



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E**

**QUÍMICA MEDICINAL**

**AVALIAÇÃO DO LASSBio-1524 E TRÊS  
NOVOS ANÁLOGOS EM MODELO DE  
INFLAMAÇÃO AGUDA**

**NATÁLIA DE MORAIS SALES**

**RIO DE JANEIRO**

**2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

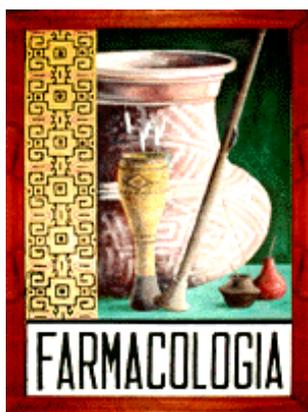
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E**

**QUÍMICA MEDICINAL**

# **AVALIAÇÃO DO LASSBio-1524 E TRÊS NOVOS ANÁLOGOS EM MODELO DE INFLAMAÇÃO AGUDA**

**NATÁLIA DE MORAIS SALES**



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

**RIO DE JANEIRO**

**Março de 2014**

# **Avaliação do LASSBio-1524 e três novos análogos em modelo de inflamação aguda**

Natália de Moraes Sales

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Jorge Tributino

---

Prof. Dra. Josiane Neves Sabbadini

---

Profa. Dr. Luiz Eurico Nasciutti

---

Profa. Dra. Tereza Sollero Claudio-da-Silva (Revisora)

---

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

**RIO DE JANEIRO**  
**Março de 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Sales, Natália de Moraes

Avaliação do LASSBio-1524 e três novos análogos em modelo de inflamação aguda/ Natália de Moraes Sales. – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2014.

xviii, 83 f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f 73

1. N-acilidrazona 2. Migração celular 3. Inflamação 4. Nf- $\kappa$ B. 5. Atividade anti-inflamatória. I. Fernandes, Patrícia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”.

Isaac Newton

Minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda da minha mãe por me proporcionar o sentimento da integridade e perseverança. Por essa razão, gostaria de reconhecer minha gratidão a ela e dedicar esse trabalho àqueles que sofrem de doenças inflamatórias.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, minha maior incentivadora, que esteve sempre ao meu lado, meu exemplo de força e coragem, que me apoiou em todos os momentos para chegar até aqui. Sem seu estímulo e confiança eu nunca teria conseguido. Obrigada por tudo.

À minha família, que mesmo muitas vezes não entendendo o que eu fazia, esteve sempre torcendo e apoiando, maravilhados com minha caminhada. Saibam que essa vitória é o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Ao meu noivo, pela paciência, amizade e companheirismo nos momentos de cansaço, sempre me apoiando e ajudando a enfrentar as dificuldades.

À Profa. Patricia Dias Fernandes, que além de orientadora, se tornou um grande exemplo na minha jornada científica. Muito obrigada pelo incentivo, pelo companheirismo, por acreditar em mim e por acreditar nesse trabalho. Gostaria de agradecer também pelos conselhos, conversas e pelos ensinamentos que vou levar para a vida. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Carlos Alberto Manssour Fraga, por ter cedido os compostos utilizados nesse trabalho e à sua aluna, a doutoranda Rosana Coimbra Nogueira de Freitas, pela síntese dos compostos, por ter sido tão solícita e disposta a ajudar.

Aos alunos e ex-alunos do laboratório de Farmacologia da Dor e Inflamação: Mariana, Milena, Thais, Carol, Larissa, Andrea, Fabiana, Gabriela, Jorge, e aos alunos de iniciação científica que passaram por lá nesses dois anos. Obrigada pela companhia, ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho. Sem esquecer do Alan, nosso técnico sempre disposto a ajudar e sempre indispensável nas discussões e esclarecimentos.

Aos professores Luiz Eurico Nasciutti, Jorge Tributino e Josiane Neves Sabbadini pela participação na Banca Examinadora.

À professora Tereza Sollero pelas contribuições durante a revisão deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, por terem contribuído para a minha formação.

A todos os funcionários da Farmacologia.

Ao instituto Vital Brazil pela doação dos animais.

Às Agências de Fomento (CAPES, CNPq e FAPERJ) pelo apoio financeiro concedido como bolsa de pesquisa ou auxílio financeiro ao Laboratório.

## RESUMO

### **Avaliação do LASSBio-1524 e três novos análogos em modelo de inflamação aguda**

Natália de Moraes Sales

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

O LASSBio-1524 e seus três novos análogos *N*-acilidrazônicos, o LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 foram desenhados como inibidores da enzima IKK- $\beta$ , que participa da ativação da via canônica do NF- $\kappa$ B. A atividade farmacológica desses compostos foi avaliada através do método da bolsa de ar subcutânea (BAS) induzido por carragenina e através de dosagens de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio. Foi possível observar nesse modelo de inflamação aguda, que o pré-tratamento com o LASSBio-1524 ou seus três análogos, nas quatro doses testadas, 3, 10, 30 e 100  $\mu$ mol/kg, foram capazes de reduzir de maneira significativa a migração de leucócitos para a cavidade gerada no dorso dos animais. O pré-tratamento com o LASSBio-1524 e seus análogos também reduziu a produção de NO, mas não foi capaz de inibir significativamente o extravasamento proteico. Com relação às citocinas inflamatórias, todas as doses dos compostos reduziram significativamente a produção de TNF- $\alpha$ . O mesmo aconteceu com relação à IL-1 $\beta$ , com exceção do LASSBio-1763 e LASSBio-1764. Os três derivados do LASSBio-1524 reduziram significativamente a produção da interleucina-10, mas não o próprio. Os compostos também não interferiram na produção de IFN- $\gamma$  e MCP-1 na BAS. Com exceção do LASSBio-1760, todos os compostos reduziram de maneira significativa o metabolismo oxidativo de leucócitos polimorfonucleares. Nossos dados indicam que os compostos testados possuem uma atividade anti-inflamatória, que pode estar relacionada à inibição da migração de leucócitos, redução da produção de NO, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Pode estar relacionada também à redução do metabolismo oxidativo, ambos efeitos ligados à ativação do fator NF- $\kappa$ B.

**Palavras-chave:** 1. *N*-acilidrazona 2. Migração celular 3. Inflamação 4. Nf- $\kappa$ B. 5. Atividade anti-inflamatória

**Rio de Janeiro  
Janeiro de 2014**

## ABSTRACT

### **Evaluation of LASSBio-1524 and three new analogues in acute inflammation model**

LASSBio-1524 and its three N-acylhydrazone new analogs, LASSBio-1760, LASSBio-1763 and LASSBio-1764 were designed as inhibitors of the IKK- $\beta$  enzyme, which participates in the activation of NF- $\kappa$ B canonical pathway. The pharmacological activity of these compounds was evaluated with the subcutaneous air pouch (SAP) induced by carrageenan and by measurement of inflammatory mediators and reactive oxygen species. It was observed in this acute inflammation model that pretreatment with LASSBio-1524 or its three analogues, tested in doses of 3, 10, 30 and 100  $\mu$ mol/kg, were able to significantly reduce leukocyte migration to the cavity. Pretreatment with LASSBio-1524 and its analogues also decreased NO production but was not able to significantly inhibit protein extravasation. In relation to inflammatory cytokines, all compounds in all doses significantly reduced TNF- $\alpha$  production. The same happened to interleukin IL-1 $\beta$ , with exception of LASSBio-1763 and LASSBio-1764. All three LASSBio-1524 derivatives significantly reduced interleukin IL-10 production. The compounds did not affect IFN- $\gamma$  and MCP-1 production in the SAP. With exception of LASSBio-1760, all compounds significantly reduced the oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes. Our data indicate that the tested compounds have anti-inflammatory activity, which may be related to inhibition of leukocyte migration, reducing the production of NO, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . This effect may also be related to reduction of oxidative metabolism, both effects linked to activation of NF- $\kappa$ B factor.

**Keywords:** 1. N-acylhydrazone 2. Cell migration 3. Inflammation 4. NF- $\kappa$ B. 5. Anti-inflammatory activity.

**Rio de Janeiro  
Janeiro de 2014**

## SUMÁRIO

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| Lista de Figuras .....      | x   |
| Lista de Tabelas .....      | x   |
| Lista de Esquemas .....     | x   |
| Lista de Gráficos .....     | xi  |
| Lista de Abreviaturas ..... | xii |

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 1  |
| 1.1. Inflamação .....   | 2  |
| 1.2. Migração leucocitária .....  | 6  |
| 1.3. Mediadores inflamatórios .....   | 10 |
| 1.4. Citocinas .....  | 12 |
| 1.5. Fator nuclear $\kappa$ B .....   | 16 |
| 1.6. Papel das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na resposta<br>inflamatória ..... | 20 |
| 1.7. Anti-inflamatórios utilizados na terapêutica .....                                     | 25 |
| 1.8. <i>N</i> -acilhidrazonas .....   | 27 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 29 |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 30 |
| 2.2. Objetivos específicos .....  | 30 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 31 |
| 3.1. LASSBio-1524 e análogos .....  | 32 |
| 3.2. Animais .....  | 33 |
| 3.3. Soluções e reagentes utilizados .....  | 33 |
| 3.4. Protocolo experimental .....   | 36 |
| 3.4.1 Preparo e administração do LASSBio-1524 e análogos .....                              | 36 |
| 3.4.2 Modelo da Bolsa de Ar Subcutânea (BAS) .....  | 36 |
| 3.4.3 Quantificação de proteínas totais .....   | 38 |
| 3.4.4 Quantificação da produção de Óxido Nítrico (NO) .....                                 | 38 |
| 3.4.5 Dosagem de Citocinas .....  | 39 |
| 3.4.6 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio<br>(ROS) .....              | 40 |
| 3.5. Análise estatística .....  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| <b>4. RESULTADOS</b> .....  | 42 |
| 4.1. Efeito anti-inflamatório no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS) ..... | 43 |
| 4.1.1. Contagem total de células .....  | 43 |
| 4.1.2. Contagem diferencial de células .....                                  | 45 |
| 4.1.3. Avaliação de Mielotoxicidade .....                                     | 48 |
| 4.1.4. Quantificação de proteínas totais .....                                | 50 |
| 4.1.5. Quantificação de Óxido Nítrico (NO) .....                              | 52 |
| 4.1.6. Dosagem de citocinas .....   | 54 |
| 4.2. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio .....          | 61 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | 62 |
| <b>6. CONCLUSÕES</b> .....  | 71 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                    | 73 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Sinais clássicos da inflamação .....  | 4  |
| <b>Figura 2:</b> Tempo de resposta à inflamação .....  | 6  |
| <b>Figura 3:</b> Transmigração leucocitária .....  | 9  |
| <b>Figura 4:</b> Vias de ativação do Nf- $\kappa$ B em resposta a estímulos pró-inflamatórios .....              | 19 |
| <b>Figura 5:</b> Formação de ROS e RNS .....   | 23 |
| <b>Figura 6:</b> Estratégia inicial para desenho estrutural da molécula LASSBio-1524 .....                       | 28 |
| <b>Figura 7:</b> Planejamento estrutural do LASSBio-1524 e seus análogos .....                                   | 32 |
| <b>Figura 8:</b> Esquema representativo da reação do DCFH-DA .....   | 41 |
| <b>Figura 9:</b> Estruturas do LASSBio-1524 e de seus derivados, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 ..... | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Dose eficaz 50% (DE <sub>50</sub> ) dos compostos com relação à migração celular no modelo da BAS ..... | 65 |
| <b>Tabela 2:</b> Resumo dos efeitos do LASSBio-1524 e seus análogos .....  | 69 |

## LISTA DE ESQUEMAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Esquema 1:</b> Protocolo do modelo da bolsa de ar subcutânea ..... | 37 |
|---|----|

## LISTA DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Gráfico 1:</b> Efeito do LASSBio-1524 e de seus análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na migração de leucócitos induzida por carragenina para a bolsa de ar subcutânea (BAS) ..... | 44 |
| <b>Gráfico 2:</b> Efeito do LASSBio-1524 e de seus análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na migração de células polimorfonucleares induzida por carragenina na BAS .....              | 46 |
| <b>Gráfico 3:</b> Efeito do LASSBio-1524 e de seus análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na migração de células mononucleares induzida por carragenina na BAS .....                   | 47 |
| <b>Gráfico 4:</b> Contagem dos leucócitos totais no sangue .....  | 48 |
| <b>Gráfico 5:</b> Contagem dos leucócitos totais no lavado da medula óssea .....  | 49 |
| <b>Gráfico 6:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por carragenina na BAS .                                   | 51 |
| <b>Gráfico 7:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de óxido nítrico induzido por carragenina na BAS .....   | 53 |
| <b>Gráfico 8:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de TNF- $\alpha$ induzido por injeção carragenina na BAS .....                                     | 55 |
| <b>Gráfico 9:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção da citocina IL-1 $\beta$ induzido por carragenina na BAS .....                                     | 57 |
| <b>Gráfico 10:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção da citocina IL-10 induzido por carragenina na BAS .....   | 58 |
| <b>Gráfico 11:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de interferon- $\gamma$ induzido por carragenina na BAS .....                                     | 59 |
| <b>Gráfico 12:</b> Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de MCP-1 induzido por carragenina na BAS .....  | 60 |
| <b>Gráfico 13:</b> Metabolismo oxidativo em leucócitos coletados da BAS 24 horas após injeção de carragenina, estimulados com PMA .....   | 61 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>µg</b>              | Micrograma                                   |
| <b>µL</b>              | Microlitro                                   |
| <b>AA</b>              | Ácido araquidônico                           |
| <b>AIEs</b>            | Anti-inflamatórios esteroidais               |
| <b>AINEs</b>           | Anti-inflamatórios não esteroidais           |
| <b>ANOVA</b>           | Análise de variância                         |
| <b>BAX</b>             | Proteína X associada a BCL2                  |
| <b>BCA</b>             | Ácido bicinconínico                          |
| <b>BSA</b>             | Albumina bovina sérica                       |
| <b>BSA</b>             | Albumina bovina sérica                       |
| <b>COX</b>             | Ciclo-oxigenase                              |
| <b>cyPGs</b>           | Prostaglandina                               |
| <b>d.p.</b>            | Desvio padrão                                |
| <b>DCF</b>             | 2', 7'-diclorofluoresceína                   |
| <b>DCF-DA</b>          | 2'-7' diclorodihidrofluoresceína diacetato   |
| <b>DCFH</b>            | 2'7' - diclorofluoresceína                   |
| <b>DE<sub>50</sub></b> | Dose efetiva em 50% da população             |
| <b>DMSO</b>            | Dimetilsulfóxido                             |
| <b>EDTA</b>            | Ácido etilenodiamino tetra-acético           |
| <b>ELISA</b>           | Ensaio imunoenzimático                       |
| <b>eNOS</b>            | Óxido nítrico sintase endotelial             |
| <b>FADD</b>            | Domínio de morte da proteína associada a Fas |
| <b>HETE</b>            | Ácido hidroxieicosatetraenoico               |
| <b>ICAM-1</b>          | Molécula de adesão intracelular 1            |
| <b>IFN- γ</b>          | Interferon γ                                 |
| <b>Ig</b>              | Imunoglobulina                               |
| <b>IKK</b>             | Proteínas inibidoras de κB cinases           |
| <b>IL-1</b>            | Interleucina 1                               |
| <b>IL-10</b>           | Interleucina 10                              |
| <b>IL-1β</b>           | Interleucina 1β                              |
| <b>IL-2</b>            | Interleucina 2                               |
| <b>IL-6</b>            | Interleucina 6                               |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>IL-8</b>            | Interleucina 8  |
| <b>ILs</b>             | Interleucinas   |
| <b>iNOS</b>            | Óxido nítrico sintase induzida                              |
| <b>IκB</b>             | Proteína inibidora de κb                                    |
| <b>LASSBio</b>         | Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas |
| <b>LPS</b>             | Lipopolissacarídeo  |
| <b>LTs</b>             | Leucotrienos  |
| <b>LX</b>              | Lipoxina  |
| <b>MAPK</b>            | Proteína quinase ativada por mitógeno                       |
| <b>MCP-1</b>           | Proteína quimiotática de monócitos-1                        |
| <b>mg</b>              | Miligrama   |
| <b>mL</b>              | Mililitro   |
| <b>NAH</b>             | N-acilidrazona  |
| <b>NEMO</b>            | Modulador essencial de NF-κb                                |
| <b>NF-κB</b>           | Fator nuclear κb  |
| <b>nNOS</b>            | Óxido nítrico sintase neuronal                              |
| <b>NO</b>              | Òxido nítrico   |
| <b>NOS</b>             | Óxido nítrico sintase                                       |
| <b>p53</b>             | Proteína de 53kD  |
| <b>PAF</b>             | Fator de ativação plaquetário                               |
| <b>PBS</b>             | Tampão fosfato salina                                       |
| <b>PG</b>              | Prostaglandina  |
| <b>PI</b>              | Prostaciclina   |
| <b>PI3K</b>            | Fosfatidilinositol 3-quinase                                |
| <b>PLA<sub>2</sub></b> | Fosfolipase A <sub>2</sub>                                  |
| <b>PLA<sub>2</sub></b> | Fosfolipase A <sub>2</sub>                                  |
| <b>PMA</b>             | Forbol miristato acetato                                    |
| <b>PMN</b>             | Leucócitos polimorfonucleares                               |
| <b>q.s.p</b>           | Quantidade suficiente para                                  |
| <b>r.p.m.</b>          | Rotações por minuto   |
| <b>RNS</b>             | Espécies reativas de nitrogênio                             |
| <b>ROS</b>             | Espécies reativas de oxigênio                               |
| <b>SOD</b>             | Superóxido dismutase  |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>TGF - <math>\beta</math>1</b> | Fator de crescimento transformante- $\beta$ 1             |
| <b>TLRs</b>                      | Receptores do Tipo Toll                                   |
| <b>TNFR1</b>                     | Receptor de fator de necrose tumoral tipo 1               |
| <b>TNFR2</b>                     | Receptor de fator de necrose tumoral tipo 2               |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>   | Fator de necrose tumoral $\alpha$                         |
| <b>TRADD</b>                     | Domínio de morte associado ao fator de necrose tumoral    |
| <b>TRAF2</b>                     | Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral 2 |
| <b>TXA<sub>2</sub></b>           | Tromboxano A <sub>2</sub>                                 |
| <b>TXs</b>                       | Tromboxanos   |
| <b>VCAM-1</b>                    | Molécula de adesão de célula vascular                     |

## **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Inflamação**

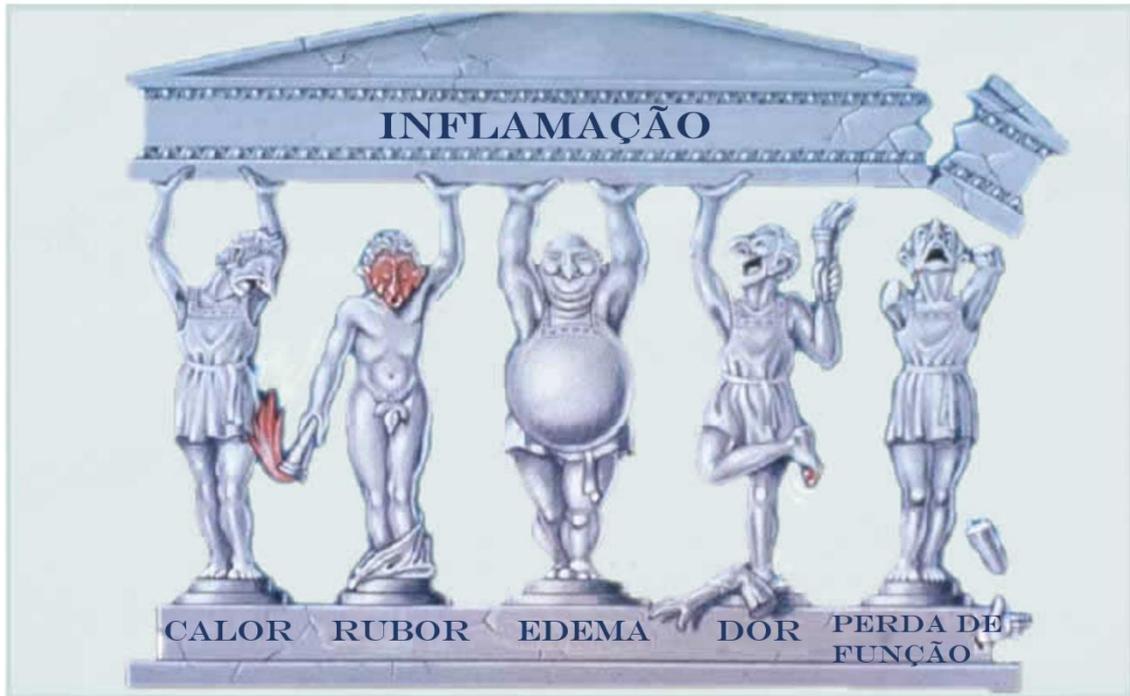
A inflamação é uma resposta vital do organismo a estímulos externos considerados nocivos ou a uma lesão do tecido e pode levar ao restabelecimento da estrutura e função tecidual após reações vasculares, migração e ativação de leucócitos e respostas sistêmicas. Entretanto, quando exacerbada essa resposta pode ter efeitos prejudiciais ao organismo. O processo inflamatório pode ainda ser definido como uma sequência de eventos em resposta à infecção por micro-organismos e suas toxinas, lesão tecidual, traumatismos, agressão induzida por agentes físicos ou químicos (queimaduras, radiação), entre outros (CHEN & NUÑEZ, 2010).

Uma das principais características do processo inflamatório é a reação dos vasos sanguíneos que, com o aumento da permeabilidade, leva ao acúmulo de fluido e leucócitos nos tecidos extravasculares. Isso promove aumento local na concentração de mediadores inflamatórios. Para que este processo ocorra é necessária a imunidade inata e em alguns casos, da resposta imune adaptativa, dois principais componentes integrantes de defesa do organismo (LAWRENCE e cols., 2002).

A imunidade inata não só atua como primeira linha de defesa contra o material nocivo, mas após reconhecimento de um estímulo adequado, fornece os estímulos necessários para instruir o sistema imune adaptativo a montar uma resposta. Além disso, a imunidade inata ocorre independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, não sendo alterada qualitativa ou quantitativamente após o contato. Os principais mecanismos na imunidade inata são a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (CHAPLIN, 2010; SERHAN e cols., 2011).

Por sua vez, a resposta imune adaptativa depende do fornecimento de efetores pelo sistema imune inato, na forma de fagócitos e granulócitos, para lidar com o causador da injúria. A resposta imune adaptativa também depende da ativação de células especializadas, os linfócitos e das moléculas solúveis que eles produzem (anticorpos, citocinas e quimiocinas). As principais características da resposta imune adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (CHAPLIN, 2010; YANG e cols., 2012).

A reação inflamatória é caracterizada por uma resposta inicial imediata. Uma vez que o antígeno ou o dano tecidual é detectado, tem início o recrutamento de neutrófilos para o local da injúria. Os sinais clínicos da inflamação (Figura 1), chamados sinais clássicos, que foram inicialmente descritos por Cornelius Celsus há mais de 2000 anos são calor, rubor, edema, dor e cronicamente a perda da função (LAWRENCE e cols., 2002). Esses sinais são resultado da vasodilatação, do acúmulo de leucócitos, aumento do fluido intersticial e ainda de uma estimulação dos terminais nervosos pelos mediadores inflamatórios (KVIETYS & GRANGER, 2012).



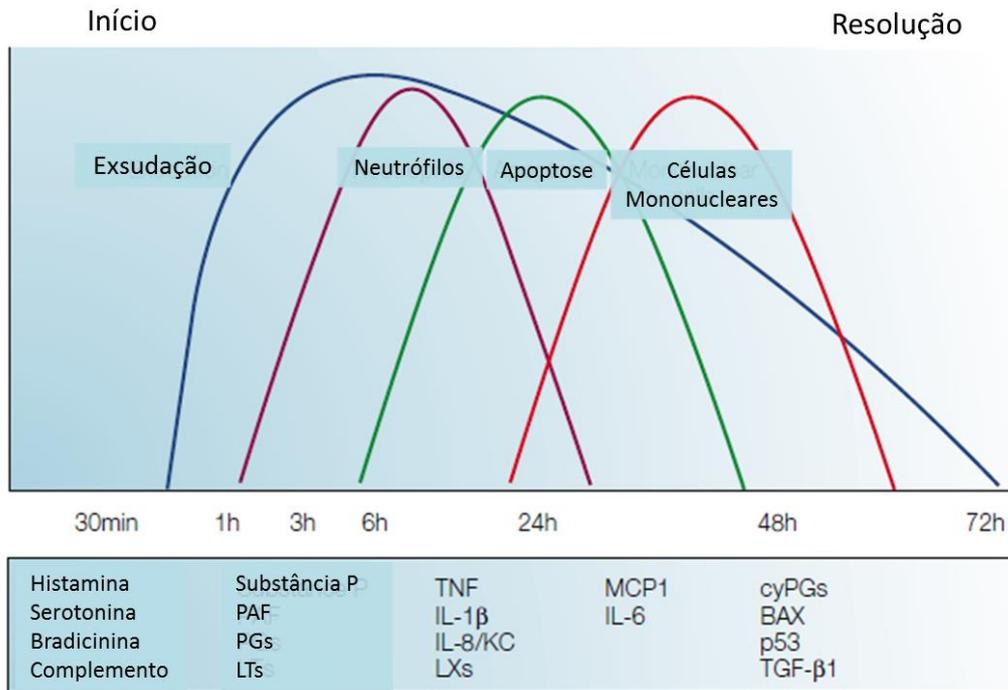
**Figura 1:** Sinais clássicos da inflamação (Adaptado de LAWRENCE e cols., 2002).

A inflamação pode ainda ser dividida em aguda e crônica, de acordo com sua duração e características patológicas. A inflamação aguda se inicia alguns segundos ou minutos após a instalação do agente agressor e tem uma duração relativamente curta (de minutos a várias horas ou poucos dias). É caracterizada pelo recrutamento inicial de neutrófilos, seguido pelo recrutamento de monócitos que se diferenciam em macrófagos. Suas principais características são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos. A inflamação crônica tem uma duração maior e está histologicamente associada a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese), fibrose e necrose tissular (ARITA, 2012).

Na figura 2 podemos observar o tempo “teórico” de resposta à inflamação aguda e os mediadores associados ilustrando a cinética celular e liberação sequencial de

mediadores. Nos primeiros 30 minutos, aminas vasoativas e mediadores lipídicos levam a um aumento na permeabilidade vascular com consequente formação de exsudado e edema, evento este que é seguido pela produção de citocinas e quimiocinas e por moléculas de adesão que ativam o endotélio e medeiam a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o sítio inflamatório. Aproximadamente de 6 a 48 horas depois do estímulo inflamatório, mediadores anti-inflamatórios, tais como as lipoxinas (LX) e prostaglandinas (PGs) atenuam a migração celular e promovem apoptose e retirada de PMNs do sítio inflamatório. Então se inicia a fagocitose de células apoptóticas por células mononucleares, promovendo a liberação de mediadores anti-inflamatórios como o fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (LAWRENCE e cols., 2002).

A inflamação termina quando o agente agressor é eliminado e os mediadores secretados são destruídos ou dispersos. Além disso, existem mecanismos anti-inflamatórios ativos que controlam a resposta e evitam que ela cause danos excessivos ao hospedeiro (MEDZHITOV, 2008).



**Figura 2:** Tempo de resposta à inflamação. LX, lipoxinas; cyPGs, prostaglandinas ciclopentenônicas; TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento transformante- $\beta$ 1; BAX, proteína associada a BCL-2; IL, interleucina; LTs, leucotrienos; MCP1, proteína quimiotática de monócitos; PAF, fator de ativação plaquetária; PGs, prostaglandinas, TNF, fator de necrose tumoral (Adaptado de LAWRENCE e cols., 2002).

## 1.2.Migração leucocitária

A chegada de leucócitos para o local da lesão ou infecção é de grande importância e uma série de eventos ocorridos entre os leucócitos e o endotélio garante que os leucócitos deixem a corrente sanguínea no local correto onde ocorre a inflamação. A migração transendotelial é a etapa do processo inflamatório em que os leucócitos atravessam as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos próximos ao local da inflamação e é um ponto crítico na regulação dessa resposta. Todo o benefício advindo da resposta inflamatória e quase todos os efeitos colaterais ocorrem após a chegada de leucócitos dos vasos sanguíneos para o sítio inflamatório (MULLER,

2013).

O número de neutrófilos no sangue periférico, por exemplo, é geralmente constante, mas esse número é capaz de aumentar significativamente após um estímulo inflamatório. Esses neutrófilos são originados de células tronco da medula óssea e podem ser rapidamente mobilizados durante reações inflamatórias. A liberação de neutrófilos da medula óssea resulta em um aumento do número de neutrófilos circulantes disponíveis para serem recrutados e migrarem para o sítio da inflamação (FURZE & RANKIN, 2008).

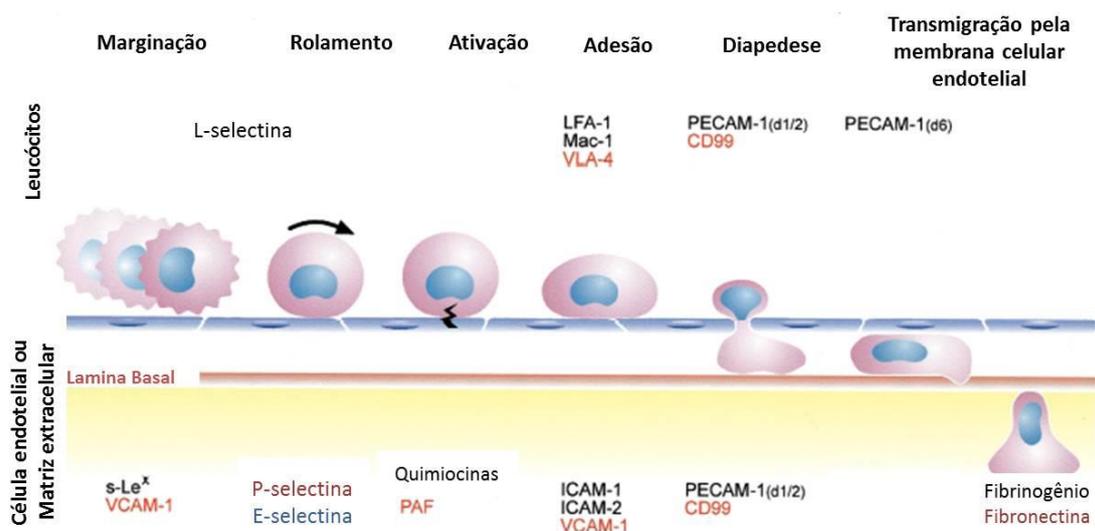
Um grande número de moléculas das células endoteliais tem sido envolvido na transmigração, tanto que uma deleção genética ou bloqueio destas moléculas prejudica a diapedese. Além de funções adesivas, estas moléculas de sinalização, como a molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula 1 de adesão vascular (VCAM-1), tem outras funções que contribuem para o seu papel na transmigração celular (MULLER, 2011).

Em condições normais de fluxo sanguíneo, as células se localizam preferencialmente no centro do fluxo sanguíneo, onde a resistência é menor e a velocidade do fluxo sanguíneo é maior. Quando há vasodilatação (por exemplo, em vênulas pós-capilares) nos locais de inflamação, a velocidade do fluxo sanguíneo diminui e as células circulantes colidem mais frequentemente com as células endoteliais ativadas e que expressam moléculas de adesão. Após o rolamento dos leucócitos sobre o endotélio vascular, ocorre sua firme aderência à superfície endotelial, o que aumenta de forma significativa o contato entre o leucócito e a célula endotelial. A finalidade do rolamento é fazer com que os leucócitos entrem em contato com a célula endotelial para que eles possam ser ativados posteriormente por quimiocinas e outros agentes pró-inflamatórios apresentados na superfície das células endoteliais. As quimiocinas,

produzidas no endotélio ou por células inflamatórias intersticiais e transportadas para o lado luminal do endotélio, ligam-se a seus receptores e essa ligação leva à transdução de sinais que ativam integrinas de leucócitos (MULLER, 2003).

As integrinas são uma família de receptores de adesão, heterodiméricos, que existem no estado de repouso em uma conformação inativa. A ativação das integrinas resulta em uma alteração conformacional que favorece a ligação de leucócitos (HYNES, 1992).

Como mostra a figura 3, as células endoteliais ativadas expressam muitas moléculas de adesão da família das selectinas, ICAM-1 e VCAM-1. As selectinas são glicoproteínas presentes em leucócitos (L-selectina), endotélio (E-selectina e P-selectina) e plaquetas (P-selectina) que se ligam a moléculas glicosiladas presentes na superfície de outras células e, em geral, medeiam adesão de baixa afinidade entre leucócitos e endotélio. Apesar da baixa afinidade, essa interação é suficiente para atrair os leucócitos para a periferia do fluxo sanguíneo e promover o contato dos leucócitos com o endotélio (MULLER, 2013).



**Figura 3:** Transmigração leucocitária (Adaptado de MULLER, 2013).

No caso do neutrófilo, seu primeiro contato com o endotélio ativado é mediado pela interação das selectinas P e E. A histamina e outros mediadores da inflamação aguda estimulam a translocação de P-selectina dos Corpos de Weibel-Palade (vesículas secretórias intracitoplasmáticas) para a superfície luminal de células endoteliais. Então a P-selectina interage com ligantes de selectina nos leucócitos. Concomitantemente, a L-selectina, de expressão constitutiva nos neutrófilos, liga-se ao conjunto de mucinas na superfície do endotélio. Essas ligações são de dissociação rápida, o que faz com que os neutrófilos rolem na parede do vaso impelidos pelo fluxo sanguíneo e sejam expostos a fatores quimiotáticos. Entre os fatores quimiotáticos, destacam-se fragmentos de fibrina, colágeno, fatores solúveis plaquetários, mediadores dos mastócitos, C3a, C4a e C5a, resíduos do metabolismo bacteriano, como os peptídeos n-formilados, e as quimiocinas secretadas por diferentes tipos celulares (RANKIN, 2004). As quimiocinas induzem alterações nas integrinas, levando ao reconhecimento de maior avidéz aos ligantes expressos no endotélio, imobilizando os neutrófilos e promovendo sua aderência à parede do vaso. A migração das células aderidas para o tecido adjacente é direcionada pelo gradiente crescente de produtos quimiotáticos, facilitado pela interação das integrinas aos componentes da matriz extracelular (como a fibrina e a fibronectina). O extravasamento e migração leucocitária são dependentes de quimiocinas como a proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1), produzida nos locais de infecção, se ligando aos proteoglicanos da matriz extracelular e em moléculas similares na superfície das células endoteliais. A interleucina (IL)-8, liberada por macrófagos ativados, atrai neutrófilos, que são estimulados a migrar para o tecido inflamado, ao passo que MCP-1 recruta monócitos, células T, células *natural killer* (NK) e mais tardiamente, células

dendríticas (CARLOS & HARLAN, 1994).

A dinâmica de produção das moléculas de adesão varia de minutos a horas. Algumas, como a P-selectina, são encontradas nos corpos de Weibel-Palade que rapidamente se fundem à membrana plasmática quando a célula é estimulada. Outras, como a E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, demandam horas para sua síntese (MULLER, 2003).

### **1.3. Mediadores inflamatórios**

Os mediadores inflamatórios podem ser originados do plasma, tais como os componentes do sistema complemento, do sistema da coagulação e as cininas ou ainda originados de células e de tecidos, tais como a histamina, a serotonina, metabólitos do ácido araquidônico (AA), fator de ativação plaquetário (PAF), óxido nítrico (NO) e interleucinas (ILs) (RANKIN, 2004).

O AA é um ácido graxo que apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. É liberado a partir de fosfolípidios de membrana através da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que pode ser ativada por diversos estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos e mitogênicos, que também ativam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1) (HILÁRIO e cols., 2006). O AA pode ser metabolizado pela via das ciclo-oxigenases, dando origem a formação de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) ou pela via das lipoxigenases levando a síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (ARITA, 2012).

Os produtos do metabolismo do AA por estas duas vias enzimáticas são chamados de eicosanoides, constituindo uma grande família de compostos formada pelas PGs, TXs e LTs, que possuem elevada potência e garantem um amplo espectro de

atividades biológicas. (PETERS-GOLDEN & HENDERSON, 2007). Os eicosanoides desempenham importante função na indução e na facilitação de patologias, principalmente as doenças inflamatórias, tendo por isso, a supressão de suas ações sido um dos principais alvos e objetivos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (BOTTING, 2006).

Existem isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX), a COX-1, a COX-2 e a COX-3. A COX-1 é uma proteína constitutiva encontrada no retículo endoplasmático de vários tipos celulares como estômago, rins e plaquetas, enquanto a expressão da COX-2, inicialmente tida como induzível pelo processo inflamatório, é constitutiva no endotélio vascular, pulmão e cérebro. A COX-3 é encontrada principalmente no sistema nervoso central e coração (BOTTING, 2010). Já entre as LOs estão as 5-lipoxigenase (5-LO), 12-lipoxigenase (12-LO) e a 15-lipoxigenase (15-LO) (HARIZI e cols., 2008).

A COX é, portanto, responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanoídes, que são produzidos através da ação de uma gama de enzimas que utilizam a prostaglandina  $H_2$  resultando em tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ),  $PGE_2$ ,  $PGF_2$ ,  $PGD_2$  e  $PGI_2$  e as etapas posteriores são dependentes de enzimas tecido-específicas (ARITA, 2012).

Os locais mais importantes de produção de lipoxinas são as mucosas e os vasos sanguíneos. Nas mucosas as lipoxinas são geradas principalmente pelos neutrófilos a partir do 15-ácido-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), o qual é fornecido pelas células do epitélio (SCANNELL & MADERNA, 2006). Já nos vasos sanguíneos, a biossíntese envolve a oxigenação do AA pela 5-lipoxigenase em leucócitos e a liberação do intermediário  $LTA_4$ , o qual é convertido em lipoxina pelas plaquetas através da atividade da 12-LO (biossíntese transcelular) (BOTTING, 2010).

Vários mediadores e vias moleculares modulam a sobrevivência e morte de leucócitos nos locais de inflamação incluindo moléculas intracelulares da família das

vias de sinalização PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), cascata das MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos) e NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) (LELEKOV-BOISSARD e cols., 2009, SRIRAM e cols., 2011), citocinas pró-inflamatórias (ANDINA e cols., 2009) e ROS (espécies reativas de oxigênio). Em condições inflamatórias, a produção de superóxido é aumentada, pois este desenvolve um importante papel na resposta imune de mamíferos. O superóxido tem ação antimicrobiana e facilita a morte de micro-organismos invasores, pois através de oxidação lipídica a membrana plasmática é degradada. Paradoxalmente, ROS e RNS (espécies reativas de nitrogênio) podem ainda prejudicar o tecido, devido a sua sinalização e outras funções não-antimicrobianas, essas moléculas são importantes na limitação do sequestro de neutrófilos e lesão vascular durante sepse e no controle da resposta inflamatória a fungos (FANG, 2004; SEGAL, 2005).

#### **1.4. Citocinas**

Citocinas são proteínas produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune e sua produção é iniciada principalmente quando as células são ativadas por estímulos inflamatórios. As citocinas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular e ter ainda diferentes efeitos, dependendo das condições do microambiente, no entanto, citocinas diferentes podem ter ações similares. Elas podem potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas e a maioria delas exerce efeitos parácrinos (ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras da citocina) ou efeitos autócrinos (ação sobre o tipo celular que a produz) (BORISH & STEINKE, 2003; PRASAD & MCCULLOUGH, 2013).

Já foram descritas mais de 200 citocinas diferentes, pertencentes às famílias de

hematopoiéticas, interferons, quimiocinas e TNF (fator de necrose tumoral) (WATANABE e cols., 2004).

As quimiocinas são pequenas proteínas quimioatraentes secretadas por diferentes tipos celulares. Elas controlam a adesão, quimiotaxia e ativação de vários tipos de leucócitos além de desempenhar papel fundamental na resposta inflamatória, recrutando células inflamatórias para o local da lesão por quimiotaxia. Quimiocinas também controlam e atuam em diversos processos biológicos como hematopoese, angiogênese e metástase de tumores. As vias de transdução de sinais ativadas pelas quimiocinas promovem a ativação de integrinas nos leucócitos, levando a adesão à parede do endotélio, geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina dos basófilos e ativação de proteases de neutrófilos (BORISH & STEINKE, 2003).

Originalmente, as citocinas e quimiocinas eram nomeadas de acordo com a sua função por exemplo, o fator de crescimento de células T, agora é chamado interleucina-2 (IL-2) e a MCP-1, (proteína atraente de macrófagos), é chamada de CCL2, mas devido às suas ações pleiotrópicas, de múltiplos efeitos, a nomenclatura mudou para números para facilitar o entendimento (KUNKEL e cols., 1995). O efeito das citocinas se dá após a ligação ao seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula. As famílias de receptores são: superfamília das imunoglobulinas (Ig); receptores classe I (também conhecidos como família de receptores das hematopoiéticas); receptores classe II (também conhecidos como família de receptores de interferons); membros da família de receptores de TNF e receptores de quimiocinas (PRASAD & McCULLOUGH, 2013).

Cabe destacar a ação moduladora das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que atuam nos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória. O TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  (interferon-  $\gamma$ ), IL-12 e IL-18 são exemplos de citocinas pró-

inflamatórias, enquanto a IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- $\alpha$  são reconhecidas como anti-inflamatórias. (BORISH & STEINKE, 2003).

O TNF- $\alpha$  possui diversas propriedades biológicas, atuando sobre a diferenciação, proliferação, ativação e morte celular. Esta citocina exerce também efeito quimiotático sobre monócitos e neutrófilos, estimula a produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos e modula a função de linfócitos B e T (BEUTLER & CERAMI, 1989). O TNF- $\alpha$  humano produzido pelos macrófagos, linfócitos T ativado e por outras células não linfoides é sintetizado em duas formas biologicamente ativas: uma forma precursora, associada à membrana, e uma solúvel, derivada da sua clivagem proteolítica (SMYTH & JOHNSTONE, 2000). Existem dois tipos de receptores para TNF- $\alpha$ : tipo I (TNFR1) e tipo II (TNFR2), os quais estão presentes na membrana plasmática de vários tipos de células, com exceção dos eritrócitos (BORISH e cols., 2003).

A ligação ao receptor TNFR1 pode iniciar a clivagem e ativação das caspases, envolvidas no processo de apoptose. Já a ativação do TNFR2 pode desencadear sinais intracelulares dependentes das quinases levando à ativação do fator NF- $\kappa$ B e expressão de genes celulares para TNF- $\alpha$ . Ainda, a ligação aos receptores pode resultar na ativação e proliferação celular (SMYTH & JOHNSTONE, 2000; MAZZON & CUZZOCREA, 2007).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina, predominantemente produzida por células T e NK em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios e imunes. É produzido por células TH1, estimuladas por IL-12, sendo a principal citocina secretada por estas células. Sua produção é fundamental para que a resposta imune contra patógenos seja eficiente (BILLIAU & MATTHYS, 2009). Receptores para essa citocina são expressos por praticamente todas as células do corpo, permitindo sua ação em muitos órgãos e tecidos (SCHURGERS e cols., 2012).

O IFN- $\gamma$  interfere na modulação da resposta inflamatória, ativando macrófagos e células endoteliais, estimula a secreção de quimiocinas, citocinas com ação quimiotática e outros mediadores inflamatórios. Adicionalmente, aumenta a atividade de células apresentadoras de antígenos e a capacidade de reconhecimento de antígenos por linfócitos T (BILLIAU & MATTHYS, 2009). Ativa a transcrição de genes que participam da atividade antiviral, apoptose, processamento de antígeno, expressão de MHC e o desenvolvimento de linfócitos TH1. Além disso, induz macrófagos a destruir e/ou restringir o crescimento de bactérias alvos (SCHURGERS e cols., 2012).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória secretada pelos linfócitos T auxiliares tipo 2 (TH2), que regula a resposta imune, inibindo reações alérgicas. A ação mais importante da IL-10 na inflamação se deve aos efeitos no endotélio, leucócitos e fibroblastos, bem como a indução das reações da fase aguda, onde a IL-10 induz várias mudanças, a maioria relacionada à transcrição de gene para síntese de moléculas de adesão endotelial, mediadores químicos como citocinas, fator de crescimento, óxido nítrico (NO); também regula a produção de enzimas associadas à remodelação de células matrizes e quando associada ao TNF, induz a resposta da fase aguda à infecção ou agressão tecidual (FUJIWARA & KOBAYASHI, 2005). Essa atividade específica da IL-10, também desencadeada pelo monócito, tem muito a ver com a regulação da leucopoiese durante um processo inflamatório. A IL-10 atua junto aos fibroblastos e células endoteliais estimulando a liberação de fatores de crescimento para granulócitos, macrófagos e monócitos. Além disso, libera TNF que estimulará os linfócitos T a produzirem anticorpos específicos (NG e cols., 2013).

As IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) são citocinas pleiotrópicas secretadas pelos macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e B, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. Funcionalmente são semelhantes e atuam sinergisticamente sobre diversas atividades biológicas; induzem principalmente a síntese e secreção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, sendo reconhecidas como reguladoras da resposta de fase aguda do processo inflamatório. Estas citocinas estimulam também a produção de quimiocinas, as quais atraem as células inflamatórias para o foco inflamatório (AREND e cols., 2008).

### **1.5. Fator nuclear $\kappa$ B**

O fator de transcrição NF- $\kappa$ B tem ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados. (HAYDEN & GOSH, 2004). Desde a sua descoberta há mais de 25 anos, o NF- $\kappa$ B tem servido como modelo sistema para transcrição induzível e devido aos seus amplos efeitos fisiológicos e clínicos, atrai grande interesse de pesquisa. No entanto, a função do NF- $\kappa$ B ainda levanta questões sobre como um conjunto limitado de mediadores de sinalização é capaz de integrar diversos estímulos para atingir um tipo de célula e resposta específica. Contudo, o NF- $\kappa$ B não existe isoladamente e estudos começaram a elucidar como a comunicação e como as redes de sinalização paralelas moldam essa resposta (OECKINGHAUS e cols., 2011).

Vários tipos de estímulos podem ativar o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, tais como infecções virais, bacterianas, citocinas inflamatórias e o acoplamento antígeno-receptor,

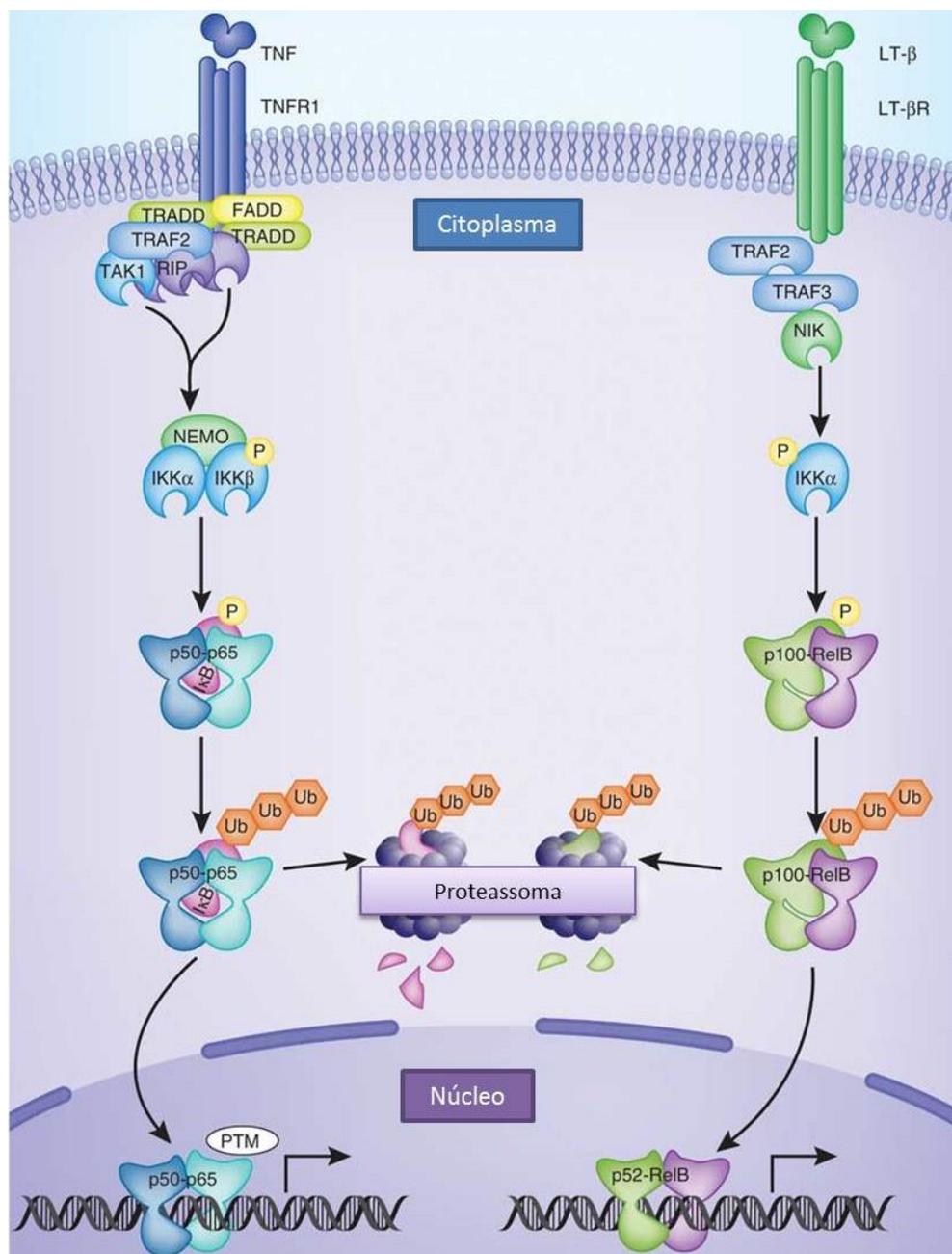
além de estímulos físicos, fisiológicos e estresse oxidativo (CAMANDOLA & MATTSON, 2007).

O NF- $\kappa$ B inclui um complexo grupo de fatores de transcrição homo e heterodiméricos localizados no citoplasma de todas as células e que, uma vez ativados, translocam para o núcleo. Os principais membros da família são: NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), NF- $\kappa$ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB e c-Rel. Heterodímeros contendo p65 e também p50 ou p52 estão entre os mais frequentes observados em várias linhagens de células (GHOSH e cols., 1998).

Em condições de repouso, dímeros de NF- $\kappa$ B estão ligados a I $\kappa$ Bs (proteínas inibidoras de  $\kappa$ B), que sequestram os complexos de NF- $\kappa$ B inativos no citoplasma. Quando induzida por estímulo se dá início a degradação de proteínas I $\kappa$ B através fosforilação pelo complexo I $\kappa$ B cinase (IKK), o qual consiste em duas quinases cataliticamente ativas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  e a subunidade reguladora IKK $\gamma$  (NEMO). Proteínas I $\kappa$ B fosforiladas são alvo de ubiquitinação e degradação proteossomal, o que leva a liberação dos dímeros de NF- $\kappa$ B para que possam translocar para o núcleo. Como a ativação depende da degradação do I $\kappa$ B, o complexo IKK é o “guardião” da sinalização do NF- $\kappa$ B e representa um ponto crítico para a interação com vias de sinalização em paralelo (PERKINS, 2007).

De maneira geral, existem duas vias principais de ativação do NF- $\kappa$ B, as vias canônica e não canônica (figura 4). A via canônica (esquerda) é induzida pela maioria dos estímulos fisiológicos do NF- $\kappa$ B, como por exemplo, sinais dos receptores de citocinas como o receptor de TNF- $\alpha$  (TNFR) e de IL-1, bem como de receptores tipo toll (TLRs), como o TLR4, principal sinalizador do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. A estimulação em TNFR1 leva a ligação do adaptador TRADD, que fornece uma plataforma de montagem para o recrutamento do adaptador FADD e TRAF2 (fator

associado ao receptor de TNF). Esta via canônica, dependente de IKK $\beta$  e NEMO, leva principalmente à fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  e translocação nuclear de heterodímeros de NF- $\kappa$ B contendo RELA. Em contraste, a via não-canônica (direita) depende da fosforilação mediada por IKK $\alpha$  das proteínas precursoras p100 associadas à RELB que leva ao processamento parcial de p100 a complexos p52/RELB. Esta via não-canônica é induzida por uma sinalização específica da família do TNF, como o CD40, e também a linfoxina- $\beta$  (OECKINGHAUS e cols., 2011).



**Figura 4:** Vias de ativação do Nf- $\kappa$ B em resposta a estímulos pró-inflamatórios

(Adaptado de OECKINGHAUS e cols., 2011).

## **1.6. Papel das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na resposta inflamatória**

Embora o oxigênio molecular possa ser considerado não reativo, a sua redução univalente leva à formação de espécies com elétrons desemparelhados na camada de valência, ou seja, espécies químicas reativas com átomos de oxigênio na sua composição (EBERHARDT, 2001).

O termo Espécie Reativa de Oxigênio/Nitrogênio é usado para identificar radicais e alguns não radicais que se apresentam como agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (HALLIWELL, 2006).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas naturalmente em nosso organismo, através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (por exemplo, na utilização do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação e na produção do óxido nítrico (NO) (GUERRA e cols., 2007).

As células fagocíticas estão entre os componentes mais importantes da resposta imune inata, que é a primeira linha de defesa do hospedeiro. Dois dos mais importantes sistemas antimicrobianos de células fagocíticas são a NADPH oxidase de fagócitos (também conhecido como phox) e a via da óxido nítrico sintase (NOS), que é responsável pela geração de radicais superóxido ( $O_2^-$ ) e NO, respectivamente. Embora esses sistemas dependam ambos de NADPH e oxigênio molecular, e por vezes funcionem em conjunto, a NADPH oxidase e a NOS estão em complexos enzimáticos separados com regulação independente (FANG e cols., 2010).

Um desequilíbrio entre a produção de ROS/RNS e sua eliminação pelos sistemas antioxidantes favorecendo a superprodução dessas espécies é chamado de estresse oxidativo e estresse nitrosativo (RIDNOUR e cols., 2005, KVIETYS & GRANGER, 2012).

Esta superprodução é o mecanismo comum por trás de muitas neuropatologias, responsabilizando-se por danos a lipídios, proteínas e DNA. Por causa disso, o estresse oxidativo e nitrosativo tem sido implicado numa grande variedade de doenças humanas assim como no processo de envelhecimento (VALKO e cols., 2007).

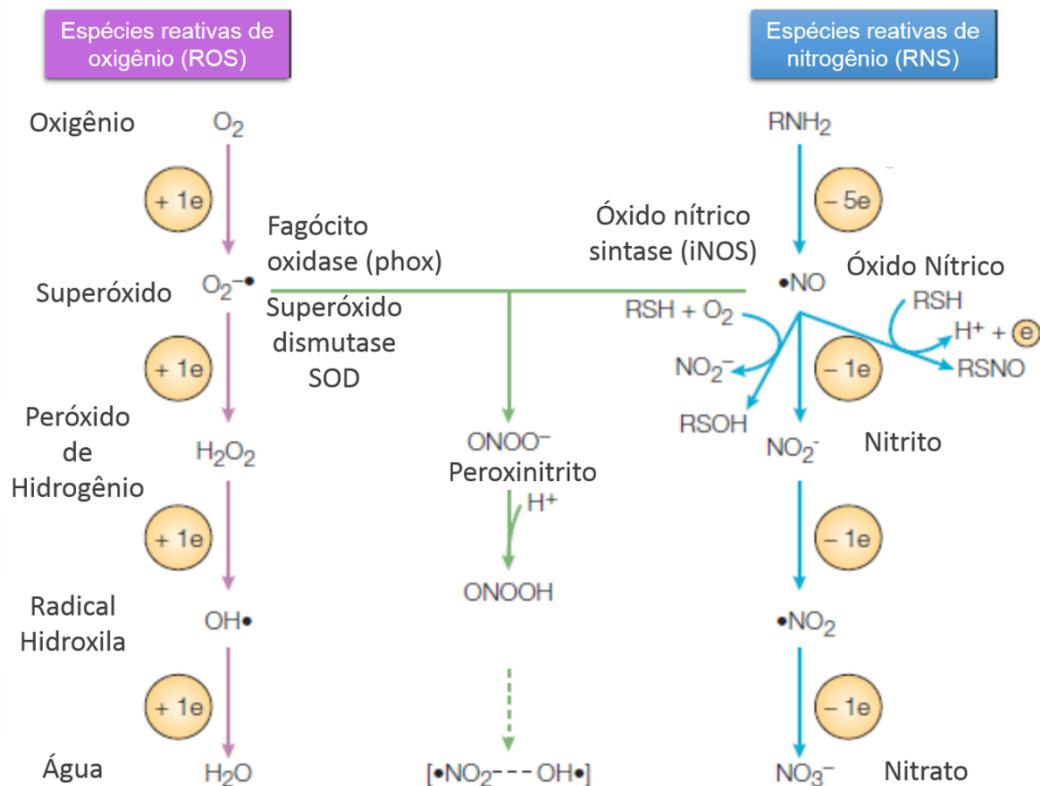
Espécies reativas de oxigênio podem ter um papel importante no controle do acúmulo de leucócitos durante a inflamação. Sob condições de estresse oxidativo, a enzima superóxido dismutase (SOD) age como um sistema de defesa celular endógeno que degrada o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A  $H_2O_2$  tem sido demonstrada induzir a apoptose em células epiteliais (HUSSAIN e cols., 2010), células endoteliais (FANG e cols., 2010) e neutrófilos (LOPES e cols., 2011). Além disso, o potencial terapêutico da SOD na resolução da resposta inflamatória pode ser uma importante ferramenta para terapia anti-oxidativa baseada na sua capacidade de catalisar a dismutação de radicais superóxido. O tratamento com reagentes que mimetizam a SOD reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (CUZZOCREA e cols., 2001).

Além dos ROS, as RNS, como o NO, participam do processo inflamatório. A função do NO depende da sua concentração e da sua interação com biomoléculas e proteínas. O NO reage com oxigênio formando nitrito ou nitrato e quando reage com ROS pode vir a dar origem ao peroxinitrito. O NO é um mediador importante, sintetizado por células endoteliais, macrófagos, neurônios e diversos outros tipos celulares. Fisiologicamente é sintetizado pela ação das enzimas NOS endotelial (eNOS)

e neuronal (nNOS), que catalisam a transformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. Esta catálise é ativada pelo aumento do fluxo de cálcio para o interior da célula e o cálcio e a calmodulina (proteína de baixo peso molecular, que funciona como co-fator para ativar a NOS), ligam-se a óxido nítrico sintase. Esta ligação irá ativá-las e a catálise da transformação de L-arginina em L-citrulina e NO irá ocorrer. Será produzida uma pequena quantidade de NO, porém suficiente para difundir-se para a musculatura lisa. O NO não precisa de transportadores específicos e nem de canais específicos (KUN, 2001).

Já a NOS induzível (iNOS), não é expressa constitutivamente nas células e só o faz após um estímulo, como por exemplo por LPS e/ou citocinas. Após a ativação, a célula é capaz de produzir grande quantidade de NO por curtos períodos de tempo (MONCADA e cols., 1991).

A geração de ROS e RNS na inflamação se dá a partir da NADPH oxidase de fagócitos e da enzima iNOS, que são expressos em leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, embora a quantidade de ROS produzida seja maior em neutrófilos que em macrófagos e estes produzam muito mais RNS que neutrófilos (figura 5) (FANG, 2004).



**Figura 5:** Formação de ROS e RNS. A reação de espécies reativas de nitrogênio com cisteína sulfidrilica pode resultar em S-nitrosilação ou oxidação para o ácido sulfênico, bem como formação de pontes dissulfeto, que são potencialmente reversíveis. O ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ) possuem padrões distintos de reatividade.  $ONOOH$  espontaneamente decompõe-se através de uma série de espécies, que se assemelham a radicais  $OH$  e/ou  $NO_2$ . Quando a concentração de L-arginina é limitante, a óxido nítrico sintase (NOS) pode produzir superóxido juntamente com  $NO$ , o que favorece a formação de peroxinitrito. (Adaptado de FANG, 2004).

O NO é um potente agente vasodilatador, que entre outras funções reduz a adesão e agregação de plaquetas e o recrutamento leucocitário durante a resposta inflamatória (MONCADA e cols., 1991; KVIETYS & GRANGER, 2012). O NO atua também em outros sistemas, tais como o sistema nervoso central, gastrointestinal, respiratório, cardíaco e genitourinário.

O NO reage oxidativamente com o Fe(II) do cluster Fe-S, destruindo assim a ação enzimática. Ele também pode atuar de várias outras formas como, por exemplo, desativando a ribonucleotídeo redutase pela destruição do radical tirosila, essencial na sub-unidade R2 da enzima. Existe também a possibilidade do NO ligar-se ao Fe dos grupos heme da hemoglobina e no citocromo a3 da citocromo oxidase, resultando no bloqueio das funções destas proteínas (FANG e cols., 2010).

Em suma, o óxido nítrico produzido em casos de estresse danifica as células ligando-se a certas enzimas que estão envolvidas na respiração celular, impedindo-as de trabalhar adequadamente.

## **1.7. Anti-inflamatórios utilizados na terapêutica**

Apesar de ser um processo importante envolvido na defesa do organismo, a inflamação pode estar presente em estímulos dolorosos e crônicos, havendo a necessidade de tratamento terapêutico. São utilizados na terapia vários grupos de medicamentos anti-inflamatórios. Dentre eles, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e esteroidais (AIEs).

Desde a descoberta do ácido acetilsalicílico em 1893, AINEs representam uma das classes de maior diversidade de fármacos clinicamente disponíveis no Brasil. Seu efeito se dá a partir da inibição da COX e, portanto, a síntese de prostaglandinas e de todos os compostos derivados. A COX-1 e a COX-2 diferem quanto à sensibilidade à inibição por determinados AINEs. Fármacos como aspirina, ibuprofeno, diclofenaco e indometacina atuam de maneira não seletiva sobre a COX (FLOWER, 2003).

Devido ao grande número de complicações gastrointestinais e efeitos adversos provocados pelos AINEs tradicionais a pesquisa farmacêutica enfrentava um grande desafio na procura de compostos que atuassem na inflamação aguda e crônica (SCHENONE e cols., 2006). Com esse objetivo é que na década de 1990, foram introduzidos no mercado os inibidores específicos para a COX-2, exibindo à classe farmacêutica uma saída para reduzir os efeitos adversos causados pelos AINEs tradicionais. Surgiram os então denominados “coxibes”, inibidores seletivos para COX-2, que, no entanto possuem alguns efeitos cardiovasculares decorrentes da inibição seletiva, originando um desequilíbrio entre a produção de prostaciclina no endotélio e TXA<sub>2</sub> nas plaquetas. (CHAN e cols., 2009)

Dentre os AIEs mais prescritos mundialmente estão os derivados sintéticos disponíveis como a dexametasona e prednisolona, análogos estruturais dos hormônios glicocorticoides (SCHWEINGRUBER e cols., 2012). O mecanismo de ação desses fármacos consiste em induzir a expressão da proteína lipocortina (também conhecida por macrocortina ou anexina 1), que tem como função inibir a enzima fosfolipase A2; essa, por sua vez, atua na disponibilização do ácido araquidônico presente nos fosfolípídeos da membrana celular. Dessa forma, os AIEs diminuem indiretamente a síntese de ácido araquidônico e seus produtos, como LT, PGs e TXs. Os glicocorticoides endógenos, cortisol nos humanos e corticosterona nos roedores, são hormônios produzidos pelas glândulas adrenais e são essenciais no desenvolvimento embrionário, no controle da resposta ao estresse (SCHWEINGRUBER e cols., 2012), além de participarem de inúmeras funções fisiológicas, regulando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (BUSILLO e cols., 2013) e também na resolução da inflamação (MEDZHITOV, 2008). Um dos mecanismos pelo qual os glicocorticoides exercem seus efeitos anti-inflamatórios é a sua capacidade de interagir e modular a ativação do fator NF- $\kappa$ B (PRUETT e cols., 2003). É bem estabelecido que os glicocorticoides aumentam a transcrição da proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ , mantendo o NF- $\kappa$ B na sua forma inativa no citoplasma e impedindo sua translocação para o núcleo (QUAN e cols., 2000).

Para que o planejamento de novos fármacos possa acontecer é necessário que os pesquisadores explorem as ferramentas da química medicinal, que se dedica a estudar as razões moleculares da ação dos fármacos, ou seja, a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, incluindo planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias, que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novos fármacos (BARREIRO & FRAGA, 2001).

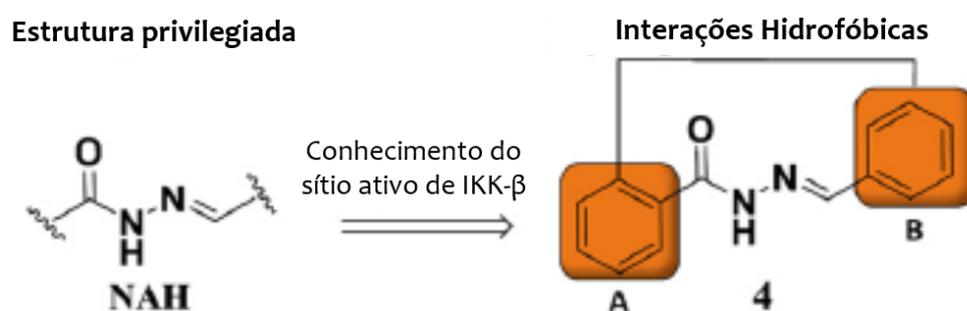
## 1.8. N-acilidrazonas

A investigação das hidrazonas como fármacos é corrente. Os estudos que as envolvem são, por exemplo, os antimicrobianos, os anticonvulsivantes, os analgésicos, os anti-inflamatórios, os antituberculosos, os antitumorais, os antimaláricos, os antidepressivos e os vasodilatadores (ROLLAS & KUCUKGUZEL, 2007).

De modo geral, as *N*-acilidrazonas que têm sido sintetizadas recentemente são análogas ou possuem anéis aromáticos e/ou heteroaromáticos em cada extremo do grupamento. Uma hidrazona derivada do ácido gálico demonstrou propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SILVA e cols., 2010).

Os trabalhos desenvolvidos no LASSBio (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Biologicamente Ativas) com derivados *N*-acilidrazônicos (NAH), evidenciaram o caráter de estrutura privilegiada para esses compostos (FRAGA e BARREIRO, 2006). A primeira série de NAH bioativas estudadas no LASSBio foi planejada racionalmente utilizando-se ferramentas da Química Medicinal, de modificação molecular, como a hibridação molecular (BOURGUIGNON, 1996), o bioisosterismo (LIMA & BARREIRO, 2005), a simplificação molecular, a homologação e a restrição conformacional (BOURGUIGNON, 1996). Tais estratégias permitem variações importantes no padrão de lipofilicidade, de sítios doadores/aceptores de ligação-H, bem como nas distâncias e orientações conformacionais dos respectivos farmacóforos, viabilizando uma diferenciação no reconhecimento molecular de compostos da mesma classe química frente às biomacromoléculas, o que é refletido na seletividade (WERMUTH, 2004).

A proposição da estrutura de um novo inibidor de IKK $\beta$  foi feita explorando as interações com o sítio ativo da enzima. Partindo da subunidade NAH, uma estrutura privilegiada (DUARTE e cols., 2007), fez-se alterações nas subunidades arila e imina (figura 6), originando o composto LASSBio-1524 (AVILA e cols., 2011), ponto de partida para a síntese do LASSBio-1760 LASSBio-1763 e LASSBio-1764.



**Figura 6:** Estratégia inicial para desenho estrutural da molécula LASSBio-1524 (Adaptado de AVILA e cols., 2011)

## **2. OBJETIVOS**

## **Objetivo geral**

Estudar o perfil farmacológico e caracterizar a atividade dos derivados *N*-acilidrazônicos desenhados como novos inibidores de IKK $\beta$ , LASSBio-1524 e seus três análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 quanto a potenciais efeitos anti-inflamatórios em modelos experimentais *in vivo* e investigar, com o auxílio de dosagens bioquímicas, alguns dos mecanismos que poderiam estar relacionados com essas atividades.

### **2.2. Objetivos específicos**

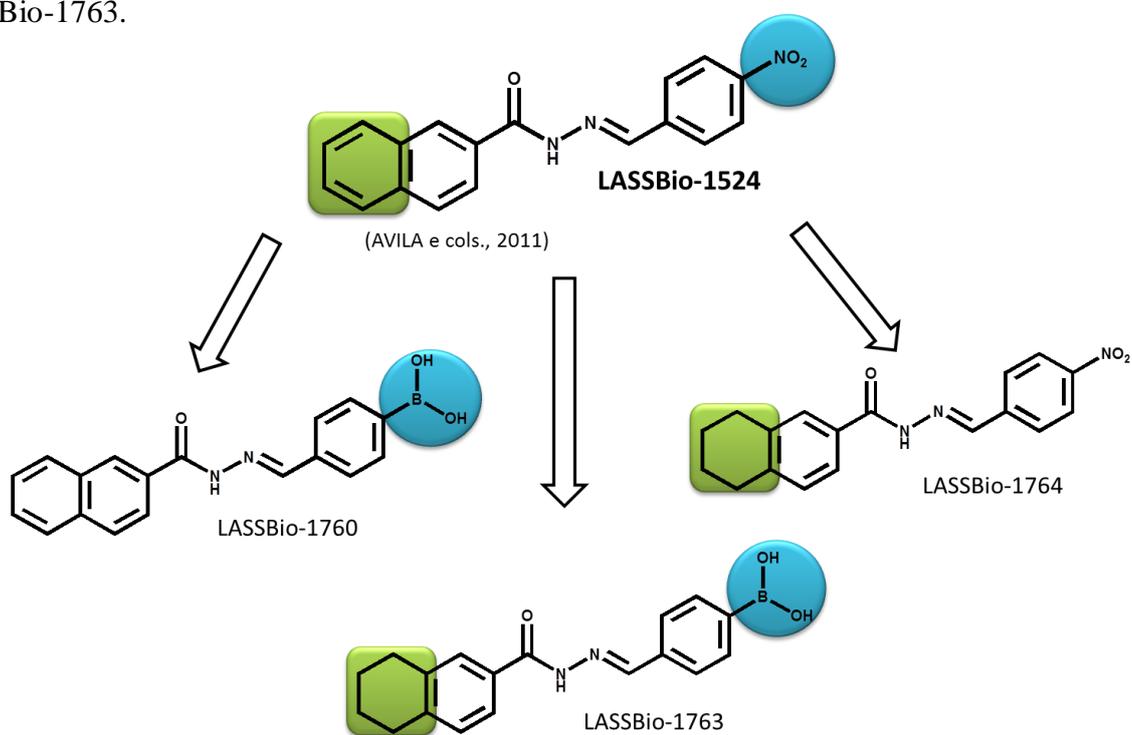
1. Avaliar a possível atividade anti-inflamatória do LASSBio-1524 e seus três análogos através de modelos de inflamação aguda e migração celular;
2. Investigar os mecanismos relacionados com o efeito anti-inflamatório dos compostos
3. 3. Investigar se há interferência na produção de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1. LASSBio-1524 e análogos

O LASSBio-1524 (AVILA e cols., 2011) e seus análogos o LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 foram sintetizados pela aluna Rosana Nogueira de Freitas, no Laboratório de Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio, Faculdade de Farmácia, UFRJ) sob a orientação do professor Carlos Alberto Manssour Fraga.

A síntese do LASSBio-1524 se deu a partir da proposição da estrutura de um novo inibidor da proteína inibidora de  $\kappa$ B kinases beta (IKK $\beta$ ) partindo da subunidade N-acilidrazona (NAH), cujo planejamento estrutural está na figura 7. É possível verificar que a partir de uma troca bioisostérica do grupo nitro do LASSBio-1524 pelo ácido borônico, foi obtido o derivado LASSBio-1760. Através da redução de um dos anéis aromáticos da naftila obteve-se o LASSBio-1764 e a troca bioisostérica do grupo nitro com o ácido borônico associada à redução de uma das naftilas gerou o composto LASSBio-1763.



**Figura 7:** Planejamento estrutural do LASSBio-1524 e seus análogos LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764.

### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster (20-25g), os grupos experimentais foram compostos de 5 a 8 animais, de ambos os sexos, doados pelo Centro de Produção de Animais do Instituto Vital Brazil. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração, além do ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada. Para que não houvesse interferência dos alimentos na absorção das substâncias administradas aos animais, os mesmos foram mantidos em jejum por 3 horas antes da realização dos experimentos.

Os protocolos experimentais utilizados nesta dissertação seguiram as regras preconizadas pela Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA), do Centro de Ciências da Saúde/UFRJ recebendo o número DFBCICB015-04/16.

### 3.3. Soluções e reagentes utilizados

#### Anestésico

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Cloridrato de quetamina | 50 mg/kg |
| Cloridrato de xilasina  | 20 mg/kg |

**Bactéria fonte de nitrato redutase:** *E. coli* em 5 mL de Trypticase Soy Broth, em condições de anaerobiose a 37°C por 18-20h. O meio é centrifugado a 11.000 r.p.m., 15 minutos e lavado com PBS, resultado em alíquotas de 100 µL de 150 mg/mL armazenadas a -70°C.

**Carragenina:** Foi preparada na concentração de 10 mg/mL, onde foi injetado 1 mL dessa solução estéril na cavidade formada no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS).

**Dexametasona:** foi comprada na concentração de 2 mg/mL e administrada por via intraperitoneal (i.p) na dose de 1,5 µmol/kg uma hora antes da injeção de carragenina na cavidade.

### **Reagente de Griess**

Misturam-se partes iguais dos reagentes A e B no momento da dosagem.

#### Reagente A:

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Sulfonamida                        | 1 grama |
| H <sub>2</sub> O ultrapura, q.s.p. | 100 mL  |

#### Reagente B:

|   |           |
|---|-----------|
| Dicloreto de naftiletlenodiamina              | 0,1 grama |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> a 10 %, q.s.p. | 100 mL    |

### **Tampão Fosfato Salina (PBS)**

|   |             |
|---|-------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)  | 1,78 gramas |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro) | 7,61 gramas |
| NaCl                                      | 8,5 gramas  |
| H <sub>2</sub> O ultrapura, q.s.p.        | 1000 mL     |

### **Tampão de bloqueio**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Soro Fetal Bovino | 10 mL  |
| PBS, q.s.p.       | 100 mL |

### **Tampão diluente de ensaio**

|                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| NaHCO <sub>3</sub>                 | 7,13 gramas |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>    | 1,59 gramas |
| H <sub>2</sub> O ultrapura, q.s.p. | 1000 mL     |

### **Tampão de Lavagem**

|             |         |
|-------------|---------|
| Tween 20    | 0,5 mL  |
| PBS, q.s.p. | 1000 mL |

### **3.4. Protocolo experimental**

#### **3.4.1 Preparo e administração do LASSBio-1524 e análogos**

O LASSBio-1524 e seus análogos LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 foram preparados em uma solução estoque de 100  $\mu\text{mol}$  em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os LASSBios foram administrados por via oral nas doses e 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , em volume final de 100  $\mu\text{L}$  de veículo (Polissorbato 80). O fármaco utilizado como referência foi a Dexametasona (1,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ), intraperitoneal.

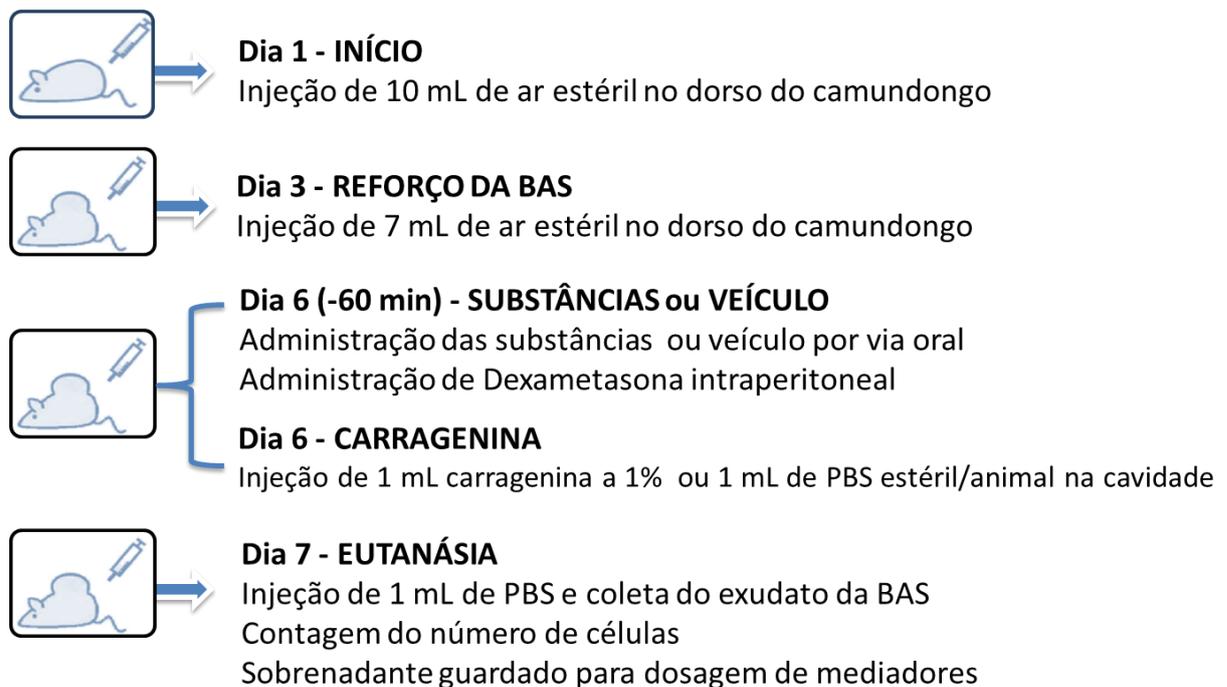
#### **3.4.2 Modelo da Bolsa de Ar Subcutânea (BAS)**

Uma vez que o  $\text{IKK}\beta$  participa da ativação da via clássica do  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , a primeira avaliação farmacológica do LASSBio-1524 e seus análogos foi a atividade anti-inflamatória através do modelo da BAS. Este modelo consiste na formação de uma bolsa de ar no dorso do camundongo através da injeção de ar estéril e da injeção de uma solução de carragenina 1%, um agente flogístico que induz a migração celular. (RAYMUNDO e cols., 2011).

A BAS foi formada no dorso dos animais através da injeção de 10 mL de ar estéril. Após 3 dias, a fim de manter a cavidade, foram injetados mais 7 mL de ar estéril. No 6° dia, os animais foram tratados com o LASSBio-1524 e seus análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 e 60 minutos depois foi feita uma injeção de carragenina 1%, estéril, na cavidade formada. Um grupo controle negativo foi tratado com veículo (Tween 80) 60 minutos antes de receber a injeção da solução de carragenina estéril na BAS e um grupo controle positivo recebeu Dexametasona (1,5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  i.p). Após 24 horas da injeção de carragenina, os animais foram eutanasiados e a cavidade foi lavada com 1 mL de PBS (Esquema 1). Do exsudato coletado foi

realizada a contagem total e diferencial dos leucócitos em contador automático de células (pocH-100iV Diff, Sysmex). O exsudato foi centrifugado a 1000 r.p.m., por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -20°C para dosagens posteriores.

Para a contagem dos leucócitos do sangue, os camundongos foram anestesiados com o anestésico *quetamina/xilasina* e 100 uL de sangue foram coletados e colocados em tubos com 15 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Para a contagem de leucócitos da medula óssea, o fêmur foi retirado, suas extremidades foram cortadas e foi lavado com 1 mL de PBS estéril. A contagem dos leucócitos foi imediatamente realizada no contador automático de células (pocH-100iV Diff, Sysmex).



**Esquema 1:** Protocolo do modelo da bolsa de ar subcutânea.

### **3.4.3 Quantificação de proteínas totais**

Foi utilizado o método colorimétrico com ácido bicinconínico (BCA). Foi feita a dosagem seguindo o kit comercial de quantificação de proteínas BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA) (HILL & STRAKA, 1988).

O método baseia-se na capacidade das proteínas, em meio alcalino, reduzirem o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ . Este último, juntamente com o BCA, forma um complexo de cor púrpura cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração da proteína (SMITH e cols., 1985).

No momento da dosagem, foram misturados os reagentes A e B na proporção 50:1. Então foram incubados 5  $\mu\text{L}$  da amostra e 195  $\mu\text{L}$  da mistura dos reagentes A e B, a 37°C por 30 minutos.

A absorbância foi medida em leitor de Elisa, a 562 nm. A concentração de proteínas foi expressa em mg/mL e foi calculada através de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

### **3.4.4 Quantificação da produção de Óxido Nítrico (NO)**

O NO produzido em fluidos biológicos decai ao metabólito estável nitrato, enquanto que aquele produzido em meio de cultura decai ao metabólito nitrito. Como não existe técnica colorimétrica direta para dosagem de nitrato, o NO produzido no sobrenadante da BAS foi quantificado pela técnica de conversão de nitrato em nitrito (RAYMUNDO e cols., 2011).

Para os ensaios *in vivo*, as amostras da BAS foram desproteinizadas e em seguida, misturou-se à amostra fosfato de sódio (0,5 M; pH 7,2), formato de amônio (2,4 M; pH 7,2) e *E. coli*. Após incubação por 2 h a 37° C, foi feita centrifugação a 10.000 r.p.m. por 10 minutos. Partes iguais do sobrenadante e do reagente de Griess

foram incubadas por 10 minutos (GREEN e cols., 1982) e a absorvância foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm. Valores da concentração de nitrato estão expressos em  $\mu\text{M}$ , calculados a partir de uma curva padrão de nitrato de sódio, feita previamente.

Para os ensaios *in vitro*, a dosagem de nitrito foi realizada em células RAW 264.7. As células foram plaqueadas à  $5 \times 10^4$  por poço em imunoplaças de 96 poços. Duas horas depois foram adicionados os compostos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{M}$  e uma solução de 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS para ativar os macrófagos. Após 24h de incubação, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da cultura foi coletado para avaliação da produção de NO. Como controle negativo foi usado sobrenadante da cultura de macrófagos não tratado e não estimulado com LPS e como controle positivo foram macrófagos estimulados com LPS e não tratados.

### **3.4.5 Dosagem de Citocinas**

A quantificação das citocinas foi realizada no exsudato da BAS. Foram utilizados kits específicos de ELISA, o ELISA BD OptEIA™ Set mouse, para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$  e MCP-1 e suas concentrações foram determinadas de acordo com as recomendações do fabricante (B&D Biosciences).

De forma resumida imunoplaças de 96 poços foram incubadas durante a noite, a 4° C, com anticorpo específico de captura. Após o período de incubação as placas foram lavadas e bloqueadas com tampão de bloqueio por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  das amostras ou o padrão específico. As placas foram mais uma vez incubadas durante a noite e então lavadas com o tampão de lavagem e incubadas por 1h em temperatura ambiente, com o anticorpo de detecção

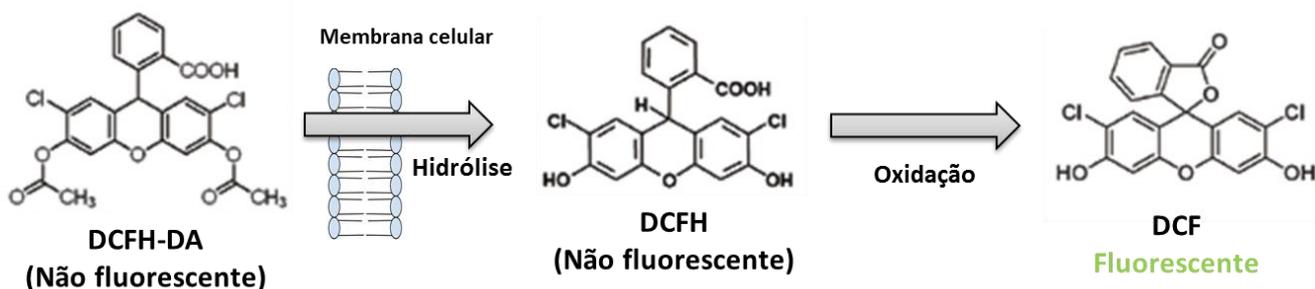
conjugado à enzima. As placas foram lavadas e a solução de substrato foi adicionada. Após nova incubação por 30 minutos, ao abrigo da luz, foi adicionado  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1N (25  $\mu\text{L}$ /poço) como solução de parada. A leitura foi feita em seguida.

A absorbância foi medida a 450 nm utilizando-se um leitor de microplacas e as concentrações de citocinas foram calculadas através de uma curva padrão e estão expressas como ng/mL.

#### **3.4.6 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Para avaliar se o LASSBio-1524 ou seus análogos são capazes de conter o aumento do metabolismo oxidativo de neutrófilos basal e frente a estímulos e investigar ainda se esse é um dos seus mecanismos de ação, leucócitos coletados na BAS foram colocados em tubos ( $10^6$  células) em um volume de 1 mL. Em seguida foi feita uma incubação a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por uma hora. Então foram adicionados às células os compostos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 ou LASSBio-1764, nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{M}$  e incubadas por mais 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

As células foram tratadas com 10 nM de forbol miristato acetato (PMA) e incubadas por 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Foi então adicionada 2  $\mu\text{M}$  de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA), seguida de nova incubação por 30 minutos, à  $37^\circ\text{C}$ . O DCF-DA permeia rapidamente a membrana celular. Uma vez no espaço intracelular, é hidrolisado pelas esterases, sendo convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) que é um composto não fluorescente e impermeável à membrana celular. Na presença de ROS, o DCFH é oxidado no interior da célula e produz um composto fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que permanece no espaço intracelular (figura 8) (SRIVASTAVA e cols., 2009). A fluorescência emitida é captada no canal FL-1 do citômetro de fluxo.



**Figura 8:** Esquema representativo da reação do DCFH-DA.

### 3.5. Análise estatística

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados grupos de 6 a 8 animais, selecionados aleatoriamente. Para os ensaios *in vitro*, cada grupo experimental foi feito em triplicata. Cada protocolo foi repetido, pelo menos, 3 vezes.

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (d.p.). A significância estatística foi calculada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni, através do programa GraphPad Prisma 5.0. Valores de p menores que 0,05 ( $*p < 0,05$ ) foram considerados significativos.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Efeito anti-inflamatório no modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS)**

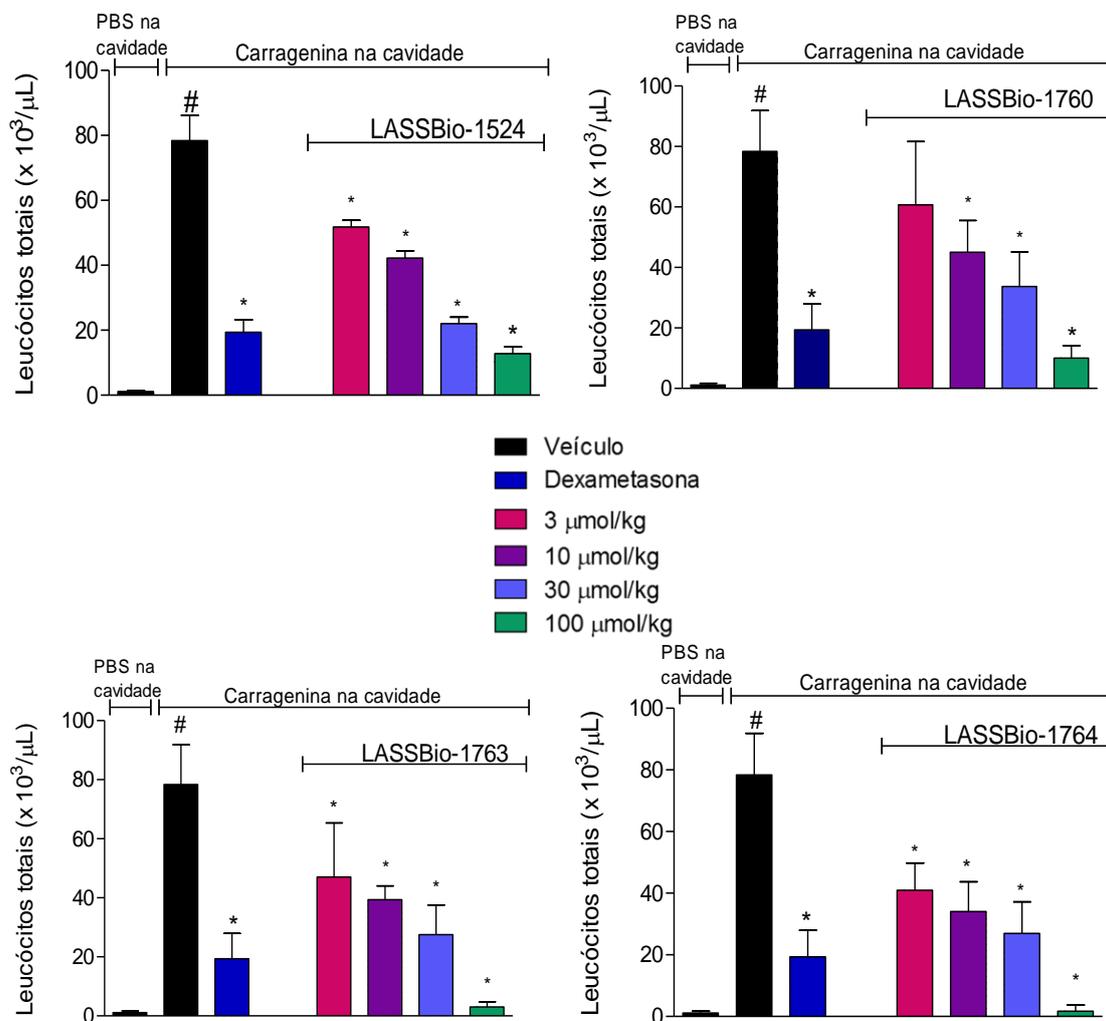
Ellis e cols., em 2000, demonstraram a presença da ativação do NF- $\kappa$ B no modelo da BAS. Uma vez que o LASSBio-1524 e seus análogos foram sintetizados com o objetivo de serem inibidores da enzima IKK $\beta$ , o primeiro modelo experimental realizado foi o da BAS, para verificar se a inibição da quinase prejudicaria a migração inflamatória, bem como o extravasamento proteico e produção de mediadores inflamatórios e citocinas.

##### **4.1.1. Contagem total de células**

O primeiro parâmetro avaliado vinte e quatro horas após a injeção de carragenina na BAS foi a migração celular. De acordo com os resultados apresentados, a injeção de carragenina na BAS dos animais pré-tratados oralmente com o veículo (Polissorbato 80) causou um aumento significativo no número de leucócitos totais na cavidade ( $78,3 \pm 15,7 \times 10^3$  células/ $\mu$ L) em relação ao grupo que recebeu a injeção de PBS na BAS ( $1,1 \pm 0,5 \times 10^3$  células / $\mu$ L). Já nos animais que foram pré-tratados intraperitonealmente com o anti-inflamatório Dexametasona ( $1,5 \mu$ mol/kg) uma hora antes da injeção de carragenina, foi observada redução de 75% no número total de células que migraram para a cavidade ( $19,4 \pm 9,6 \times 10^3$  células/ $\mu$ L).

Nos grupos que receberam tratamento com o LASSBio-1524 ou um dos seus três análogos (LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764) foi possível observar redução significativa e dose dependente no número de leucócitos totais que migraram para a cavidade (Gráfico 1).

O cálculo da dose efetiva em inibir em 50% a migração de células ( $DE_{50}$ ), para cada uma das substâncias mostrou que LASSBio-1524 obteve uma  $DE_{50}$  de 9  $\mu\text{mol/kg}$ , o LASSBio-1760 teve  $DE_{50}$  de 16  $\mu\text{mol/kg}$ , o LASSBio-1763 obteve a  $DE_{50}$  de 7  $\mu\text{mol/kg}$  e o LASSBio-1764 obteve a mais baixa  $DE_{50}$ , de 5  $\mu\text{mol/kg}$ .



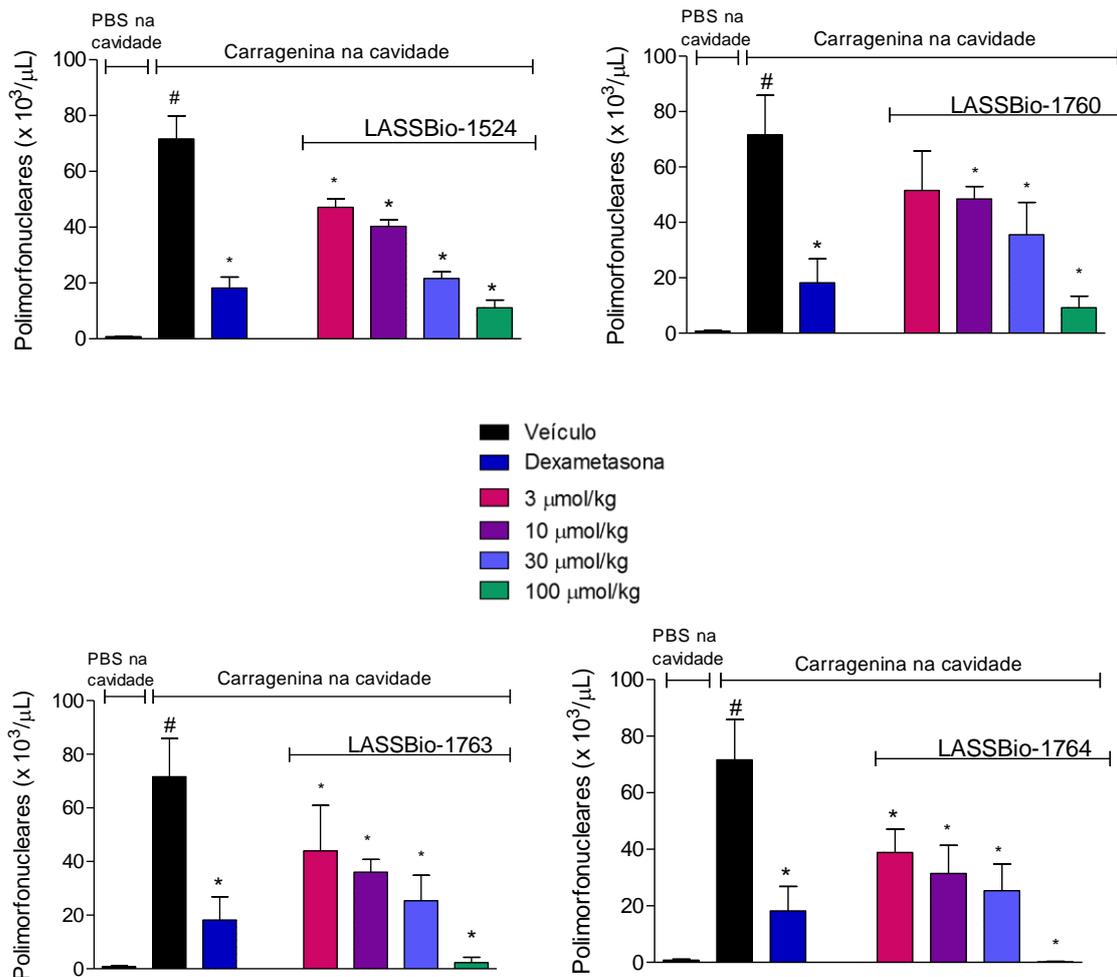
**Grafico 1:** Efeito do LASSBio-1524 e de seus análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na migração de leucócitos induzida por carragenina para a bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente, 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios, nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ , ou pré-tratados intraperitonealmente com Dexametasona (1,5  $\mu\text{mol/kg}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padro do número de leucócitos totais (x  $10^3/\mu\text{L}$ ). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. #quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

#### **4.1.2. Contagem diferencial de células**

Para avaliar se o LASSBio-1524 e/ou seus análogos seriam capazes de alterar o perfil da migração celular foi feita uma contagem diferencial das células coletadas no exsudato da BAS.

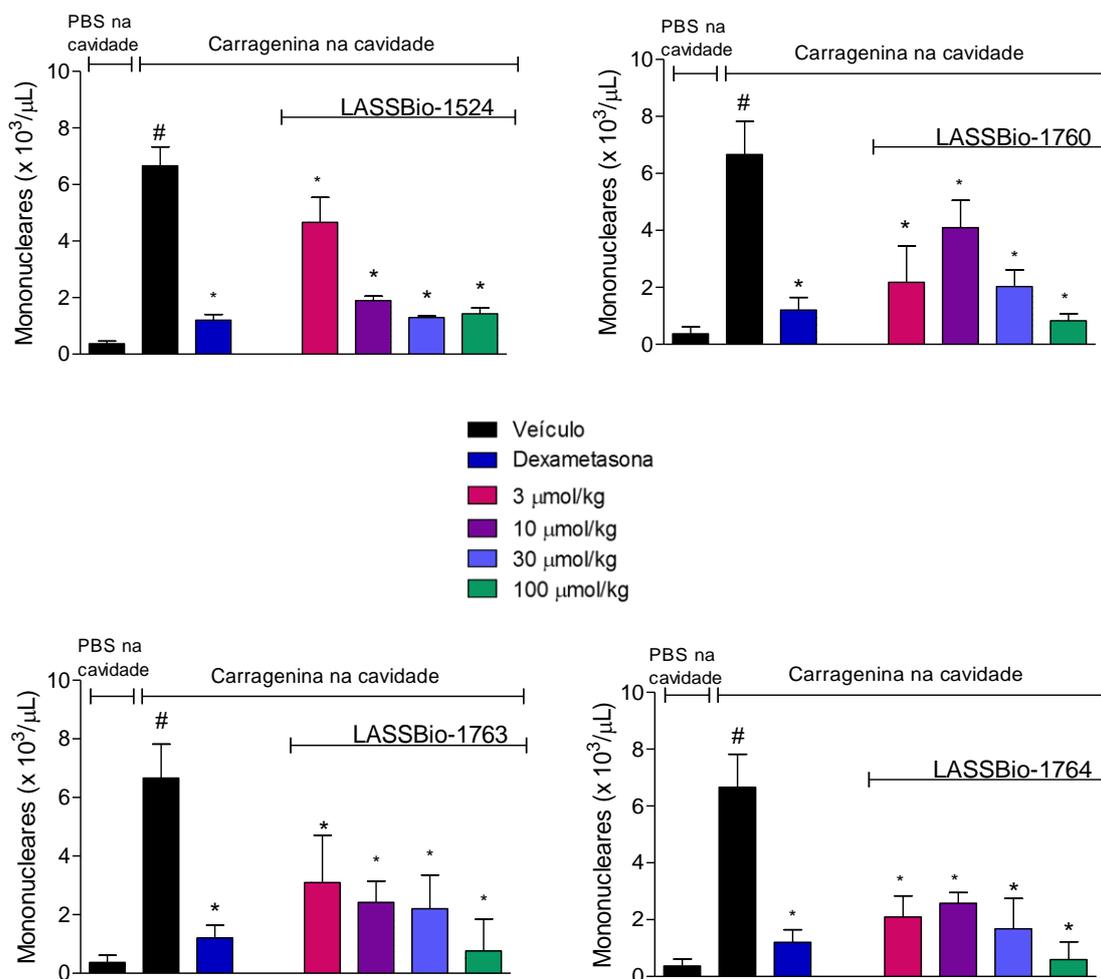
Nos animais que receberam a injeção de carragenina, o pré-tratamento oral com LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 ou LASSBio-1764 reduziu significativamente número de células polimorfonucleares e mononucleares, proporcionalmente ao que tinha sido observado na contagem total.

A injeção de carragenina resultou em um elevado número de células polimorfonucleares ( $71,6 \pm 16,4 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) quando comparado com o grupo que recebeu a injeção de PBS ( $0,8 \pm 0,4 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) na BAS (Gráfico 2).



**Grafico 2:** Efeito do LASSBio-1524 e de seus análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na migração de células polimorfonucleares induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ , ou pré-tratados intraperitonealmente (i.p) com Dexametasona (1,5  $\mu\text{mol/kg}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. do número de polimorfonucleares ( $\times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \* quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS, # quando comparado ao grupo pré-tratado com veículo que recebeu PBS na BAS.

Com relação ao número de células mononucleares que migraram para a BAS, também houve aumento na quantidade de células do grupo que recebeu carragenina na cavidade ( $6,6 \pm 1,8 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) quando comparado ao grupo que recebeu PBS ( $0,3 \pm 0,5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ), gráfico 3.

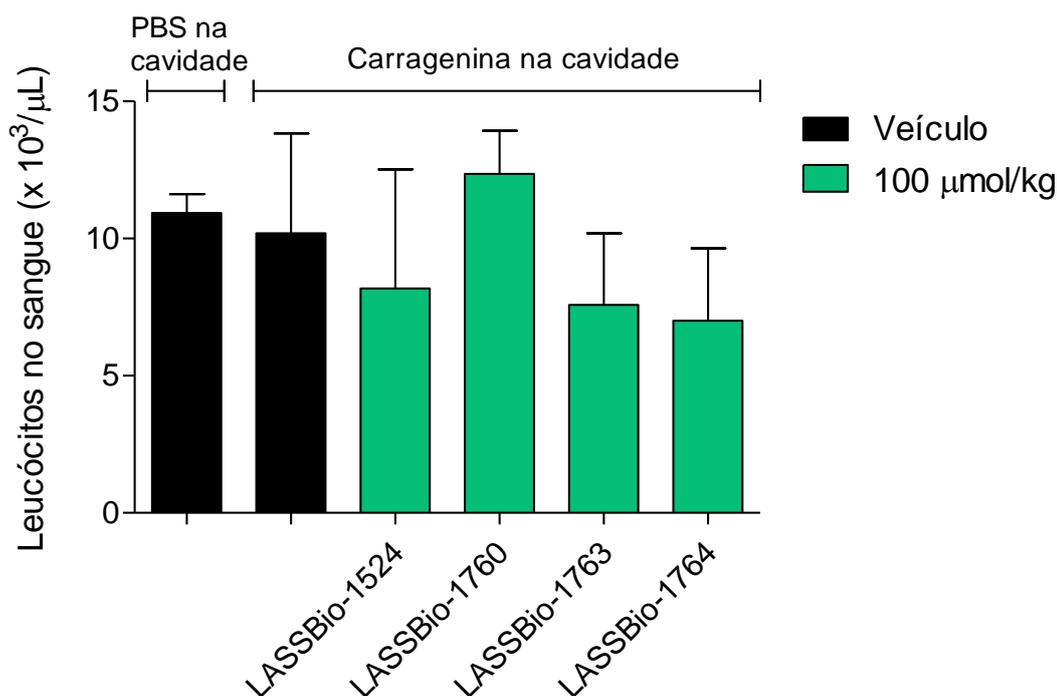


**Gráfico 3:** Efeito do LASSBio-1524 e de seus análogos, LASSbio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na migração de células mononucleares induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ , ou pré-tratados intraperitonealmente com Dexametasona (1,5  $\mu\text{mol/kg}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão do número de mononucleares ( $\times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \* quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS, # quando comparado ao grupo pré-tratado com veículo que recebeu PBS na BAS.

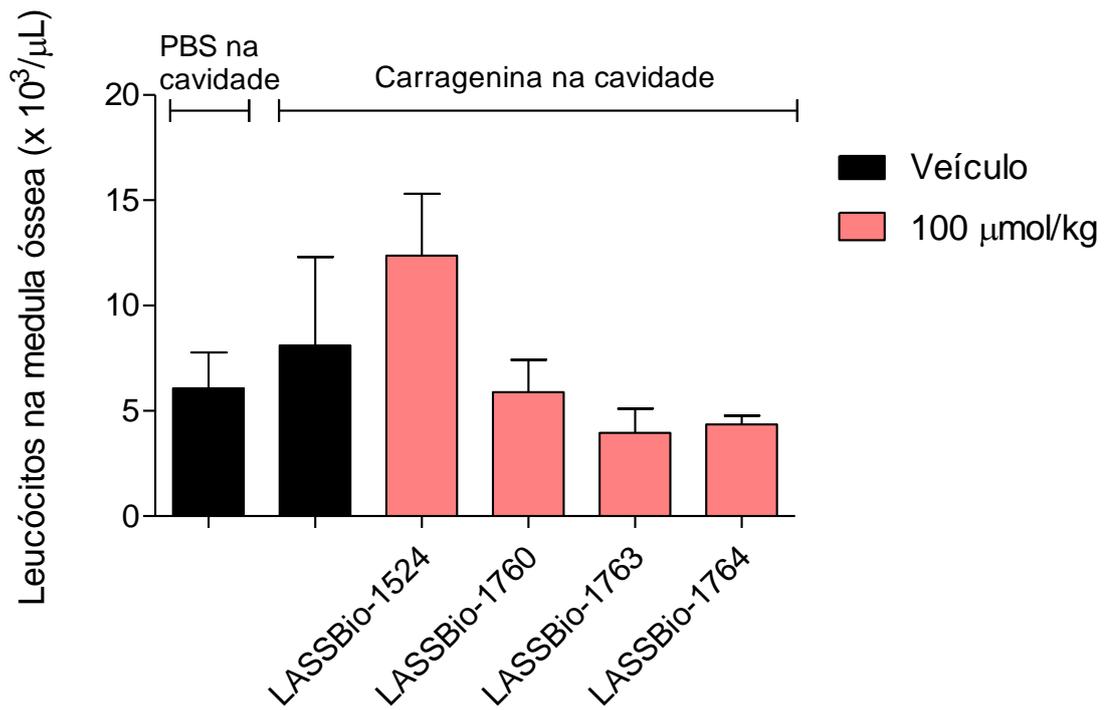
### 4.1.3. Avaliação de Mielotoxicidade

Para nos certificarmos de que o efeito inibitório na migração das células era decorrente de um efeito direto na celularidade e não um efeito tóxico inespecífico fizemos a contagem total de leucócitos no sangue e na medula óssea dos animais que foram pré-tratados com a maior dose (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) de cada um dos LASSBios.

Os resultados apresentados no gráfico 4 e 5 mostram não haver diferenças significativas com relação ao número de leucócitos totais do sangue e da medula, respectivamente, entre os grupos pré-tratados com o LASSBio-1524, seus análogos ou os respectivos controles.



**Gráfico 4:** Contagem dos leucócitos totais no sangue. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios (100  $\mu\text{mol/kg}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão do número de leucócitos totais ( $\times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ).

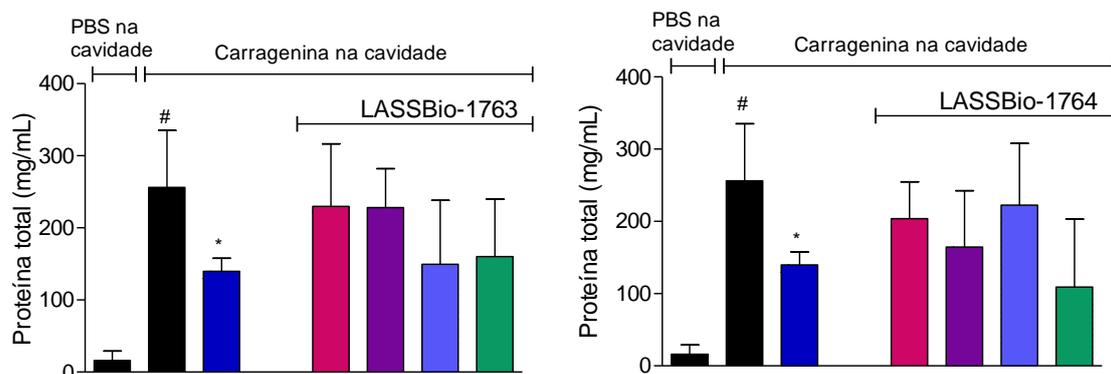
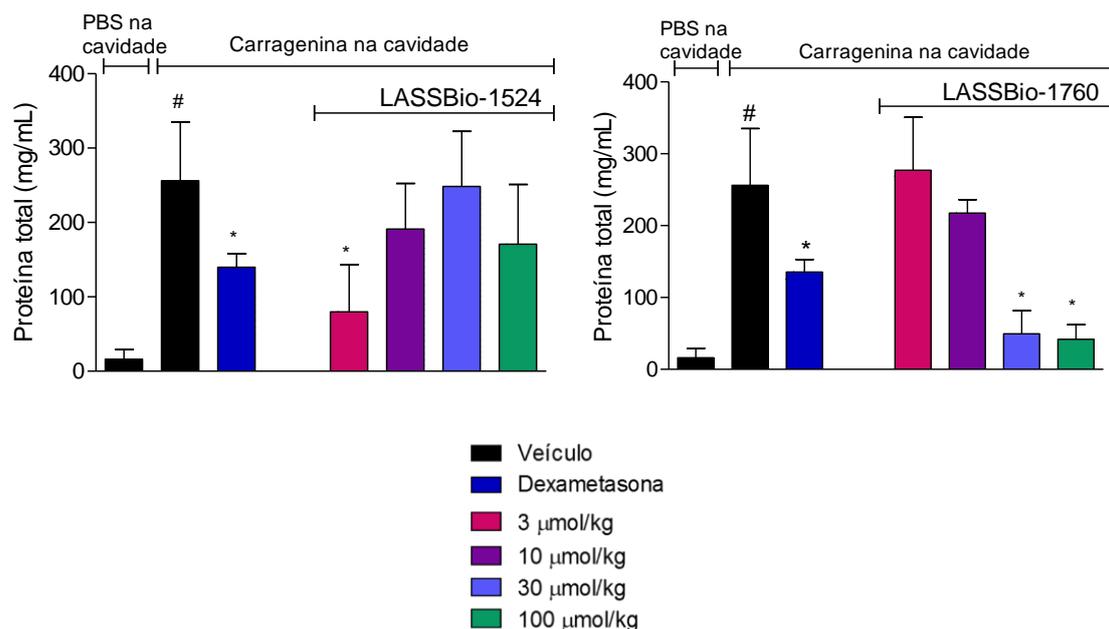


**Gráfico 5:** Contagem dos leucócitos totais no lavado da medula óssea. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios (100  $\mu\text{mol/kg}$ ). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão do número de leucócitos totais ( $\times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ).

#### **4.1.4. Quantificação de proteínas totais**

Um dos eventos que ocorre durante o processo inflamatório é o aumento da permeabilidade vascular decorrente da ação de inúmeros mediadores inflamatórios produzidos no local da injúria (MULLER, 2011).

No grupo dos animais pré-tratados com veículo e que recebeu a injeção de PBS na cavidade, foram quantificadas  $17,2 \pm 11,5$  mg/mL de proteínas totais e no grupo que recebeu a injeção de carragenina foram quantificadas  $256,0 \pm 96,1$  mg/mL de proteínas. Nos animais pré-tratados com Dexametasona a concentração de proteína no exsudato da BAS foi de  $139,5 \pm 17,6$  mg/mL, tendo um percentual de inibição de 46% em relação ao grupo veículo. Considerando os grupos dos animais pré-tratados com LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 ou LASSBio-1764, apenas o LASSBio-1524 na dose de 3  $\mu\text{mol/kg}$  e o LASSBio-1760, nas doses de 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$  foram capazes de reduzir significativamente a concentração de proteínas totais presentes no lavado. LASSBio-1524 reduziu em 69,1% e o LASSBio-1760 reduziu em 80% e 84%, nas doses de 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente (Gráfico 6).



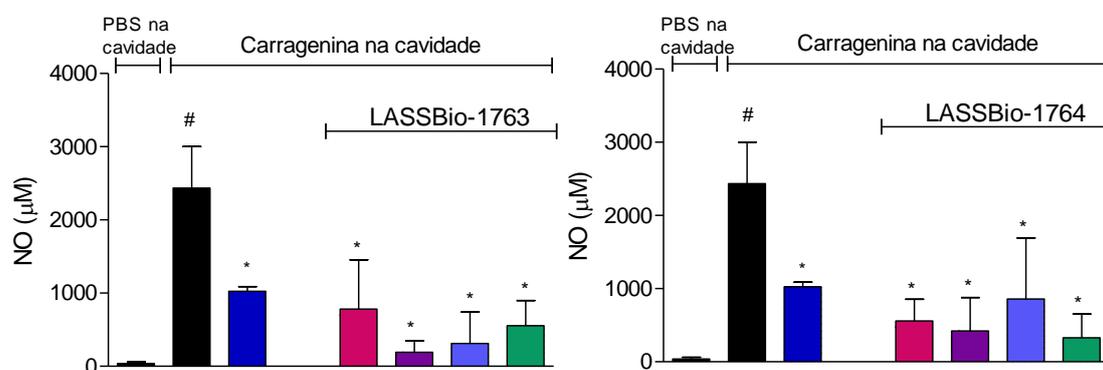
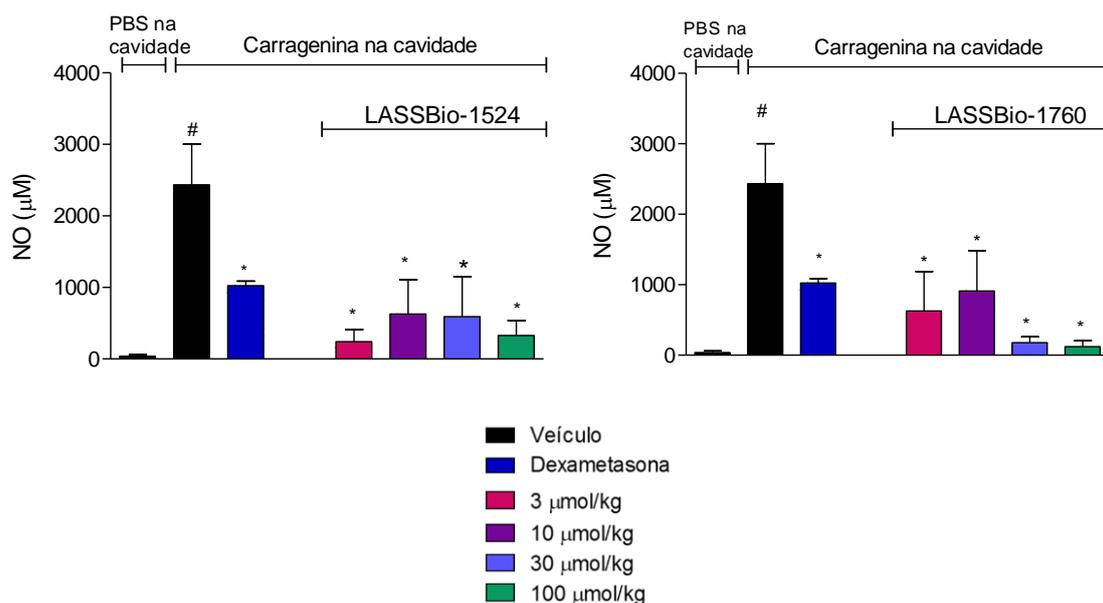
**Gráfico 6:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 no extravasamento de proteínas plasmáticas induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100 µmol/kg, ou pré-tratados intraperitonealmente com Dexametasona (1,5 µmol/kg). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da concentração de proteínas totais (mg/mL). A significância estatística (\* $p < 0,05$ ) foi calculada entre os grupos tratados com os LASSBios ou dexametasona e veículo e por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. # quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

#### 4.1.5. Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

Com o objetivo de avaliarmos alguns mediadores inflamatórios produzidos durante o processo inflamatório e um possível efeito das substâncias estudadas, quantificamos a produção de NO acumulado no exsudato da BAS na forma de nitrato.

Animais pré-tratados oralmente com veículo e que receberam a injeção de PBS na BAS, apresentaram uma concentração de  $38,5 \pm 25,5 \mu\text{M}$  de NO, enquanto nos animais pré-tratados oralmente com veículo e que receberam a injeção de carragenina na BAS quantificou-se  $2.433,9 \pm 844,0 \mu\text{M}$ . No grupo pré-tratado intraperitonealmente com Dexametasona, quantificou-se  $1.024,3 \pm 56,9 \mu\text{M}$ , correspondendo a uma inibição de 45,8% (Gráfico 7).

Nos animais que receberam a injeção de carragenina na BAS, o pré-tratamento com o LASSBio-1524 e seus 3 análogos foi capaz de reduzir significativamente a produção de NO quando comparado com a administração do veículo. O LASSBio-1524 nas doses de 3, 10, 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$ , reduziu em 90,1%, 74,2%, 75,6% e 86,5% a produção de NO, respectivamente. O LASSBio-1760 reduziu a produção de NO em 74,2%, 62,5%, 92,7% e 94,9%, respectivamente. O LASSBio-1763 em 67,9%, 92,1%, 87,2% e 77,1% e o LASSBio-1764 reduziu a produção de NO em 77,0%, 82,6%, 64,7% e 86,4%, respectivamente.

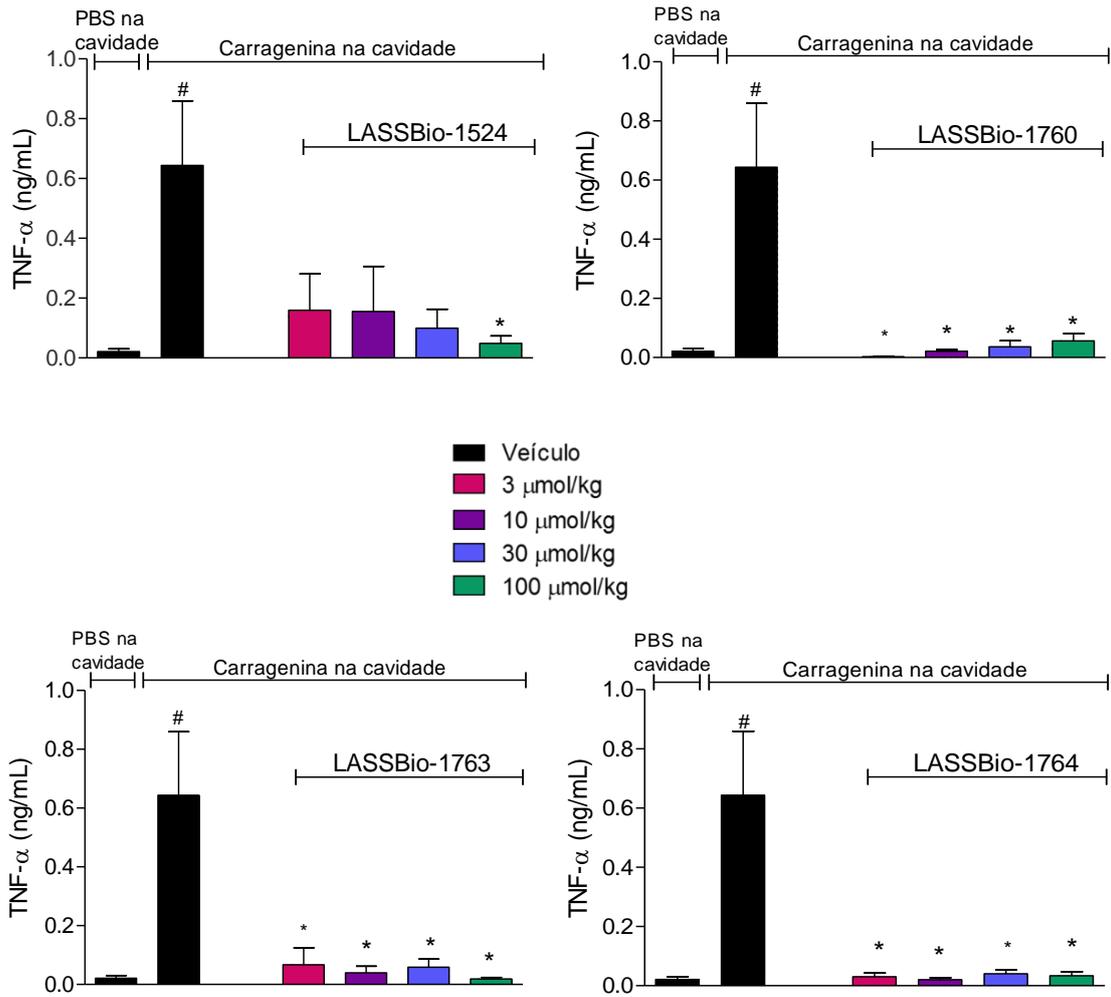


**Gráfico 7:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de óxido nítrico induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100 µmol/kg, ou pré-tratados intraperitonealmente com Dexametasona (1,5 µmol/kg). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da concentração de NO (em µM). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. #quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

#### 4.1.6. Dosagem de citocinas

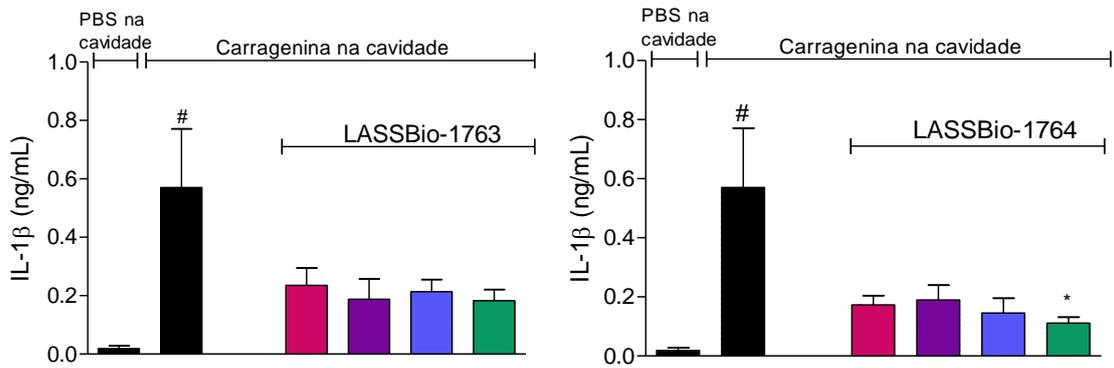
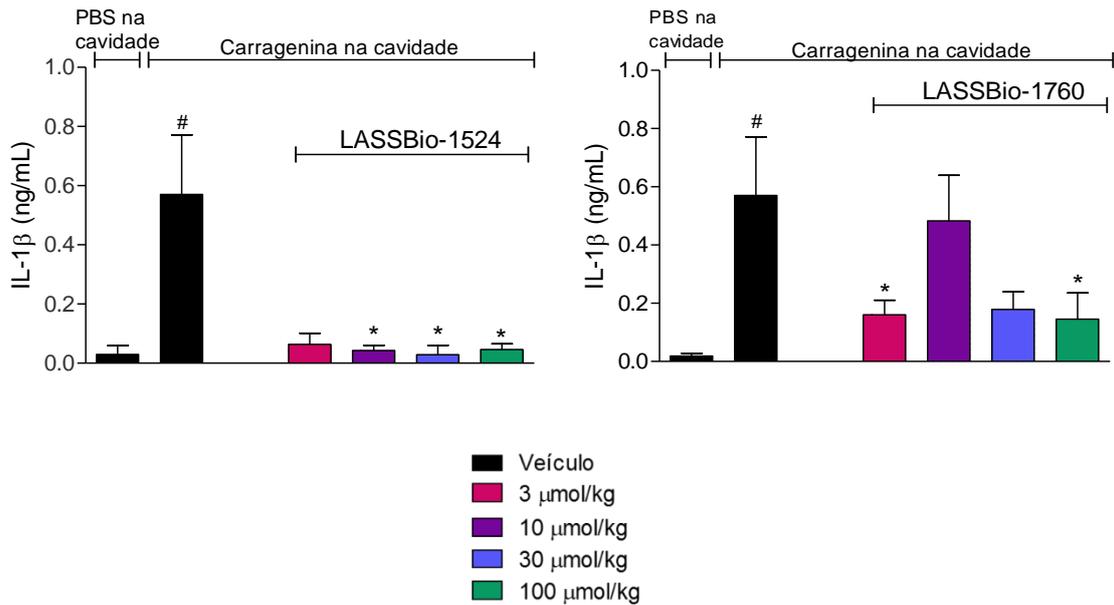
Uma vez que a ativação de NF- $\kappa$ B resulta na produção de citocinas, quimiocinas e expressão dos seus respectivos receptores (ILIOPOULOS e cols., 2009), foi feita a quantificação de algumas citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ ) e da quimiocina MCP-1, para avaliarmos se a redução na migração celular seria um reflexo somente do número de células ou se houve interferência do fator de transcrição após tratamento com os compostos. Ficou evidenciada uma elevação na produção dessas citocinas nos animais que receberam pré-tratamento com veículo e a injeção de carragenina na BAS quando comparado aos animais que receberam PBS na BAS.

Com relação à produção de TNF- $\alpha$ , os compostos foram capazes de reduzir significativamente os níveis da citocina quando comparados ao grupo que foi tratado com veículo e recebeu a injeção de carragenina na BAS ( $0,6 \pm 0,2$  ng/mL), chegando muito próximos aos valores do grupo que recebeu PBS ( $0,02 \pm 0,01$  ng/mL). Com o tratamento do LASSBio-1524, houve redução significativa dos níveis da citocina na dose de 100  $\mu$ mol/kg (92,1%). Os análogos do LASSBio-1524 reduziram a concentração de TNF- $\alpha$  em todas as doses. O LASSBio-1760 reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  em 98,4%, 96,8%, 95,3% e 92,1%, respectivamente. O LASSBio-1763 reduziu em 90,6%, 95,3%, 92,1% e 98,4%, respectivamente e o LASSBio-1764 obteve uma redução de 95,3%, 96,8%, 93,75 e 95,3%, respectivamente (Gráfico 8).



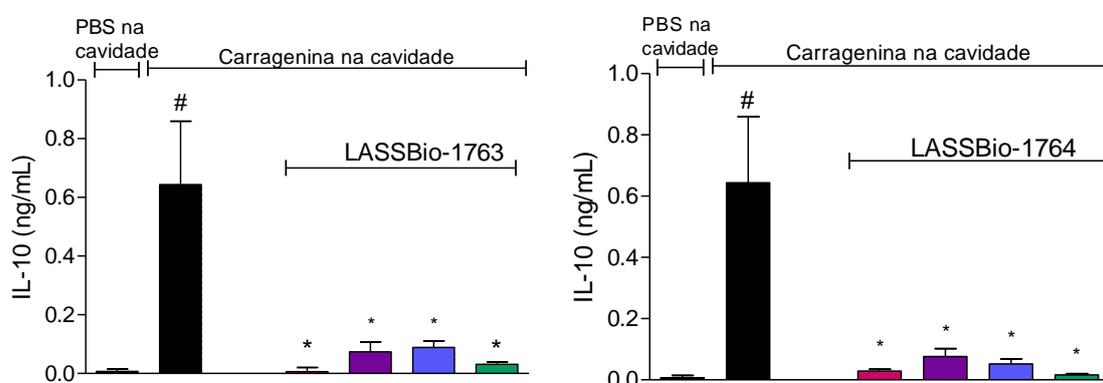
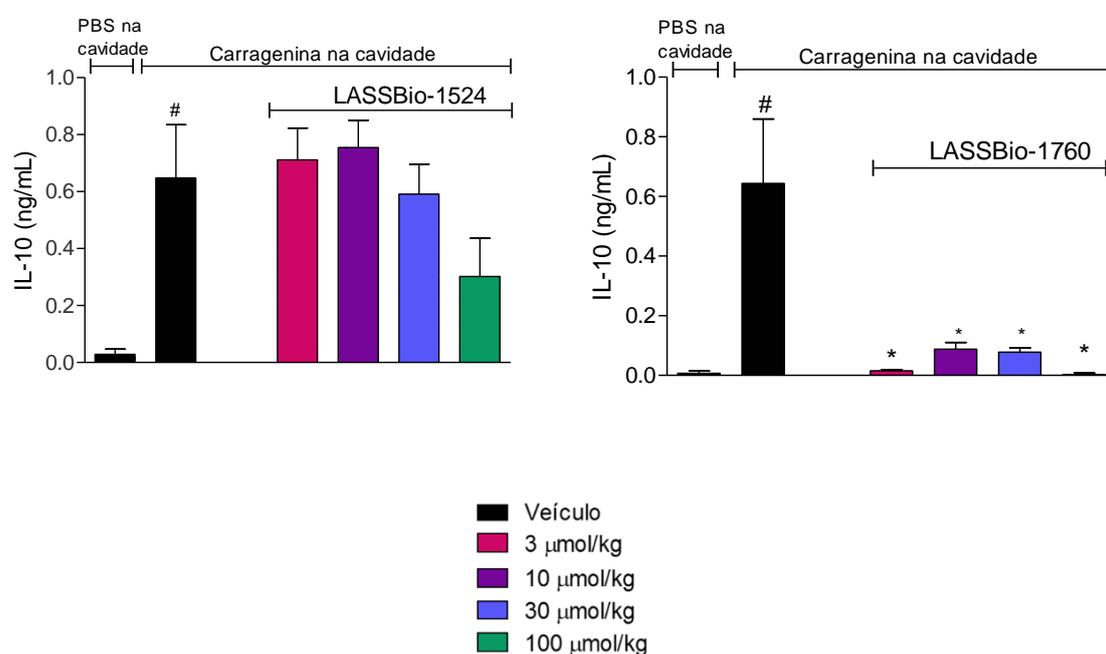
**Gráfico 8:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de TNF- $\alpha$  induzido por injeção carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da concentração de TNF- $\alpha$  (em ng/mL). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. #quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

A citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , também teve seus níveis reduzidos pelo tratamento com o LASSBio-1524 em 92,9%, 96,4%, 92,8 nas doses de 10, 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente. Com o tratamento do LASSBio-1760, houve redução significativa nas doses de 3 e 100  $\mu\text{mol/kg}$  (71,9% e 75,4%, respectivamente). O LASSBio-1763 não provocou redução significativa nos níveis de IL-1 $\beta$ . Já o LASSBio-1764 somente reduziu significativamente a concentração de IL-1 $\beta$  na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$  em 80,7% (Gráfico 9).



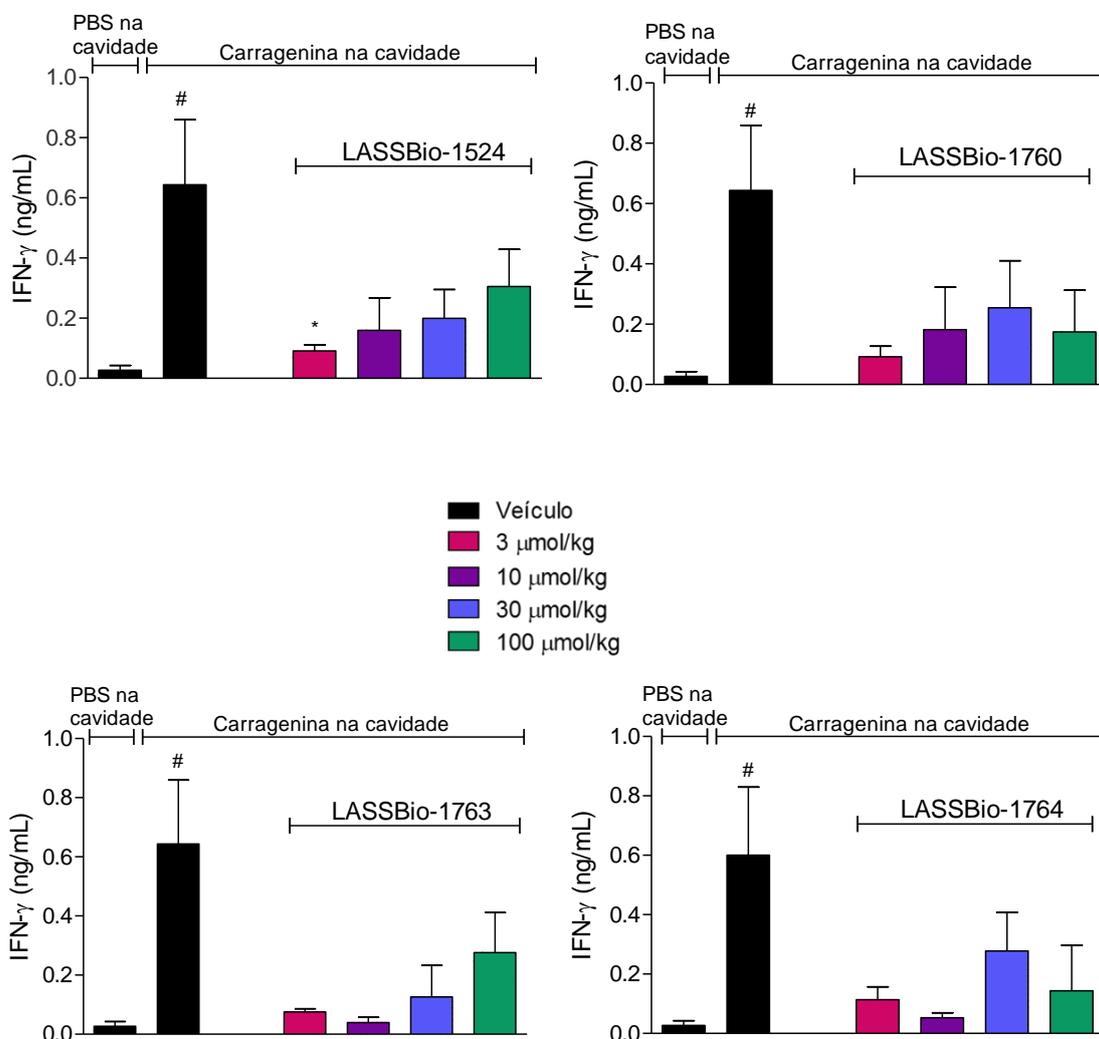
**Gráfico 9:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção da citocina IL-1 $\beta$  induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. da concentração de IL-1 $\beta$  (ng/mL). A significância estatística (\* $p < 0,05$ ) foi calculada entre os grupos tratados por análise de variância (ANOVA) seguida de pós teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. # quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

O gráfico 10 mostra que a interleucina anti-inflamatória IL-10, que também é regulada pelo fator nuclear NF- $\kappa$ B, teve sua concentração reduzida significativamente pelo pré-tratamento com os 3 análogos do LASSBio-1524, mas o próprio não foi capaz de induzir redução significativa. LASSBio-1760 demonstrou redução na produção de IL-10 em 97,6%, 87,5%, 89,1% e 99,7% respectivamente o LASSBio-1763 reduziu em 99,0%, 89,2%, 87,5% e em 95,3%. O LASSBio-1764 reduziu em 96,8%, 88,1%, 92,2% e em 98,4% a produção de IL-10.



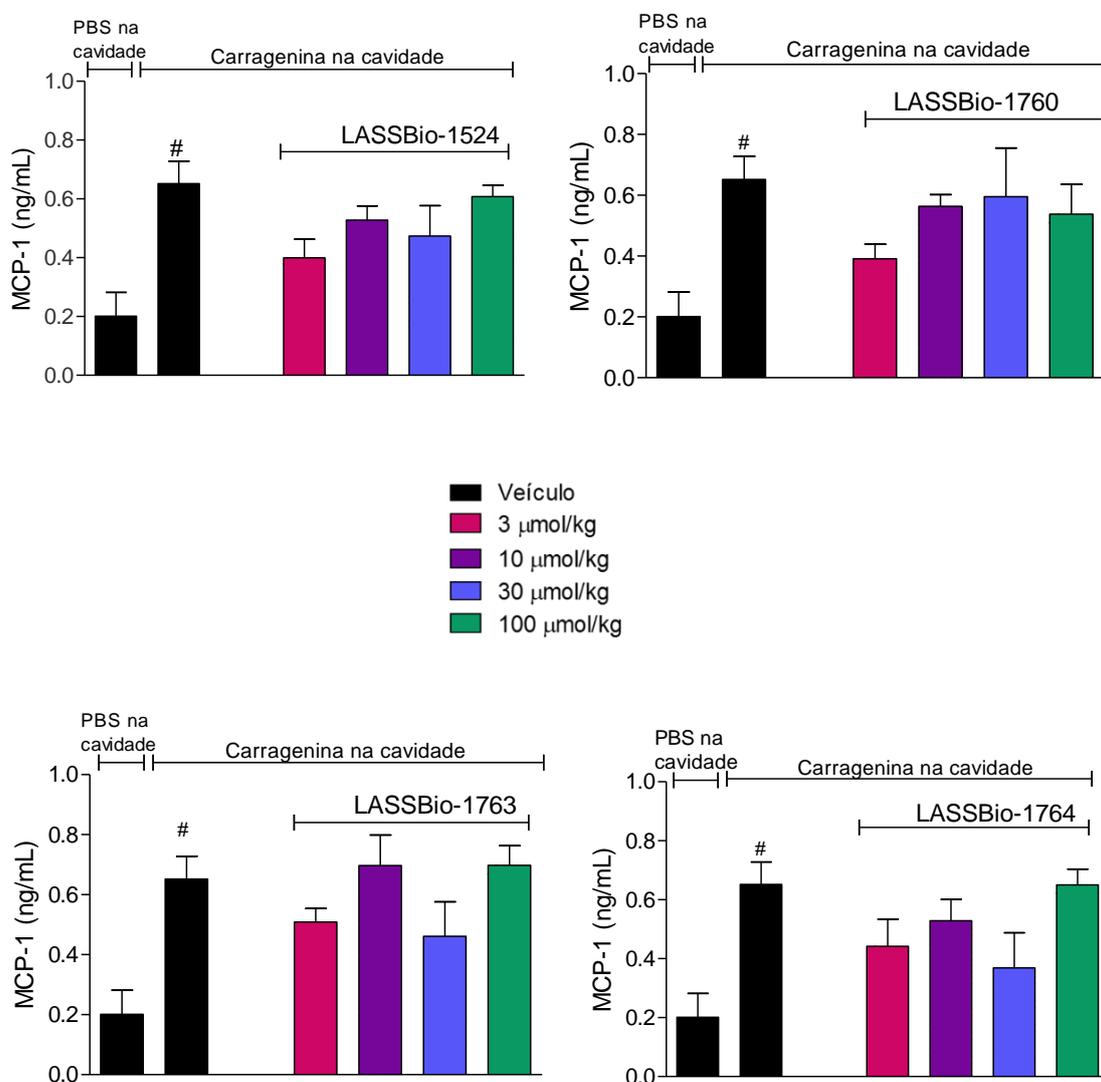
**Gráfico 10:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção da citocina IL-10 induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da concentração de IL-10 (em  $\text{ng/mL}$ ). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. #quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

Com relação a produção de interferon- $\gamma$ , no grupo dos animais pré-tratados oralmente com veículo e que receberam não teve sua produção influenciada pelo LASSBio-1524 ou seus análogos (Gráfico 11).



**Gráfico 11:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de interferon- $\gamma$  induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da concentração IFN- $\gamma$  (em ng/mL). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. #quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

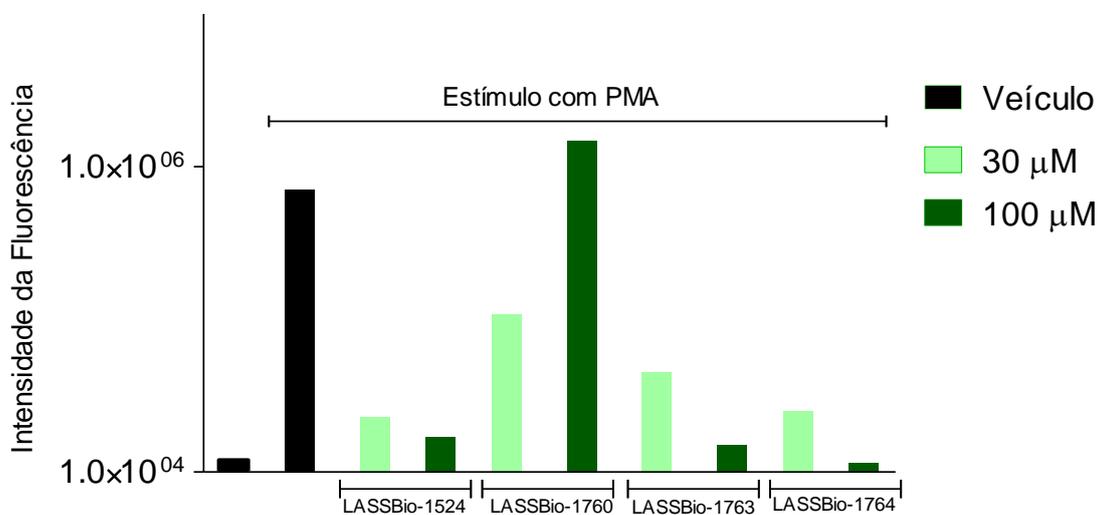
A proteína quimiotática de monócitos-1, MCP-1 também não teve sua produção influenciada significativamente pelo pré-tratamento com nenhum dos compostos (Gráfico 12).



**Gráfico 12:** Efeito dos LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 na produção de MCP-1 induzido por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de carragenina na BAS, com veículo (Polissorbato 80) ou com os LASSBios nas doses de 3, 10, 30 ou 100 µmol/kg. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão da concentração MCP-1 (em ng/mL). A significância estatística ( $p < 0,05$ ) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. \*quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu PBS na BAS. #quando comparados os grupos o pré-tratado com o veículo que recebeu carragenina na BAS.

## 4.2. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio.

Espécies reativas de oxigênio podem ter um papel importante no controle do acúmulo de leucócitos durante a inflamação. Após indução da migração celular por carragenina na BAS foi realizado uma lavagem da cavidade e as células foram tratadas com o LASSBio-1524 e seus análogos nas concentrações de 30 e 100  $\mu\text{M}$  e após marcação com a sonda 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, foi medida a intensidade de fluorescência das células que estavam expressando ROS, analisadas por citometria de fluxo em FL-1 (Gráfico 13). É possível verificar uma redução na expressão de FL1, ou seja, do metabolismo oxidativo das células após tratamento nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$  dos compostos: LASSBio-1524, nas duas concentrações do LASSBio-1763 e ainda mais pronunciada após o tratamento com LASSBio-1764.



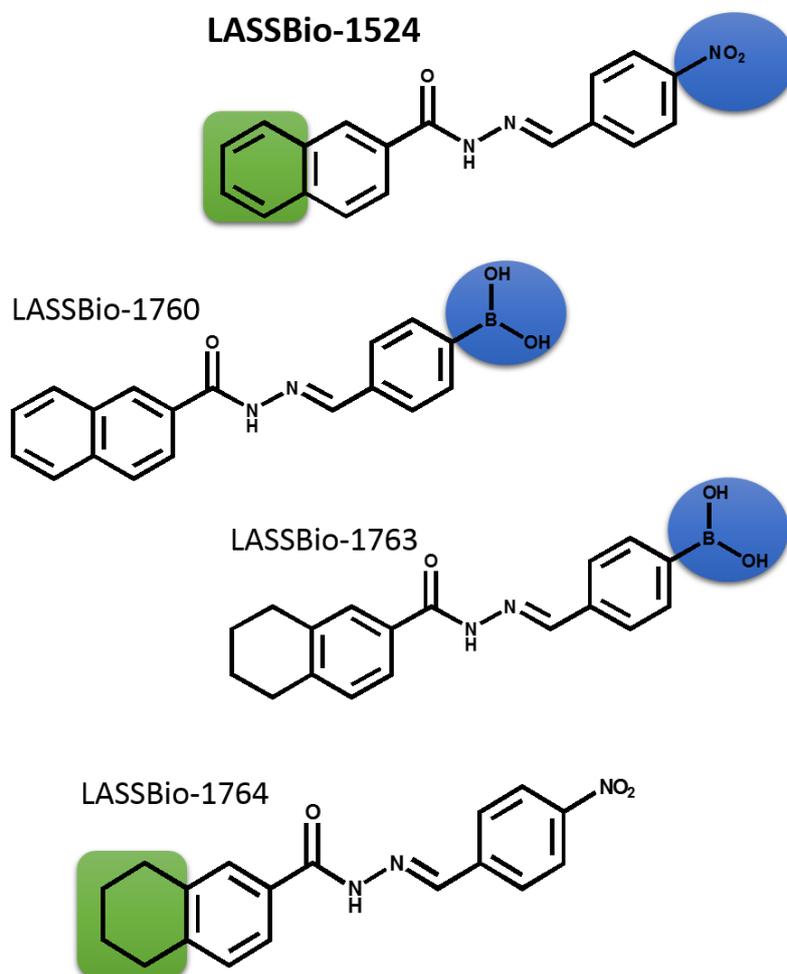
**Gráfico 13:** Metabolismo oxidativo em leucócitos coletados da BAS 24 horas após injeção de carragenina, estimulados com PMA. Leitura foi feita no Citômetro de Fluxo contando 10000 eventos. No gráfico os valores são mostrados em média geométrica da intensidade de fluorescência da expressão de DCFH em FL1.

## **5. DISCUSSÃO**

Atualmente a necessidade de encontrar novos medicamentos, mais potentes e com menos efeitos colaterais é cada vez maior. O conhecimento da topografia molecular tridimensional (3D) do receptor, especialmente do sítio de interação, permite o desenho de antagonistas/agonistas de receptores por processos de complementaridade molecular planejada, originando assim moléculas cada vez mais seletivas.

O padrão *N*-acilidrazona (NAH) caracteriza-se por possuir diferentes pontos de possível diversidade estrutural, importantes na construção de distintas famílias de compostos protótipos e possíveis candidatos a fármacos. Baseando-se nas estratégias de bioisosterismo, algumas séries de NAH foram sintetizadas e avaliadas farmacologicamente, de forma a permitir o estudo das relações entre a estrutura química e suas respectivas atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antitrombóticas (FRAGA & BARREIRO, 2006). Hoje já é conhecido que hidrazonas tem propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (SILVA e cols., 2010; PAVAN, 2010).

Em busca de novos derivados, o grupo do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Biologicamente Ativas (LASSBio) sintetizou o (E)-*N'*-(4-nitrobenziliden)-*N*-metil-2-naftoidrazida (LASSBio-1524). Esta molécula foi desenhada como inibidora da enzima IκB kinase-β. A partir dele, novos análogos denominados de LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 foram sintetizados (Figura 9) com o objetivo de terem efeitos anti-inflamatórios e/ou antitumorais mais significativos e com maior potência do que a molécula mãe. Em estudos anteriores foi mostrado que LASSBio-1524 possuía promissores efeitos anti-inflamatórios no modelo do edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AVILA e cols., 2011). Estes dados o colocaram como composto a ser testado em modelos mais completos de inflamação aguda.



**Figura 9:** Estruturas do LASSBio-1524 e de seus derivados, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764. Em azul a representação da troca bioisostérica do grupo Nitro pelo ácido Borônico. Em verde a redução da naftila.

O primeiro modelo utilizado para a investigação do potencial anti-inflamatório do LASSBio-1524 e seus 3 análogos foi o modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS), um modelo que envolve migração celular, produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), citocinas, entre outros. Este modelo é amplamente utilizado pela possibilidade de análises quantitativas dos mediadores envolvidos no processo inflamatório, o que o torna uma excelente ferramenta de estudo e triagem de novos agentes anti-inflamatórios. Além disso, a bolsa formada no dorso dos animais gera uma membrana similar à membrana sinovial, o que permitiria até a investigação de futuros candidatos a fármacos para tratamento da inflamação crônica, como artrite reumatoide (VIGIL e cols., 2008). Ellis e colaboradores, em 2000, também demonstraram que esse modelo também envolve a ativação do fator NF-κB.

Antes de estudarmos os efeitos do LASSBio-1524 e seus análogos na BAS avaliarmos se estes poderiam causar algum efeito citotóxico (no sangue ou medula). Os resultados obtidos após tratamento dos animais com as substâncias indicam que não houve alteração na contagem de leucócitos totais no sangue e na medula. Estes dados estão dentro da faixa de variação dos dados de literatura (de 4 a 12 x 10<sup>3</sup> células/μL) (QUESENBERRY e cols., 2004).

O pré-tratamento com LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 reduziu a migração celular em todas as doses testadas, de maneira dose-dependente. O cálculo da DE<sub>50</sub> levou a valores inferiores a 16 μmol/kg (Tabela 1).

|                  | LASSBio-1524 | LASSBio-1760 | LASSBio-1763 | LASSBio-1764 |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| DE <sub>50</sub> | 9 μmol/kg    | 16 μmol/kg   | 7 μmol/kg    | 5 μmol/kg    |

**Tabela 1:** Dose eficaz 50% (DE<sub>50</sub>) dos compostos com relação à migração celular no modelo da BAS.

Neste modelo da BAS parece que a redução de um dos anéis aromáticos da naftila mostrou ser uma boa alternativa para melhorar a atividade anti-inflamatória, já que os resultados obtidos com LASSBio-1763 e LASSBio-1764 foram melhores do que LASSBio-1524 e LASSBio-1760, que possuem o grupo naftila. O grupo nitro (NO<sub>2</sub>) demonstrou contribuir mais para a ação anti-inflamatória do que o grupo ácido borônico [B(OH)<sub>2</sub>].

Os mediadores inflamatórios liberados na BAS também são capazes de causar aumento na permeabilidade vascular (ALLER e cols., 2006). Sendo assim, outro parâmetro avaliado neste modelo foi o extravasamento de proteínas plasmáticas. Apenas a menor dose do LASSBio-1524 e as doses de 30 e 100 µmol/kg do LASSBio-1760 foram capazes de reduzir significativamente o extravasamento proteico, mas este fato não influenciou no potencial anti-inflamatório dos compostos. Uma possível explicação poderia ser que as substâncias testadas não devem agir diretamente em receptores localizados na superfície endotelial e que, quando ativados por seus agonistas, causam contração das células endoteliais com consequente aumento na permeabilidade vascular.

O bloqueio do NO tem potencial para produzir benefício terapêutico na inflamação, uma vez que sua produção exacerbada está presente em uma série de doenças como artrite, doença inflamatória intestinal, Alzheimer, Parkinson entre outras (VALLANCE & LEIPER, 2002; SAMPAIO e cols., 2013). Já foi observado que o bloqueio do NO em modelos de inflamação aguda contribuiu para a melhoria e redução do fenômeno inflamatório (MAHAT e cols., 2010). Também foi demonstrado em modelos de indução da inflamação com carragenina, a presença da forma induzida da enzima óxido nítrico sintase já nas primeiras 6 horas (POSADAS, 2004).

Tanto o LASSBio-1524 como seus 3 análogos, e em todas as doses, foram capazes de reduzir em mais de 60% a produção de NO, sendo o LASSBio-1760 responsável pela maior redução nas doses de 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$  (92,7% e 94,9%, respectivamente). Este dado sugere que estas substâncias poderiam estar agindo através de inibição direta das óxido nítrico sintases, principalmente a forma induzida (iNOS), reduzindo sua atividade enzimática ou talvez inibindo a síntese/expressão da iNOS nas células.

Nossos resultados também mostraram que todos os análogos reduziram os níveis de TNF- $\alpha$  de forma similar, não apresentando padrão de dose dependência ou possibilidade de calcular uma dose efetiva, uma vez que todos reduziram em mais de 90% os níveis da citocina. Estes dados, em conjunto com aqueles obtidos na inibição do NO indicam que as vias TNF- $\alpha$  e NO se interconectam. Citocinas pró-inflamatórias como, o TNF- $\alpha$ , ativam uma série de vias de sinalização, entre elas a via do NF- $\kappa\text{B}$ , e seus níveis tem conhecidamente uma correlação direta com a enzima iNOS (VODOVOTZ e cols., 1998).

A IL-1 $\beta$  é outra citocina produzida por diversos tipos celulares e também é capaz de induzir a síntese de diversas enzimas como p. ex., fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclo-oxigenase-2 e iNOS, levando à síntese de prostaglandinas e NO (AREND e cols., 2008). A inibição de IL-1 $\beta$  resulta em superregulação na expressão de moléculas de adesão, o que é um fator chave para o recrutamento de leucócitos e contribui para a inibição da migração celular (VIGIL e cols., 2008, GABAY e cols., 2010). Nossos dados mostraram que apenas o LASSBio-1524 e LASSBio-1760 foram capazes de reduzir os níveis de IL-1 $\beta$ . Estes dados indicam que essa citocina pode ter participação na inibição significativa da migração celular causada pelos dois compostos. A produção de IL-1 $\beta$  leva ao aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e à ativação da via de transcrição gênica por NF- $\kappa\text{B}$  (AREND e

cols., 2008). Uma vez que o tratamento reduziu os níveis de IL-1 $\beta$ , essas ações não acontecerão na mesma proporção, o que pode ter sido reproduzido em nossos resultados, levando à resolução do processo inflamatório.

O IFN- $\gamma$  atua ativando macrófagos e células endoteliais e estimulando a secreção de quimiocinas e citocinas, uma resposta que se manifesta de maneira benéfica e protetora do organismo (BILLIAU, 2009). Esse comportamento pode ser confirmado por nossos resultados, uma vez que apenas a menor dose do LASSBio-1524 interferiu na produção de IFN- $\gamma$ . Nenhum dos análogos foi capaz de reduzir a produção de maneira significativa.

Com relação à produção da quimiocina MCP-1, nenhum dos compostos interferiu em sua produção, o que pode ser explicado pelo fato de que esta quimiocina MCP-1 recruta monócitos, células T, células NK e células dendríticas mais tardiamente do que outras células (CARLOS & HARLAN, 1994).

A forma ativa do NF- $\kappa$ B já é encontrada no modelo da BAS desde o primeiro dia de experimento (ELLIS et al., 2000). Assim, a ação dos compostos N-acilidrazônicos através do bloqueio da via de ativação de NF- $\kappa$ B, poderia explicar a significativa atividade anti-inflamatória evidenciada e a redução justamente das citocinas cuja expressão é regulada por este fator de transcrição. A citocina anti-inflamatória IL-10 teve sua produção reduzida apenas pelo pelos três análogos do LASSBio-1524, mas não pelo próprio. Sabendo que o NF- $\kappa$ B controla a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 (GUPTA e cols., 2010), por esse motivo, pode ser que os compostos sejam capazes de inibir algum componente da cascata de ativação de NF- $\kappa$ B.

Uma vez que o stress oxidativo pode ser prejudicial na resolução da inflamação e que a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) seja o mecanismo por trás de muitas neuropatologias, o estresse oxidativo e nitrosativo tem sido implicado numa grande variedade de doenças humanas assim como no processo de envelhecimento (VALKO e cols., 2007). Nossos resultados indicam que a inibição na produção de ROS também parece ser parte do mecanismo de ação dos compostos LASSBio-1524, LASSBio-1763 e LASSBio-1764.

Os dados obtidos ao longo dessa dissertação indicam que tanto o LASSBio-1524, como seus novos análogos, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764 possuem significativo efeito anti-inflamatório reduzindo parâmetros inflamatórios. O mecanismo de ação ainda necessita ser elucidado, mas um possível alvo pode ser o NF- $\kappa$ B visto que este segundo mensageiro está presente nas vias de sinalização do NO e das citocinas cujos níveis foram reduzidos.

Para resumir todos os dados, a tabela 2 mostra todos os resultados obtidos com os testes da BAS, a migração de leucócitos, as dosagens de mediadores e ainda a dosagem de espécies reativas e oxigênio.

| <b>Pré-<br/>tratamento</b> |      | <b>Migração<br/>leucócitos</b> | <b>PV</b> | <b>NO</b> | <b>IL-1<math>\beta</math></b> | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>IL-10</b> | <b>MCP-<br/>1</b> | <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>ROS</b> |
|----------------------------|------|--------------------------------|-----------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------|-------------------|--------------------------------|------------|
| -                          | Carr | ↑↑↑                            | ↑↑↑       | ↑↑↑       | ↑↑↑                           | ↑↑↑                            | ↑↑↑          | ↑↑↑               | ↑↑↑                            | ↑↑↑        |
| <b>LASSBio-<br/>1524</b>   | Carr | ↓↓↓                            | ↓         | ↓↓        | ↓↓                            | ↓                              | s/ef         | s/ef              | ↓                              | ↓↓         |
| <b>LASSBio-<br/>1760</b>   | Carr | ↓↓↓                            | ↓         | ↓↓↓       | ↓                             | ↓↓↓                            | ↓↓↓          | s/ef              | s/ef                           | s/ef       |
| <b>LASSBio-<br/>1763</b>   | Carr | ↓↓↓                            | s/ef      | ↓↓        | s/ef                          | ↓↓↓                            | ↓↓↓          | s/ef              | s/ef                           | ↓↓         |

|                     |      |     |      |    |      |     |     |      |      |     |
|---------------------|------|-----|------|----|------|-----|-----|------|------|-----|
| <b>LASSBio-1764</b> | Carr | ↓↓↓ | s/ef | ↓↓ | s/ef | ↓↓↓ | ↓↓↓ | s/ef | s/ef | ↓↓↓ |
|---------------------|------|-----|------|----|------|-----|-----|------|------|-----|

**Tabela 2:** Resumo dos efeitos do LASSBio-1524 e seus análogos. Carr = carragenina; PV = permeabilidade vascular, s/ef = sem efeito; ↑ = aumento; ↓ = redução

Com isso pode-se dizer que o composto LASSBio-1764, que teve melhor resultado na migração celular, apresentando a menor DE<sub>50</sub>, seria o composto mais potente e por isso promissor, embora não tenha tido efeito significativo na permeabilidade vascular e na inibição significativa da produção de IL-1 $\beta$ , sua capacidade de conter o processo inflamatório observado na BAS isso não foi afetada.

Dessa forma, o LASSBio-1764 poderia ser o composto de escolha para a continuidade dos estudos em outros modelos experimentais e para possíveis novas alterações na sua estrutura química.

## **7. CONCLUSÕES**

Após realização do estudo farmacológico com o LASSBio-1524, LASSBio-1760, LASSBio-1763 e LASSBio-1764, podemos concluir que:

Todos os compostos mostraram efeito anti-inflamatório uma vez que inibiram:

- A migração celular no modelo da BAS;
- A produção de óxido nítrico (NO);
- A produção de citocinas anti-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ;
- A citocina pró-inflamatória IL-10;
- O metabolismo oxidativo de neutrófilos polimorfonucleares.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLER, M.A.; ARIAS J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Medical Science Monitor**. 12: 225-234. 2006.

ANDINA, N.; CONUS, S.; SCHNEIDER, E.M.; FEY, M.F.; SIMON, H.U. Induction of Bim limits cytokine-mediated prolonged survival of neutrophils. **Cell Death & Differentiation**. 16: 1248–55. 2009.

AREND, W.P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunological Reviews**. 223: 20–38. 2008.

ARITA, M. Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution **The Journal of Biochemistry**. 152: 313–319. 2012.

AVILA, C.M.; LOPES, A.B.; GONÇALVES, A.S.; SILVA, L.L.; ROMEIRO, N.C.; MIRANDA, A.L.P.; SANT'ANNA, C.M.R.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. Structure-based design and biological profile of (E)-N-(4-Nitrobenzylidene)-2-naphthohydrazide, a novel small molecule inhibitor of I $\kappa$ B kinase- $\beta$ . **European Journal of Medicinal Chemistry**. 46: 1245-1253. 2011.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: ARTMED. Cap. 6: Estratégias de modificação molecular. p. 163-210. 2008.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The biology of cachectin/TNF-a primary mediator of the host response. **Annual Review of Immunology**. 7: 625-55. 1989.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon- $\gamma$ : A historical perspective. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 20: 97–113. 2009.

BORISH, L.C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 111: 460-475. 2003.

BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**. 31: 208-219. 2006.

BOTTING, R.M. Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. **Pharmacological Reports**. 62: 518-525, 2010.

BOURGUIGNON, J. J. Identical and non-identical twin drugs. In: WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Nova Iorque: Academic Press. 261-294. 1996.

BUSILLO, J.M.; CIDLOWSKI, J.A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. **Trends in Endocrinology & Metabolism**. 24: 109-19. 2013.

CAMANDOLA S.; MATTSON M. P. NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. 11: 123-132. 2007.

CARLOS T.M.; HARLAN J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**. 4: 2068-210. 1994.

CHAN, C.C.; REID, C.M.; AW, T.J.; LIEW, D.; HAAS, S.J.; KRUM, H. Do COX-2 inhibitors raise blood pressure more than nonselective NSAIDs and placebo? An update meta-analysis. **Journal of Hypertension**. 12: 2332-2341. 2009.

CHAPLIN, D.D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 125: S3-23. 2010.

CHEN, G.Y.; NUÑEZ, G.; Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**. 10: 826-837. 2010.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO L, CAPUTI, A.P.; RILEY, D.P.; SALVEMINI, D. Protective effects of M40403, a superoxide dismutase mimetic, in a rodent model of colitis. **European Journal of Pharmacology**. 30: 79-89. 2001.

DUARTE, C.D.; BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A. Privileged Structures: A Useful Concept for the Rational Design of New Lead Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 7: 1108-1119. 2007.

EBERHARDT, M.K. **Reactive oxygen metabolites – Chemistry and medical consequences.** 1<sup>a</sup> ed. Boca Raton: CRC PRESS. Cap. 3: Chemistry of oxygen-derived radicals. p. 34. 2001.

ELLIS, L.; GILSTON V.; SOO C.C.; MORRIS, C.J.; KIDD B.L.; WINYARD, P.G. Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in the rat air pouch model of inflammation. **Annals of the Rheumatic Diseases.** 59: 303–307. 2000.

FANG W.T.; LI H.J.; ZHOU L.S. Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. **Acta Pharmacology,** 31: 485–492, 2010.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. **Nature Reviews.** 2: 820-833, 2004.

FLOWER, R. J. The development of COX2 inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery.** 2: 179-191. 2003.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, anti-inflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry,** 13: 167-198, 2006.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy,** 4: 281-288. 2005.

FURZE, R.C.; RANKIN, S.M.; Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology,** 125: 281-288. 2008.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Reviews Rheumatology.** 6: 232-241. 2010.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- $\kappa$ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology.** 16: 225-260. 1998.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHONK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry.** 126: 131-138. 1982.

GUERRA, A.N.; GAVALA, M.L.; CHUNG, H.S.; BERTICS, P.J. Nucleotide receptor signaling and the generation of reactive oxygen species. **Purinergic Signaling**. 3: 39-51. 2007.

GUPTA, S.C.; SUNDARAM, C.; REUTER, S.; AGGARWAL, B.B. Inhibiting NF- $\kappa$ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1799: 775–787. 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERUDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. 4<sup>a</sup> Ed. - Oxford: **Oxford University Press**. Cap.1 Oxygen is a toxic gas—an introduction to oxygen toxicity and reactive species. p. 22. 2007.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived icosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**. 10: 461-469. 2008.

HAYDEN, M.S. GOSH, S. Signaling to NF- $\kappa$ B. **Genes & Development**. 18: 2195-2224. 2004.

HILÁRIO, M.O.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Journal of Pediatrics**. 06: 82-85. 2006.

HILL, H.D.; STRAKA, J.G. Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Analytical Biochemistry*. 170: 203-208. 1988.

HUSSAIN, S.; THOMASSEN, L.C.; FERECATU, I.; BOROT, M.C.; ANDREAU, K.; MARTENS, J.A. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. **Particle and Fiber Toxicology**. 7-10. 2010.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**. 69: 11–25, 1992.

ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H.A.; STRUHL, K. An epigenetic switch involving NF- $\kappa$ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. **Cell**. 139: 693–706. 2009.

KUN, J.F. Nitric oxide synthase 2 (Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. **Journal Infectious Diseases**. 184: 330–336. 2001.

KUNKEL, S. L.; LUKACS, N.; STRIETER, R. M. Chemokines and their role in human disease. **Agents & Actions Supplements**. 46: 11-22, 1995.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, N.D. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**. 52: 556–592. 2012.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Immunology**. 2: 787-795. 2002.

LELEKOV-BOISSARD, T.; CHAPUISAT, G.; BOISSEL, J.P.; GRENIER, E.; DRONNE, M.A. Exploration of beneficial and deleterious effects of inflammation in stroke: Dynamics of inflammation cells. **Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**. 367: 4699–716. 2009.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**. 12: 23- 49. 2005.

LOPES, F; COELHO, FM.; COSTA, V.V.; VIEIRA, E.L.M.; SOUSA, L.P.; SILVA, T.A. ; VIEIRA, LQ.; TEIXEIRA, MM.; PINHO, V. Hydrogen peroxide resolves neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. **Arthritis and Rheumatism**. 63: 2651-2660. 2011.

MAHAT, M.Y.; KULKARNI, N.M.; VISHWAKARMA, S.L.; KHAN, F.R.; THIPPESWAMY, B.S.; HEBBALLI, V.; ADHYAPAK A.A.; BENADE, V.S.; ASHFAQUE, S.M.; TUBACHI, S.; PATIL, B.M. Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of kaempferol. **European Journal of Pharmacology**. 642: 169-176. 2010.

MAZZON, E. CUZZOCREA, S. Role of TNF- $\alpha$  in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. **Respiratory Research**. 8: 75-94. 2007.

- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454: 428-435. 2008.
- MONCADA, S; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. 43: 109-142. 1991.
- MULLER WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte Transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**. 24: 326–33, 2003.
- MULLER, W.A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annual Reviews in Pathology and Mechanistic Diseases**. 6: 323–344. 2011.
- MULLER, W.A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Veterinary Pathology**. 50: 7-22. 2013.
- NG, T.H.; BRITTON, G.J.; HILL, E.V.; VERHAGEN, J.; BURTON, B.R.; WRAITH, D.C. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Frontiers in Immunology**. 129: 1-13, 2013.
- OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M.S.; SANKAR. Crosstalk in NF-  $\kappa$ B signaling pathways. **Nature Immunology**. 12: 695–708. 2011.
- ORISH, C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 11: S460-S475. 2003.
- PAVAN, F.R.; MAIA, P.I. DA S.; LEITE, S.R.A.; DEFLON, VICTOR M.; BATISTA, ALZIR, A.; SATO, DAISY, N.; FRANZBLAU, SCOTT, G.; CLARICE, Q.F. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-mycobacterium tuberculosis activity and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45: 1898-1905. 2010.
- PERKINS, N.D. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. **Nature Reviews**. 8: 49-62. 2007.
- PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W.R. Leucotrienes. **The New England Journal of Medicine**. 357: 1841-1854, 2007.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**. 142: 331-338, 2004.

PRASAD, G.; MCCULLOUGH, M. Chemokines and cytokines as salivary biomarkers for the early diagnosis of oral cancer. **International Journal of Dentistry**. 2013: 1-7. 2013.

PRUETT, S.B.; FAN, R.; ZHENG Q. Characterization of glucocorticoid receptor translocation, cytoplasmatic ikappaB, nuclear NFkappaB and activation of NFkappaB in T lymphocytes exposed to stress inducible concentrations of corticosterone *in vivo*. **International Immunopharmacology**. 3: 1-16. 2003.

QUAN N.; HE L.; LAI W.; SHEN T.; HERKENHAM M. Induction of Ikappabalpha mRNA expression in the brain by glucocorticoids: a negative feedback mechanism for immune-to-brain signaling. **Journal of Neuroscience**. 20: 6473-6477. 2000.

QUESENBERRY, K.E.; CARPENTER, J.W. **Ferrets, Rabbits, and Rodents** - Clinical Medicine and Surgery. 2<sup>a</sup> ed. Philadelphia: SAUNDERS. Cap. 28: Basic Anatomy, Physiology, Husbandry, and Clinical Techniques. p. 286-298. 2004.

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical Issues**. 15: 3-17. 2004.

RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hypis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. 134: 725-732. 2011.

RIDNOUR, L.A.; SIM, J.E.; CHOI, J.; DICKINSON, D.A.; FORMAN, H.J.; AHMAD, I.M.; COLEMAN, M.C.; HUNT, C.R.; GOSWAMI, P.C.; SPITZ, D.R. Nitric oxide-induced resistance to hydrogen peroxide stress is a glutamate cysteine ligase activity-dependent process. **Free Radical Biology & Medicine**. 38: 1361-71. 2005.

ROLLAS, S.; KUCUKGUZEL, S.G. Biological activities of hydrazone derivatives. **Molecules**. 12: 1910-1939. 2007.

SAMPAIO, A. L. F.; DALLI, J.; BRANCALEONE, V.; D'ACQUISTO, F.; PERRETTI, M.; WHEATLEY, C. Biphasic Modulation of NOS Expression, Protein and Nitrite Products by Hydroxocobalamin Underlies Its Protective Effect in Endotoxemic Shock: Downstream Regulation of COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and HMGB1 Expression. **Mediators of Inflammation**. 2013: -20. 2013.

SCANNELL, M.; MADERNA, P. Lipoxins and Annexin-1: Resolution of Inflammation and Regulation of Phagocytosis of Apoptotic Cells. **The Scientific World Journal**. 6: 1555–1573. 2006.

SCHENONE, S. BRULLO, C.; BRUNO, O.; BONDAVALLI, F.; RANISE, A.; FILIPPELLI, W.; RINALDI, B.; CAPUANOB, A.; FALCONEB, G. New 1,3,4-thiadiazole derivatives endowed with analgesic and anti-inflammatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 14: 1698–1705. 2006.

SCHURGERS E.; VANOIRBEEK J.; BILLIAU A.; HOET P.; NEMERY B.; VERBEKEN E.; MATTHYS P. Pulmonary inflammation in mice with collagen-induced arthritis is conditioned by complete Freund's adjuvant and regulated by endogenous IFN- $\gamma$ . **European Journal of Immunology**. 42: 3223-3234. 2012.

SCHWEINGRUBER, N.; REICHARDT, S.D.; LUHDER, F.; REICHARDT H.M. Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Journal of Neuroendocrinology**. 24: 174-182. 2012.

SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**. 23: 197-223. 2005.

SERHAN, C.N.; KRISHNAMOORTHY, S.; RECCHIUTI, A.; CHIANG, N. Novel anti-inflammatory pro-resolving mediators and their receptors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 11: 629-647. 2011.

SILVA, Y.K.C.; AUGUSTO, C.V.; BARBOSA, M.L. de C.; MELO, G.M. de A.; QUEIROZ, A.C. de; DIAS, T. de L. M. F.; BISPO, W.; Jr.; BARREIRO, E.J.; LIMA, L.M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 18: 5007-5015. 2010.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J. AND KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. 150: 76-85. 1985.

SMYTH, M.J.; JOHNSTONE, R.W. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Microscopy Research and Technique**. 50: 196-208. 2000.

SRIRAM, S.; SUBRAMANIAN, S.; SATHIAKUMAR, D.; VENKATESH, R.; SALERNO, M.S.; MCFARLANE, C.D.; KAMBADUR, R.; SHARMA, M. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- $\kappa$ B. **Aging Cell**. 10: 931-948. 2011.

SRIVASTAVA, N.; GONUGUNTA, V.K; PULI, M.R.; RAGHAVENDRA, A.S. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. **Planta**. 4: 757-765. 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39: 44-84. 2007.

VALLANCE, P.; LEIPER, J. Blocking NO synthesis: how, where and why? **Nature Reviews Drug Discovery**. 1: 939-950. 2002.

VIGIL, S. V. G.; DE LIZ R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model air pouch. **Transplante Immunology**. 19: 25-29. 2008.

VODOVOTZ, Y.; KOPP J.B.; TAKEGUCHI, H.; SHRIVASTAV, S.; COFFIN, D.; LUCIA, M.S.; MITCHELL, J.B.; WEBBER, R.; LETTERIO, J.; WINK, D.; ROBERTS, A. B. Increased mortality, blunted production of nitric oxide, and increased production of TNF- $\alpha$  in endotoxemic TGF- $\beta$ 1 transgenic mice. **Journal of Leukocyte Biology**. 63: 31–39. 1998.

WATANABE, H.; NUMATA, K.; ITO, T.; TAKAGI, K.; MATSUKAWA, A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**. 22: 460-466. 2004.

WERMUTH, C.G. Selective optimization of side activities: another way to drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**. 47: 1303-1314. 2004.

YANG, C.S.; SHIN, D.M.; JO, E.K. The role of NLR-related protein 3 inflammasome in host defense and inflammatory diseases. **International Neurology Journal**. 16: 2-12. 2012.