu, Amarelo: Cumpriu parcialmente e Vermelho: Não Cumpriu.

Por fim, a relevância dos estudos incluídos foi analisada seguindo os itens (Apêndice A, Tabela suplementar 5). A síntese dos 4 itens revelou que 7 estudos (César *et al.*, 2015; Deng *et al.*, 2012; Elkamhawy *et al.*, 2020; Faine *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021) (53,8%) foram



relevantes sem restrições e 6 estudos (Alleva *et al.*, 2002; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2011, Xie *et al.*, 2014) (46,2%) foram relevantes com restrições (Figura 8). Esta restrição é intimamente relacionada à falta de mensuração da citotoxicidade (viabilidade celular), o que dificulta a determinação de concentrações seguras para os compostos analisados no sistema de teste (item 4: concentração). Além disso, as moléculas avaliadas por Ghafoori, Rezaei, Mohammadi, (2017) foram consideradas tiazolidinadionas, diferindo da classificação reportada pelos autores. Esta alteração afetou o critério relativo a substância teste (item 1: substância). (Apêndice A, Tabela suplementar 5).

Figura 8 – Resumo da relevância dos estudos incluídos (n = 13)

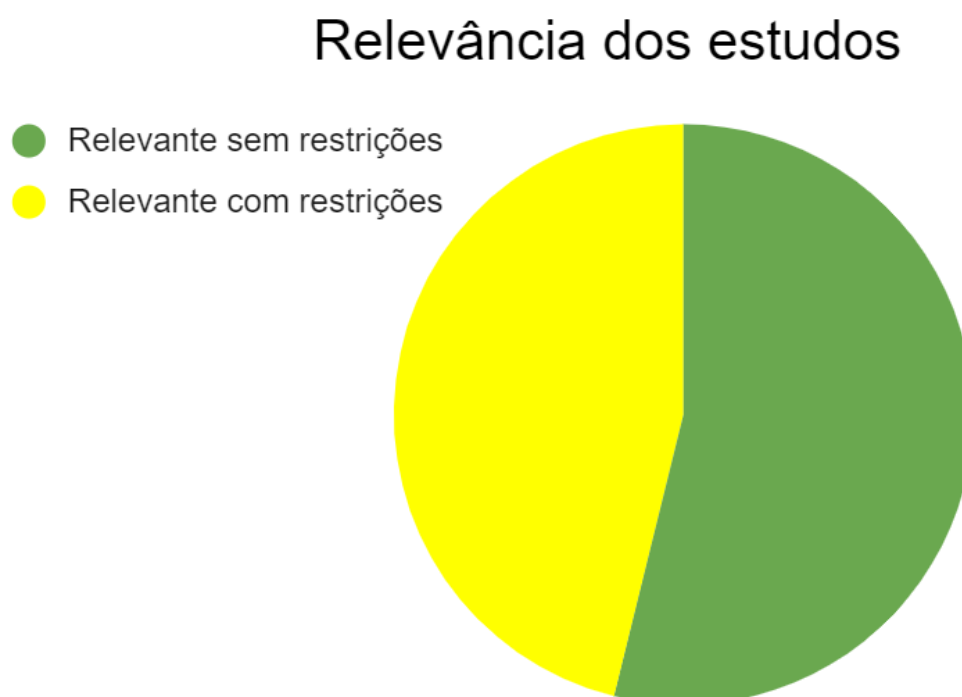


Figura 8. Resumo da relevância dos estudos incluídos (n = 13), seguindo a ferramenta SciRAP.

Verde: relevante sem restrições; Amarelo: relevante com restrições.

#### 7.4 RESULTADO INDIVIDUAL DOS ESTUDOS

Todos os estudos incluídos avaliaram a mensuração do NO e seus metabólitos utilizando os reagentes de Griess (Green *et al.*, 1982). Com exceção de 1 estudo (Li *et al.*, 2013), todos os derivados das tiazolidinas foram capazes de diminuir a produção deste parâmetro. Além do grupo controle LPS, foi observado a presença,

ou não, de grupo controle positivo (fármacos de referência). Neste caso, apenas 6 estudos apresentaram algum tipo de controle positivo (Alleva *et al.*, 2002; César *et al.*, 2015; Elkamhawy *et al.*, 2020; Faine *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011), sendo que Rosiglitazona foi o único que se repetiu em mais de um estudo (César *et al.*, 2015; Faine *et al.*, 2011).

Com relação aos desfechos secundários, 7 estudos avaliaram a expressão da iNOS (César *et al.*, 2015; Faine *et al.*, 2011; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019, Sato; Tatsunami; Wakame, 2021) e 4 estudos analisaram a ativação da via do NF- $\kappa$ B (Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021; Xie *et al.*, 2014). A maioria dos estudos concluiu que os derivados das tiazolidinas estudados apresentaram a capacidade de diminuir a maioria dos parâmetros pró-inflamatórios, incluindo NO, iNOS, NF- $\kappa$ B e demais marcadores. Um resumo descritivo das características anti-inflamatórias dos estudos incluídos pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo das características anti-inflamatórias dos estudos incluídos (n = 13)

Autor, Ano, País	Foi utilizado controle positivo? (nome, concentração)	A tiazolidina inibiu os principais desfechos? (S/N)	Desfechos secundários	Conclusão
Alleva <i>et al.</i> , (2002), Estados Unidos da América	Ciglitazona	Sim	IL-6, TNF- $\alpha$ , PPAR $\gamma$	O estudo esclareceu discrepâncias na literatura, mostrando que o PPAR- $\gamma$ regula a liberação de NO e citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos murinos M0 ativados apenas com LPS. Estes resultados sugerem que as tiazolidinonas podem ser mais eficazes na supressão da atividade M0 precocemente (isto é, na ausência de IFN- $\gamma$ ).
César <i>et al.</i> , (2015), Brasil	Rosiglitazona	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), iNOS, COX-2, VCAM-1; MCP-1; Apoptose, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$	LYSO-7 possui propriedades anti-inflamatórias e o tratamento com TZD atenua a progressão da aterosclerose em camundongos LDLr <sup>-/-</sup> , modulando o metabolismo lipídico e o processo de inflamação.
Deng <i>et al.</i> , (2012), China	Sem fármaco de referência	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), Migração celular, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$	Este estudo confirmou o efeito anti-inflamatório <i>in vitro</i> e o potencial terapêutico de 7k em modelo <i>in vivo</i> . A proteção hepática de 7k contribuiu para o seu efeito inibitório na produção de mediadores pró-inflamatórios, suprimindo a infiltração de macrófagos.
Eikamhawy <i>et al.</i> , (2020), República da Coreia	NS-398 10 nM) e L-NIL (40 $\mu$ M)	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE <sub>2</sub>	Os compostos 7a e 7p exibiram atividade anti-inflamatória significativa <i>in vitro</i> . O composto 7a apresentou maior estabilidade plasmática e microssomal. Além disso, sua eficácia <i>in vivo</i> foi confirmada, aumentando as taxas de sobrevivência dos grupos de animais tratados.
Faine <i>et al.</i> , (2011), Brasil	Rosiglitazona (1-5 $\mu$ M); Rosiglitazone (3 $\mu$ M)	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), NOx1, NOx2, Apoptose, iNOS, COX-2, CD36, PPAR $\gamma$	O SF23 apresentou uma afinidade fraca para o PPAR- $\gamma$ , com propriedades anti-inflamatórias semelhantes em macrófagos estimulados por LPS. Em macrófagos ativados, o SF23 também apresentou efeitos antioxidantes significativos, inibindo a produção de ERO, hiperpolarização mitocondrial e diminuindo a expressão das subunidades HO-1, Nrf2 e NADPH.
Ghafoori, Rezaei, Mohammadi, (2017), Irã	Sem fármaco de referência	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), iNOS, COX-2, NF- $\kappa$ B	Os resultados revelaram que o composto B diminuiu a expressão dos sinais relacionados com a inflamação (NO, iNOS e COX-2) pela regulação do NF- $\kappa$ B.
Li <i>et al.</i> , (2013), China	Sem fármaco de referência	Não	Proliferação celular, Fagocitose, IL-6, IL-8, I $\kappa$ B- $\alpha$ , p38 MAPK, iNOS, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B	A presente investigação demonstrou que o CH2b pode promover a ativação de NF- $\kappa$ B e p38 MAPK, aumentando várias funções de macrófagos induzidos por LPS, incluindo expressão de iNOS, produção de NO, citocinas e fagocitose.
Ma <i>et al.</i> , (2015), China	Indometacina (100 $\mu$ M)	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), iNOS	O composto 7-44 diminuiu a atividade da iNOS e a produção de NO em células RAW 264.7.
Ma <i>et al.</i> , (2010), China	Sem fármaco de referência	Sim	Migração celular	SKLB010 inibiu diversos mediadores inflamatórios em tecidos articulares de ratos. Os mecanismos de ação envolvidos englobam a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias e a migração de macrófagos.
Rezaei <i>et al.</i> , 2017, Irã	Sem fármaco de referência	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), iNOS, COX-2	Este estudo demonstrou que TZD-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> é capaz de reduzir significativamente a produção de NO e expressão de mRNA da COX-2 e iNOS em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.
Sato, Tatsunami, Wakame, (2021) Japão	Sem fármaco de referência	Sim	Viabilidade celular (citotoxicidade), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, p38 MAPK, JNK, ERK, iNOS, NF- $\kappa$ B	Demonstramos que o EPS suprime a resposta inflamatória em células RAW264.7 estimuladas por LPS.
Wang <i>et al.</i> , (2011), China	Bifendato (DBD)	Sim	-	Este estudo sintetizou uma série de derivados de dimetil [1,10 - Bifenil] -2,20 -dicarboxilato contendo tiazolidina 2,4-diona. O composto 7k demonstrou potente atividade anti-inflamatórias e hepatoprotetoras.

Xie <i>et al.</i> , (2014), China	Sem fármaco de referência	Sim	p38 MAPK, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ , p65 e p50)	Os resultados confirmaram o efeito protetor do SKLB010 na hepatite aguda, sugerindo que a supressão contribui para a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo/nitrativo e apoptose celular.
-----------------------------------	---------------------------	-----	------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabela 4. Principais características relacionadas a atividade anti-inflamatória dos artigos incluídos na revisão sistemática.

## 7.5 RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS (ABORDAGEM GRADE)

A certeza na evidência cumulativa avaliada pela abordagem GRADE foi considerada “moderada” para a inibição do NO (n = 13), diminuição da expressão da iNOS (n = 7) e fosforilação do NF- $\kappa$ B (n = 4). Neste caso, todos os estudos foram avaliados de maneira conjunta, possibilitando a determinação da certeza da evidência cumulativa para cada desfecho. Em todos os desfechos o tema “imprecisão” foi considerado “grave” devido à falta de densidade celular observada nos estudos analisados (Tabela 5).

Tabela 5 – Sumário da certeza da evidência cumulativa baseado na abordagem GRADE

Nº de estudos	Risco de viés	Inconsistência	Indiretividade	Imprecisão	Outras considerações	Certeza da evidência
<b>Os derivados das tiazolidinas podem ser utilizados para diminuir a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?</b>						
13	Não sério	Não sério	Não sério	Sério <sup>a</sup>	Não	+++
<b>Os derivados das tiazolidinas podem ser utilizados para diminuir a expressão da iNOS em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?</b>						
7	Não sério	Não sério	Não sério	Sério <sup>a</sup>	Não	+++
<b>Os derivados das tiazolidinas podem ser utilizados para diminuir a ativação da via no NF-<math>\kappa</math>B em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS?</b>						
4	Não sério	Não sério	Não sério	Sério <sup>a</sup>	Não	+++

Tabela 5. Certeza da evidência cumulativa baseada na abordagem GRADE, com modificações para estudos *in vitro*, onde <sup>a</sup>sem densidade celular; +++: Moderado

## 7.6 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Dentre os artigos que avaliaram a expressão da iNOS (n = 7) e a fosforilação de NF- $\kappa$ B (n = 4), apenas 1 estudo (Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017) apresentou a densidade celular utilizada durante os experimentos referentes a estes parâmetros. Como a densidade celular foi utilizada para representar a população dos estudos incluídos (células por poço) (Facchin *et al.*, 2022), optou-se por realizar a meta-análise apenas para o desfecho primário (inibição do NO). Portanto, apenas artigos com

densidade celular especificada para NO foram considerados ( $n = 9$ ) (Alleva *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2012; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Rezaei *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014). A análise foi realizada utilizando a diferença média padronizada entre o grupo controle (LPS) e o grupo de tratamento com as tiazolidina.

A primeira meta-análise foi gerada com todos os 9 artigos, independentemente das substituições ou subclasses de compostos analisados (Apêndice A, Tabela suplementar 6). As diferenças entre as médias padronizadas variaram entre -0.8 e 91.1, sendo que a maioria das estimativas foi positiva (89.0%), favorecendo o grupo tratado com tiazolidinas. A diferença da média padronizada estimada, com base no modelo de efeitos aleatórios, foi de 17.4 (IC 95.0%: -1.4 a 36.3). Portanto, o resultado médio não diferiu significativamente de zero ( $z = 1.8$ ,  $p = 0.07$ ). De acordo com o teste Q, os resultados verdadeiros parecem ser heterogêneos ( $Q(8) = 2037656.5$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\tau^2 = 833.7$ ,  $I^2 = 100.0\%$ ). Além disso, um intervalo de precisão de 95% para os resultados verdadeiros foi dado por -42.2 a 77.1. Assim, embora o resultado médio seja estimado como positivo, em alguns estudos o verdadeiro resultado pode, de fato, ser negativo. Um exame dos resíduos estudantis revelou que 1 estudo (Rezaei *et al.*, 2019) teve um valor superior a  $\pm 2.7$ , tornando-o um potencial *outlier* no contexto deste modelo (Figura 9A). A exclusão deste estudo (Rezaei *et al.*, 2019), não apresentou mudanças significativas durante a quantificação dos resultados, sendo mantido nesta meta-análise.

Diante desta heterogeneidade e da presença de potenciais *outlier*, uma segunda meta-análise foi realizada, levando em consideração a grande maioria dos estudos ( $n = 11$ ) que avaliaram tiazolidinadionas (Apêndice A, Tabela suplementar 6). Dentre estes trabalhos, 8 apresentaram densidade celular e foram considerados. No entanto, 2 estudo (Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Rezaei *et al.*, 2019), foram considerados *outlier*, sendo excluídos desta meta-análise ( $n = 6$ ) (Alleva *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2014) (Apêndice A, Tabela suplementar 6). As diferenças entre as médias padronizadas observadas variaram entre 3.7 e 9.7, sendo a maioria das estimativas foi positiva (100.0%), favorecendo o tratamento com tiazolidinadionas (Figura 9B). A diferença da média padronizada estimada, com base no modelo de efeitos aleatórios, foi de 6,25 (IC 95.0%: 4.3 a 8.1). Portanto, o desfecho médio diferiu significativamente de zero ( $z = 6.4$ ,  $p < 0.0001$ ). De acordo com o teste Q, os resultados verdadeiros parecem ser

heterogêneos ( $Q(5) = 221468.2$ ,  $p < 0.0001$ ,  $\tau^2 = 5.6$ ,  $I^2 = 99.9\%$ ). Um intervalo de previsão de 95.0% para os resultados verdadeiros foi dado por 1.2 a 11.3. Assim, mesmo que possa haver alguma heterogeneidade, os verdadeiros resultados dos estudos são geralmente semelhantes aos resultados médios estimados. O exame dos resíduos estudantis revelou que nenhum dos estudos apresentou valor superior a  $\pm 2.6$ , portanto não houve indicação de *outliers* no contexto deste modelo (Figura 9B).

Figura 9 – *Forest plot* das médias na produção de NO entre o grupo controle (LPS) e o grupo intervenção (derivados das tiazolidinas) dos estudos incluídos.

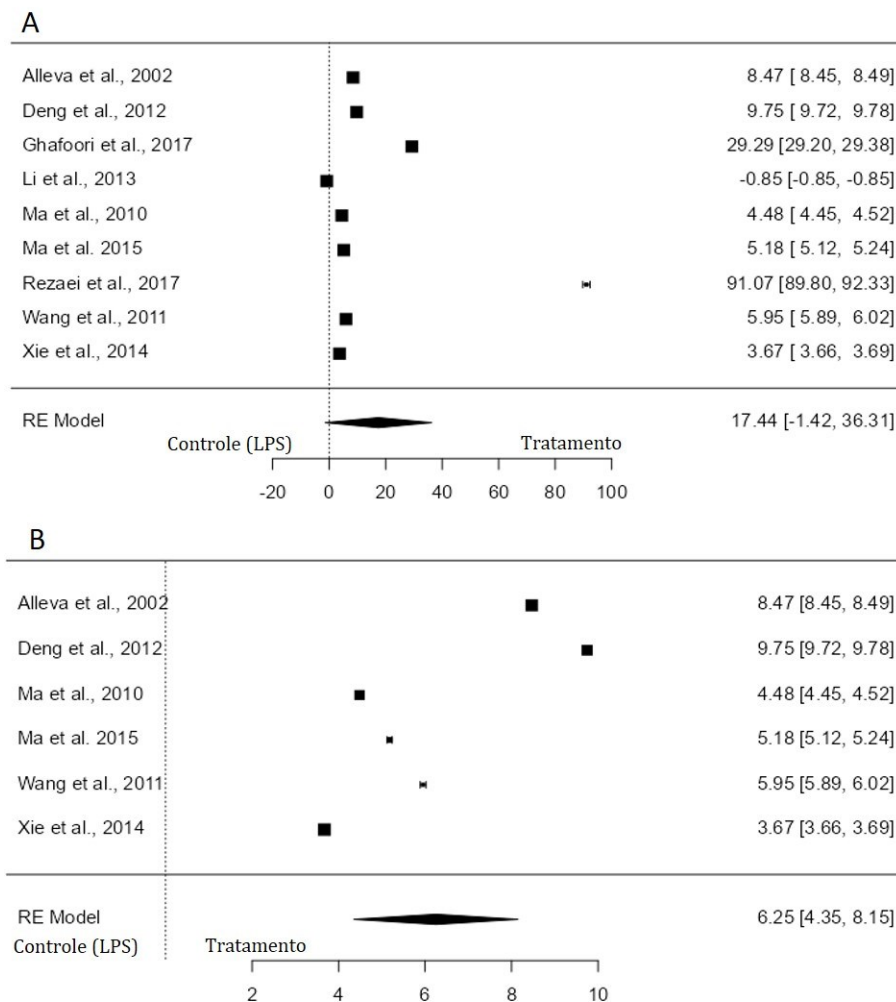


Figura 9. Análise quantitativa dos estudos incluídos. A meta-análise foi realizada para o desfecho primário (NO) e incluiu apenas artigos com densidade celular relatada. (A) Controle: LPS; Tratamento: Derivados de tiazolidinas ( $n = 9$ ); (B) Controle: LPS; Tratamento tiazolidinadionas ( $n = 6$ ). Os resultados foram calculados pelo software Jamovi (versão 2.3, Sydney, Austrália).

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 RESUMO DAS EVIDÊNCIAS

As atividades biológicas das tiazolidinas são investigadas há décadas, sugerindo uma ação anti-inflamatória proeminente, com provável correlação com o anel heterocíclico que compõe a estrutura destes compostos. Algumas revisões de literatura descrevem a afinidade destas estruturas em diminuir parâmetros pró-inflamatórios, inibindo a expressão da COX-2, iNOS e seus produtos PGE<sub>2</sub> e NO (Aqlan *et al.*, 2022; Dhadda *et al.*, 2023; Manjal *et al.*, 2017). Neste contexto, linhagens celulares como as de macrófagos RAW 264.7, podem atuar como sistemas ideais para investigação inicial e seleção de novas moléculas com possível ação anti-inflamatória (Khatua; Simal-Gándara, Acharya, 2022). Nesta revisão sistemática, 3 estudos incluídos realizaram a triagem de derivados das tiazolidinas (Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Ma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011), continuando os experimentos após a mensuração do NO. Os demais estudos incluídos avaliaram a atividade anti-inflamatória de compostos tiazolidínicos previamente selecionados. Nesse cenário, apenas 1 estudo (Li *et al.*, 2013) mostrou aumento na produção de NO após tratamento prévio com tiazolidina. No entanto, os autores consideraram o composto tiazolidin-4-ona (CH<sub>2</sub>b) como um candidato à fármaco de imunestimulação.

Os macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS aumentam rapidamente a expressão de genes responsáveis pela alta síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como NO, O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proporcionando um ambiente eficaz para a pesquisa da atividade anti-inflamatória de novos compostos (Gantner; Lafond; Bonini, 2020). Entretanto, a falta de padronização em modelos pré-clínicos *in vitro*, referentes às doses de LPS, densidade celular, presença de controle positivo, entre outros, dificulta a comparação e refinamento desses estudos (Bas *et al.* 2021; Facchin *et al.* 2022). Para resolver estes impasses, fomos muito críticos na aplicação dos critérios de elegibilidade e na extração dos dados, para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. É importante destacar que o número de passagens celulares e a triagem para contaminação por micoplasma foram os itens menos cumpridos durante a avaliação da qualidade dos relatórios pela ferramenta SciRAP. Além disso, a falta de densidade celular foi determinante para a avaliação quantitativa dos estudos incluídos.

Além disso, a avaliação da qualidade metodológica (SciRAP) foi utilizada para avaliar a descrição do sorotipo de LPS, a composição do meio de cultura utilizado (DMEM, com 10% de soro fetal bovino), as características de incubação (temperatura, umidade e concentração de CO<sub>2</sub>) e o número de repetições e experimentos (mínimo n = 3). Devemos ressaltar ainda, que em todos os critérios de avaliação do SciRAP, houve um item que não foi contemplado por quase nenhum dos estudos. No reporte de qualidade de relatórios, por exemplo, na sessão do sistema de teste, apenas 1 autor (Li *et al.*, 2013) relatou o número de passagens celulares utilizadas para realizar os experimentos, além de fornecer informações sobre as medidas tomadas para rastrear ou evitar contaminações por micoplasma, bactérias, fungos ou vírus. Durante a avaliação da qualidade metodológica, os principais critérios não preenchidos foram detectados na sessão de compostos e controles, onde apenas 4 artigos responderam de maneira satisfatória os itens relacionados à solubilidade do composto testado e descreveram o veículo de solubilização (Alleva *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2014). Apesar disso, ao analisarmos todos os itens preconizados pelo SciRAP, ainda obtivemos uma maioria de estudos com qualidade de relatórios e qualidade metodológica elencados como alta, garantindo um bom nível de confiabilidade aos estudos incluídos. Além disso, todos os trabalhos foram relevantes para comprovar a capacidade dos derivados das tiazolidinas em diminuir a produção de NO.

Além de determinar a inibição do NO, esta revisão sistemática avaliou também 7 estudos que determinaram a expressão da iNOS e sua correlação com a diminuição dos valores de NO após o tratamento com tiazolidinas (César *et al.*, 2015; Faine *et al.*, 2011; Ghafoori; Rezaei; Mohammadi, 2017; Li *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021). Esses artigos demonstraram a capacidade destes derivados em diminuir tais parâmetros, considerados essenciais durante a formação e manutenção de um processo inflamatório. Outras literaturas também sugerem que a supressão da superprodução de NO mediada por iNOS pode ser um novo alvo medicamentoso para o combate e tratamento de doenças inflamatórias (Saleron *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2014).

Alguns estudos descrevem uma classe emergente de medicamentos anti-inflamatórios definidos como anti-inflamatórios não esteroides liberadores de óxido nítrico (NO-AINE), onde uma estrutura de 1,3-tiazolidina-4-ona pode ser ligada covalentemente por um espaçador em uma estrutura tradicional de AINE, garantindo



um mecanismo de ação relacionado à inibição do NO e à supressão da iNOS (Bindu; Mazumder; Bandyopadhyay, 2020; Borhade *et al.*, 2012; Sava *et al.*, 2021). Esses estudos corroboram com os resultados encontrados na evidência cumulativa avaliada pela abordagem GRADE. Os estudos incluídos demonstraram um grau evidência cumulativa moderada, sugerindo que a estrutura heterocíclica central presente nos derivados das tiazolidinas são capazes de diminuir a produção de NO, podendo suprimir a expressão da iNOS e a ativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. É válido ressaltar que a falta da descrição de densidade celular foi considerada como o principal ponto para uma certeza da evidência moderada, visto que a população em estudo não foi descrita de maneira satisfatória por alguns autores.

Sendo assim, 12 dos 13 estudos incluídos demonstraram a atividade positiva dos derivados das tiazolidinas em diminuir a produção de NO, quando comparados ao controle negativo (LPS). Além disso, estes compostos diminuíram a produção de NO de maneira semelhante aos diversos fármacos de referência utilizados como controle positivo. A meta-análise, por sua vez, apresentou diferença média padronizada com estimativa positiva nas duas análises realizadas, com valores de 89.0% para o grupo de derivados das tiazolidinas e 100.0% para o subgrupo das tiazolidinadionas. Em ambos os casos, esta estimativa positiva foi favorável ao tratamento com os compostos testes. Apesar da heterogeneidade e dos *outliers* encontrados no grupo da primeira meta-análise, podemos perceber que os resultados se mantem favoráveis ao tratamento, mesmo com o valor de  $p$  não significativo. Tais resultados estão intimamente relacionados as diferenças estruturais encontradas nos compostos analisados neste grupo, visto que a primeira meta-análise foi realizada com todos os estudos que apresentaram densidade celular, não levando em consideração as diversas substituições e subgrupos (tiazolidinadionas, tiazolidin-4-ona, etc...). Quando analisados por subgrupos, podemos observar um  $p$  significativo e a ausência de heterogeneidade para os estudos que avaliaram o potencial anti-inflamatório das tiazolidinadionas. Estudos *in vitro* semelhantes, utilizando macrófagos induzidos por LPS, demonstraram uma diminuição significativa na produção de NO após tratamento com tiazolidinas (Gim; Kang; Jeon, 2007; Ma *et al.*, 2011; Ueda *et al.*, 2004), onde mudanças sutis nas substituições e grupos funcionais podem levar a alterações significativas na capacidade destas moléculas em diminuir a produção de NO (Mohr *et al.*, 2022; Vasincu *et al.*, 2021).

Algumas revisões de literatura sugerem que os derivados das tiazolidina são capazes também de alterar a via de sinalização do NF- $\kappa$ B em diferentes modelos *in vitro* (Bhatnagar; Pemawat, 2023; Kanso *et al.*, 2021; Sahiba *et al.*, 2020). Na verdade, o NF- $\kappa$ B desempenha um papel fundamental na regulação das expressões da iNOS, COX-2 e TNF- $\alpha$  (Capece *et al.*, 2022; Takiguchi *et al.*, 2021). A instigação do NF- $\kappa$ B é diretamente proporcional à iniciação do TLR4 promovida por moléculas endógenas, conferindo um fenótipo M1 para macrófagos induzidos por LPS. Esta polarização para M1 favorece o desencadeamento da fosforilação das subunidades do NF- $\kappa$ B (Orecchioni *et al.*, 2019). Diante disso, 4 dos estudos incluídos nesta revisão analisaram a ativação da via do NF- $\kappa$ B após a indução por LPS e tratamento com tiazolidinas.

Ghafoori, Rezaei, Mohammadi, (2017), destacaram que os derivados das tiazolidinas podem reduzir a fosforilação da subunidade p65, diminuindo a ativação do NF- $\kappa$ B. Xie e colaboradores (2014), demonstraram que o composto SKLB010 inibiu a fosforilação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , p38MAPK, e a atividade de ligação ao DNA, diminuindo a translocação nuclear de p65 e p50 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Sato; Tatsunami; Wakame, (2021), pontuaram que o composto EPS (ácido 5-[(1Z,2E)-2-metil-3-fenil propenilideno]-4-oxo-2-tioxo-3-tiazolidina acético) não inibiu a fosforilação do NF- $\kappa$ B, mas promoveu a degradação dos níveis da sua expressão proteica. Por fim, Li e colaboradores (2013), relataram que o tratamento com tiazolidin-4-ona aumentou a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , promovendo a translocação nuclear de NF- $\kappa$ Bp65 em macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS. É válido ressaltar que, embora Elkamhawy e colaboradores (2020) não tenham avaliado a atividade de derivados das tiazolidinas na via NF- $\kappa$ B usando modelo de macrófagos RAW 264.7 induzido por LPS, suas moléculas de teste (tiazolidina-2,4-dionas) foram modeladas como inibidores covalentes alostéricos irreversíveis de IKK- $\beta$ , bloqueando a dissociação do inibidor (I $\kappa$ B) e a consequente ativação do NF- $\kappa$ B, culminando na diminuição de NO, IL-6, TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Outros estudos encontrados na literatura, descrevem a ação de compostos derivados das tiazolidinas sobre a via de sinalização do NF- $\kappa$ B em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (Hasanzadeh *et al.*, 2021; Mohr *et al.*, 2022)

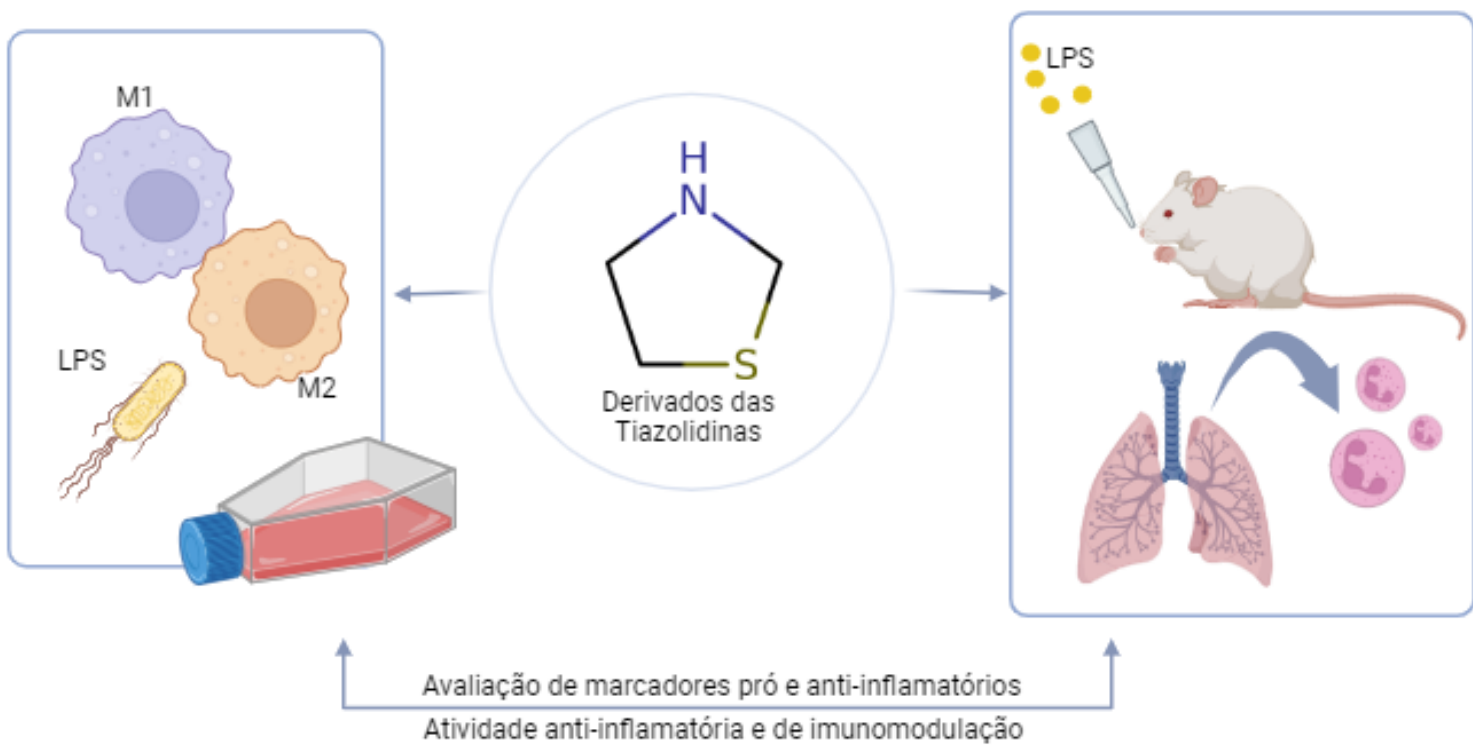
## 8.2 LIMITAÇÕES

Algumas limitações quanto à aplicação clínica desta revisão devem ser consideradas. Primeiramente, apenas estudos *in vitro* foram avaliados. Esses modelos representam a base da pesquisa pré-clínica, onde é analisada a eficácia anti-inflamatória de novos compostos. Portanto, esses dados também merecem uma avaliação cuidadosa. Além disso, não existe uma ferramenta específica de certeza de evidência padronizada para estudos *in vitro*. Sendo assim, adaptamos a abordagem GRADE (Borges *et al.*, 2016; Guyatt *et al.*, 2011; Pavan *et al.*, 2015; Santesso *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2017) para avaliar a certeza da evidência de nossos estudos *in vitro*, classificando-os por meio de linhas de base comparáveis. Outro ponto valioso a ser considerado foi a heterogeneidade encontrada nos estudos incluídos. A falta de densidade celular, a diferença entre os medicamentos de referência utilizados como controle positivo e a ausência dos mesmos, impossibilitaram a realização de uma análise quantitativa para os desfechos secundários (por exemplo, iNOS e NF- $\kappa$ B). Em relação à meta-análise realizada para determinar a inibição do NO, destacamos a presença de um possível *outlier* (Rezaei *et al.*, 2019). Após deliberação, optamos por manter este estudo na primeira análise (grupo tiazolidina n = 9), pois sua retirada não alterou significativamente os resultados anteriores. Para a meta-análise, consideramos todos os compostos com anel estrutural tiazolidínico, criando apenas um subgrupo para as tiazolidinadionas. Devemos ressaltar ainda, que a diferença entre os substituintes e subgrupos dos derivados das tiazolidinas também podem ter interferido na avaliação, principalmente durante a primeira meta-análise realizada.

## 9 CONCLUSÃO

Considerando todas as evidências encontradas, esta revisão sistemática mostrou que compostos derivados das tiazolidinas são capazes de diminuir a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Além disso, esta inibição pode estar associada à capacidade das estruturas heterocíclicas destes compostos em reduzir a expressão da iNOS, regulando negativamente a via de sinalização do NF- $\kappa$ B.

### CAPÍTULO 3- AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE 28 COMPOSTOS DERIVADOS DAS 2-IMINOTIAZOLIDINAS



## 10 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta normal e adaptativa iniciada após a interação do organismo com estímulos nocivos (Aghasafari; George; Pidaparti, 2018). Esta resposta é iniciada no local da infecção, podendo evoluir sistematicamente, causando alterações irreversíveis na homeostase do hospedeiro (Varela *et al.*, 2018). A resposta inflamatória aguda é crucial para a correta eliminação do agente estressor, visando a reparação tecidual e a regeneração do órgão afetado. Neste contexto, os macrófagos desempenham um papel fundamental no reconhecimento do agente invasor, apresentando em sua superfície receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) (Gaber; Strehl; Buttgereit, 2017).

A resposta celular dos macrófagos está intimamente relacionada à ativação desses PRRs, principalmente da classe dos receptores do tipo *Toll-like* (TLR). Dependendo da caracterização dos estímulos nocivos, diferentes mediadores solúveis são produzidos, levando à polarização de macrófagos para o fenótipo M1 (perfil pró-inflamatório) ou para o fenótipo M2 (perfil anti-inflamatório/regenerativo) (Murray, 2017). Diante da plasticidade funcional que estas células apresentam, podemos considerar os macrófagos como alvos ideais para manipulação terapêutica durante condições inflamatórias crônicas e refratárias ao tratamento anti-inflamatório convencional (Benedetto *et al.*, 2019).

Neste cenário, derivados das tiazolidinas representam uma fonte estrutural para o desenvolvimento de novos medicamentos (Bodhak *et al.*, 2022). As 2-iminotiazolidinas e seus análogos são uma classe amplamente conhecida de compostos heterocíclicos, caracterizados pela presença de um anel central que contém fragmento S – C – N (Bhattacharyya, 2020). Embora esses compostos tenham sido associados a importantes efeitos anti-inflamatórios, os mecanismos pelo qual esse fenômeno ocorre ainda não foram elucidados. Sendo assim, o objetivo deste capítulo é avaliar o efeito anti-inflamatório e de imunomodulação de 28 derivados das 2-iminotiazolidinas.

### 10.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Diante das características abordadas na seção 3 (capítulo 1), os experimentos práticos conduzidos durante o capítulo III foram desenhados com base em 2 modelos

de inflamação: *in vitro* e *in vivo*. A triagem inicial e posterior elucidação do mecanismo de ação das 2-iminotiazolidinas foi realizado com base em modelo de inflamação *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Para a confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo* (modelo inflamatório de maior complexidade) optou-se pelo modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS em camundongos murinos (Lubschinski *et al.*, 2022; Mohr *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019).

## 11 OBJETIVOS

### 11.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anti-inflamatório de 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas e sua possível ação sobre a polarização de macrófagos M1/M2, utilizando modelos de estudos *in vitro* e *in vivo*.

### 11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 11.2.1 *In vitro* (Macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS)

- Avaliar a viabilidade celular (citotoxicidade) dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas em macrófagos RAW 264.7;
- Investigar a ação dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados sobre a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO);
- Determinar o efeito dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados na produção de citocinas pró- (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-13 e IL-4) utilizando ensaios imunoenzimáticos ELISA;
- Determinar o efeito dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados na produção de citocinas pró- (MCP-1, IL-12p70) e anti-inflamatórias (IL-10) utilizando citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados sobre a fosforilação total da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B;
- Determinar a ação dos compostos derivados das 2-imotiazolidinas selecionados sobre a expressão das enzimas iNOS, COX-2 e ARG-1;
- Avaliar a ação dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados sobre a expressão do receptor de manose (MR/CD206);
- Determinar a ação dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados sobre a capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS



### **11.2.2 *In vivo* (Modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS)**

- Confirmar o efeito anti-inflamatório dos compostos derivados das 2-imotiazolidinas selecionados sobre a migração leucocitária, analisando a contagem total e diferencial de leucócitos;
- Investigar o efeito dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados sobre a exsudação tecidual (pulmões).

## 12 METODOLOGIA

### 12.1 COMPOSTOS

Os **28** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas foram gentilmente cedidos pelos professores Dr. Misael Ferreira e Dr. Marcus Mandolesi Sá do Departamento de Química da UFSC. Os procedimentos de síntese e obtenção foram realizados no laboratório MESOlab, com base na tese do Dr. Misael Ferreira (Ferreira, 2015).

#### 12.1.1 Compostos derivados da 2-iminotiazolidinas

A síntese de uma variedade dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (**1-23**) foram prontamente alcançadas por um processo de deslocamento nucleofílico do tipo dominó/adição intramolecular anti-Michael, mediado por base, envolvendo tioureais substituídas e brometos alílicos com um grupo nitrofenil retirador de elétrons. Essa transformação, ocorreu em condições leves e simples, onde diferentes grupos funcionais foram bem tolerados (Ferreira *et al.*, 2022; Ferreira; Sá, 2015).

Os 5 derivados das 2-iminotiazolidinas restantes (**24-28**), foram obtidos de transformações quimioseletivas de grupos funcionais, incluindo: a redução do grupo nitroaromático com cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ) para originar a porção aminoaril dos derivados **24-26**; redução do éster carboxílico com borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) para a formação estrutural do composto **27**; hidrólise alcalina do éster carboxílico para produzir o ácido carboxílico correspondente ao composto **28** (Ferreira *et al.*, 2022; Ferreira; Sá, 2015) A representação da síntese desses compostos pode ser observada na Figura 10.

Figura 10 – Representação simplificada da síntese dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

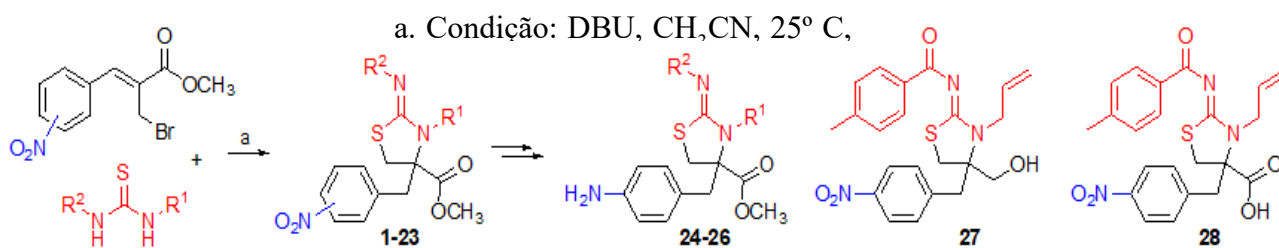


Figura 10. Esquema simplificado da síntese dos derivados das 2-iminotiazolidinas onde, **1-23** foram prontamente sintetizados pelo deslocamento nucleofílico dominado mediado por base/anti-Michael e **24-28** foram derivados de transformações simples de grupos funcionais quimiosseletivos. Fonte: Ferreira, Sá, (2015); Ferreira *et al.*, (2022).

Por sua vez, estas moléculas e seus substituintes (R, R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup>) são listados na Tabela 6.

Tabela 6 – Correlação dos **28** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

Compostos	W	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Nome
<b>1</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF104
<b>2</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	MF19
<b>3</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF26
<b>4</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF25
<b>5</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF84
<b>6</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF82
<b>7</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	( <i>E</i> )-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCO	MF200
<b>8</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF92
<b>9</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF102
<b>10</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF163
<b>11</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF79
<b>12</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF89
<b>13</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	MF146
<b>14</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	MF145
<b>15</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF83
<b>16</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF176
<b>17</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	MF130
<b>18</b>	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF143
<b>19</b>	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF80
<b>20</b>	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	( <i>E</i> )-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCO	MF74
<b>21</b>	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF171
<b>22</b>	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF81
<b>23</b>	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	MF107
<b>24</b>	4-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF151
<b>25</b>	4-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF136
<b>26</b>	4-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	H	MF184
<b>27</b>	4-NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF189
<b>28</b>	4-NO <sub>2</sub>	COOH	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF219

Tabela 6. Listagem dos **28** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas e seus substituintes (R, R1 e R2), numerados de acordo com a ordem de sintetização das moléculas e seus respectivos nomes usados para a identificação no MESOlab.

### 12.1.2 Preparo dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

Antes das diluições, os compostos foram mantidos em sua forma original, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Para os experimentos *in vitro*, cada composto foi dissolvido em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), seguindo concentrações pré-definidas. As diluições foram realizadas no mesmo dia para cada experimento, sendo incorporadas ao meio de cultura sempre na proporção máxima de 1%. Para os ensaios *in vivo*, os compostos selecionados foram diluídos em tampão fosfato-salino (PBS) contendo 5% de DMSO. As diluições foram preparadas alguns minutos antes de cada experimento, levando sempre em consideração o peso de cada animal utilizado.

## 12.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Na tentativa de diminuir gastos e otimizar o número de animais utilizados, este estudo foi conduzido em 3 etapas distintas, seguindo as metodologias descritas (Figura 11).

### 12.2.1 Triagem *in vitro* dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

Na primeira etapa, optamos por realizar a triagem inicial das 2-iminotiazolidinas (**1-28**), iniciando os experimentos com o teste de viabilidade celular, onde qualquer composto considerado tóxico para a linhagem de macrófagos RAW 264.7 seria prontamente descartado. Em seguida, realizamos o primeiro experimento envolvendo marcadores pró-inflamatórios, onde mensuramos a capacidade dos compostos em diminuir a produção de metabólitos do óxido nítrico. Os compostos com melhores resultados seguiram para o último estudo preliminar, que consiste no doseamento das principais citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 e IL-4) (Figura 11, etapa A).

### **12.2.2 Confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo* dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas**

As 2-iminotiazolidinas que conseguiram alcançar todos os resultados esperados durante a primeira etapa apresentando: baixa citotoxicidade, diminuição de NO (IC<sub>50</sub> dentro do intervalo esperado), inibição de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-13 e IL-4), seguiram para a experimentação em camundongos, onde os parâmetros de migração leucocitária e exsudação foram analisados (Figura 11, etapa B).

### **12.2.3 Investigação *in vitro* do mecanismo de ação anti-inflamatório dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas**

Após a triagem *in vivo*, os compostos com atividade biológica comprovada em camundongos, foram submetidos a uma nova investigação *in vitro* que buscou elucidar o seu mecanismo de ação perante outros parâmetros pró-inflamatórios (NF- $\kappa$ B, iNOS, COX-2, MCP-1 e IL-12p70) e anti-inflamatórios (IL-10, Arginase, atividade fagocítica e CD206) (Figura 11, etapa C).

Figura 11 – Desenho experimental realizado durante a avaliação da atividade anti-inflamatória dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

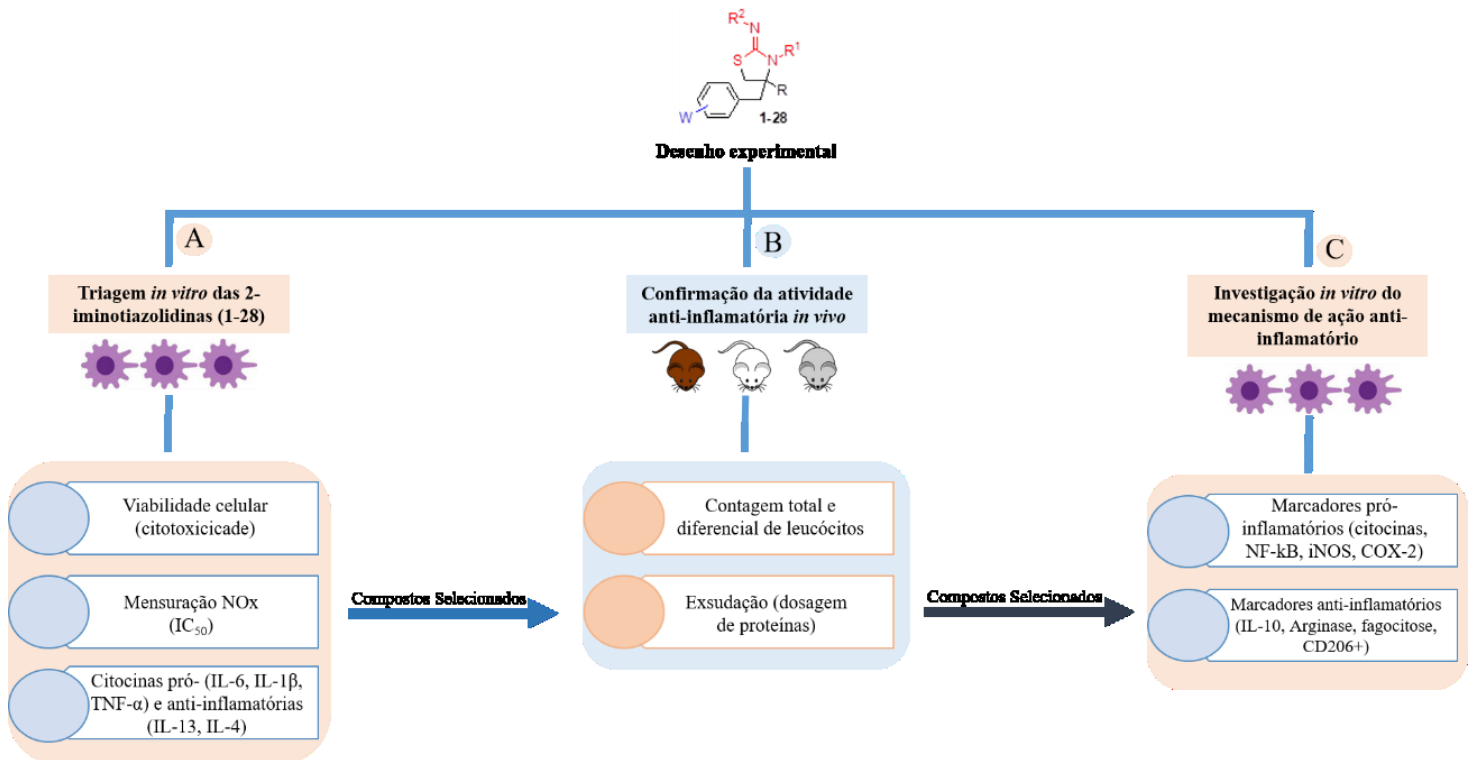


Figura 11. Desenho experimental conduzido em 3 etapas para o estudo da atividade anti-inflamatória das 2-iminotiazolidinas (1-28). Realização da triagem inicial *in vitro* (A), com posterior confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo* (B), seguida da investigação *in vitro* do mecanismo de ação anti-inflamatório (C). Fonte: Elaborado pela autora

## 12.3 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Esta subseção descreve as metodologias utilizadas durante a triagem e investigação *in vitro* do mecanismo de ação anti-inflamatório dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.

### 12.3.1 Cultura de macrófagos RAW 264.7

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi cedida gentilmente pela Professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Durante todos os procedimentos, as células utilizadas foram mantidas em estufa umidificada com CO<sub>2</sub> a 5%, e temperatura programada de 37° C. O meio de escolha foi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com ou sem fenol, dependendo do experimento realizado. Este meio foi

suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e antibióticos (penicilina e estreptomicina) a 1%.

Todos os experimentos foram conduzidos entre a 3<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> passagens, com confluência ótima de 80%. As células sofreram passagem com troca de meio em intervalos de 48-72 h. Por se tratar de uma linhagem de células aderentes, os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram lavados PBS e desprendidos das garrafas de cultura com o auxílio de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Versene®) e rodos (*cell scraper*). Todos os materiais utilizados foram devidamente esterilizados e os experimentos foram conduzidos em local apropriado e isento de microrganismos contaminantes.

### **12.3.2 Determinação prévia da densidade celular de macrófagos RAW 264.7 utilizando azul de Tripán**

Antes da condução de cada experimento, a densidade celular foi normalizada utilizando a técnica de azul de Tripán. Este corante apresenta a capacidade de atravessar o citoplasma de células mortas, corando-as de azul (Strober, 1997, 2015). Sendo assim, antes de cada experimento as células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 mL de meio de cultura. Uma alíquota desta suspensão foi separada em um *ependorf*, onde foi acrescentado o azul de Tripán (1:1). Após homogeneização, 10 µL 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 400 vezes). O número de células viáveis obtidas foi padronizado e utilizado para realização do plaqueamento em diversas placas, de tamanhos e áreas de adesão diferentes, variando de acordo com a metodologia empregada em cada experimento realizado (Tabela 7).



Tabela 7 – Concentrações de células e volumes de meio de cultura utilizados no plaqueamento da linhagem de macrófagos RAW 264.7 durante os experimentos *in vitro*.

Nº de poços	Concentração (cel/poço)	Volume Final (mL)
6	$5 \times 10^5$	5
24	$1 \times 10^5$	1
96	$5 \times 10^4$	0.1

Tabela 7. Valores utilizados no plaqueamento da linhagem celular RAW 264.7, de acordo com o número de poços de cada placa (6, 24 e 96), suas respectivas concentrações celulares e volume de suspensão celular final (por poço).

### 12.3.3 Viabilidade celular (citotoxicidade) dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidonas perante macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Inicialmente, os 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas foram submetidos ao ensaio de viabilidade celular empregando a técnica fluorimétrica com Resazurina, para assim, confirmar seu potencial citotóxico frente a linhagem de macrófagos RAW 264.7 (Anoopkumar-Dukie *et al.*, 2005).

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 tiveram sua concentração estimada ( $5 \times 10^4$  células/poço) e foram transferidos para placas de 96 poços. As placas foram incubadas em estufa umedecida (temperatura 37° C e CO<sub>2</sub> a 5%) para a adesão e proliferação dos macrófagos durante 24 horas. Posteriormente, cada poço foi tratado com concentrações pré-determinadas para cada composto (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µM). As células passaram por uma segunda incubação de 24 horas, seguido pelo descarte do sobrenadante e substituição do meio de cultura por uma solução de 100 µL (1:10, diluída em meio de cultura com DMEM sem fenol) de Resazurina (1,5 mg/mL). As placas foram incubadas por 2 h em estufa umedecida (temperatura 37° C e CO<sub>2</sub> a 5%) com posterior homogeneização do material e leitura em fluorescência entre 530/590, com o auxílio de um espectroscópio de fluorescência (PerkinElmer® LS 55, Waltham, MA, USA).

Partindo deste teste foi possível determinar a CC<sub>10</sub> de cada composto, ou seja, a concentração mínima necessária para matar 10% da linhagem de células utilizadas, e conseqüentemente manter uma viabilidade de 90%. Esse é o desfecho esperado para os modelos de inflamação *in vitro*, onde a viabilidade celular do sistema deve ser preservada para a continuidade dos experimentos (Chan *et al.*, 2017). A concentração

de cada CC<sub>10</sub> foi calculada por meio de uma análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da viabilidade celular), onde a viabilidade celular do grupo controle branco, tratado com DMSO (1%), foi considerado como referência (100% de células viáveis).

#### **12.3.4 Modelo de inflamação *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

Todos os experimentos subsequentes foram realizados com macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (*E. Coli*: O111:B4 - Sigma Aldrich), utilizando um modelo de inflamação *in vitro* que mimetiza as condições ideais para o estudo de marcadores e vias de sinalização do processo inflamatório (Rossol *et al.*, 2011) (Figura 12).

Após contagem e padronização da concentração de células pela técnica de Tripán, o plaqueamento foi realizado de acordo com o número de poços de cada placa necessária por experimento, sendo que esta concentração de células é proporcional a área de cada poço. As placas foram acondicionadas em estufa umidificada com ambiente e temperatura controlados (37° C e CO<sub>2</sub> à 5%) durante 24 horas, proporcionando o tempo necessário para a adesão e replicação exponencial da linhagem de macrófagos utilizada. Após este intervalo, o meio de cultura foi substituído e as células foram tratadas com os compostos de interesse nas doses pré-definidas. As placas foram incubadas por 1 hora, com posterior indução por LPS (diluídos em PBS estéril no dia de cada experimento). A concentração de LPS foi de 1 µg/mL ou 5 µg/mL, dependendo do experimento conduzido. Após um último período de incubação, que variou de acordo com cada experimento (4, 6 ou 24 horas), as células ou sobrenadante foram coletados para a realização dos ensaios da atividade anti-inflamatória e de imunomodulação (Lubschinski *et al.*, 2022; Mohr *et al.*, 2019).

Além do tratamento com os compostos pesquisados, optou-se pela utilização dos grupos controles: branco (tratado com os veículos DMSO 1% e PBS estéril), controle negativo LPS (tratado com o veículo DMSO 1%) e o controle positivo dexametasona (7 µM).

Figura 12 – Modelo de inflamação *in vitro* utilizado na linhagem de macrófagos RAW 264.7

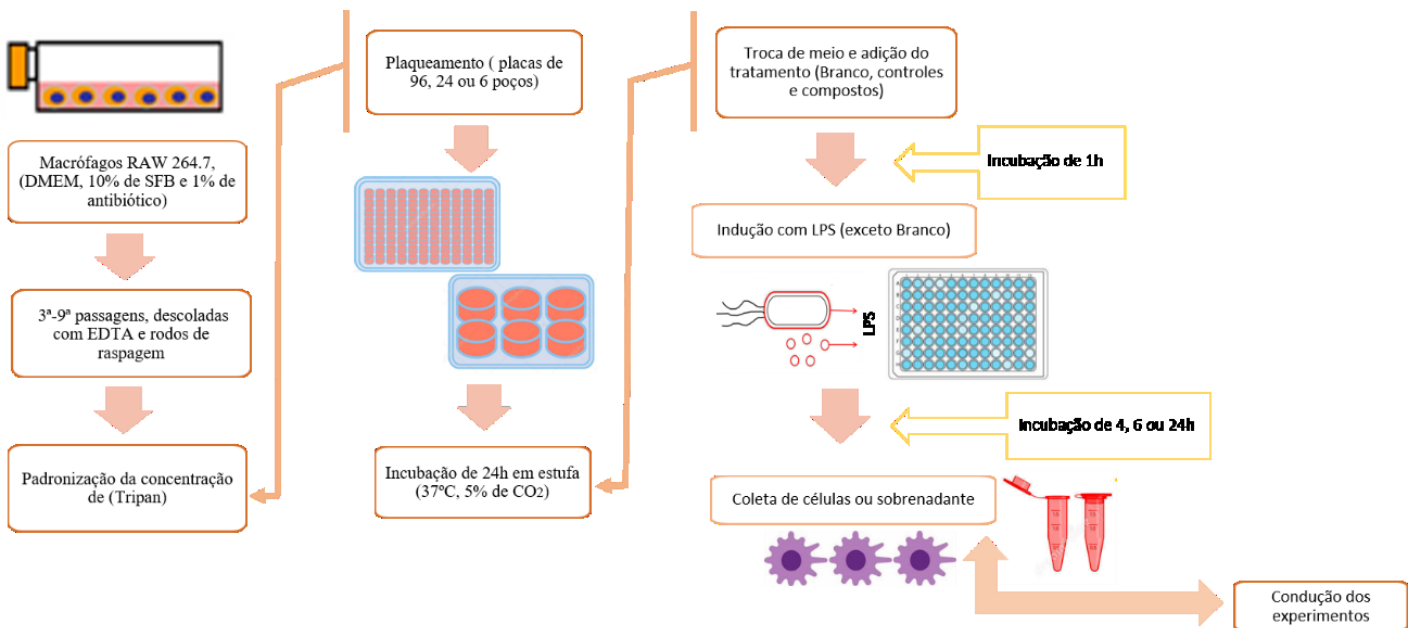


Figura 12. Padronização do modelo de inflamação *in vitro* utilizado na linhagem de macrófagos RAW 264.7 durante os ensaios de triagem e investigação do mecanismo de ação dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas. Fonte: Elaborado pela autora.

### 12.3.5 Mensuração dos metabólitos do óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

A produção do NO foi mensurada indiretamente, utilizando a reação de Griess (Green *et al.*, 1982), que quantifica a formação do metabólito nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), presente em maior quantidade na linhagem de macrófagos utilizada. Os reagentes de Griess empregados na reação apresentam a capacidade de reduzir o nitrato a nitrito, produzindo uma coloração de tonalidade rósea que pode ser lida pelo comprimento de onda de 540 nm (Dirsch; Stuppner; Vollmar, 1998).

Placas de 96 poços (5x10<sup>4</sup> células/poço) foram incubadas por 24 horas. Os macrófagos foram pré-tratados com os melhores compostos derivados das 2-iminotiazolidinas com concentrações definidas a partir da determinação prévia da CC<sub>10</sub> (1, 3, 10, 30 e 100 µM). Optou-se pela utilização dos grupos controles: branco, controle negativo LPS e controle positivo dexametasona. Após 1 hora, todos os grupos (exceto branco) foram estimulados com LPS (1 µg/mL), e incubados em estufa por mais 24 horas. Na sequência, 50 µL de sobrenadante foi coletado para a realização

da dosagem dos metabólitos do NO em placas de ELISA de 96 poços, com adição de 50  $\mu$ L dos reagentes de Griess (1:1). Após uma incubação de 40 minutos ao abrigo de luz (37° C), a leitura da placa foi realizada, com o auxílio do leitor de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN) no comprimento de onda de 540 nm.

A partir da dosagem dos metabólitos do NO foi possível determinar a IC<sub>50</sub> dos compostos testados, ou seja, a concentração de cada composto capaz de inibir em 50% os níveis de NO quando comparados ao controle inflamado (LPS) (Sebaugh, 2011). Este valor foi obtido por meio de uma análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da inibição de NO), calculados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

### **12.3.6 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias por ELISA (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-13) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

Os macrófagos foram dispostos em placas de 96 poços e após incubação de 24 horas, foram pré-tratados, nas concentrações de 1, 3, 10 e 30  $\mu$ M, com os melhores compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados a partir dos resultados obtidos pela mensuração de NO e determinação da IC<sub>50</sub>. Após 1 hora, seguiu-se indução por LPS (1  $\mu$ g/mL), com incubação por 24 horas. O sobrenadante foi coletado para a determinação dos níveis das citocinas pesquisadas.

Todas as citocinas foram mensuradas utilizando kits comerciais pelo método inumoenzimático (ELISA) seguindo as instruções do fabricante. Anticorpos monoclonais específicos para cada citocina foram utilizados, com suas concentrações estimadas por meio da interpolação da curva padrão de cada kit. Para o doseamento de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-13 optou-se pela utilização de kits comerciais da Peprotech (Rocky Hill, Estados Unidos da América), enquanto que, para IL-1 $\beta$  foi utilizado kit da BD Biosciences (San Diego, Califórnia, Estados Unidos da América). As densidades ópticas foram determinadas em comprimento de onda de 450 nm com o auxílio da leitora de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN). Os resultados para cada citocina foram expressos em pg/mL, seguindo os parâmetros de sensibilidade de cada ensaio.

### **12.3.7 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias por citometria de fluxo (IL-12p70, MPC-1 e IL-10) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

Para a quantificação de citocinas por citometria de fluxo, foram utilizadas placas de 24 poços, onde os macrófagos foram pré-tratados com a melhor concentração (30  $\mu$ M) do melhor composto, definido pela triagem inicial das 2-iminotiazolidinas. Além do tratamento com o composto, foram utilizados os grupos controles branco, controle negativo (LPS) e controle positivo (dexametasona). Após o período de indução por LPS e incubação, todo o sobrenadante foi coletado para a determinação das concentrações das citocinas presentes no kit *Cytometric Bead Array* (CBA) - *Cell Inflammation* kit (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) (IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , MPC-1, IL-6 E IL-10).

O kit de escolha apresenta seis *beads* (esferas marcadas) de populações e intensidade de fluorescência diferentes, marcadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina. 25  $\mu$ L de sobrenadante foram adicionados as *beads* e aos anticorpos de detecção, seguido de incubação ao abrigo da luz por 3 h (37° C). As amostras foram lavadas com solução de *wash buffer* e lidas no Citômetro de Fluxo FacsVerse (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). 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). Os valores finais foram expressos em pg/mL.

### **12.3.8 Determinação da fosforilação da subunidade p65 da via NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

Para a determinação da fosforilação da subunidade p65 da via NF- $\kappa$ B, foram utilizadas placas de 6 poços. A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi tratada com a melhor concentração do melhor composto (30  $\mu$ M). Além deste tratamento, foram utilizados os grupos controles branco, controle negativo LPS e controle positivo dexametasona. Decorrido 1 hora, todos os grupos (exceto branco) foram estimulados com LPS (5  $\mu$ g/mL), por um período de 6 horas. As células foram descoladas, centrifugadas (200g, 5 min, 4° C) e lavadas com PBS. Antes do experimento, todas as amostras tiveram seus níveis de proteína ajustados utilizando a técnica de Lowry

(Lowry *et al.*, 1951), para garantir a mesma concentração de proteínas para cada amostra (60 µg). As células foram transferidas para microplacas de ELISA contendo anticorpos monoclonais específicos para a proteína p65 fosforilada. O protocolo experimental foi realizado seguindo as orientações do fabricante para o Kit de ELISA NF-κB p65 (*Cell Signaling Technology*, Massachusetts, EUA). A leitura da absorbância foi realizada em leitor ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN) a 540 nm.

### **12.3.9 Avaliação da atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

A atividade fagocítica da linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi mensurada a partir de ensaio colorimétrico de vermelho neutro. Esta técnica se baseia na capacidade dos macrófagos de fagocitar o corante em maior ou menor quantidade, dependendo do tratamento e indução empregados (Weeks *et al.*, 1987). Sabe-se que macrófagos de fenótipo M2 apresentam uma maior capacidade de fagocitar o corante, resultando em uma coloração mais intensa após a lise celular (Yunna *et al.*, 2020).

Para o experimento, foram utilizadas placas de 96 poços, com pré-tratamento na melhor concentração (30 µM) do composto escolhido. Após tratamento, indução por LPS e incubação de 24 horas, o meio de cultura foi substituído por 100 µL/poço de solução contendo vermelho neutro (0,075%), solubilizado em DMEM sem fenol. As placas foram incubadas durante 1 hora (37° C), seguido de descarte da solução e lavagem da placa com 200 µL de PBS estéril. Por fim, 200 µL/poço do tampão de lise celular (1% de ácido acético glacial, 50% etanol, 49% água deionizada) foram adicionados à placa, com incubação de 1 hora e leitura final da absorbância em leitor de ELISA MB-580 (HEALES, Gouwei Road, SZN, CN) a 540 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento dos níveis de fagocitose celular, onde o índice fagocítico foi mensurado pela seguinte equação: índice fagocítico (IF) =  $A1/A0$ , onde A1 representa a absorbância das amostras analisadas e A0 é a absorbância do controle branco (veículo) (Jia *et al.*, 2019).

### **12.3.10 Quantificação de mRNA por RT-qPCR para a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e Arginase (ARG-1) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

Este método quantifica as diferenças nos níveis de expressão gênica entre as amostras e grupos analisados (Nolan; Hands; Bustin, 2006). Todos os reagentes empregados na análise foram mantidos em freezer (-4° C) ou geladeira até o momento de sua utilização. Os procedimentos foram realizados em cabine de fluxo laminar de uso exclusivo para RT-qPCR, com materiais esterilizados, livres de RNase (ribonuclease). Água DEPC autoclavada (0,01%) foi utilizada na extração das amostras, com acondicionamento em banho de gelo entre cada etapa. O armazenamento do RNA e da cDNA obtidos foi realizado em freezer -80° C (de 7 a 60 dias). Todas as incubações durante o processo foram conduzidas em termociclador (MJ Research-Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### *12.3.10.1 Extração e quantificação do RNA*

Após a adesão das células em placas de 6 poços, os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com o melhor composto e induzidos com LPS (5 µg/mL) por 4 horas até o descolamento das mesmas e acondicionamento em banho de gelo. As células foram então, centrifugadas (200g, 5 minutos, 4° C) para a purificação do RNA pelo método de extração por coluna, utilizando o protocolo descrito pelo kit comercial de escolha (Zymo Research Corp., Irvine, CA, EUA). A análise da concentração e pureza do RNA obtido, foi determinada medindo a absorbância de cada amostra com o auxílio de um espectrofotômetro NanoVue® Plus UV-Vis (Chicago, Illinois, EUA) a 260 nm. Amostras com uma razão de pureza (qualidade)  $A_{260}/A_{280} > 1,45$  foram consideradas com pouca contaminação proteica e aptas para o seguimento da extração.

#### *12.3.10.2 Protocolo de eliminação de DNA residual com DNase*

Realizado a partir do kit comercial de escolha (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), as amostras de RNA extraídas foram tratadas com DNase (desoxirribonuclease I), digerindo as fitas de DNA e clivando a ligação

hidrolítica fosfodiéster do DNA (5'). Tal procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com adição de 1 µg da amostra de RNA (cálculo conforme análise da quantidade de RNA extraído), 1 µL tampão 10x de reação DNase I (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl), 1 µL DNase I (1 U/µL) e água milliQ DEPC 0,1% autoclavada qsp. (volume final de 10 µL). O preparo obtido foi incubado por 30 minutos (37° C) em termociclador (MJ Research-Bio-Rad, Hercules, CA, USA), com posterior adição de 1 µL de EDTA (50mM, pH 8.0) para inativar a ação da DNase I. Após esta etapa, as amostras foram aquecidas por 10 minutos (65° C) e acondicionadas em banho de gelo. Devido à instabilidade da DNase extraída, optou-se pelo início imediato do protocolo para a obtenção da cDNA (RT-qPCR) (Dalmarco *et al.*, 2012).

#### 12.3.10.3 Protocolo para a obtenção de cDNA (RT-qPCR)

Esta etapa foi realizada seguindo as especificações do kit comercial de escolha (RevertAid®H Minus-Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras foram preparadas para um volume de reação final de 20 µL, com preparo dividido em 2 etapas.

Para a primeira etapa, os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 5 µL da amostra de RNA total, ou seja, o equivalente a 500 ng de RNA (digerida na etapa anterior), 1 µL oligo dT e 6 µL de água DEPC. Após agitar lentamente, as amostras foram centrifugadas e incubadas em termociclador por 5 minutos (65° C). Para a segunda etapa, foram adicionados as amostras: 4 µL de *First Strada* (5x), 1 µL de RiboLock RNase inhibitor (20 un/µL), 2 µL de dntp mix (10 mM) e 1 µL de RevertAid®H Minus M-MuL V Reverse Transcriptase (200 U/µL), somando o volume final de 20 µL. Após breve agitação, as amostras foram incubadas por 60 minutos à 42° C e à 72° C por 5 minutos, utilizando termociclador.

#### 12.3.10.4 Protocolo RT-qPCR Quantitativo-Comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando 1 µL de cDNA (obtido na etapa anterior), com a adição dos seguintes reagentes listados na Tabela 8.



Tabela 8 – Relação dos reagentes empregados durante a reação de RT-qPCR em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Material	Quantidade (µl)
<i>Primer sense</i>	1
<i>Primer anti-sense</i>	1
<i>Master mix</i>	6,25
H <sub>2</sub> O – <i>nuclease free</i>	3,25
cDNA (amotra)	1
<b>Total</b>	<b>12,5</b>

Tabela 8. Relação e quantidade de reagentes empregados de acordo com o protocolo de RT-qPCR quantitativo-comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) para placa de 96 poços.

Os iniciadores específicos para a amplificação de cada gene de interesse (*primer sense* e *primer anti-sense*) foram previamente escolhidos (iNOS, COX-2 e ARG-1: 0,5 µM) (Tabela 9), com adição de master mix Ludwig Biotec® SYBR Green RT-qPCR mix 1:1 ROX (2x) (Ludwig Biotec, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil) e água (*nuclease free*), totalizando um volume final por poço de 12,5 µL. As amostras foram pipetadas (triplicata) em placas de 96 poços *fast* RT-qPCR (StepOnePlus®, Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Para a realização da reação de RT-qPCR, as seguintes etapas no StepOnePlus® foram respeitadas: 1) 5 minutos à 95° C; 2) 45 ciclos com 3 etapas de: 45 segundos à 95° C, 45 segundos à 58° C e 45 segundos a 72° C. Posteriormente, todas as reações foram seguidas de análise da curva de *melting* para detectar possíveis contaminações ou amplificação de produtos inespecíficos nas reações. Além disso para excluir a possibilidade de contaminação, foram realizados controles negativos contendo água miliQ como amostra. Como controle endógeno, foram utilizados iniciadores que amplificam o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) (Tabela 9) de expressão constitutiva. As sequencias de nucleotídeos de cada iniciador estão descritos na tabela 9. Para o cálculo da expressão dos mRNA utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Tabela 9 – Iniciadores (*primers sense* e *anti-sense*) utilizados nas reações de RT-qPCR em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Gene	<i>Sense</i> (5'-3')	<i>Anti-sense</i> (5'-3')
iNOS	CGA.AGT.TTC.TGG.CAG.CAG.C	AGC.ACT.CTC.TTG.CGG.ACC.AT
COX-2	CAA.AGG.CCT.CCA.TTG.ACC.GA	TGG.ACG.AGG.TTT.TTC.CAC.CAG
ARG-1	GTT.CCC.AGA.TGT.ACC.AGG.ATT.C	CGA.TGT.CTT.TGG.CAG.ATA.TGC
GAPDH	GTG.TCC.GTC.GTG.GAT.CT G.AC	GGA.GAC.AAC.CTG.GTC. CTC.AG

Tabela 9. Relação dos *primers sense* e *anti-sense* utilizados durante os experimentos de RT-qPCR, sendo eles: iNOS, COX-2, ARG-1 e GAPDH como controle endógeno para todos os genes pesquisados.

### 12.3.11 Determinação da expressão do receptor de manose (CD206) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Os macrófagos do tipo M2 tem uma ampla gama de funções, que incluem a supressão da inflamação e promoção do reparo tecidual. Eles expressam em sua superfície, receptores característicos desta fenotipagem, sendo eles denominados com receptores de manose (CD206) (Tang; Nikolic-Paterson; Lan, 2019).

Para avaliar a expressão do receptor de manose na superfície dos macrófagos tratados com o melhor composto derivado das 2-iminotiazolidinas, utilizou-se placas de 24 poços, onde os macrófagos foram pré-tratados com a melhor concentração do composto escolhido. Após tratamento, indução por LPS (5 µg/mL) e incubação por 24 horas, as células foram descoladas, coletadas e lavadas com 300 µL de PBS. Posteriormente, realizou-se a adição de 300 µL de albumina 1%, com incubação aproximada de 1 hora e 30 minutos. Na sequência, as células foram novamente lavadas com 300 µL de PBS estéril e ressuspensas com tampão de ligação. Adicionou-se 2,5 µL do marcador CD206-FITC, com incubação de 15 minutos ao abrigo da luz. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, São José, CA, EUA), sendo observada na leitura o percentual de células positivas para o marcador CD206 com o auxílio do programa FACSuite® (BD Biosciences, São José, CA, EUA).

## 12.4 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Esta subseção descreve as metodologias utilizadas durante a confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo* dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas em camundongos murinos submetidos ao modelo de lesão aguda pulmonar (ALI) induzida por LPS.

### 12.4.1 Animais utilizados no modelo de ALI induzida por LPS

Para os experimentos *in vivo* listados abaixo, foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos com aproximadamente 1 mês de idade, com peso entre 20-25 g. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e acomodados no biotério setorial do laboratório (LAPI) em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem (renovada a cada 2 dias), temperatura ( $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e luz (ciclos claro/escuro de 12 h) controladas. Receberam alimentação (ração) e água à vontade (*ad libitum*) em bebedouros e comedouros apropriados e trocados em intervalos de 48h, durante todos os experimentos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo nº 6118110417. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 12.4.2 Anestesia e morte indolor assistida dos animais utilizados durante o modelo de ALI induzida por LPS

Durante o procedimento de instilação de LPS utilizou-se cetamina (10%) e xilasina (2%) nas concentrações de 75 mg/kg e 15 mg/kg respectivamente, administradas por via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram acompanhados durante todo o processo de recuperação da anestesia, com o auxílio de bolsas térmicas para assegurar a total recuperação e manutenção do calor corporal pós procedimento. Nenhum animal foi deixado sem supervisão durante o procedimento.

A morte indolor assistida foi realizada com os mesmos fármacos [cetamina (10%) e xilasina (2%)], nas concentrações de 225 mg/kg e 45 mg/kg, administrados

via intraperitoneal (i.p.). Os animais foram acompanhados durante todo o procedimento, que ocorreu dentro das dependências do laboratório de pesquisa.

#### **12.4.3 Modelo de ALI induzida por LPS e obtenção do lavado bronco-alveolar (BALF)**

O modelo de lesão aguda pulmonar (ALI) induzida pela instilação de LPS em camundongos mimetiza o processo de inflamação das vias aéreas, visto que o contato com essa substância endógena desempenha um papel-chave no desenvolvimento de doenças como a síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS) em humanos (Reutershan *et al.*, 2005). Sendo assim, os animais foram divididos em grupos distintos, sendo eles: Salina (tratados com o veículo DMSO 5%); controle negativo LPS (tratado com o veículo DMSO 5%); controle positivo dexametasona (5 mg/kg); e tratamento com os compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (analisados nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg) (n = 6).

Os animais foram tratados de acordo com cada grupo pré-definido por via de administração oral (v.o.), com o auxílio de uma gavagem. Após 1 hora, os camundongos (exceto controle salina) foram anestesiados para a instilação de LPS via intranasal (5 mg/kg em 50 µL de PBS). Os animais anestesiados foram deitados com a cabeça elevada enquanto a solução contendo LPS (*E. Coli*: O111:B4 - Sigma Aldrich) foi instilada (gotejada) em suas narinas. Os animais permaneceram com a cabeça elevada até sua recuperação completa.

Após 12h da instilação, os camundongos sofreram eutanásia por *overdose* de Cetamina e Xilasina e foram preparados para a coleta do lavado bronco alveolar (BALF). Os animais foram fixados em mesa cirúrgica, onde uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais foi realizada. Seu diafragma foi gentilmente aberto para que as costelas e clavícula fossem cortados com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Todo esse procedimento teve como intuito, expor a traqueia do animal e facilitar o processo de lavagem pulmonar realizado de maneira intratraqueal.

A lavagem dos pulmões foi procedida com o auxílio de uma cânula amarrada ao início da traqueia de cada animal, por onde foi introduzido 1 mL de solução salina com citrato (1%, p/v), bombeada 3 vezes para dentro dos pulmões dos animais (Mohr *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019). O BALF coletado (aproximadamente 800-1000 µL) foi armazenado em *ependorf* e mantido em banho de gelo para a realização da

contagem total e diferencial de leucócitos. O restante do material foi acondicionado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até a determinação da exsudação. A representação do modelo de inflamação *in vivo* pode ser observada na Figura 13.

Figura 13 – Representação do modelo *in vivo* de lesão aguda pulmonar induzida por LPS utilizado em camundongos murinos

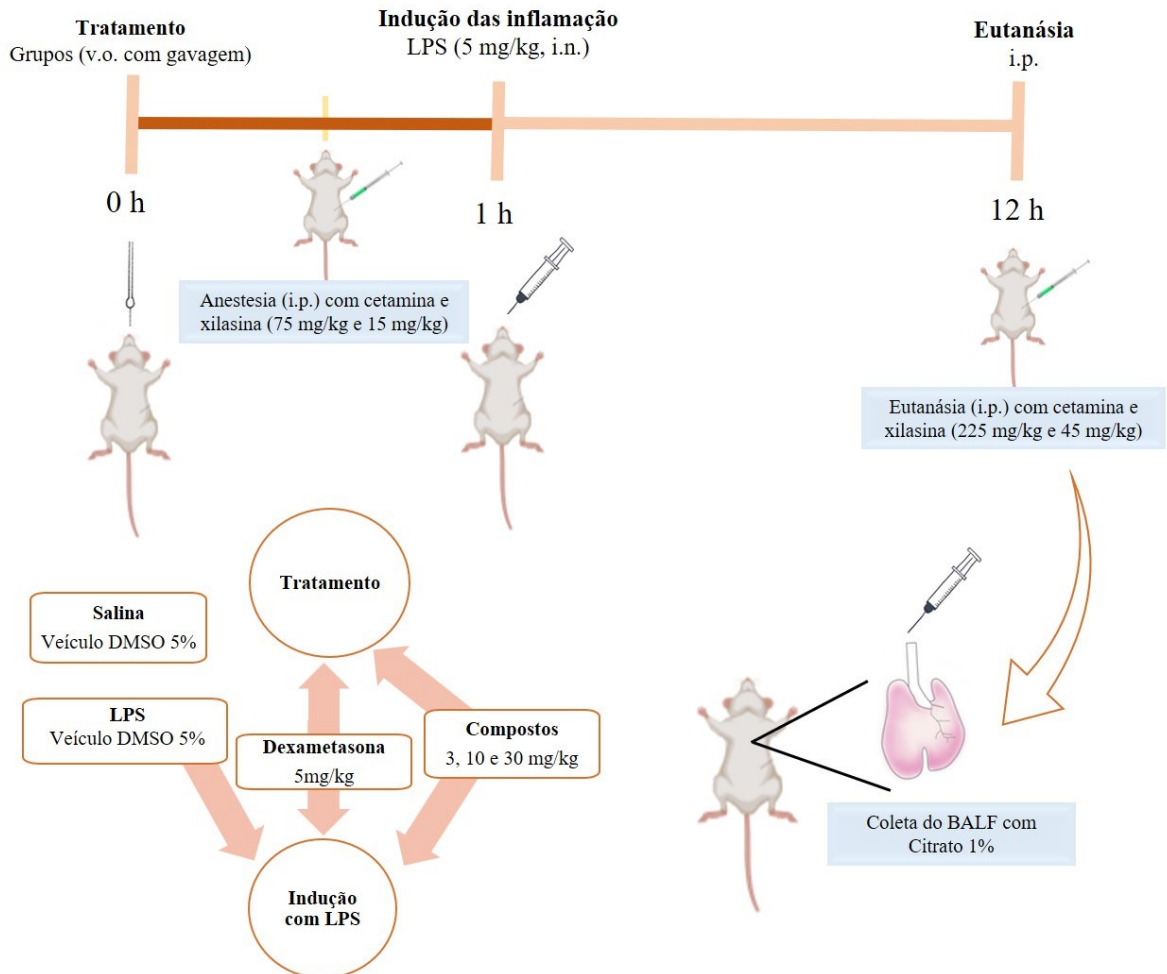


Figura 13. Esquema simplificado do modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS e os grupos de tratamento utilizados. Fonte: Elaborado pela autora.

#### 12.4.4 Contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos com ALI induzida por LPS

Logo após a morte indolor assistida dos animais e coleta do BALF, alíquotas de cada amostra foram separadas para a contagem total de leucócitos, utilizando líquido de Türk para a diluição (1:4). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer

com o auxílio de microscópio óptico comum (aumento de 400 vezes). A presença de leucócitos foi investigada e contabilizada nos 4 quadrantes da câmara de Neubaer, sendo que todas as amostras foram analisadas separadamente por 2 pesquisadores diferentes. Os resultados foram expressos em número total de leucócitos  $\times 10^5/\text{mL}$ .

A contagem diferencial de leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) foi realizada após o preparo de esfregaços celulares, contendo 50  $\mu\text{L}$  de BALF. As lâminas com o material foram centrifugadas (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA) e posteriormente coradas com Panótico® (NewProv, Pinhais-PR, Brasil). A contagem e identificação foi realizada utilizando um microscópio óptico comum, com objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes) contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ( $\times 10^5$ ).

#### **12.4.5 Determinação da exsudação em camundongos com ALI induzida por LPS**

A exsudação dos pulmões foi mensurada por meio da quantidade de proteínas presentes no BALF, partindo da técnica descrita por Lowry e colaboradores (1951). O BALF coletado de cada animal foi centrifugado e uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  (diluída em 95  $\mu\text{L}$  de água destilada) foi transferida para uma placa de ELISA de 96 poços. Paralelamente, foi construída uma curva de calibração (albumina bovina 1%).

Após a adição da amostra diluída, 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Lowry foram adicionados em cada poço (25% de CTC: carbonato de sódio:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 10%, sulfato de cobre:  $\text{CuSO}_4$  0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada), com incubação de 10 minutos, seguida pelo acréscimo de 50  $\mu\text{L}$  do reagente Folin. A primeira reação ocasiona a redução do íon cobre formando um complexo com as ligações peptídicas. Enquanto que, a segunda reação envolve a redução do reagente Folin, causando uma mudança na coloração da solução para azul. As amostras foram incubadas por 30 minutos com posterior leitura em 630 nm, realizada com o auxílio de leitora de microplacas (Organon, Technica Roseland, New Jersey, EUA).

### **12.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Todos os resultados foram analisados pelo GraphPad Prism® versão 8.0 (San Diego, California, EUA). Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$

erro padrão da média (E.P.M.) (dados paramétricos). Os resíduos dos dados foram analisados para normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e sua homocedasticidade foi confirmada pelo teste de Bartlett. A partir disso, todos os dados foram considerados homocedáticos e paramétricos, sendo então, analisados pelo ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 13 RESULTADOS

### 13.1 TRIAGEM *IN VITRO* DOS 28 COMPOSTOS DERIVADOS DAS 2-IMINOTIAZOLIDINAS

#### 13.1.1 Viabilidade celular (citotoxicidade) dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidonas perante macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Todos os **28** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas foram avaliados nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{M}$ , demonstrando um conjunto variável de resultados para cada  $\text{CC}_{10}$ . Esses resultados variaram entre 6  $\mu\text{M}$  a  $> 1000$   $\mu\text{M}$  (Tabela 10). Dentre esses compostos, **20** derivados das 2-iminotiazolidinas (**1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 25**) apresentaram  $\text{CC}_{10}$  acima de 100  $\mu\text{M}$ , valor que pode ser considerado como parâmetro para definir uma citotoxicidade segura para condução de experimentos *in vitro*. Sendo assim, esses **20** compostos foram selecionados para participar dos próximos experimentos.



Tabela 10 – Valores de viabilidade celular (citotoxicidade) dos **28** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

Compostos	W	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	CC <sub>10</sub> (µM)
1	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> CO	122
2	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	31
3	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	243
4	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	40
5	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	175
6	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	529
7	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	(E)-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCO	80
8	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> CO	161
9	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> CO	107
10	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	180
11	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	> 1000
12	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	> 1000
13	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	882
14	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	> 1000
15	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	208
16	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	> 1000
17	4-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	> 1000
18	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	286
19	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	347
20	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	(E)-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCO	606
21	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	312
22	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	> 1000
23	2-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	6
24	4-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	9
25	4-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	171
26	4-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	H	13
27	4-NO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	7
28	4-NO <sub>2</sub>	COOH	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	40

Tabela 10. Valores de CC<sub>10</sub> para os **28** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas testados, utilizando o teste colorimétrico com Resazurina. Os compostos foram avaliados nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µM e os experimentos foram realizados em triplicatas, com repetições em dias diferentes. Os resultados foram calculados por análise de regressão não linear usando o log da concentração *versus* a resposta normalizada (porcentagem de viabilidade celular). Executado com o programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

### **13.1.2 Efeito dos 20 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas nos níveis de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

A inibição de NO foi mensurada como primeiro parâmetro para avaliar a atividade anti-inflamatória dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas em estudo (nas concentrações de 1 a 100  $\mu\text{M}$ ). Dos **20** compostos testados, **17 (1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 25)** foram capazes de reduzir a produção de NO. Esses resultados foram utilizados para posterior determinação da  $\text{IC}_{50}$  de cada composto (Tabela 11), onde valores inferiores a 30  $\mu\text{M}$  foram considerados indicativos de uma atividade anti-inflamatória mais eficaz (Zhao *et al.*, 2019). Dentre os **17** compostos, apenas **5 (8, 13, 17, 21 e 22)** apresentaram  $\text{IC}_{50}$  abaixo de 30  $\mu\text{M}$ , sendo selecionados para os próximos experimentos. Como esperado, o fármaco de referência dexametasona, também foi capaz de inibir a produção de NO (Tabela 11).

Tabela 11 – Efeito inibitório dos **20** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas sobre a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Compostos	IC <sub>50</sub> (µM)	W	R	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Nome
<b>1</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF104
<b>3</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF26
<b>5</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF84
<b>6</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF82
<b>8</b>	8.4 ± 0.6	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF92
<b>9</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF102
<b>10</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CO	MF163
<b>11</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF79
<b>12</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF89
<b>13</b>	15.3 ± 0.3	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	MF146
<b>14</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO	MF145
<b>15</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF83
<b>16</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF176
<b>17</b>	4.4 ± 0.3	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	NH <sub>2</sub>	H	MF130
<b>18</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF143
<b>19</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF80
<b>20</b>	> 30	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	(E)-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CHCO	MF74
<b>21</b>	3.1 ± 1.7	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF171
<b>22</b>	9.7 ± 8.5	-NO <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF81
<b>25</b>	> 30	-NH <sub>2</sub>	COOCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	4-CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO	MF136
Dexametasona	0.6 ± 1.8					Controle

Tabela 11. Tabela com os valores de IC<sub>50</sub> dos **20** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas testados perante a inibição de NO. Apenas compostos com IC<sub>50</sub> < 30 µM (**8**, **13**, **17**, **21** e **22**) foram aceitos para a continuação dos experimentos. Valores de IC<sub>50</sub> foram calculados por meio de análise de regressão não linear utilizando o logaritmo da concentração em função da resposta normalizada (porcentagem da inibição de NO), calculados com auxílio do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, EUA).

### 13.1.3 Efeito dos 5 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-4 e IL-13) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Os 5 compostos selecionados (**8**, **13**, **17**, **21** e **22**) foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir as citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β e TNF-α) e, ao mesmo tempo, aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-13) nas 3 doses testadas (3, 10 e 30 µM).

Todas os compostos derivados das 2-iminotiazolidinas estudados (**8**, **13**, **21** e **22**) inibiram a produção de TNF-α em pelo menos uma das 3 concentrações testadas.

Os compostos **8**, **13** e **17**, diminuíram este parâmetro apenas na concentração mais alta de 30  $\mu\text{M}$  (% de inibição: **8**:  $22.0 \pm 3.9$ ; **13**:  $16.3 \pm 7.1$ ; **17**:  $62.2 \pm 4.4$ ) ( $P < 0.001$ ), enquanto que, os derivados **21** e **22** diminuíram a produção de TNF- $\alpha$  em todas as concentrações testadas (3, 10 e 30  $\mu\text{M}$ ) (% de inibição: **21**:  $57.5 \pm 8.3$ ,  $59.6 \pm 3.6$ ,  $69.9 \pm 3.0$ ; **22**:  $20.5 \pm 9.5$ ,  $26.0 \pm 2.8$ ,  $29.0 \pm 2.3$ ) ( $P < 0.001$ ) (Tabela 12). Com relação a IL-1 $\beta$ , apenas o composto **17** não foi capaz de diminuir a produção deste marcador. Os demais compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (**8**, **13**, **21** e **22**), foram capazes de inibir IL-1 $\beta$  em pelo menos uma das concentrações testadas (% de inibição: **8**:  $58.1 \pm 9.7$ ,  $56.7 \pm 16.9$ ; **13**:  $64.8 \pm 17.7$ ; **21**:  $67.9 \pm 2.1$ ; **22**:  $63.2 \pm 3.9$ ,  $63.7 \pm 13.8$ ,  $63.73 \pm 7.4$ ) ( $P < 0.01$ ) (Tabela 12). Por fim, apenas 3 compostos (**13**, **21** e **22**) conseguiram inibir com sucesso a produção de IL-6 (% de inibição: **13**:  $34.9 \pm 1.1$ ; **21**:  $30.7 \pm 1.8$ ; **22**:  $23.2 \pm 7.6$ ,  $26.2 \pm 8.0$ ) ( $P < 0.01$ ) (Tabela 12). Como esperado, o fármaco de referência, dexametasona, foi capaz de inibir todas as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) pesquisadas (% de inibição:  $44.9 \pm 6.9$ ;  $71.4 \pm 8.3$ ;  $58.6 \pm 5.7$ , respectivamente) ( $P < 0.001$ ) (Tabela 12).

Com relação ao aumento das citocinas anti-inflamatórias, apenas o composto **8** não foi capaz de elevar a produção dos 2 parâmetros analisados (IL-4 e IL-13). Os demais compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (**13**, **17**, **21** e **22**) conseguiram aumentar a produção de IL-4 e IL-13 em pelo menos uma das concentrações utilizadas (% de aumento: **13**:  $142.8 \pm 6.8$ ,  $158.2 \pm 13.8$ ,  $87.0 \pm 6.3$ ; **17**:  $175.0 \pm 18.4$ ,  $177.3 \pm 2.7$ ,  $151.8 \pm 23.6$ ; **21**:  $289.0 \pm 1.6$ ,  $179.0 \pm 36.2$ ,  $192.4 \pm 26.6$ ; **22**:  $227.3 \pm 0.2$ ,  $253.7 \pm 24.7$ ,  $438.3 \pm 46.6$ ) ( $P < 0.001$ ) (Tabela 12). Dexametasona também foi capaz de aumentar ambos os parâmetros analisados (% de aumento para IL-4:  $76.6 \pm 6.8$  e IL-13:  $343.1 \pm 56.8$ ) ( $P < 0.001$ ) (Tabela 12).

Tabela 12 – Efeito dos **5** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (**8**, **13**, **17**, **21** e **22**) na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Tratamento	Concentração	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-4	IL-13
B	Veículo (1%)	883.3 $\pm$ 333.3	1090.0 $\pm$ 232.7	12.2 $\pm$ 12.6	75.9 $\pm$ 7.2	37.0 $\pm$ 11.2
LPS	1 $\mu$ g/mL	3683.3 $\pm$ 284.1####	2615.0 $\pm$ 178.2####	156.3 $\pm$ 51.7####	2755.0 $\pm$ 597.8####	179.5 $\pm$ 18.8####
<b>8</b>	3 $\mu$ M	4150.0 $\pm$ 302.5	2365.0 $\pm$ 332.9	103.8 $\pm$ 11.7	4077.5 $\pm$ 499.4	330.8 $\pm$ 32.6
	10 $\mu$ M	3750.0 $\pm$ 497.8	2215.0 $\pm$ 534.6	72.2 $\pm$ 26.4*	3737.5 $\pm$ 340.5	278.3 $\pm$ 115.0
	30 $\mu$ M	3583.3 $\pm$ 214.3	2015.0 $\pm$ 175.6**	88.8 $\pm$ 46.1*	3880.0 $\pm$ 242.1	203.3 $\pm$ 49.8
<b>13</b>	3 $\mu$ M	3983.3 $\pm$ 513.7	2315.0 $\pm$ 100.0	83.8 $\pm$ 5.8	3815.0 $\pm$ 145.8	435.8 $\pm$ 21.3*
	10 $\mu$ M	3416.7 $\pm$ 517.8	2360.0 $\pm$ 77.0	122.2 $\pm$ 47.6	3945.0 $\pm$ 480.1*	488.3 $\pm$ 42.9*
	30 $\mu$ M	2416.7 $\pm$ 71.8**	2315.0 $\pm$ 321.5*	75.5 $\pm$ 48.2*	4032.5 $\pm$ 441.3*	339.5 $\pm$ 19.6*
<b>17</b>	3 $\mu$ M	3750.0 $\pm$ 267.4	2335.0 $\pm$ 390.7	89.7 $\pm$ 42.1	4095.0 $\pm$ 183.3*	485.8 $\pm$ 57.3**
	10 $\mu$ M	3516.7 $\pm$ 150.3	2415.0 $\pm$ 259.8	113.7 $\pm$ 5.0	4090.0 $\pm$ 208.0*	500.8 $\pm$ 8.5**
	30 $\mu$ M	3516.7 $\pm$ 302.5	985.0 $\pm$ 200.0***	95.5 $\pm$ 66.0	4235.0 $\pm$ 220.2**	427.0 $\pm$ 73.3**
<b>21</b>	3 $\mu$ M	2583.3 $\pm$ 831.4	785.0 $\pm$ 485.3***	83.0 $\pm$ 37.5	3595.0 $\pm$ 294.6	698.0 $\pm$ 5.0**
	10 $\mu$ M	2783.0 $\pm$ 900.0	985.0 $\pm$ 160.7***	98.8 $\pm$ 20.3	3485.0 $\pm$ 111.4	508.3 $\pm$ 112.7**
	30 $\mu$ M	2616.7 $\pm$ 115.5**	835.0 $\pm$ 132.3***	47.2 $\pm$ 5.8**	3990.0 $\pm$ 808.0*	572 $\pm$ 82.6**
<b>22</b>	3 $\mu$ M	3594.7 $\pm$ 1840.9	1865.0 $\pm$ 430.1*	58.0 $\pm$ 10.8*	3510.0 $\pm$ 366.9	587.5 $\pm$ 0.6**
	10 $\mu$ M	2983.3 $\pm$ 485.7*	1902.0 $\pm$ 126.9*	52.2 $\pm$ 37.7*	4490.0 $\pm$ 528.5*	662.0 $\pm$ 76.8***
	30 $\mu$ M	2583.3 $\pm$ 513.1*	1815.0 $\pm$ 104.1**	53.8 $\pm$ 20.2*	4515.0 $\pm$ 455.0*	997.0 $\pm$ 145.0***
Dexametasona	7 $\mu$ M	1583.3 $\pm$ 422.8***	1535.0 $\pm$ 312.2**	48.0 $\pm$ 26.3**	5015.0 $\pm$ 403.0***	726.0 $\pm$ 176.5***

Tabela 12. Efeito dos 5 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas nas principais citocinas pró- e anti-inflamatórias (resultados expressos em valores absolutos de absorbância). As células foram pré-tratadas nas concentrações de 3, 10 e 30  $\mu$ M de cada composto (**8**, **13**, **17**, **21** e **22**) e estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/mL) após 1 hora. O sobrenadante foi utilizado para quantificar cada citocina separadamente. Dexametasona foi utilizada com controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. dos valores absolutos: \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 e \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

Após análise das citocinas acima descritas, podemos afirmar que apenas os compostos **13**, **21** e **22** (Tabela 12) foram capazes de diminuir todas as citocinas pró-inflamatórias pesquisadas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e, concomitantemente, aumentar a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-13. Sendo assim, esses **3** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas demonstraram características anti-inflamatórias e imunomoduladoras nesta etapa da triagem *in vitro*, sendo submetidas à avaliação do efeito anti-inflamatório em modelo *in vivo*. As estruturas e características estruturais dos **3** melhores compostos derivados 2-iminotiazolidinas estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 – Característica e estrutura química dos **3** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados após triagem *in vitro* utilizando modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (**13**, **21** e **22**)

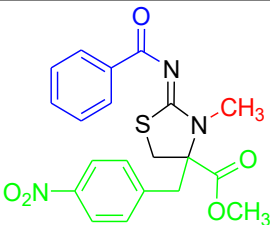
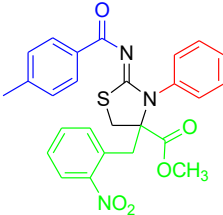
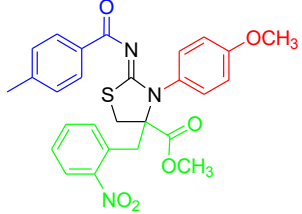
Identificação	Composto	Estrutura	Dados	logP
13	MF-146		C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S PM: 413,447 PF: 159,0-160,0 °C Solubilidade: DMSO	3,36
21	MF171		C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S PM: 489,5429 PF: 196,0-197,5 °C Solubilidade: DMSO	5,45
22	MF81		C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S PM: 519,5689 PF: 196,0-197,0 °C Solubilidade: DMSO	5,51

Tabela 13. Principais características e estrutura dos **3** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas selecionados após triagem *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. PM: Peso molecular; PF: Ponto de fusão; logP: coeficiente de partição. Fonte: Dados fornecidos pelo Dr. Misael Ferreira, Departamento de Química/UFSC (MESOlab).

## 13.2 CONFIRMAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO* DOS COMPOSTOS DERIVADOS DAS 2-IMINOTIAZOLIDINAS (**13**, **21** E **22**).

### 13.2.1 Efeito dos **3** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas na migração leucocitária (contagem total e diferencial de leucócitos) de camundongos com ALI induzida por LPS

Inicialmente, os 3 compostos estudados (**13**, **21** e **22**) foram testados apenas em sua maior concentração (30 mg/kg). É possível observar que os derivados das 2-iminotiazolidinas **21** e **22** não surtiram efeito na diminuição da migração total (Figura 14A) e diferencial de leucócitos (Figura 14B). Sendo assim, apenas o composto **13** foi testado em todas as concentrações (3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg).

Figura 14 – Efeito dos **3** compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (**13**, **21** e **22**) (30 mg/kg) na contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos com ALI induzida por LPS

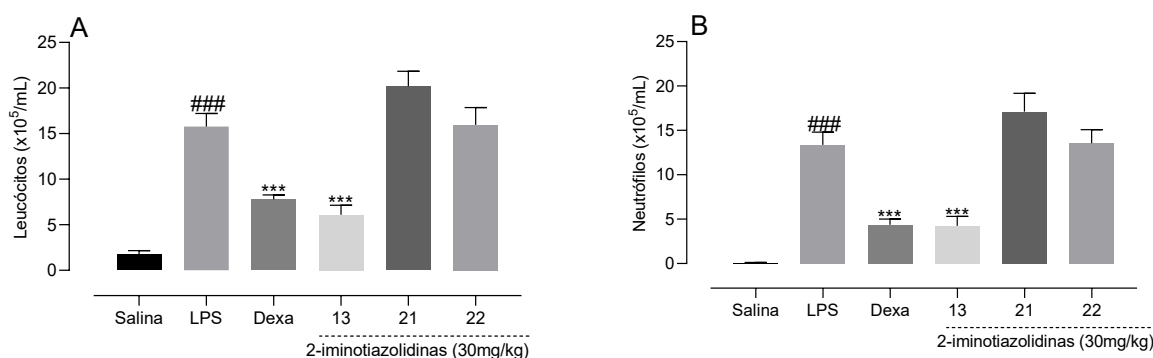


Figura 14. Contagem total (A) e diferencial (B) de leucócitos na maior concentração de 30 mg/kg dos 3 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas testadas (**13**, **21** e **22**). Salina: animais saudáveis tratados apenas com soro fisiológico estéril (0,9%) e veículo (DMSO 1%); LPS (controle negativo): animais inflamados com LPS 1 µg/mL (i.n.); Dexa (controle positivo): animais pré-tratados com dexametasona (5 mg/kg, via oral) 1 hora antes da administração de LPS; **13**, **21** e **22** (2-iminotiazolidinas): animais pré-tratados com os compostos na dose de 30 mg/kg (via oral) 1 hora antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M.; n = 6; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 e \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

O composto derivado das 2-iminotiazolidina [metil 2-(benzoilimino)-3-metil-4-(4-nitrobenzil)-1,3-tiazolidina-4-carboxilato] (**13**) demonstrou um desempenho favorável, sendo capaz de diminuir a contagem total de leucócitos, com inibição nas concentrações de 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição: 27.4 ± 6.7 e 61.3 ± 6.5, respectivamente) (P < 0.001) (Figura 15A). Esta inibição, pode ser correlacionada com a capacidade do composto de reduzir a migração de neutrófilos para o local da inflamação. Podemos observar que esta diminuição também ocorre nas concentrações de 10 mg/kg e 30 mg/kg (% de inibição: 39.4 ± 8.6 e 68.2 ± 7.9, respectivamente) (P < 0.001) (Figura 15B). O fármaco de referência, dexametasona, também foi capaz de inibir a contagem total e diferencial em modelo de camundongos com ALI induzida por LPS (% de inibição: 50.7 ± 3.1 e 67.4 ± 4.) (P < 0.001) (Figura 15A) (Figura 15B).

Figura 15 – Efeito da 2-iminotiazolidina **13** (3, 10 e 30 mg/kg) na contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos com ALI induzida por LPS

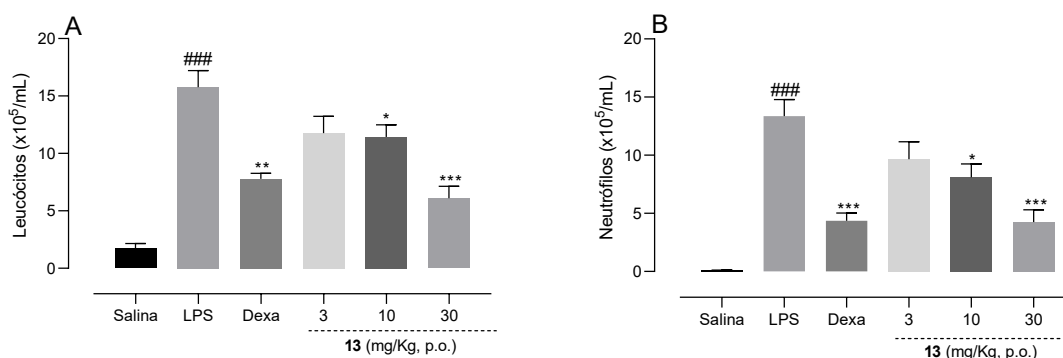


Figura 15. Avaliação do efeito da 2-iminotiazolidina **13** na contagem total (A) e diferencial (B) de leucócitos (30, 10 e 3 mg/kg). Salina: animais saudáveis tratados apenas com soro fisiológico estéril (0,9%) e veículo (DMSO 1%); LPS (controle negativo): animais inflamados com LPS 1 µg/mL (i.n.); Dexa (controle positivo): animais pré-tratados com dexametasona (5 mg/kg, via oral) 1 hora antes da administração de LPS; **13** (2-iminotiazolidinas): animais pré-tratados com os compostos nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (via oral) 1 hora antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M.; n = 6; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 e \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

Com a confirmação da atividade anti-inflamatória do composto **13** [metil 2-(benzoilimino)-3-metil-4-(4-nitrobenzil)-1,3-tiazolidina-4-carboxilato], apenas este derivado das 2-iminotiazolidinas seguiu para a próxima etapa da avaliação *in vivo*.

### 13.2.2 Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na exsudação em camundongos com ALI induzida por LPS

A 2-iminotiazolidina **13** demonstrou a capacidade de reduzir a formação de exsudato nos pulmões dos camundongos tratados. A inibição foi observada em todas as concentrações testadas (3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg) (% de inibição: 66.4 ± 5.6, 65.8 ± 5.2 e 76.9 ± 4.5, respectivamente) (P < 0.001) (Figura 16). Dexametasona também foi capaz de inibir o parâmetro analisado (% de inibição: 69.4 ± 6.8) (P < 0.001) (Figura 16).



Figura 16 – Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na exsudação (3, 10 e 30 mg/kg) de camundongos com ALI induzida por LPS

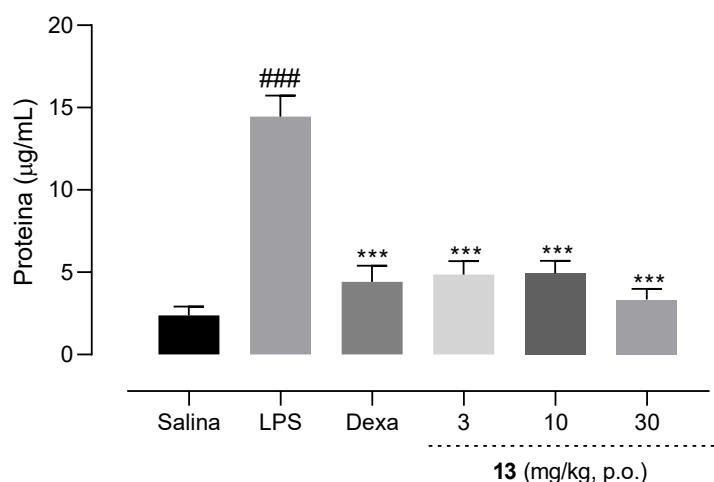


Figura 16. Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na exsudação em pulmões de camundongos induzidos por LPS. Salina: animais saudáveis tratados apenas com soro fisiológico estéril (0.9%) e veículo (DMSO 1%); LPS (controle negativo): animais inflamados com LPS 1 µg/mL (i.n.); Dexa (controle positivo): animais pré-tratados com dexametasona (5 mg/kg, via oral) 1 hora antes da administração de LPS; **13** (2-iminotiazolidinas): animais pré-tratados com os compostos nas doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg (via oral) 1 hora antes da administração de LPS. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M.; n = 6; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 e \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

### 13.3 INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIO DA 2-IMINOTIAZOLIDINA **13**

Após triagem *in vitro* e confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo*, apenas o composto **13** [metil 2-(benzoilimino)-3-metil-4-(4-nitrobenzil)-1,3-tiazolidina-4-carboxilato] permaneceu para a última etapa do estudo, onde investigamos o mecanismo de ação anti-inflamatória, utilizando novamente o modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.

Optamos por realizar todos os experimentos com a melhor concentração *in vitro* do composto, ou seja, a concentração da 2-iminotiazolidina **13** que foi capaz de inibir os parâmetros pró-inflamatórios (NO e citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-13) durante o processo de triagem *in vitro* dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas.

Sendo assim, todos os experimentos desta etapa foram realizados na melhor concentração do composto **13** (30  $\mu\text{M}$ ).

### 13.3.1 Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na quantificação da proteína p65 fosforilada (NF- $\kappa\text{B}$ ) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

A quantificação da proteína p65 fosforilada foi realizada para avaliar a capacidade da 2-iminotiazolidina **13** em inibir a ativação da via de sinalização do NF- $\kappa\text{B}$ . Neste experimento, a 2-iminotiazolidina **13** conseguiu inibir significativamente a fosforilação da subunidade p65 para o núcleo celular de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (% de inibição:  $71.2 \pm 0.6$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 17). Essa inibição foi similar à observada no controle dexametasona ( $65.0 \pm 2.1$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 17).

Figura 17 – Efeito da 2-iminotiazolidina **13** (30  $\mu\text{M}$ ) sobre a fosforilação da subunidade p65 da via NF- $\kappa\text{B}$  em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

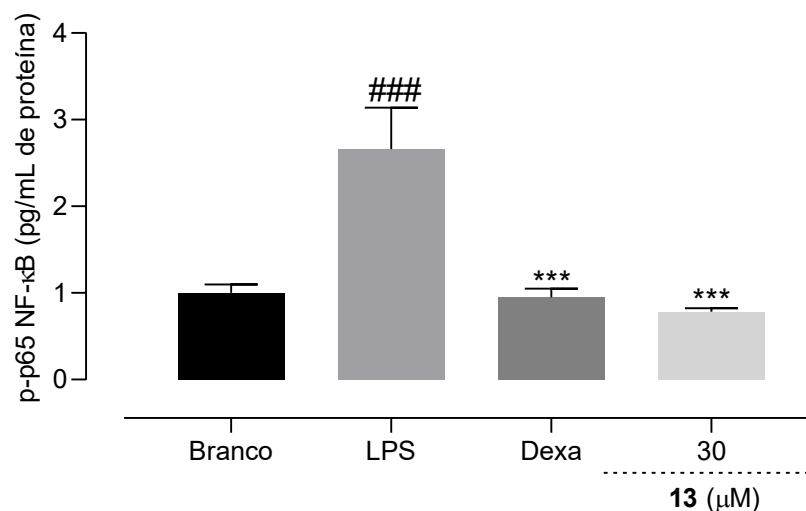


Figura 17. Efeito da 2-iminotiazolidina **13** sobre a fosforilação da subunidade p65 da via de sinalização do NF- $\kappa\text{B}$ . Branco: células tratadas apenas com veículo (DMSO e PBS estéril); LPS: controle negativo, tratado apenas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e DMSO (1%); Dexa: controle positivo, tratado com dexametasona (7  $\mu\text{M}$ ) e Composto **13**: tratado com a melhor dose (30  $\mu\text{M}$ ). As colunas representam a média  $\pm$  e E.P.M. de experimentos realizados em triplicata. \*\*\* $P < 0.001$ , em comparação com os grupos negativo LPS (###).

### **13.3.2 Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na quantificação por RT-qPCR da expressão de mRNA de iNOS, COX-2 e Arginase-1 de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS**

A 2-iminotiazolidina **13** foi capaz de inibir significativamente a expressão de mRNA de ambos os genes pró-inflamatórios pesquisados (% de inibição: iNOS:  $98.8 \pm 0.3$  e COX-2:  $99.3 \pm 0.2$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 18A) (Figura 18B). O controle positivo, dexametasona, também diminuiu os 2 parâmetros analisados (% de inibição: iNOS:  $97.4 \pm 0.1$  e COX-2:  $84.3 \pm 7.8$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 18A) (Figura 18B). Além de inibir a expressão de mRNA de marcadores pró-inflamatórios, podemos observar que a 2-iminotiazolidina **13** conseguiu aumentar a produção de mRNA da Arginase-1, proteína reconhecida como importante marcador anti-inflamatório (% de aumento da ARG-1:  $125.6 \pm 27.44$ ) ( $P < 0.05$ ) (Figura 18C). Dexametasona também foi capaz de aumentar a transcrição gênica da Arginase-1 (% de aumento da ARG-1:  $318.3 \pm 18.95$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 18C).

Figura 18 – Efeito da 2-iminotiazolidina **13** sobre a expressão de mRNA da iNOS, COX-2 e Arginase-1 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

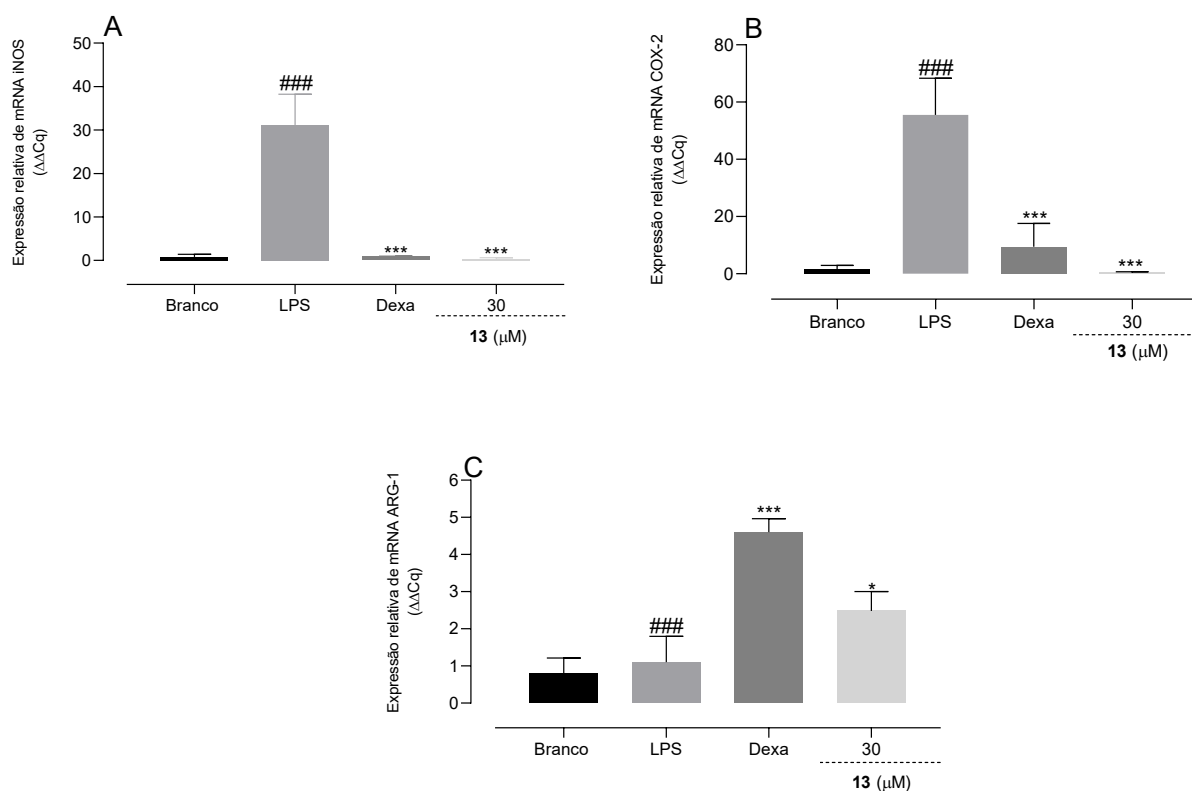


Figura 18. Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na expressão da iNOS (A), COX-2 (B) e ARG-1 (C) utilizando a técnica de RT-qPCR em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Branco: células tratadas apenas com veículo (DMSO e PBS estéril); LPS: controle negativo, tratado apenas com LPS (1  $\mu g/mL$ ) e DMSO (1%); Dexa: controle positivo, tratado com dexametasona (7  $\mu M$ ) e composto **13**: tratado com a melhor dose (30  $\mu M$ ). Os resultados foram calculados em duplicata pelo método CT relativo em comparação com os resultados do grupo branco (células não tratadas e não induzidas por LPS) ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n = 3; \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

### 13.3.3 Efeito da 2-iminotiazolidina **13** na quantificação de citocinas por citometria de fluxo em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

A 2-iminotiazolidina **13** foi capaz de diminuir a produção da citocina IL-12p70 e da quimocina MCP-1 (% de inibição: IL-12p70:  $42.7 \pm 11.1$  e MCP-1:  $90.6 \pm 0.8$ ) (P < 0.05) (P < 0.001) (Figura 19A) (Figura 19B). Por se tratarem de 2 marcadores pró-inflamatórios, o controle positivo (dexametasona), também foi capaz de inibir a

liberação de IL-12p70 e MCP-1 (% de inibição:  $44.4 \pm 3.5$  e  $96.4 \pm 0.5$ , respectivamente) ( $P < 0.05$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 19A) (Figura 19B).

Ao mesmo tempo, a 2-iminotiazolidina **13** foi aumentou a liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (% de aumento:  $329.1 \pm 23.4$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 19C). O fármaco dexametasona também aumentou a liberação desta citocina (% de aumento:  $253.9 \pm 22.3$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 19C).

Figura 19 – Efeito do composto **13** em citocinas pró- (IL-12p70 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10) em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

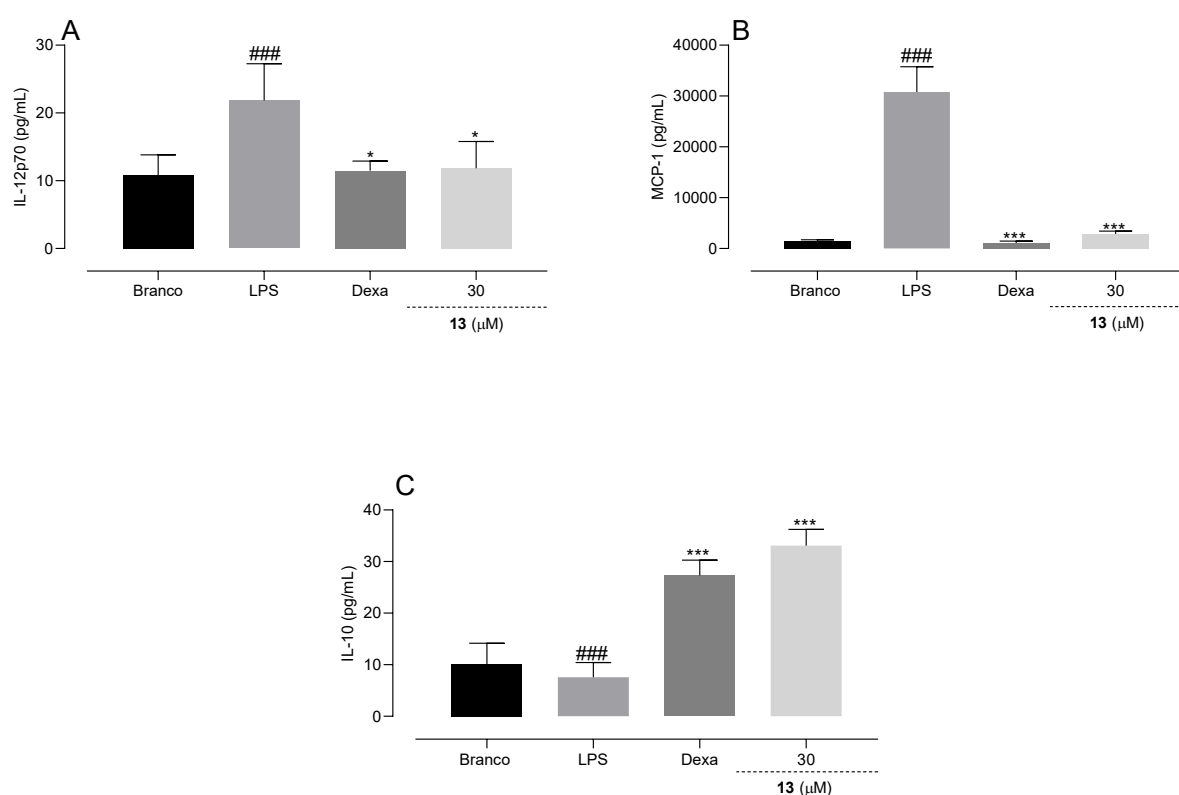


Figura 19. Atividade da 2-iminotiazolidina **13** em citocinas de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS utilizando técnica de citometria de fluxo onde, IL-12p70 (A), MCP-1 (B) e IL-10 (C). Branco: células tratadas apenas com veículo (DMSO e PBS estéril); LPS: controle negativo, tratado apenas com LPS (1 μg/mL) e DMSO (1%); Dexa: controle positivo, tratado com dexametasona (7 μM) e composto **13**: tratado com a melhor dose (30 μM). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n = 3; \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

### 13.3.4 Avaliação da 2-iminotiazolidina **12** na atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Podemos observar que a 2-iminotiazolidina **13** aumentou o índice fagocítico na linhagem de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (% de aumento:  $148.7 \pm 5.1$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 20). O fármaco de referência, dexametasona também foi capaz de induzir o aumento da atividade fagocítica destes macrófagos ( $174.5 \pm 5.2$ ) ( $P < 0.001$ ) (Figura 20).

Figura 20 – Efeito da 2-iminotiazolidina **13** sobre a atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

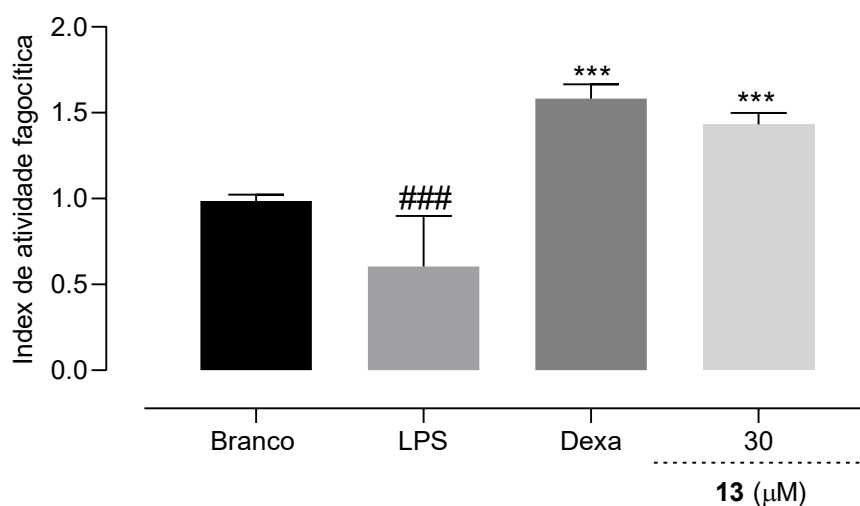


Figura 20. Atividade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS, utilizando técnica colorimétrica de vermelho neutro. Branco: células tratadas apenas com veículo (DMSO e PBS estéril); LPS: controle negativo, tratado apenas com LPS (1  $\mu$ g/mL) e DMSO (1%); Dexa: controle positivo, tratado com dexametasona (7  $\mu$ M) e composto **13**: tratado com a melhor dose (30 $\mu$ M). O índice fagocítico foi medido pela seguinte equação: (IP):  $A1/A0$  onde, A1 representa a absorbância da amostra, LPS e Dexa, e A0 é a absorbância do controle Branco. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n = 3; \*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001, em comparação com os grupos negativo LPS (###).

### 13.3.5 Avaliação do efeito da 2-iminotiazolidina **13** da expressão de receptores de manose (CD206) na superfície de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

Por fim, a análise da expressão dos receptores de superfície CD206 foi realizada. A 2-iminotiazolidina **13** foi capaz de aumentar a expressão desse receptor na linhagem de macrófagos RAW 264.7 induzida por LPS (% de aumento:  $60.4 \pm 8.5$ ) ( $P < 0.01$ ) (Figura 21). O fármaco de referência, dexametasona, também apresentou a capacidade de aumentar este marcador anti-inflamatório (% de aumento:  $56.5 \pm 14.6$ ) ( $P < 0.01$ ) (Figura 21).

Figura 21 – Efeito da 2-iminotiazolidina **13** sobre a expressão do receptor de manose (CD206) na superfície de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS

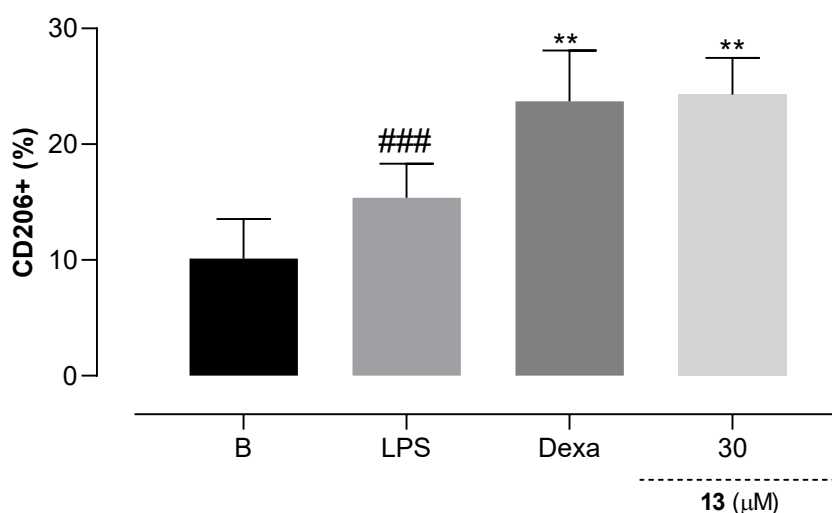


Figura 21. Avaliação do aumento da expressão de marcadores de superfície CD206 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS onde, Branco: células tratadas apenas com veículo (DMSO e PBS estéril); LPS: controle negativo, tratado apenas com LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e DMSO (1%); Dexa: controle positivo, tratado com dexametasona (7  $\mu\text{M}$ ) e composto **13**: tratado com a melhor dose (30 $\mu\text{M}$ ). Os resultados para CD206 foram quantificados como porcentagem de expressão dos receptores pelo programa FACSuite®. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n = 3;

\*\* $P < 0.01$ , em comparação com os grupos negativo LPS (###).

### 13.4 RESULTADOS DO DESENHO EXPERIMENTAL

Após as 3 etapas projetadas para o desenho experimental, as 2-iminotiazolidinas (**1-28**) foram testadas de em modelos *in vitro* e *in vivo*. Após triagem e confirmação da atividade anti-inflamatória, apenas a 2-iminotiazolidina **13** teve o seu mecanismo de ação avaliado. O resumo das etapas de experimentação pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 22).

Figura 22 – Resumo dos resultados obtidos durante a avaliação da atividade anti-inflamatória dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas

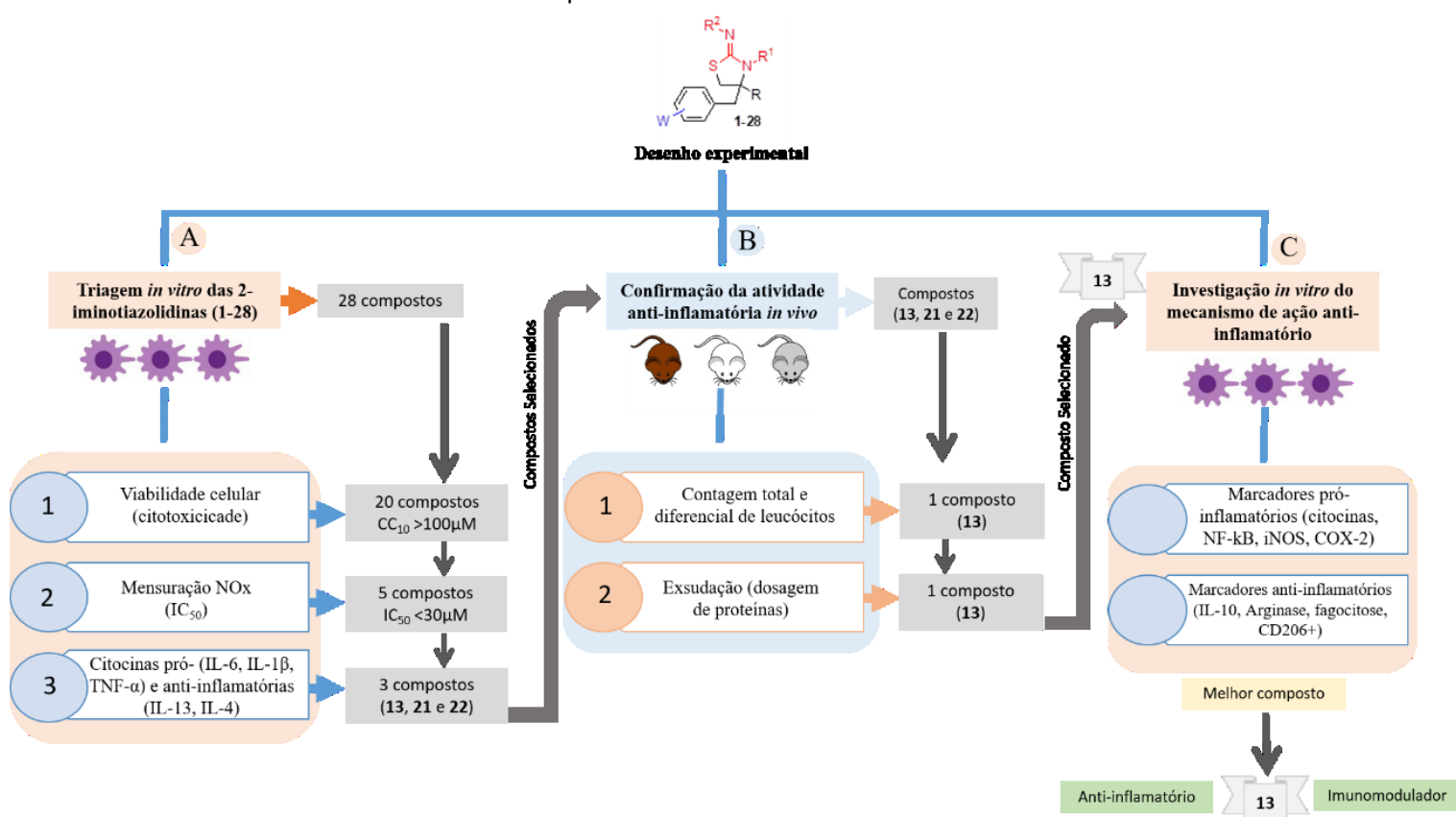


Figura 22. Resumo dos resultados obtidos após a aplicação do desenho experimental conduzido em 3 etapas para o estudo da atividade anti-inflamatória dos 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas. Realização da triagem inicial *in vitro* (A), com posterior confirmação da atividade anti-inflamatória *in vivo* (B), seguida da investigação *in vitro* do mecanismo de ação anti-inflamatório (C). De 28 compostos estudados, apenas a 2-iminotiazolidina **13** [metil 2-(benzoilimino)-3-metil-4-(4-nitrobenzil)-1,3-tiazolidina-4-carboxilato] foi testada na última etapa de experimentos, demonstrando atividade anti-inflamatória e potencial para imunomodulação de macrófagos. Fonte: Elaborado pela autora.



## 14 DISCUSSÃO

Os ensaios de citotoxicidade são uma parte crucial do desenvolvimento farmacêutico moderno e representam uma maneira fácil e eficaz de avaliar os efeitos de compostos químicos nas mais diversas linhagens de células usadas em experimentos *in vitro* (Bácskay *et al.*, 2018; Kamiloglu *et al.*, 2020; Niles; Moravec; Riss, 2008). A não realização desta etapa, pode comprometer os demais passos das experimentações, visto que valores seguros de citotoxicidade não foram avaliados (Riss *et al.*, 2019; Roth; Zilliacus; Beronius, 2021). Seguindo esta linha de raciocínio, 20 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas (**1-28**) testadas neste estudo apresentaram valores altos de CC<sub>10</sub>, garantindo a viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS durante os experimentos. Abordagens semelhantes podem ser observadas em diversos estudos que, ao preconizarem a baixa citotoxicidade e alta viabilidade celular, garantiram concentrações fidedignas para a realização de experimentos para a atividade anti-inflamatória de diversos compostos derivados das tiazolidinas (Deng *et al.*, 2012; Faine *et al.*, 2011; Rezaei *et al.*, 2019; Samala *et al.*, 2014).

Quando falamos de inflamação, um dos primeiros marcadores pró-inflamatórios mensurados é o óxido nítrico (Facchin *et al.*, 2022; Stuehr; Haque, 2018). Macrófagos polarizados classicamente para fenótipo M1 são caracterizados pela liberação de grandes quantidades de NO e aumento da expressão da iNOS (Yao; Xu; Jin, 2019). Ueda e colaboradores (2004), demonstraram que derivados da 2-imino-1,3-tiazolidina 4,5-dialquil-substituídos são potentes inibidores da iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS e IFN- $\gamma$ . Esses compostos foram capazes de inibir a produção da iNOS com valores de IC<sub>50</sub> baixos (Ueda *et al.*, 2004). Diversos estudos corroboram com este cenário, demonstrando a capacidade de compostos derivados das tiazolidinas em diminuir a produção de NO, inibindo a expressão da iNOS (César *et al.*, 2015; Faine *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015; Rezaei *et al.*, 2019; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021). Tal afinidade pode estar correlacionada a estrutura heterocíclica central das tiazolidinas, que facilita a inserção e modificação de radicais e demais grupos funcionais adicionados à molécula (D'hooghe e De Kimpe, 2008).

Durante nosso estudo, podemos verificar que 5 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas conseguiram inibir a produção de NO com valores de IC<sub>50</sub> entre 3-15  $\mu$ M. Estes 5 compostos contêm um grupo nitroaromático altamente retirador de

elétrons em vez de uma porção aminoaril fortemente liberadora de elétrons (como na anilina presente no composto **25**). No entanto, a posição destes grupos substituídos no anel aromático, pode variar de para- (4-nitrofenil para os compostos **8**, **13**, e **17**) a orto (2-nitrofenil para os compostos **21** e **22**). Com relação à substituição do anel tiazolidina, o efeito dos grupos R1 na posição 3 é menos previsível em termos de atividade, pois inclui o grupo amino altamente hidrofílico (composto **17**). Outros compostos, entretanto, apresentam grupos hidrofóbicos, sejam eles pequenos como o metil incorporado ao composto **13** ou grupos aril maiores (fenil nos compostos **8** e **21** e o 4-metoxifenil presente no composto **22**). Outra imprevisibilidade pode ser observada para os grupos R2 na posição 2 dos 5 compostos mais ativos, pois podem ser representados apenas por hidrogênio (composto **17**) ou grupos acil (acetil no composto **8** e aroil nos compostos **13**, **21** e **22**). No entanto, compostos contendo um grupo retirador fraco de elétrons em R2, como 4-bromobenzoil (compostos **5**, **6** e **19**) não foram tão ativos ( $IC_{50} > 30 \mu M$ ). Uma comparação mais ampla entre R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> (Tabela 7), revelou outra correlação importante, relacionada aos compostos ativos **8** e **13** que podem ser classificados como regioisômeros (isômeros de posição) em relação à posição dos grupos metil e fenil em R1 e R2. Em outras palavras, a posição relativa dos grupos metil e fenil em **8** e **13** não parecem influenciar na capacidade destes compostos em diminuir a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Por outro lado, análogos contendo apenas grupos metil pequenos (composto **10**) ou grupos fenil maiores e mais hidrofóbicos (composto **14**) em R1 e R2, aparentam não ser tão ativos quanto os compostos **8** e **13**. Esses resultados demonstram que mudanças sutis na estrutura destas 2-iminotiazolidinas ocasionou alterações significativas em sua capacidade biológica de diminuir a produção de NO.

Outros marcadores extensamente pesquisados durante o processo de inflamação englobam diversas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Lee *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). Diversos autores demonstram a capacidade de compostos derivados das tiazolidinas em diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (Alleva *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2012; Elkamhawy *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2013; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021; Xie *et al.*, 2014). Durante a etapa de triagem realizada em nosso estudo, os compostos derivados das 2-iminotiazolidinas demonstraram ação similar, ao diminuir a produção de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Diferentemente dos estudos citados acima, os compostos derivados das 2-iminotiazolidinas estudados neste capítulo tiveram sua ação testada em citocinas anti-

inflamatórias, demonstrando o aumento da produção de IL-4 e IL-13 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.

Embora os compostos **8** e **13** sejam análogos, com estrutura molecular diferindo apenas na posição dos substituintes (isômeros de posição), podemos notar que tal modificação estrutural pode estar relacionada com a dificuldade que o composto **8** apresentou em aumentar os marcadores anti-inflamatórios IL-4 e IL-13, sendo o único composto derivado das 2-iminotiazolidinas que não aumentou nenhuma das 2 citocinas anti-inflamatórias testadas. Sendo assim, podemos constatar que, uma única mudança alostérica é suficiente para alterar a funcionalidade da molécula, visto que o composto **13** teve sucesso em aumentar IL-4 e IL-13. Outra observação importante é que a posição relativa dos grupos metil e fenil dos compostos **8** e **13** não influenciou a capacidade destes em diminuir a produção de NO. Entretanto, essa diferença de posição é suficiente para impedir que o composto **8** diminua a liberação de IL-6. Além disso, todos os compostos selecionados após a triagem *in vitro* (**13**, **21** e **22**) apresentaram substituições de caráter hidrofóbico em R1 (posição 3) e, coincidentemente, substituições aroil na posição 2 (R2). Tais características podem estar relacionadas com a capacidade destes compostos derivados das 2-iminotiazolidinas em diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a liberação de citocinas anti-inflamatórias.

Após a triagem *in vitro* descrita acima, os compostos **13**, **21** e **22** tiveram sua ação anti-inflamatória testada em modelo *in vivo* de lesão aguda pulmonar induzida por LPS. Com relação aos resultados obtidos a partir deste modelo, podemos observar que todos os compostos selecionados possuem uma substituição hidrofóbica em R1 mas, apenas o composto **13** [metil 2-(benzoilimino)-3-metil-4-(4-nitrobenzil)-1,3-tiazolidina-4-carboxilato] foi capaz de diminuir a migração leucocitária no pulmão inflamado dos camundongos. Tal atividade pode ser justificada, em partes, pela substituição hidrofóbica mais leve presente na posição 3 do composto **13**, onde podemos observar apenas um grupo metil. Já os compostos **21** e **22**, apresentaram substituições hidrofóbicas maiores (grupo fenil e 4-metoxifenil, respectivamente), que podem ter influenciado diretamente na biodisponibilidade oral destes compostos, dificultando sua ação. Esse fato é confirmado pelo coeficiente de partição (logP) dos compostos, uma vez que o logP dos compostos derivados das 2-iminotiazolidinas **21** e **22** apresentam valores acima de 5 (logP > 5) (Lipinski, 2004, 2016). Além disso, a utilização de substituintes maiores também causou um aumento do peso molecular

dos compostos **21** e **22**, representando outro fator relevante durante a experimentação *in vivo*, principalmente de compostos introduzidos por via oral. Sendo assim, é justificável assumirmos que os compostos **21** e **22** não apresentaram atividade em modelo animal devido ao seu maior caráter hidrofóbico e peso molecular elevado, visto que a via de administração escolhida foi a oral.

Durante o processo inflamatório, mimetizado por modelos animais de inflamação, podemos observar o aumento da migração leucocitária, juntamente com a exsudação da área lesionada. Esse ambiente é caracterizado pela grande quantidade de polimorfonucleares (neutrófilos) e acúmulo de proteína sérica (Chen *et al.*, 2020; Gusev; Zhuravleva, 2021; Santin *et al.*, 2018). Em nossos estudos, além de atenuar a migração leucocitária total e diferencial (neutrófilos), a 2-iminotiazolidina **13** ainda foi capaz de diminuir a exsudação tecidual em todas as doses testadas. Estudo similares, realizados por Santos e colaboradores (2018), demonstraram a capacidade de compostos derivados das tiazolidinadionas em diminuir a migração leucocitária e exsudação no pulmão de camundongos BALB/c com ALI induzida por LPS (Santos *et al.*, 2018). Além disso, diferentes modelos *in vivo* corroboram com esses achados, ao confirmar a atividade anti-inflamatória de compostos derivados das tiazolidinas perante a migração leucocitária e exsudação tecidual (Barbosa *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2010; Ottaná *et al.*, 2005; Santin *et al.*, 2018)

Após a confirmação *in vivo* da atividade anti-inflamatória da 2-iminotiazolidina **13**, buscamos elucidar o mecanismo de ação *in vitro* deste composto. Sendo assim, pudemos constatar que a 2-iminotiazolidina **13** foi capaz de inibir a fosforilação da proteína total p65 presente na cascata de ativação da via do NF- $\kappa$ B, culminando na diminuição da expressão de COX-2 e iNOS. Estudos realizados por Ghafouri, Rezaei, Mohammadi (2017), demonstraram o potencial de compostos derivados das tiazolidinas em diminuir a expressão da iNOS e COX-2 por meio da regulação da via do NF- $\kappa$ B em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Resultados similares podem ser encontrados em alguns estudos, que correlacionam a diminuição da ativação da via do NF- $\kappa$ B com a inibição de iNOS e COX-2 (Elkamhawy *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2013; Sato; Tatsunami; Wakame, 2021). Com base nestes resultados, levantamos a hipótese de que a 2-iminotiazolidina **13** pode impedir a fosforilação da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, regulando negativamente esta via de sinalização e, conseqüentemente, diminuindo a liberação de marcadores pró-inflamatórios (NO, TNF- $\alpha$  e IL-6) e atuando

expressivamente sobre a expressão de mRNA de marcadores relacionados ao processo inflamatório (iNOS e COX-2).

Além disso, a 2-iminotiazolidina **13** foi capaz de diminuir a produção da citocina IL-12p70 e da quimocina MCP-1. Modelo similar ao nosso, foi utilizado em outros estudos (César *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2009) para comprovar a ação de compostos derivados das tiazolidinas sobre a diminuição de MCP-1 em macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS (César *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2009). Outros estudos também demonstraram a capacidade de tiazolidinadionas em diminuir a liberação de MCP-1 em diferentes linhagens *in vitro* de macrófagos (Hall; McDonnell, 2007; Tanaka *et al.*, 2005). Ainda neste cenário, podemos observar a diminuição de IL-12p70. Diversos autores correlacionam a baixa produção desta citocina com o aumento da população de macrófagos do tipo M2 no sítio da inflamação, contribuindo para o processo final e resolutorio da infecção (Lee *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2014; Muñoz *et al.*, 2020). De fato, populações de macrófagos M2 podem ser caracterizadas pela baixa produção de IL-12 e alta liberação de IL-10 (Cutolo *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2015; Mirlekar; Pylayeva-Gupta, 2021).

A caracterização fenotípica dos macrófagos (M1/M2) vem sendo cada vez mais estudada e documentada, com marcadores específicos para cada fenótipo encontrado. Além das citocinas acima citadas, sabe-se que macrófagos ativados para fenótipo M2 apresentam altos níveis de fagocitose, com expressão de marcadores de superfície característicos (CD206), além de outros fatores como, aumento de citocinas anti-inflamatórias e expressão acentuada de Arginase-1 (Orecchioni *et al.*, 2019; Takiguchi *et al.*, 2021; Wculek *et al.*, 2021). Primeiramente, nos deparamos com o aumento da produção de IL-10 na presença da 2-iminotiazolidina **13** que, juntamente com as citocinas IL-4 e IL-13, são essenciais para conferir plasticidade aos macrófagos durante processos de proliferação celular, reparo tecidual e resolução de processos inflamatórios (Wang *et al.*, 2014). Além disso, o aumento da fagocitose e da expressão de marcadores de superfície CD206 podem ser observados nos macrófagos pré-tratados com a 2-iminotiazolidina **13**.

Uma das principais formas de diferenciar macrófagos M1 de M2 é pelo contrabalanço que existe entre a ativação da Arginase-1 (M2) e iNOS (M1), visto que a ativação de um é inversamente proporcional a atividade do outro (Kashfi; Kannikal; Nath, 2021; Mills, 2012; Noël *et al.*, 2004). É o que podemos observar durante nossos estudos, uma vez que a 2-iminotiazolidina **13** age inibindo de maneira extensiva a

produção da iNOS ao mesmo tempo que aumenta significativamente a expressão de Arginase-1, sugerindo assim, uma mudança do fenótipo desses macrófagos induzidos inicialmente por LPS.

Para garantir que os agentes inflamatórios sejam removidos de maneira eficaz, a expressão de CD206 é baixa durante o início da inflamação e alta durante o processo de resolução da mesma. Em geral, CD206 é responsável pelo início da fagocitose, ativando vias imunossupressoras que resultam na diminuição de TNF- $\alpha$  e IL-6, aumentando os níveis de expressão de fatores anti-inflamatórios como IL-10 e IL-1R $\alpha$  (Bart *et al.*, 2021; Tang; Le, 2015). É justamente este cenário que podemos observar a partir dos resultados obtidos para a 2-iminotiazolidina **13**. Com o aumento da expressão de CD206, vemos o index fagocítico se elevar, juntamente com o aumento de IL-10 e diminuição de citocinas pró-inflamatórias. Podemos assim, sugerir que o pré-tratamento com a 2-iminotiazolidina **13** auxilia no processo de resolução do quadro inflamatório ocasionado pela indução de LPS em modelo *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7. Podemos assim, propor um balanceamento entre o fenótipo inicial M1 e sua mudança para M2 ao longo do tratamento com a 2-iminotiazolidina **13**. Devido à escassez de estudos relacionados a polarização de macrófagos por classes de compostos derivados das tiazolidinas, podemos considerar tais achados como únicos na literatura até então disponível.

## 15 CONCLUSÃO

A partir dos resultados expostos, podemos confirmar a ação anti-inflamatória exercida pela classe de compostos derivados das 2-iminotiazolidinas, com grande afinidade perante a diminuição de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  em modelo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Seu potencial efeito anti-inflamatório foi confirmado *in vivo*, utilizando modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS, inibindo a migração leucocitária e exsudação no BALF coletado de pulmões de camundongos. A 2-iminotiazolidina **13** foi capaz ainda, de diminuir significativamente a expressão da iNOS e COX-2 ao inibir a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS. Além disso, este composto exerceu ação imunomoduladora em macrófagos, alterando seu fenótipo M1 para M2 ao aumentar a fagocitose, a expressão de Arginase-1, CD206 e a liberação de diversas citocinas anti-inflamatórias. Embora seus efeitos imunomodulatórios sejam inéditos na literatura, mais estudos são necessários para comprovar a totalidade dos mecanismos de ação envolvidos por trás da atividade anti-inflamatória da 2-iminotiazolidina **13**.

## EPÍLOGO

Durante a revisão sistemática realizada, nos deparamos com uma grande heterogeneidade de estudos, onde a falta de padronização e descrição de determinados procedimentos, dificultaram e afunilaram o número de artigos incluídos. Apesar disso, os resultados extraídos desses estudos foram suficientes para demonstrar a ação anti-inflamatória de compostos derivados das tiazolidinas em modelo *in vitro*. De maneira quantitativa, conseguimos evidenciar a capacidade das tiazolidinadionas em diminuir a produção de óxido nítrico quando comparado ao controle negativo LPS em modelo *in vitro* de macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS.

Esses estudos, serviram como base para o desenvolvimento e continuidade desta tese, ao avaliarmos a atividade anti-inflamatória de 28 compostos derivados das 2-iminotiazolidinas. Partindo desse preceito, fomos capazes de demonstrar a ação anti-inflamatória e a atividade imunomodulatória inédita da 2-iminotiazolidina **13**. A falta de literatura abordando a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, nos faz acreditar que os resultados relacionados a citocinas, fagocitose, CD206 e ARG-1 adquiridos ao longo dessa pesquisa são únicos, evidenciando a possível utilização de derivados das tiazolidinas como imunomoduladores e candidatos a fármacos para a resolução do processo inflamatório.

Diante da literatura encontrada e dos resultados dispostos nesta tese, podemos afirmar que mais estudos se fazem necessários para determinar as doses, toxicologia, segurança terapêutica e mecanismos de ação da 2-iminotiazolidina **13**, visando sua confirmação em outros modelos *in vivo* e, posteriormente em ensaios clínicos. A longo prazo, poderemos considerar essa molécula como um possível candidato à fármaco, aumentando ainda mais o leque de atividades biológicas atribuída aos derivados das tiazolidinas.



## REFERÊNCIAS

ABDELALL, Eman K.A.; KAMEL, Gehan M. Synthesis of new thiazolo-celecoxib analogues as dual cyclooxygenase-2/15-lipoxygenase inhibitors: determination of regio-specific different pyrazole cyclization by 2d nmr. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 118, p. 250-258, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.049>.

ABEDI, Farshad *et al.* Acute lung injury: the therapeutic role of rho kinase inhibitors. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 155, p. 1-9, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104736>.

AGHASAFARI, Parya; GEORGE, Uduak; PIDAPARTI, Ramana. A review of inflammatory mechanism in airway diseases. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 59-74, 10 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2>.

ALLEVA, David G. *et al.* Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ : counter-regulatory activity by IFN- $\gamma$ . **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 71, n. 4, p. 677-685, 1 abr. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.71.4.677>.

ANAVI, Sarit; TIROSH, Oren. INOS as a metabolic enzyme under stress conditions. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 146, p. 16-35, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411>.

ANDRABI, Syed Muntazir *et al.* Nitric Oxide: physiological functions, delivery, and biomedical applications. **Advanced Science**, [S.L.], v. 10, n. 30, p. 1-28, 26 ago. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202303259>.

ANITHA, Mandala; SWAMY, Kumara, K. C. Synthesis of thiazolidine-thiones, imino-thiazolidines and oxazolidines via the base promoted cyclisation of epoxy-sulfonamides and heterocumulenes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 402-413, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7ob02915b>.

ANOOPKUMAR-DUKIE, Shailendra *et al.* Resazurin assay of radiation response in cultured cells. **The British Journal Of Radiology**, [S.L.], v. 78, n. 934, p. 945-947, out. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1259/bjr/54004230>.

AQLAN, Faisal M. *et al.* Thiazolidinone: a structural motif of great synthetic and biological importance. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1250, p. 1-26, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131771>.

ARAÚJO, Ana C.; WHEELOK, Craig E.; HAEGGSTRÖM, Jesper Z. The Eicosanoids, Redox-Regulated Lipid Mediators in Immunometabolic

Disorders. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 275-296, 20 jul. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2017.7332>.

ASAMI, Jinta; SHIMIZU, Toshiyuki. Structural and functional understanding of the toll-like receptors. **Protein Science**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 761-772, 24 fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.4043>.

ASHOUR, Hayam M. A.; EL-ASHMAWY, Ibrahim M.; BAYAD, Aida E. Synthesis and pharmacological evaluation of new pyrazolyl benzenesulfonamides linked to polysubstituted pyrazoles and thiazolidinones as anti-inflammatory and analgesic agents. **Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly**, [S.L.], v. 147, n. 3, p. 605-618, 7 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00706-015-1549-x>.

ATRI, Chiraz; GUERFALI, Fatma; LAOUINI, Dhafer. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1-15, 19 jun. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061801>.

BÁCSKAY, Ildikó *et al.* **Cytotoxicity**: role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development. London: Intech, 2018. 266 p.

BARBOSA, Karla P.S. *et al.* Reduction of carrageenan-induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 718, n. 1-3, p. 197-205, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.033>.

BARROS, Cleiton D. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR $\gamma$  ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 3805-3811, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.045>.

BART, Valentina M. T. *et al.* Macrophage reprogramming for therapy. **Immunology**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 128-144, 25 jan. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.13300>.

BAS, Aurora *et al.* Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. **Small**, [S.L.], v. 17, n. 15, p. 1-14, 22 jan. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.202006027>.

BEHZADI, Payam *et al.* Toll-Like Receptors: general molecular and structural biology. **Journal Of Immunology Research**, [S.L.], v. 2021, p. 1-21, 29 maio 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/9914854>.

BENAM, Kambez H. *et al.* Engineered In Vitro Disease Models. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 195-262, 24 jan. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040418>.

BENEDETTO, Paola di *et al.* Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 1-8, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102369>.

BERG, Mariska Pm van Den; MEURS, Herman; GOSENS, Reinoud. Targeting arginase and nitric oxide metabolism in chronic airway diseases and their comorbidities. **Current Opinion In Pharmacology**, [S.L.], v. 40, p. 126-133, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2018.04.010>.

BHANDARI, Sonal; SAKLA, Akash P.; SHANKARAIHAH, Nagula. FeCl<sub>3</sub>-Catalyzed [3+2] Cycloaddition Reaction: a mild synthetic approach to spirooxindolo-2-iminothiazolidine scaffolds. **Chemistryselect**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 2886-2891, 11 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.201904397>.

BHATNAGAR, Ayushi; PEMAWAT, Gangotri. An overview on synthetic routes of anti-inflammatory active scaffolds including thiazole and thiazolidine cores. **Phosphorus, Sulfur, And Silicon And The Related Elements**, [S.L.], v. 198, n. 7, p. 554-565, 30 mar. 2023. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10426507.2023.2189253>.

BHATTACHARYYA, Aditya. Synthetic Routes to 2-Iminothiazolidines: state-of-the-art 2006-2020. **Current Organic Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 24, p. 2823-2844, 31 dez. 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1385272824999201019162400>.

BHATTACHARYYA, Aditya; KAVITHA, Chandagirikoppal Vijendra; GHORAI, Manas K. Stereospecific Synthesis of 2-Iminothiazolidines via Domino Ring-Opening Cyclization of Activated Aziridines with Aryl- and Alkyl Isothiocyanates. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 81, n. 15, p. 6433-6443, 25 jul. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.6b01551>.

BINDU, Samik; MAZUMDER, Somnath; BANDYOPADHYAY, Uday. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 180, p. 1-21, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>.

BODHAK, Chandan *et al.* Efficient synthesis of functionalized 2-iminothiazolines by ultrasonication under solvent-free conditions and access to 5-aryl-2-iminothiazolines. **Results In Chemistry**, [S.L.], v. 4, p. 1-9, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100301>.

BORGES, Gabriel Á. *et al.* In vivo and in vitro effects of curcumin on head and neck carcinoma: a systematic review. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 3-20, 24 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12455>.

BORHADE, Namdev *et al.* NO-NSAIDs. Part 3: nitric oxide-releasing prodrugs of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 465-481, 2012. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.60.465>.

BRENNER, Dirk; BLASER, Heiko; MAK, Tak W. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 362-374, 26 maio 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3834>.

BROSTJAN, Christine; OEHLER, Rudolf. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. **Cell Death Discovery**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-8, 22 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-020-0255-6>.

BURN, Garth L. *et al.* The Neutrophil. **Immunity**, [S.L.], v. 54, n. 7, p. 1377-1391, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>.

CAPECE, Daria *et al.* NF- $\kappa$ B: blending metabolism, immunity, and inflammation. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 43, n. 9, p. 757-775, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2022.07.004>.

CAPRA, Valérie *et al.* Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1851, n. 4, p. 377-382, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.002>.

CÉSAR, Fernanda A. *et al.* New indole-thiazolidine attenuates atherosclerosis in LDLr<sup>-/-</sup> mice. **Vascular Pharmacology**, [S.L.], v. 71, p. 174-180, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.009>.

CHAN, Amy H.; SCHRODER, Kate. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 217, n. 1, p. 1-10, 14 out. 2019. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20190314>.

CHAN, Christina *et al.* Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. **Pharmacology Research & Perspectives**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 1-12, 29 set. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prp2.359>.

CHEN, Hong; BAI, Chunxue; WANG, Xiangdong. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine. **Expert Review Of Respiratory Medicine**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 773-783, dez. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/ers.10.71>.

CHEN, Kexin *et al.* Thiazole-based and thiazolidine-based protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors as potential anti-diabetes agents. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 519-534, 25 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-020-02668-4>.

CHEN, Linlin *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 14 dez. 2017. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.

CHEN, Xuxin *et al.* Macrophage polarization and its role in the pathogenesis of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 69, n. 9, p. 883-895, 10 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-020-01378-2>.

CHITRE, Trupti S. *et al.* Designing of Thiazolidin-4-one Pharmacophore using QSAR Studies for Anti-HIV Activity. **Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 581-589, 17 maio 2021. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.5530/ijper.55.2.97>.

CIESIELSKA, Anna; MATYJEK, Marta; KWIATKOWSKA, Katarzyna. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 78, n. 4, p. 1233-1261, 15 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y>.

CINELLI, Maris A. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. **Medicinal Research Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 158-189, 13 jun. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21599>.

COCHRAN, William G. The Combination of Estimates from Different Experiments. **Biometrics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 101-129, mar. 1954. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/3001666>.

COIN, Guillaume *et al.* Expedient Synthesis of 2-Iminothiazolidines via Telescoping Reactions Including Iron-Catalyzed Nitrene Transfer and Domino Ring-Opening Cyclization (DROC). **European Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 2021, n. 3, p. 443-448, 9 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.202001379>.

CUTOLO, Maurizio *et al.* The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 13, p. 1-14, 19 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.867260>.

D'HOOOGHE, Matthias; KIMPE, Norbert de. Synthetic approaches towards 2-iminothiazolidines: an overview. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 513-535, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2005.09.028>.

DAHIYA, Anjali; ALI, Wajid; PATEL, Bhisma K. Catalyst and Solvent Free Domino Ring Opening Cyclization: a greener and atom economic route to 2-iminothiazolidines. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 4272-4281, 3 fev. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04723>.

DALMARCO, Eduardo M. *et al.* Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 476-482, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.04.012>.

DENG, Chongyang *et al.* A Novel Small Molecule, (E)-5-(2,4-di-tert-butyl-6-((2,4-dioxothiazolidin-5-ylidene)methyl)phenyl)-5'-methyl-7,7'-dimethoxy-4,4'-bibenzo[d][1,3]dioxole-5,5'-dicarboxylate (7k), Alleviates the Development of d-



Galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Failure by Inhibiting Macrophage Infiltration and Regulating Cytokine Expression. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [S.L.], v. 341, n. 1, p. 146-155, 11 jan. 2012. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.11>

DENNIS, Edward A.; NORRIS, Paul C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 511-523, 3 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3859>.

DHADDA, Surbhi *et al.* Contemporary progress in the green synthesis of spirothiazolidines and their medicinal significance: a review. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 3723-3742, 2023. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d2ra07474e>.

DIRSCH, Verena; STUPPNER, Hermann; VOLLMAR, Angelika. The Griess Assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts?. **Planta Medica**, [S.L.], v. 64, n. 05, p. 423-426, jun. 1998. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-957473>.

ELKAMHAWY, Ahmed *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinedione derivatives as irreversible allosteric IKK- $\beta$  modulators. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 157, p. 691-704, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.020>.

ELKAMHAWY, Ahmed *et al.* Thiazolidine-2,4-dione-based irreversible allosteric IKK- $\beta$  kinase inhibitors: optimization into in vivo active anti-inflammatory agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 188, p. 1-16, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111955>.

FACCHIN, Bruno M. *et al.* Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 71, n. 7-8, p. 741-758, 25 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-022-01584-0>.

FAINE, Luciane A. *et al.* Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of a New Arylidene-Thiazolidinedione in Macrophages. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 22, p. 3351-3360, 1 ago. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986711796504600>.

FERREIRA, Misael *et al.* Diversity-Oriented Synthesis of 2-Iminothiazolidines: pushing the boundaries of the domino nucleophilic displacement/intramolecular anti-Michael addition process. **European Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 2022, n. 15, p. 1-10, 20 abr. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.202101562>.

FERREIRA, Misael. **Preparação de sais de isotiourônio a partir de brometos alílicos e tioureias**: avaliação da atividade antitumoral e aplicações na síntese de 2-iminotiazolidinas e derivados. 2015. 265 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

FERREIRA, Misael; SÁ, Marcus M. Formal [3+2] Annulation Involving Allylic Bromides and Thioureas. Synthesis of 2-Iminothiazolidines through a Base-Catalyzed intramolecular anti-Michael addition. **Advanced Synthesis & Catalysis**, [S.L.], v. 357, n. 4, p. 829-833, 23 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.201401026>.

FUNES, Samanta C. *et al.* Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, [S.L.], v. 154, n. 2, p. 186-195, 8 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12910>.

FURMAN, David *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 1822-1832, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>.

GABER, Timo; STREHL, Cindy; BUTTGEREIT, Frank. Metabolic regulation of inflammation. **Nature Reviews Rheumatology**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 267-279, 23 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2017.37>.

GANTNER, Benjamin N.; LAFOND, Katy M.; BONINI, Marcelo G. Nitric oxide in cellular adaptation and disease. **Redox Biology**, [S.L.], v. 34, p. 1-11, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2020.101550>.

GASTEIGER, Georg *et al.* Cellular Innate Immunity: an old game with new players. **Journal Of Innate Immunity**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 111-125, 23 dez. 2016. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000453397>.

GHAFOORI, Hossein; REZAEI, Mehrnaz; MOHAMMADI, Asadollah. Anti-inflammatory Effects of Novel Thiazolidinone Derivatives as Bioactive Heterocycles on RAW264.7 Cells. **Iranian Journal Of Allergy, Asthma And Immunology**, (S.L.), v. 1, n. 16, p. 1-11, fev. 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28417622>.

GIM, Hyo Jin; KANG, Bomi; JEON, Raok. Synthesis and biological activity of 5-(4-[2-(Methyl-p-substituted phenylamino)ethoxy]benzyl)thiazolidine-2,4-diones. **Archives Of Pharmacal Research**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1055-1061, set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02980237>.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 131-138, out. 1982. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-x](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-x).

GUSEV, Evgenii; ZHURAVLEVA, Yulia. Inflammation: a new look at an old problem. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 1-41, 21 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23094596>.

GUYATT, Gordon *et al.* GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. **Journal Of Clinical Epidemiology**, [S.L.], v. 64, n. 4, p. 383-394, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.04.026>.

HALL, Julie M.; MCDONNELL, Donald P. The Molecular Mechanisms Underlying the Proinflammatory Actions of Thiazolidinediones in Human Macrophages. **Molecular**

**Endocrinology**, [S.L.], v. 21, n. 8, p. 1756-1768, 1 ago. 2007. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2007-0060>.

HARTLEY, Janet W *et al.* Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. **Retrovirology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-6, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-4690-5-1>.

HASANZADEH, Farahnaz *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B Expression in LPS-Induced RAW264.7 Macrophage Cells by a Thiazolidinone Derivative (TZDOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). **Avicenna Journal Of Medical Biochemistry**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 48-53, 29 dez. 2021. Maad Rayan Publishing Company. <http://dx.doi.org/10.34172/ajmb.2021.09>.

HAVRYLYUK, Dmytro; ROMAN, Olexandra; LESYK, Roman. Synthetic approaches, structure activity relationship and biological applications for pharmacologically attractive pyrazole/pyrazoline–thiazolidine-based hybrids. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 113, p. 145-166, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.030>.

HEEB, Lukas E. M.; EGHOLM, Cecilie; BOYMAN, Onur. Evolution and function of interleukin-4 receptor signaling in adaptive immunity and neutrophils. **Genes & Immunity**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 143-149, 6 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41435-020-0095-7>.

HIGGINS, Julian *et al.* **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions**: version 6.4 (updated august 2023). [S.L.]: Cochrane, 2023. Disponível em: [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook). Acesso em: 13 mar. 2023.

HIRANO, Toshio. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International Immunology**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 127-148, 18 dez. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxaa078>.

HIRST, Theodore C. *et al.* Study protocol – A systematic review and meta-analysis of hypothermia in experimental traumatic brain injury: why have promising animal studies not been replicated in pragmatic clinical trials?. **Evidence-Based Preclinical Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 7-9, 18 out. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ebm2.20>.

HU, Jie *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 64, p. 292-301, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.010>.

JAIN, Viral S.; VORA, Dhagash K.; RAMAA, C.S. Thiazolidine-2,4-diones: progress towards multifarious applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 1599-1620, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.029>.



JIA, Xuejing *et al.* Flavonoids from *Rhynchosia minima* root exerts anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells via MAPK/ NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 289-297, 24 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-019-00632-2>.

KAMILOGLU, Senem *et al.* Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 332-349, set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fft2.44>.

KANG, Sujin *et al.* Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 217, n. 5, p. 1-10, 8 abr. 2020. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20190347>.

KANSO, Fatima *et al.* Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: a summary of in vitro/in vivo studies. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 96, p. 1-14, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107778>.

KANY, Shinwan; VOLLRATH, Jan Tilmann; RELJA, Borna. Cytokines in Inflammatory Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 23, p. 1-31, 28 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20236008>.

KASHFI, Khosrow; KANNIKAL, Jasmine; NATH, Niharika. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: role of inos-derived no. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 1-22, 16 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10113194>.

KAUR, Baljit; SINGH, Palwinder. Inflammation: biochemistry, cellular targets, anti-inflammatory agents and challenges with special emphasis on cyclooxygenase-2. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 121, p. 1-18, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105663>.

KHATUA, Somanjana; SIMAL-GANDARA, Jesus; ACHARYA, Krishnendu. Understanding immune-modulatory efficacy in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 352, p. 1-17, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109776>.

KLIMISCH, Hans J.; ANDREAE, M; TILLMANN, U. A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 1-5, fev. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/rtp.1996.1076>.

KNAPP, Sylvia. LPS and bacterial lung inflammation models. **Drug Discovery Today: Disease Models**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 113-118, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmod.2009.08.003>.

KOTAS, Maya E.; MEDZHITOV, Ruslan. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, [S.L.], v. 160, n. 5, p. 816-827, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.010>.

KOVACH, Melissa A.; STANDIFORD, Theodore J. Toll like receptors in diseases of the lung. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1399-1406, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.013>.

KRÓL, Magdalena; KEPINSKA, Marta. Human Nitric Oxide Synthase—Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 56, 23 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22010056>.

LEE, Jae-Won *et al.* The Role of Macrophages in the Development of Acute and Chronic Inflammatory Lung Diseases. **Cells**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-19, 14 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10040897>.

LI, Chunxiao *et al.* The immunostimulatory effect of novel immunostimulator CH2b with a thiazolidin-4-one ring on the functions of LPS-activated RAW 264.7 macrophages in vitro. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 698-703, nov. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.08.011>.

LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-24, 4 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>.

LIARAS, Konstantinos; FESATIDOU, Maria; GERONIKAKI, Athina. Thiazoles and Thiazolidinones as COX/LOX Inhibitors. **Molecules**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 685, 18 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23030685>.

LIND, Maggie *et al.* Inducible nitric oxide synthase: good or bad?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 93, p. 370-375, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>.

LIPINSKI, Christopher A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, [S.L.], v. 1, n. 4, p. 337-341, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.

LIPINSKI, Christopher A. Rule of five in 2015 and beyond: target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 101, p. 34-41, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.029>.

LIU, Chao *et al.* Cytokines: from clinical significance to quantification. **Advanced Science**, [S.L.], v. 8, n. 15, p. 1-29, 10 jun. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202004433>.

LIU, Yan-Cun *et al.* Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **International Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 520-529, 2014. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.8879>.

LOWRY, Oliverh. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 193, n. 1, p. 265-275, nov. 1951. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).

LUBSCHINSKI, Tainá L *et al.* Effect of Aryl-Cyclohexanones and their Derivatives on Macrophage Polarization In Vitro. **Inflammation**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 1612-1630, 5 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-022-01646-9>.

LUO, Youfu *et al.* Discovery of (Z)-5-(4-Methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione, a Readily Available and Orally Active Glitazone for the Treatment of Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury of BALB/c Mice. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 53, n. 1, p. 273-281, 11 nov. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm901183d>.

MA, Liang *et al.* Structural exploration, synthesis and pharmacological evaluation of novel 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione derivatives as iNOS inhibitors against inflammatory diseases. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 92, p. 178-190, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.036>.

MA, Liang *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Novel 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Derivatives for the. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 7, p. 2060-2068, 7 mar. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm1011534>.

MA, Xiaojing *et al.* Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research**, [S.L.], v. 4, p. 1-15, 17 dez. 2015. F1000 Research Ltd. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7010.1>.

MA, Yinghua *et al.* (Z)-5-(4-methoxybenzylidene) thiazolidine-2, 4-dione ameliorates the adjuvant-induced arthritis via inhibiting the migration of macrophage and down-regulating the cytokine mRNA expression. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 1456-1462, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.022>.

MADDIPATI, Krishna R. Non-inflammatory Physiology of “Inflammatory” Mediators – Unalamation, a New Paradigm. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-9, 7 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.580117>.

MAGHRABY, Mohammed T. E. *et al.* Novel class of benzimidazole-thiazole hybrids: the privileged scaffolds of potent anti-inflammatory activity with dual inhibition of cyclooxygenase and 15-lipoxygenase enzymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 115403, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115403>.

MANJAL, Sundeep K *et al.* Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones: a review. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 75, p. 406-423, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.014>.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 778-795, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.012>.

MATUTE-BELLO, Gustavo; FREVERT, Charles W.; MARTIN, Thomas R. Animal models of acute lung injury. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [S.L.], v. 295, n. 3, p. 379-399, set. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008>.

MAZGAEEN, Lalita; GURUNG, Prajwal. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 379, 7 jan. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21020379>.

MAZZETI, Ana L *et al.* Review on Experimental Treatment Strategies Against Trypanosoma cruzi. **Journal Of Experimental Pharmacology**, [S.L.], v. 13, p. 409-432, mar. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/jep.s267378>.

MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 771-776, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

MERLY, Liza; SMITH, Sylvia L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something?. **Immunopharmacology And Immunotoxicology**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 55-58, 2 fev. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08923973.2017.1282511>.

MILLER, Samuel I.; ERNST, Robert K.; BADER, Martin W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 36-46, jan. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1068>.

MILLS, Charles. M1 and M2 Macrophages: oracles of health and disease. **Critical Reviews In Immunology**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 463-488, 2012. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10>.

MINHAS, Richa; BANSAL, Yogita; BANSAL, Gulshan. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: a comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 823-855, 10 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21636>.

MIRLEKAR, Bhalchandra; PYLAYEVA-GUPTA, Yuliya. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. **Cancers**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 1-23, 6 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13020167>.

MISHRA, Chandra B.; KUMARI, Shikha; TIWARI, Manisha. Thiazole: a promising heterocycle for the development of potent cns active agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 92, p. 1-34, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.031>.

MOHR, Eduarda T. B. *et al.* Evidence That the Anti-Inflammatory Effect of Rubiadin-1-methyl Ether Has an Immunomodulatory Context. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.],

v. 2019, p. 1-12, 3 nov. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/6474168>.

MOHR, Eduarda T. B. *et al.* The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 2427-2439, 22 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-022-01084-x>.

MOREIRA, Thiago L. B. *et al.* Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 183-187, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.018>.

MORTAZ, Esmail *et al.* Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-14, 2 out. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02171>.

MUÑOZ, Joseph *et al.* Macrophage Polarization and Osteoporosis: a review. **Nutrients**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1-16, 30 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu12102999>.

MURRAY, Peter J. Macrophage Polarization. **Annual Review Of Physiology**, [S.L.], v. 79, n. 1, p. 541-566, 10 fev. 2017. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>.

NANJAN, Moola J. *et al.* Thiazolidinediones as antidiabetic agents: a critical review. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 77, p. 548-567, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.02.009>.

NARDO, Dominic de. Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, [S.L.], v. 74, n. 2, p. 181-189, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>.

NASCIMENTO, Marcus V. P. S. *et al.* New pre-clinical evidence of anti-inflammatory effect and safety of a substituted fluorophenyl imidazole. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 111, p. 1399-1407, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.052>.

NATHAN, Carl; DING, Aihao. Nonresolving Inflammation. **Cell**, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 871-882, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>.

NEWTON, Kim.; DIXIT, Vishva. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 1-20, 31 jan. 2012. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>.

NGUYEN, Khue G. *et al.* Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-36, 15 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.575597>.



NILES, Andrew L; A MORAVEC, Richard; RISS, Terry L. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 655-669, 22 maio 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.3.6.655>.

NOËL, Wim *et al.* Alternatively activated macrophages during parasite infections. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 126-133, mar. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.004>.

NOLAN, Tania; HANDS, Rebecca E; BUSTIN, Stephen A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 1559-1582, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.236>.

ORECCHIONI, Marco *et al.* Macrophage Polarization: different gene signatures in m1(lps+) vs. classically and m2(lps?) vs. alternatively activated macrophages. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-14, 24 maio 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>.

OTTANÀ, Rosaria *et al.* 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 13, p. 4243-4252, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.058>.

OTTANÁ, Rosaria *et al.* Modeling and biological evaluation of 3,3'-(1,2-ethanediyl)bis[2-(4-methoxyphenyl)-thiazolidin-4-one], a new synthetic cyclooxygenase-2 inhibitor. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 448, n. 1, p. 71-80, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01888-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01888-5).

PAGE, Matthew J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **International Journal Of Surgery**, [S.L.], v. 88, p. 1-9, abr. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2021.105906>.

PANIGRAHY, Dipak *et al.* Resolution of inflammation: an organizing principle in biology and medicine. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 227, p. 1-16, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107879>.

PARISI, Luca *et al.* Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: killers or builders?. **Journal Of Immunology Research**, [S.L.], v. 2018, p. 1-25, 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8917804>.

PARK, Cheol *et al.* The regulation of the TLR4/NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways is involved in the inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative reactions by morroniside in RAW 264.7 macrophages. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 706, p. 108926, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2021.108926>.

PAVAN, Ludmila M. C. *et al.* In vitro Anti-Tumor Effects of Statins on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: a systematic review. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 1-16,

22 jun. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0130476>.

PRABHAKAR, Yenamandra S. *et al.* **QSAR and Molecular Modeling Studies in Heterocyclic Drugs II**: qsar studies on thiazolidines: a biologically privileged scaffold. Berlim: Springer-Verlag, 2006. 298 p.

REUTERSHAN, Jörg *et al.* Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [S.L.], v. 289, n. 5, p. 807-815, nov. 2005. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00477.2004>.

REZAEI, Mehrnaz *et al.* Thiazolidinedione Derivative Suppresses LPS-induced COX-2 Expression and NO Production in RAW 264.7 Macrophages. **Iranian Journal Of Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 1371-1379, jul. 2019. School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. <http://dx.doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100730>.

RISIO, Luisa de *et al.* Recovering from depression with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **Translational Psychiatry**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-19, 10 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-020-01055-2>.

RISS, Terry *et al.* **Cytotoxicity assays**: in vitro methods to measure dead cells. [S.L.]: Assay Guidance Manual, 2019. 10 p. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK540958/>. Acesso em: 12 out. 2023.

RITTIRSCH, Daniel *et al.* Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide Is Independent of Complement Activation. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 180, n. 11, p. 7664-7672, 1 jun. 2008. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7664>.

ROSALES, Carlos. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types?. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 9, p. 1-17, 20 fev. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>.

ROSS, Ewan A.; DEVITT, Andrew; JOHNSON, Jill R. Macrophages: the good, the bad, and the glutony. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1-22, 12 ago. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>.

ROSSOL, Manuela *et al.* LPS-induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. **Critical Reviews™ In Immunology**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011. Begell House. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20>.

ROTH, Nicolas; ZILLIACUS, Johanna; BERONIUS, Anna. Development of the SciRAP Approach for Evaluating the Reliability and Relevance of in vitro Toxicity Data. **Frontiers In Toxicology**, [S.L.], v. 3, p. 1-13, 15 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/ftox.2021.746430>.

RUMZHUM, N. N.; AMMIT, A. J. Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation. **Clinical & Experimental Allergy**, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 397-410, 24 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cea.12697>.

SAHIBA, Nusrat *et al.* Saturated Five-Membered Thiazolidines and Their Derivatives: from synthesis to biological applications. **Topics In Current Chemistry**, [S.L.], v. 378, n. 2, p. 1-90, 23 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s41061-020-0298-4>.

SALERON, L. *et al.* Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 177-200, 1 fev. 2002. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612023396375>.

SAMALA, Ganesh *et al.* Synthesis and antitubercular evaluation of 2-iminothiazolidine-4-ones. **European Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 550-556, 30 set. 2014. European Journal of Chemistry. <http://dx.doi.org/10.5155/eurjchem.5.3.550-556.1059>.

SANTESSO, Nancy *et al.* GRADE guidelines 26: informative statements to communicate the findings of systematic reviews of interventions. **Journal Of Clinical Epidemiology**, [S.L.], v. 119, p. 126-135, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2019.10.014>.

SANTIN, José R. *et al.* Role of an indole-thiazolidiene PPAR pan ligand on actions elicited by G-protein coupled receptor activated neutrophils. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 105, p. 947-955, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.056>.

SANTIN, José R. *et al.* Role of an Indole-Thiazolidine Molecule PPAR Pan-Agonist and COX Inhibitor on Inflammation and Microcirculatory Damage in Acute Gastric Lesions. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 1-13, 4 out. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076894>.

SANTOS, Laise A. M. *et al.* New thiazolidinedione LPSF/GQ-2 inhibits NF- $\kappa$ B and MAPK activation in LPS-induced acute lung inflammation. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 57, p. 91-101, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2018.02.011>.

SATO, Keisuke; TATSUNAMI, Ryosuke; WAKAME, Koji. Epalrestat suppresses inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. **Allergologia Et Immunopathologia**, [S.L.], v. 49, n. 5, p. 1-8, 1 set. 2021. Codon Publications. <http://dx.doi.org/10.15586/aei.v49i5.102>.

SAVA, Alexandru *et al.* New nitric oxide-releasing indomethacin derivatives with 1,3-thiazolidine-4-one scaffold: design, synthesis, in silico and in vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 139, p. 1-21, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111678>.

SEBAUGH, Jeanne. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 128-134, mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/pst.426>.



SERHAN, Charles N. *et al.* The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). **Molecular Aspects Of Medicine**, [S.L.], v. 74, p. 100894, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2020.100894>.

SHANKARAN, Kothandaraman *et al.* Evaluation of pyrrolidin-2-imines and 1,3-thiazolidin-2-imines as inhibitors of nitric oxide synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 14, n. 17, p. 4539-4544, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.06.033>.

SILVA JÚNIOR, José N. *et al.* Do thiazolidine compounds act on intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*? A systematic review. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 38611326531, 28 fev. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26531>.

SINGH, Sanjiv; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V.. MCP-1: function, regulation, and involvement in disease. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 101, p. 1-10, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>.

SIPAHI, Emine Y.; ATALAY, Figen. Experimental Models of Acute Lung Injury. **Eurasian Journal Of Pulmonology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 69-77, 2 set. 2014. Kare Publishing. <http://dx.doi.org/10.5152/ejp.2014.49091>.

SOUZA, Paula M. *et al.* Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: a systematic review. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, [S.L.], v. 120, p. 194-202, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.006>.

SPILLER, Fernando *et al.* Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 89, p. 32-40, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.011>.

STEEN, Emily H. *et al.* The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. **Advances In Wound Care**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 184-198, 1 abr. 2020. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/wound.2019.1032>.

STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols In Immunology**, [S.L.], v. 111, n. 1, p. 1-3, nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.

STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols In Immunology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-3, mar. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.

STUEHR, Dennis J; HAQUE, Mohammad Mahfuzul. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 176, n. 2, p. 177-188, 9 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14533>.

SU, Deyuan *et al.* Thiazolidine reacts with thioreactive biomolecules. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 104, p. 272-279, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.032>.

SUDO, Kenji *et al.* Novel Hepatitis C Virus Protease Inhibitors: thiazolidine derivatives. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 238, n. 2, p. 643-647, set. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.7358>.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 40, n. 3, p. 212-227, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2019.01.007>.

SWEENEY, Ryan P; LOWARY, Todd L. New insights into lipopolysaccharide assembly and export. **Current Opinion In Chemical Biology**, [S.L.], v. 53, p. 37-43, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.07.004>.

TACIAK, Bartłomiej *et al.* Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 1-13, 11 jun. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>.

TAKIGUCHI, Hiroto *et al.* Macrophages with reduced expressions of classical M1 and M2 surface markers in human bronchoalveolar lavage fluid exhibit pro-inflammatory gene signatures. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8282, n. 11, p. 1-11, 15 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-87720-y>.

TANAKA, Tokuji *et al.* Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  for monocyte recruitment and endothelial regeneration. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 508, n. 1-3, p. 255-265, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.10.056>.

TANG, Patrick M-K.; NIKOLIC-PATERSON, David J.; LAN, Hui-Yao. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 144-158, 28 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-019-0110-2>.

TANG, Yu; LE, Weidong. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 53, n. 2, p. 1181-1194, 20 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>.

THOMPSON, Aiysha; ORR, Selinda J. Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. **Cytokine**, [S.L.], v. 111, p. 398-407, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2018.05.019>.

TU, Zhaoxu *et al.* Design of therapeutic biomaterials to control inflammation. **Nature Reviews Materials**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 557-574, 28 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41578-022-00426-z>.

UCIECHOWSKI, Peter; DEMPKE, Wolfram C.M. Interleukin-6: a masterplayer in the cytokine network. **Oncology**, [S.L.], v. 98, n. 3, p. 131-137, 2020. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000505099>.

UEDA, Shigeo *et al.* 4,5-Dialkylsubstituted 2-imino-1,3-thiazolidine derivatives as potent inducible nitric oxide synthase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 15, p. 4101-4116, 1 ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.05.031>.

VAN LOO, Geert; BERTRAND, Mathieu J. M. Death by TNF: a road to inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 23, n. 5, p. 289-303, 15 nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-022-00792-3>.

VARELA, Miguel L. *et al.* Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 1115-1127, 5 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>.

VASINCU, Ioana M. *et al.* New ibuprofen derivatives with thiazolidine-4-one scaffold with improved pharmaco-toxicological profile. **Bmc Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-9, 4 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40360-021-00475-0>.

VIECHTBAUER, Wolfgang. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. **Journal Of Statistical Software**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 1-48, 2010. Foundation for Open Access Statistics. <http://dx.doi.org/10.18637/jss.v036.i03>.

VIGORITA, Maria G. *et al.* Chiral 3,3'-(1,2-Ethanediylo)-bis[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-thiazolidinones] with anti-inflammatory activity. Part 11: evaluation of cox-2 selectivity and modelling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 999-1006, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896\(02\)00518-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896(02)00518-7).

WANG, Fang *et al.* Design, synthesis and anti-inflammatory evaluation of novel 5-benzylidene-3,4-dihalo-furan-2-one derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 72, p. 35-45, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.074>.

WANG, Guangcheng *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel dimethyl[1,1'-biphenyl]-2,2'-dicarboxylate derivatives containing thiazolidine-2,4-dione for the treatment of concanavalin A-induced acute liver injury of BALB/c mice. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 46, n. 12, p. 5941-5948, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.10.005>.

WATANABE, Satoshi *et al.* The role of macrophages in the resolution of inflammation. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 129, n. 7, p. 2619-2628, 20 maio 2019. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci124615>.

WAUTIER, Jean-Luc; WAUTIER, Marie-Paule. Pro- and Anti-Inflammatory Prostaglandins and Cytokines in Humans: a mini review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 9647, 1 jun. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24119647>.

WCULEK, Stefanie K. *et al.* Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 384-408, 7 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-021-00791-9>.

WEEKS, Beverly A. *et al.* Differential uptake of neutral red by macrophages from three species of estuarine fish. **Developmental & Comparative Immunology**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 117-124, dez. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0145-305x\(87\)90013-9](http://dx.doi.org/10.1016/0145-305x(87)90013-9).

XIE, Caifeng *et al.* Protective effect of SKLB010 against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure via nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in macrophages. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 261-268, ago. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.05.012>.

YANG, Y *et al.* The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. **Cell Death & Disease**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 1-10, 26 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.140>.

YAO, Yongli; XU, Xiang-Hong; JIN, Liping. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1-13, 15 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>.

YUKI, Koichi; KOUTSOGIANNAKI, Sophia. Pattern recognition receptors as therapeutic targets for bacterial, viral and fungal sepsis. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 98, p. 107909, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107909>.

YUNNA, Chen *et al.* Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 877, p. 1-9, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.

ZAHÍÑOS, Emílio V. **Capacidad coordinante de ligandos derivados de 2-tiazolina e hidrazona frente a iones metálicos de transición**. 2007. 444 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Químicas, Universidad de Extremadura, Extremadura, 2007.

ZHANG, Qian; LENARDO, Michael J.; BALTIMORE, David. 30 Years of NF- $\kappa$ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. **Cell**, [S.L.], v. 168, n. 1-2, p. 37-57, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>.

ZHANG, Qiu *et al.* Natural Product-Inspired Synthesis of Thiazolidine and Thiazolidinone Compounds and their Anticancer Activities. **Current Pharmaceutical Design**, [S.L.], v. 16, n. 16, p. 1826-1842, 1 jun. 2010. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138161210791208983>.

ZHANG, Yongsheng *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: current research and prospective. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 235, p. 114291, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114291>.

ZHAO, Min *et al.* Anti-inflammatory Ellagitannins from *Cleidion brevipetiolatum* for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 82, n. 9, p. 2409-2418, 16 ago. 2019. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00984>.

ZINDEL, Joel; KUBES, Paul. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 493-518, 24 jan. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>.

## APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO 2

Tabela suplementar 1- Estratégias de pesquisa com palavras-chave apropriadas e termos MeSH.

Bases de dados (13/03/2023)	Estratégia de busca
Cochrane Library	"thiazolidines" OR "thiazolidine" OR "thiazolidin" OR "thiazoline" OR "thiazolin" AND "mice" OR "mouse" OR "macrophages" OR "cell culture" OR "in vitro" OR "in vivo"
Embase	('thiazolidines'/exp OR thiazolidines OR 'thiazolidine'/exp OR thiazolidine OR thiazolidin OR 'thiazoline'/exp OR thiazoline OR thiazolin) AND ('mice'/exp OR mice OR 'mouse'/exp OR mouse OR 'macrophages'/exp OR macrophages OR 'cell culture'/exp OR 'cell culture' OR 'in vitro'/exp OR 'in vitro' OR 'in vivo'/exp OR 'in vivo')
LILACS	((thiazolidines OR thiazolidine OR thiazolidin OR thiazoline OR thiazolin OR thiazolidinas OR thiazolidina OR thiazolinas)) AND ((mice OR mouse OR camundongos OR ratones OR mus musculus OR macrophages OR macrófagos OR "cell culture" OR "in vivo" OR "in vitro"))
Livivo	"thiazolidines" OR "thiazolidine" OR "thiazolidin" OR "thiazoline" OR "thiazolin" AND "mice" OR "mouse" OR "macrophages" OR "cell culture" OR "in vitro" OR "in vivo"
PubMed/MEDLINE	("thiazolidines"[MeSH Terms] OR "thiazolidine"[All Fields] OR "thiazolidin"[All Fields] OR "thiazoline"[All Fields] OR "thiazolin"[All Fields]) AND ("mice"[All Fields] OR "mouse"[All Fields] OR "macrophages"[All Fields] OR "cell culture"[MeSH Terms] OR "in vitro"[All Fields] OR "in vivo"[All Fields])
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (thiazolidines OR thiazolidine OR thiazolidin OR thiazoline OR thiazolin)) AND (TITLE-ABS-KEY (mice OR mouse OR macrophages OR "cell culture" OR "in vitro" OR "in vivo"))
Web of Science	(thiazolidines OR thiazolidine OR thiazolidin OR thiazoline OR thiazolin) AND (mice OR mouse OR macrophages OR "cell culture" OR "in vitro" OR "in vivo")
Google Scholar	(thiazolidine OR thiazoline OR thiazolin) AND (mice OR macrophage OR cell culture)

Tabela suplementar 1. Estratégia de busca conduzida para cada base de dados e literatura cinzenta (Google Scholar). Cada estratégia foi adaptada partindo da chave de busca para o PubMed/MEDLINE

Tabela suplementar 2- Artigos excluídos e motivos da exclusão

Autor; Ano	Razão para exclusão	Autor; Ano	Razão para exclusão
Abdelazeem; Salama; Maghrabi, 2015	1	Kumar; Chandra; Garg, 2009	1
Abdellatif <i>et al.</i> , 2016	1	Ma <i>et al.</i> , 2011	3
Abdu-Allah <i>et al.</i> , 2020	1	Maccari <i>et al.</i> , 2014	1
Abdullah <i>et al.</i> , 2020	1	Mahendran <i>et al.</i> , 2011	1
Ali <i>et al.</i> , 2016	3	Mangasuli; Managutti; Hosamani, 2020	1
Apotrosoaei <i>et al.</i> , 2014	1	Marri <i>et al.</i> , 2019	1
Asrondkar <i>et al.</i> , 2013	1	Mezei <i>et al.</i> , 2003	2
Balaji; Ranganayakulu; Reddy, 2017	6	Ming <i>et al.</i> , 2014	1
Bansal <i>et al.</i> , 2019	1	Mohr <i>et al.</i> , 2022	3
Barros <i>et al.</i> , 2010	1	Mroueh <i>et al.</i> , 2020	1
Bhati; Kumar, 2008	1	Mudgal <i>et al.</i> , 2014	3
César, 2013	5	Nikalje, 2014	5
César <i>et al.</i> , 2012	6	Omar; Abdu-Allah, Abdel-Moty, 2018	1
Chandra; Garg; Kumar, 2010	1	Ottanà <i>et al.</i> , 2017	1
Chaviara <i>et al.</i> , 2005	1	Ottanà <i>et al.</i> , 2005	1
Eleftheriou <i>et al.</i> , 2012	1	Pathak <i>et al.</i> , 2019	1
Elgohary; Hassan; Abass, 2011	1	Radulovic <i>et al.</i> , 2017	1
Elkamhawy <i>et al.</i> , 2018	3	Radhika; Venkatesham; Krishna, 2014	6
Elzahhar <i>et al.</i> , 2019	1	Radwan <i>et al.</i> , 2007	1
Faidallah; Rostom, 2017	1	Riboldi; Gerosa; Meroni 2009	5
Fathalla <i>et al.</i> , 2009	1	Sahoo <i>et al.</i> , 2015	1
Fayed <i>et al.</i> , 2022	1	Sava <i>et al.</i> , 2021	1
Gim, Kang; Jeon, 2007	3	Sharma <i>et al.</i> , 2006	1
Gullapelli; Maroju; Merugu, 2021	1	Shim <i>et al.</i> , 2020	2
Hu <i>et al.</i> , 2013	4	Silva <i>et al.</i> , 2014	6
Hu <i>et al.</i> , 2014	1	Tageldin <i>et al.</i> , 2018	1
Inagaki, 2003	1	Uchôa <i>et al.</i> , 2009	3
Jadhav <i>et al.</i> , 2016	6	Ueda <i>et al.</i> , 2004	3
Jaismy; Manju, 2021	3	Uwabagira; Sarojini, 2019	1
Kadry, 2014	1	Vigorita <i>et al.</i> , 1994	6
Kakarla <i>et al.</i> , 2016	1	Villa <i>et al.</i> , 2016	1
Kalia; Rao; Kutty, 2007	6	Yang <i>et al.</i> , 2022	2
Kamachi <i>et al.</i> , 2007	2	Youssef <i>et al.</i> , 2009	1
Khillare <i>et al.</i> , 2017	6	Zarghi <i>et al.</i> , 2010	1
Kim; Son, 2012	2	Zarghi <i>et al.</i> , 2007	1
Kumar <i>et al.</i> , 2003	1		

Tabela suplementar 2. Razões para exclusão 1) Estudos *in vitro* que não utilizaram macrófagos da linhagem RAW 264.7 induzidos por LPS (n = 45); 2) ): Estudos que não avaliaram a atividade anti-inflamatória de derivados das tiazolidinas (n = 5); 3) Estudos sem grupo controle inflamado por LPS (n = 8); 4) Estudos que não realizaram a mensuração de NO (n = 1); 5) Revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livro, conferências, teses e dissertações, estudos *in vivo*, *in silico* ou estudos clínicos (n = 3); 6) artigos completos não disponíveis (n = 8).



Tabela suplementar 3- Avaliação da qualidade de relatórios para os estudos incluídos (n = 13) (SciRAP)

Qualidade de relatórios		Referências												
Compostos e Controles	Domínios	Alleva <i>et al.</i> , 2002	Cesar <i>et al.</i> , 2015	Deng <i>et al.</i> , 2012	Elkamdawy <i>et al.</i> , 2020	Faine <i>et al.</i> , 2011	Ghafoori <i>et al.</i> , 2017	Li <i>et al.</i> , 2013	Ma <i>et al.</i> , 2010	Ma <i>et al.</i> , 2015	Rezaei <i>et al.</i> , 2019	Sato <i>et al.</i> , 2021	Wang <i>et al.</i> , 2011	Xie <i>et al.</i> , 2014
Q1	ID do Microrganismo	C	C	C	C	NC	CP	CP	C	C	C	CP	NC	CP
Q2	Pureza do composto teste	C	C	C	C	C	C	CP	C	C	CP	NC	C	C
Q3	Descrição do veículo	C	NC	C	NC	NC	NC	NC	C	NC	C	NC	NC	C
Q4	Controle não tratado	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Sistema de Teste														
Q5	Sistema de teste	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	CP	C
Q6	Origem do sistema teste	C	NC	C	C	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	C
Q7	Viabilidade Celular	CP	C	C	C	C	C	NC	NC	C	C	C	NC	NC
Q8	Número de passagens	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Q9	Composição do meio de cultura	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	CP	C
Q10	Incubação	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q11	Contaminação por Micoplasma	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	CP	NC	NC	NC	NC	NC
Administração do composto testado														
Q12	Doses	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q13	Densidade Celular	C	NC	C	NC	NC	C	C	C	C	C	NC	C	C
Q14	Duração do tratamento	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q15	Número de replicatas	C	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Resultados e Análises														
Q16	Métodos analíticos	CP	CP	C	C	C	C	C	C	NC	C	NC	C	C
Q17	Resultados obtidos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q18	Citotoxicidade do composto	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	C	C	C	NC	NC
Q19	Clareza dos resultados	NC	C	C	C	C	C	C	CP	NC	NC	C	C	C
Q20	Análise estatística	NC	C	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	NC	CP
Financiamentos e Conflitos de interesse														



Q21	Financiamento	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C
Q22	Conflito de interesses	NC	NC	C	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC	C	NC	NC
<b>Pontuação (% “cumpriu”)</b>		<b>50,0</b>	<b>70,5</b>	<b>90,9</b>	<b>68,2</b>	<b>68,2</b>	<b>75,0</b>	<b>77,3</b>	<b>72,7</b>	<b>72,7</b>	<b>79,5</b>	<b>65,9</b>	<b>50,0</b>	<b>72,7</b>
<b>JULGAMENTO FINAL</b>		<b>B</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>B</b>	<b>A</b>

Tabela suplementar 3. Perguntas = Q; Q1: O nome do microrganismo, ID ou número CAS do LPS foi fornecido?; Q2: A pureza do composto de teste foi declarada ou é rastreável de acordo com as informações fornecidas sobre o fabricante e o número do lote?; Q3: O veículo foi descrito (solução salina, por exemplo)?; Q4: Foi incluído um controle sem tratamento ou com veículo; Q5: O sistema de teste (linha celular/células/tecido/órgão/embrião) foi descrito?; Q6: A fonte do sistema de teste foi declarada?; Q7: A viabilidade celular do sistema teste foi descrita?; Q8: Foi indicado o número de passagens celulares da linhagem celular utilizada?; Q9: A composição dos meios foi descrita, incluindo uso de soro, antibióticos?; Q10: Foram descritas temperatura de incubação, umidade e concentração de CO<sub>2</sub>?; Q11: Foram descritas medidas tomadas para evitar ou rastrear contaminação por micoplasma, bactérias, fungos e vírus?; Q12: Os níveis ou concentrações de dose administrada foram indicados?; Q13: Foi descrita a densidade celular ou número de células utilizadas durante o tratamento?; Q14: A duração do tratamento foi informada?; Q15: Foi indicado o número de repetições por nível/concentração de dose ou o número de vezes que o experimento foi repetido?; Q16: Os testes e/ou métodos analíticos utilizados foram suficientemente descritos para permitir a avaliação da confiabilidade dos resultados?; Q17: Os momentos para coleta de dados foram informados?; Q18: Foi realizado o teste de citotoxicidade do composto analisado?; Q19: Todos os resultados foram apresentados de forma clara?; Q20: Foram descritos os métodos estatísticos e *softwares* utilizados?; Q21: Foram indicadas as fontes de financiamento do estudo?; Q22: Foram divulgados quaisquer conflitos de interesse? Respostas = C: Cumprida; NC: Não Cumprida; CP: Cumpriu parcialmente; ND: Não determinado; NA: Não aplicado. Julgamento Final = M: Qualidade moderada do relatório; A: Alta qualidade de relatórios, B: Baixa qualidade de relatórios.

Tabela suplementar 4- Avaliação da qualidade metodológica para os estudos incluídos (n = 13) (SciRAP)

Qualidade metodológica		Referências												
Compostos e Controles	Domínios	Alleva et al. 2002	Cesar et al. 2015	Deng et al, 2012	Elkamhawy et al. 2020	Faine et al. 2011	Ghafoori et al. 2017	Li et al. 2013	Ma et al. 2010	Ma et al. 2015	Rezaei et al. 2019	Sato et al. 2021	Wang et al. 2011	Xie et al. 2014
Q1	Solubilidade do composto	C	NC	C	NC	NC	NC	NC	C	NC	NC	NC	NC	C
Q2	Veículo apropriado	C	NC	C	NC	NC	NC	NC	C	NC	C	NC	NC	C
Q3	Controle não tratado	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Sistema teste														
Q4	Sistema de teste confiável e sensível	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q5	Condições da cultura	CP	CP	CP	CP	CP	CP	C	CP	CP	CP	CP	CP	CP
Administração do composto teste														
Q6	Duração da exposição	C	NC	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q7	Concentrações utilizadas	C	C	C	C	C	C	NC	NC	C	C	NC	C	NC
Q8	Condições do sistema teste durante a exposição	C	C	C	C	CP	C	C	C	CP	C	CP	CP	CP
Resultados e análises														
Q9	Métodos analíticos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	NC	C	C
Q10	Resultados obtidos	C	C	C	NC	C	C	C	NC	C	C	C	C	C
Q11	Citotoxicidade do composto	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Q12	Clareza dos resultados	NC	C	C	C	C	C	NC	NC	C	NC	C	NC	NC
Q13	Análise estatística	NC	C	CP	NC	C	C	C	C	C	C	C	NC	CP
<b>Pontuação (% “cumpriu”)</b>		<b>76,9</b>	<b>76,9</b>	<b>100</b>	<b>69,2</b>	<b>84,6</b>	<b>84,6</b>	<b>69,2</b>	<b>76,9</b>	<b>84,6</b>	<b>92,3</b>	<b>76,9</b>	<b>69,2</b>	<b>84,6</b>
<b>Julgamento Final</b>		<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>A</b>

Perguntas = Q; Q1: O composto teste é solúvel nas concentrações testadas?; Q2: Foi utilizado um veículo apropriado que não interfira nos resultados do estudo?; Q3: Foi incluído um controle sem tratamento ou com veículo?; Q4: Foi utilizado um sistema de teste confiável e sensível (linhagem celular/células/tecido/órgão/embrião) com competência metabólica e relevante para investigar o composto de teste e os parâmetros analisados?; Q5: As condições de cultivo e/ou manutenção da linhagem celular/células/tecido/órgão/embrião (temperatura de incubação, umidade, concentração de CO2, meio utilizado, número de passagens celulares, controle de contaminação) foram adequadas?; Q6: A duração da exposição foi adequada ao sistema de teste e

aos parâmetros investigados; Q7: As concentrações utilizadas foram adequadas para o sistema de teste e *endpoints* investigados?; Q8: As condições do sistema teste durante e após a exposição ao composto foram adequadas (meio de cultura e soro utilizados, densidade celular, temperatura de incubação, umidade, concentração de CO<sub>2</sub>)?; Q9: Foram utilizados testes e/ou métodos analíticos confiáveis e sensíveis para investigar os parâmetros?; Q10: Foram realizados números suficientes de repetições do experimento para gerar resultados confiáveis e válidos (mínimo de três experimentos independentes)?; Q11: As medições foram coletadas em momentos adequados para gerar dados sensíveis?; Q12: A citotoxicidade foi medida e o composto de teste não causou citotoxicidade que afetasse significativamente os resultados?; Q13: Os métodos estatísticos foram claramente descritos e não parecem inadequados, incomuns ou desconhecidos? Respostas = C: Cumprida; NC: Não Cumprida; CP: Cumpriu Parcialmente; ND: Não determinado; NA: Não aplicado.

Julgamento Final = M: Qualidade metodológica moderada; A: Alta qualidade metodológica, B: Baixa qualidade metodológica

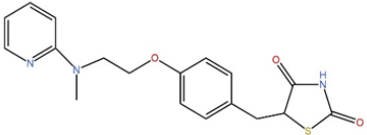
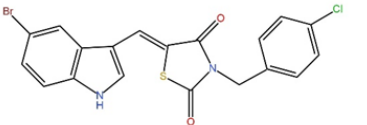
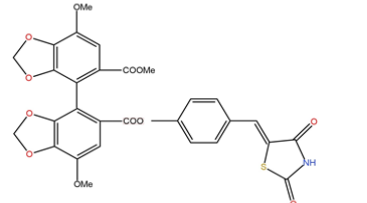
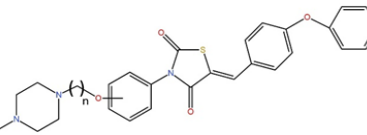
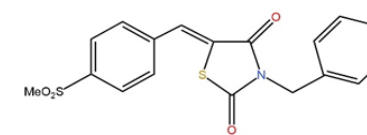
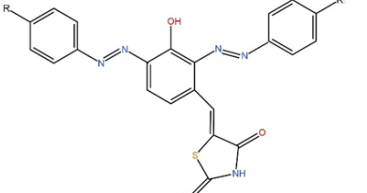
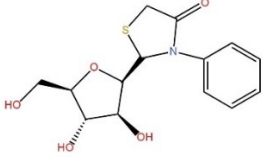
Tabela suplementar 5- Relevância dos estudos incluídos (n = 13) (SciRAP)

Relevância		Referências												
Critério	Avaliação	Alleva <i>et al.</i> , 2002	César <i>et al.</i> , 2015	Deng <i>et al.</i> , 2012	Elkamhawy <i>et al.</i> , 2020	Faine <i>et al.</i> , 2011	Ghafoori <i>et al.</i> , 2017	Li <i>et al.</i> , 2013	Ma <i>et al.</i> , 2010	Ma <i>et al.</i> , 2015	Rezaei <i>et al.</i> , 2019	Sato <i>et al.</i> , 2021	Wang <i>et al.</i> , 2011	Xie <i>et al.</i> , 2014
1	Identificação da substância teste	DR	DR	DR	DR	DR	IR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR
2	Sistema de teste utilizado	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR
3	Endpoints avaliados	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR	DR
4	Concentrações utilizadas	IR	DR	DR	DR	DR	DR	IR	IR	DR	DR	DR	IR	IR
Relevância														
<b>JULGAMENTO FINAL</b>		<b>RR2</b>	<b>RR1</b>	<b>RR1</b>	<b>RR1</b>	<b>RR1</b>	<b>RR2</b>	<b>RR2</b>	<b>RR2</b>	<b>RR1</b>	<b>RR1</b>	<b>RR1</b>	<b>RR2</b>	<b>RR2</b>

Tabela suplementar 5. Respostas para Relevância = ND: Não Determinado; DR: Diretamente Relevante; RI: Indiretamente Relevante; NO: Não relevante.

Respostas para o julgamento final = RR1: Relevante sem restrições; RR2: Relevante com restrições; NO: Não relevante.

Tabela suplementar 6- Estruturas moleculares os compostos derivados das tiazolidinas avaliados durante a meta-análise (n = 13)

Estudos	Estrutura Molecular	Densidade Celular (células/poço)
Allea <i>et al.</i> , 2002		2x10 <sup>5</sup>
César <i>et al.</i> , 2015		Não reportado
Deng <i>et al.</i> , 2012		1x10 <sup>5</sup>
Elkamhawy <i>et al.</i> , 2020		Não reportado
Faine <i>et al.</i> , 2011		Não reportado
Ghafoori <i>et al.</i> , 2017 <sup>a,b</sup>		1x10 <sup>5</sup>
Li <i>et al.</i> , 2013		5x10 <sup>5</sup>

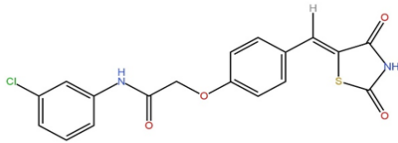
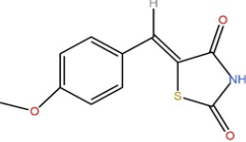
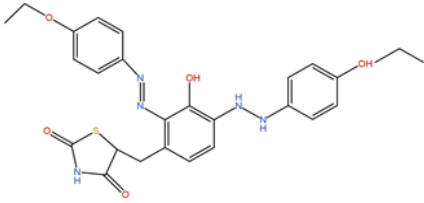
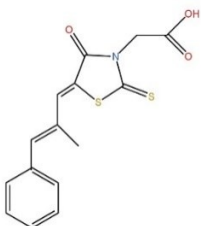
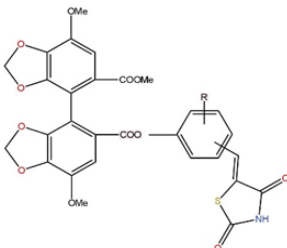
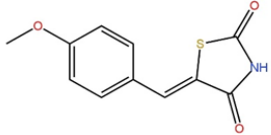
Ma <i>et al.</i> , 2015		1x10 <sup>4</sup>
Ma <i>et al.</i> , 2010		2x10 <sup>4</sup>
Rezaei <i>et al.</i> , 2019 <sup>b</sup>		5x10 <sup>3</sup>
Sato <i>et al.</i> , 2021		Não reportado
Wang <i>et al.</i> , 2011		1x10 <sup>4</sup>
Xie <i>et al.</i> , 2014		1x10 <sup>5</sup>

Tabela suplementar 6. Estrutura molecular dos compostos derivados das tiazolidinas incluídos no estudo (n = 13). César *et al.*, 2015; Elkamhawy *et al.*, 2020; Faine *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2021 não relataram a densidade celular (população) dos macrófagos RAW 264.7 induzidos por LPS e foram excluídos da meta-análise. <sup>a</sup>após avaliação da estrutura a *expert* (BGMB) considerou o composto como tiazolidinedionas; <sup>b</sup>os estudos considerados *outliers* e excluídos da segunda meta-análise.

**APÊNDICE B – REFERÊNCIAS SUPLEMENTARES DO CAPÍTULO 2**

ABDELAZEEM, Ahmed H.; SALAMA, Samir A.; MAGHRABI, Ibrahim A. Design, Synthesis, and Anti-Inflammatory Evaluation of Novel Diphenylthiazole–Thiazolidinone Hybrids. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 348, n. 7, p. 518-530, 18 maio 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201500104>.

ABDELLATIF, Khaled R.A. *et al.* Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 64, p. 1-12, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.11.001>.

ABDU-ALLAH, Hajjaj H.M. *et al.* Conjugation of 4-aminosalicylate with thiazolinones afforded non-cytotoxic potent in vitro and in vi. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 94, p. 1-10, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103378>.

ABDULLAHA, Mohd *et al.* Discovery of benzo[cd]indol-2-one and benzylidene-thiazolidine-2,4-dione as new classes of NLRP3 inflammasome inhibitors via ER-? structure based virtual screening. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 95, p. 1-7, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103500>.

ALI, Yakub *et al.* Molecular modeling and synthesis of some new 2-imino-4-thiazolidinone derivatives with promising TNF. **New Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 711-723, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5nj00078e>.

APOTROSOAEI, Maria *et al.* Design, Synthesis and the Biological Evaluation of New 1,3-Thiazolidine-4-ones Based on the 4-Amino. **Molecules**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 13824-13847, 4 set. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules190913824>.

ASRONDKAR, Ashish L. *et al.* Synthesis and study of (5Z)-5-[(4-oxo-4H-chromen-3-yl) methylidene]-1, 3- thiazolidine-2, 4-dione d. **Der Pharma Chemica**, (S.L.), v. 4, n. 5, p. 288-292, jan. 2013.

BANSAL, Garima *et al.* Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2,4-dione-pyrazole conjugates as antidiabetic, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 92, p. 1-16, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103271>.

BARROS, Cleiton D. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR? ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 3805-3811, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.045>.

BHATI, Sudhir K.; KUMAR, Ashok. Synthesis of new substituted azetidinoyl and thiazolidinoyl-1,3,4-thiadiazino (6,5-b) indoles as pro. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 43, n. 11, p. 2323-2330, nov. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.10.012>.

CÉSAR, Fernanda A. *et al.* Anti-atherogenic and anti-inflammatory effects of novel thiazolidine-2,4-diones in RAW 264.7 macrophages and in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Vascular Pharmacology**, [S.L.], v. 56, n. 5-6, p. 371, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2011.08.177>.

CÉSAR, Fernanda A. **Propriedades antiaterogênicas de novas tiazolidino-2, 4-dionas**. 2013. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CHANDRA, Trilok; GARG, Neha; KUMAR, Ashok. Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Indole Derivatives. **International Journal Of Chemtech Research**, (S.L.), v. 2, n. 2, p. 762-773, abr. 2010.

CHAVIARA, A. T. *et al.* In vivo anticancer, anti-inflammatory, and toxicity studies of mixed-ligand Cu(II) complexes of dien. **Journal Of Inorganic Biochemistry**, [S.L.], v. 99, n. 11, p. 2102-2109, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.07.011>.

ELEFTHERIOU, Phaedra *et al.* Fragment-based design, docking, synthesis, biological evaluation and structure–activity relationships of 2-benzo/benzisothiazolimino-5-aryliden-4-thiazolidinones as cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitors. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 47, p. 111-124, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.10.029>.

ELGOHARY, Ayman M. F.; HASSAN, Mohamed M.; ABASS, Mohamed. Synthesis of some quinazolin-4-one derivatives carrying ibuprofenyl moiety and their antiinflammator. **Der Pharma Chemica**, (S.L), v. 3, n. 3, p. 1-12, jan. 2011.

ELKAMHAWY, Ahmed *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinedione derivatives as irreversible allosteric IKK- $\gamma$  modulators. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 157, p. 691-704, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.020>.

ELZAHHAR, Perihan A. *et al.* Shooting three inflammatory targets with a single bullet: novel multi-targeting anti-inflammatory glitazones. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 167, p. 562-582, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.034>.

FAIDALLAH, Hassan M.; ROSTOM, Sherif A. F. Synthesis, Anti-Inflammatory Activity, and COX-1/2 Inhibition Profile of Some Novel Non-Acidic Polys. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 350, n. 5, p. 1-17, 28 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201700025>.

FATHALLA, Omar A. E-F. M. *et al.* Synthesis of novel tetrahydronaphthalen-2-yl heterocycles for analgesic, anti-inflammatory and antipyretic evaluation. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, (S.L), v. 3, n. 66, p. 259-270, jan. 2009.

FAYED, Eman A. *et al.* Design, synthesis, in silico studies, in vivo and in vitro assessment of pyridones and thiazolidinon. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.],



v. 1260, p. 1-20, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.132839>.

GIM, Hyo Jin; KANG, Bomi; JEON, Raok. Synthesis and biological activity of 5-(4-[2-(Methyl-p-substituted phenylamino)ethoxy]benzyl)thiazol. **Archives Of Pharmacal Research**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1055-1061, set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02980237>.

GULLAPELLI, Kumaraswamy; MAROJU, Ravichandar; MERUGU, Ramchander. Synthesis, In-vitro and In-silico Anti-inflammatory activity of new Thiazole derivatives. **Research Journal Of Pharmacy And Technology**, [S.L.], p. 4253-4260, 6 ago. 2021. A and V Publications. <http://dx.doi.org/10.52711/0974-360x.2021.00738>.

HU, Jie *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel thiazolidinone derivatives as potential anti-inflammatory agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 64, p. 292-301, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.04.010>.

HU, Shenglan *et al.* The regulatory peptide pidotimod facilitates M2 macrophage polarization and its function. **Amino Acids**, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 1177-1185, 31 jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-014-1676-4>.

INAGAKI, Masanao. Studies on the New Antiarthritic Drug Candidate S-2474. **Yakugaku Zasshi**, [S.L.], v. 123, n. 5, p. 323-330, 2003. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.123.323>.

JADHAV, Satish B. *et al.* Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of New Series of thiazole Based Thiazolidin-4-one Derivatives. **Der Pharmacia Lettre**, (S.L.), v. 18, n. 8, p. 214-219, jan. 2016.

KADRY, Hanan H. Synthesis, biological evaluation of certain pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as novel anti-inflammatory and analgesic agents. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 23, n. 12, p. 5269-5281, 2 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-014-1079-9>.

KAKARLA, Lavanya *et al.* Free radical scavenging,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory constituents from Indian sed. **Pharmacognosy Magazine**, [S.L.], v. 12, n. 47, p. 488, 2016. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.191467>.

KALIA, Rajiv; RAO, Chamallamudi; KUTTY, Nampurath. Synthesis and Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of N-[2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-4-oxo-thiazolidin-3-yl]-nicotinamide. **Arzneimittelforschung**, [S.L.], v. 57, n. 09, p. 616-622, 21 dez. 2011. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1296657>.

KAMACHI, Fumitaka *et al.* Involvement of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers in induction of cyclooxygenase-2 by vacuolar-type (H<sup>+</sup>)<sup>+</sup>ATPase inhibitors in RAW 264 cells. **Febs Letters**, [S.L.], v. 581, n. 24, p. 4633-4638, 7 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.055>.

KHILLARE, Lalit *et al.* Synthesis of New Thiazolyl Coupled Pyrazoles Bearing 2,4-Thiazolidinedionyl Pharmacophore and Their Anti-Inflammatory and Antibacterial Evaluation. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents In Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 46-57, mar. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1871523016666170616120346>.

KIM, Ye-Jin; SON, Dae-Yeul. Antioxidant and Inhibitory Effects of Korean Panax ginseng Extract on Pro-inflammatory Mediators in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages. **Journal Of The Korean Society Of Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 41, n. 10, p. 1371-1377, 31 out. 2012. The Korean Society of Food Science and Nutrition. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.10.1371>.

KUMAR, Ashok *et al.* Synthesis of some newer derivatives of 2-amino benzoic acid as potent anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 11, n. 23, p. 5281-5291, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896\(03\)00529-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-0896(03)00529-7).

KUMAR, Ashok; CHANDRA, Trilok; GARG, Neha. Synthesis and Anti-inflammatory Activity of 4-Substituted-2,5-Disubstituted Indolyl Azetidine-3-yl/Thiazolidin-1-yl-Substituted Triazoles. **Pakistan Journal Of Scientific And Industrial Research**, (S, v. 52, n. 5, p. 243-252, jan. 2009.

MA, Liang *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Novel 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Derivatives for the. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 7, p. 2060-2068, 7 mar. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm1011534>.

MACCARI, Rosanna *et al.* Structure–activity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivat. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 81, p. 1-14, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.003>.

MAHENDRAN, Sekar *et al.* Synthesis and Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Most Active Free Radical S. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, [S.L.], v. 59, n. 8, p. 913-919, 2011. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.59.913>.

MANGASULI, Sumitra N.; MANAGUTTI, Praveen B.; HOSAMANI, Kallappa M. Anti-inflammatory activity of novel (5Z)-3-(2-(2-oxo-2H-chromen-4-yloxy)ethyl)-5-benzylidenethiazoli: an approach to microwave synthesis. **Chemical Data Collections**, [S.L.], v. 30, p. 1-7, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100555>.

MARRI, Srinivas *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of 3-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-2-arylthiazolidin-4-ones as potential antioxidant, anti-inflammatory and analgesic agents. **Indian Journal Of Chemistry**, [s. /], v. 58, p. 109-119, jan. 2019.

MEZEI, Orsolya *et al.* Soy Isoflavones Exert Antidiabetic and Hypolipidemic Effects through the PPAR Pathways in Obese Zuck. **The Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 133, n. 5, p. 1238-1243, maio 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/133.5.1238>.

MING, Yue *et al.* CMHX008, a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Partial Agonist, Enhances Insulin Sens. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1-11, 8 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102102>.

MOHR, Eduarda T. B. *et al.* The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 2427-2439, 22 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-022-01084-x>.

MROUEH, Mohamed *et al.* Synthesis, biological evaluation and modeling of hybrids from tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]quinoline. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 100, p. 1-10, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103895>.

MUDGAL, Jayesh *et al.* Remedial effects of novel 2,3-disubstituted thiazolidin-4-ones in chemical mediated inflammation. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 210, p. 34-42, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.012>.

Balaji N. P.; RANGANAYAKULU, D.; REDDY, G. V. Subba. Synthesis, evaluation for anthelmintic and antimicrobial activity for the novel in vitro thiazolidin. **Asian Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, (S.L.), v. 1, n. 3, p. 9-15, jan. 2017.

NIKALJE, Anna P. *et al.* Synthesis and Anti-Inflammatory Evaluation of 2-(3-(2-(1,3-Dioxoisindolun-2-YL) Acetamido)-4-OXO-2-. **Proceedings Of The 18Th International Electronic Conference On Synthetic Organic Chemistry**, [S.L.], p. 1-11, 3 nov. 2014. MDPI. <http://dx.doi.org/10.3390/ecsoc-18-c010>.

OMAR, Yasser M.; ABDU-ALLAH, Hajjaj H. M.; ABDEL-MOTY, Samia G. Synthesis, biological evaluation and docking study of 1,3,4-thiadiazole-thiazolidinone hybrids as an. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 80, p. 461-471, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.036>.

OTTANÀ, Rosaria *et al.* 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 13, n. 13, p. 4243-4252, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.058>.

OTTANÀ, Rosaria *et al.* Discovery of 4-[(5-arylidene-4-oxothiazolidin-3-yl)methyl]benzoic acid derivatives active as novel potent allosteric inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B: in silico studies and in vitro evaluation as insulinomimetic and anti-inflammatory agents. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 127, p. 840-858, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.063>.

P, Jaismy J.; Manju L. S. Novel approach of multi-targeted thiazoles and thiazolidenes toward anti-inflammatory and anticancer therapy—dual inhibition of COX-2 and 5-LOX enzymes. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 236-257, 1 nov. 2020.

Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-020-02655-9>.

PATHAK, Prateek *et al.* Silica catalyzed one pot synthesis of hybrid thiazolidin-4-one derivatives as anti-tubercular and anti-inflammatory agent by attenuating COX-2 pathway. **Synthetic Communications**, [S.L.], v. 49, n. 20, p. 2725-2759, 18 out. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00397911.2019.1643485>.

RADHIKA, C.; VENKATESHAM, A.; KRISHNA, A. Synthesis and antiinflammatory activity of pyrimidine fused thiazolidinone derivatives. **International Journal Of Advances In Pharmaceutical Research**, [s. l], v. 5, n. 2, p. 99-103, jan. 2014.

RADULOVIC, Niko S. *et al.* Two goitrogenic 1,3-oxazolidine-2-thione derivatives from Brassicales taxa: challenging identification, occurrence and immunomodulatory effects. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 110, p. 94-108, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.005>.

RADWAN, Mohamed A. A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 3832-3841, 1 jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.024>.

RIBOLDI, Pier; GEROSA, M.; MERONI, P.L. Pidotimod: a reappraisal. **International Journal Of Immunopathology And Pharmacology**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 255-262, abr. 2009. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/039463200902200201>.

SAHOO, U. *et al.* Design, Synthesis of Some Novel Thiazolidin-4-one Derivatives Bearing Benzimidazole Nucleus and Biological Evaluation of their Possible in vitro Antiinflammatory as Cyclooxygenase Inhibitors and Antioxidant Activity. **Asian Journal Of Chemistry**, [s. l], v. 26, n. 24, p. 1-8, jan. 2014.

SAVA, Alexandru *et al.* New nitric oxide-releasing indomethacin derivatives with 1,3-thiazolidine-4-one scaffold: design, synthesis, in silico and in vitro studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 139, p. 1-21, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111678>.

SHARMA, Shalabh *et al.* A Study of Anti-inflammatory Activity of Some Novel ??Amino Naphthalene and ??Amino Naphthalene Derivatives. **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 339, n. 3, p. 145-152, mar. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.200500215>.

SHIM, Sun-Yup *et al.* Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of lemon myrtle (*Backhousia citriodora*) leaf extract. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 7, p. 277-281, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.01.018>.

SILVA, Jacqueline C. *et al.* Immunomodulatory effects of a new thiazolidine compound in C57BL/6J and C57BL/6J LDLr<sup>-/-</sup> mice with me. **Endocrine Reviews**, [S.L.], v. 35, p. 1, jan. 2014.

TAGELDIN, Gina N. *et al.* Design, synthesis and evaluation of some pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives bearing thiazolidinone moiety as anti-inflammatory agents. **Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 80, p. 164-173, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.06.013>.

UCHÔA, Flávia T. *et al.* Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of thiazolidinone PG15: an anti-inflammatory candidate. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 339-345, mar. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1211/jpp.61.03.0008>.

UEDA, Shigeo *et al.* 4,5-Dialkylsubstituted 2-imino-1,3-thiazolidine derivatives as potent inducible nitric oxide synthase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 15, p. 4101-4116, 1 ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2004.05.031>.

UWABAGIRA, Nadine; SAROJINI, Balladka K. 3-[(2,3-Dichlorophenyl)amino]methyl]-5-(furan-2-ylmethylidene)-1,3-thiazolidine-2,4-dione. **Molbank**, [S.L.], v. 2019, n. 4, p. 1-8, 3 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/m1083>.

VIGORITA, Maria G. *et al.* Aminopyrazinyl derivatives: synthesis and evaluation of anti-inflammatory and related activities. **Farmaco: Societa Chimica Italiana**: 1989, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 271-276, abr. 1994.

VILLA, Valentina *et al.* Novel celecoxib analogues inhibit glial production of prostaglandin E2, nitric oxide, and oxygen radicals reverting the neuroinflammatory responses induced by misfolded prion protein fragment 90-231 or lipopolysaccharide. **Pharmacological Research**, [S.L.], v. 113, p. 500-514, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.010>.

YANG, Xue-Rong *et al.* Rhodomollosides A and B, glycosides of methyl everninate from the aerial parts of *Rhododendron molle*. **Journal Of Asian Natural Products Research**, [S.L.], v. 24, n. 11, p. 1025-1032, 23 dez. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2021.2011241>.

YOUSSEF, Amal M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolyl-2,4-thiazolidinediones as anti-inflammatory and neuroprotective agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 2019-2028, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.01.021>.

ZARGHI, A. *et al.* Design and synthesis of new 2-aryl, 3-benzyl-(1,3-oxazolidine or 1,3-thiazolidine)-4-ones as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. **Medicinal Chemistry Research**, [S.L.], v. 19, n. 8, p. 782-793, 25 jul. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-009-9230-8>.

ZARGHI, Afshin *et al.* Synthesis of 2,3-diaryl-1,3-thiazolidine-4-one derivatives as selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.L.], v. 17, n. 20, p. 5634-5637, out. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.084>.



## ANEXO A – SUBMISSÃO DO ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 2

Thiazolidines derivatives and their anti-inflammatory activity in LPS-induced RAW 264.7 macrophages: A Systematic Review and Meta-Analysis

### Natural Product Research



---

Dear Eduardo Dalmarco,

Thank you for your submission.

<b>Submission ID</b>	<b>249328919</b>
<b>Manuscript Title</b>	<b>Thiazolidines derivatives and their anti-inflammatory activity in LPS-induced RAW 264.7 macrophages: A Systematic Review and Meta-Analysis</b>
<b>Journal</b>	<b>Natural Product Research</b>

If you made the submission, you can check its progress and make any requested revisions on the Author Portal

Thank you for submitting your work to our journal.  
If you have any queries, please get in touch with [GNPL-peerreview@journals.tandf.co.uk](mailto:GNPL-peerreview@journals.tandf.co.uk).

Kind Regards,  
*Natural Product Research* Editorial Office



**ANEXO B – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO REFERENTE AO CAPÍTULO 3**

The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence of  
macrophage repolarization

**Inflammopharmacology**


Inflammopharmacology  
<https://doi.org/10.1007/s10787-022-01084-x>

**Inflammopharmacology**

ORIGINAL ARTICLE



## The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization

Eduarda Talita Bramorski Mohr<sup>1</sup> · Tainá Larissa Lubschinski<sup>1</sup> · Julia Salvan da Rosa<sup>1</sup> · Guilherme Nicácio Vieira<sup>1</sup> · Mariano Felisberto<sup>1</sup> · Robson Ruan Romualdo<sup>1</sup> · Misael Ferreira<sup>2</sup> · Marcus Mandolesi Sá<sup>2</sup> · Eduardo Monguilhott Dalmarco<sup>1</sup> 

Received: 6 June 2022 / Accepted: 8 October 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022



## ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

BILUCA, Fabíola Carina *et al.* Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, [S.L.], v. 129, p. 1-9, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>.

FACCHIN, Bruno Matheus *et al.* Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 71, n. 7-8, p. 741-758, 25 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-022-01584-0>.

FELISBERTO, Mariano *et al.* Lymphocyte B Subtypes in Peripheral Blood: a prognostic biomarker for covid-19 patients. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**, [S.L.], p. 1-12, 6 fev. 2024. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jalm/jfad123>.

FRATONI, Eduarda *et al.* Effect of Dexamethasone on Mortality in Adult and Elderly Patients with Sepsis: a systematic review. **Sn Comprehensive Clinical Medicine**, [S.L.], v. 2, n. 7, p. 886-892, 19 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s42399-020-00334-9>.

LUBSCHINSKI, Tainá L. *et al.* Effect of Aryl-Cyclohexanones and their Derivatives on Macrophage Polarization In Vitro. **Inflammation**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 1612-1630, 5 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-022-01646-9>.

MOHR, Eduarda T. B. *et al.* Evidence That the Anti-Inflammatory Effect of Rubiadin-1-methyl Ether Has an Immunomodulatory Context. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2019, p. 1-12, 3 nov. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/6474168>.

MOHR, Eduarda T. B. *et al.* The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 2427-2439, 22 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-022-01084-x>.

REIS, Gustavo O. *et al.* Anti-inflammatory effects of coumarins on a murine model of acute lung injury (ALI): a brief systematic review. **Advances In Traditional Medicine**, [S.L.], p. 1-17, 30 set. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13596-023-00707-0>.

SILVA, Bibiana *et al.* Effect of Mimosa scabrella Bentham honeydew honey on inflammatory mediators. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 72, p. 1-7, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2020.104034>.

SILVA, Bibiana *et al.* Phenolic profile and in vitro anti-inflammatory activity of Mimosa scabrella Bentham honeydew honey in RAW 264.7 murine macrophages. **Journal Of Food Biochemistry**, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 1-13, 7 jan. 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.14076>.

WALTER, Laura O. *et al.* T cell maturation is significantly affected by SARS-CoV-2 infection. **Immunology**, [S.L.], v. 169, n. 3, p. 358-368, 14 mar. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.13635>.

WALTER, Laura O. *et al.* The relationship between peripheral immune response and disease severity in SARS-CoV-2 infected subjects: a cross-sectional study. **Immunology**, [S.L.], v. 165, n. 4, p. 481-496, 2 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.13457>.