



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

MARCUS VINICIUS PEREIRA DOS SANTOS NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE
IMIDAZÓIS INÉDITOS**

FLORIANÓPOLIS

2019

Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE IMIDAZÓIS
INÉDITOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Monguilhott
Dalmarco

Florianópolis

2019

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

Nascimento, Marcus Vinicius Pereira dos Santos
Avaliação pré-clínica do efeito anti-inflamatório de
imidazóis inéditos / Marcus Vinicius Pereira dos Santos
Nascimento ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco,
2019.
119 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Inflamação. 3. Imidazóis. I. Dalmarco,
Eduardo Monguilhott. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento
Avaliação pré-clínica do efeito anti-inflamatório de imidazóis inéditos

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

Prof^a. Isabel Daufenback Machado, Dr^a.
Fundação Universidade Regional de Blumenau

Prof. Felipe Dal Pizzol, Dr.
Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof. Flavio Henrique Reginatto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof^a. Dr^a. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Orientador

Florianópolis, 11 de julho de 2019.

Dedico este trabalho a meus pais, Giovani Nascimento e Regina Pereira dos Santos, por servirem de norte e suporte total para realização dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PPGFAR) pela oportunidade de realizar o doutorado.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, pela orientação.

Ao Professor Dr. Marcus Mandolesi de Sá e sua aluna Thais Rossa por sintetizarem e cederem os compostos que possibilitaram a realização desta tese.

Aos colegas de laboratório, que me acompanharam nos anos desta jornada.

Ao meu grande amigo e irmão Ricardo Braun Carabaca e a todo o Clube do Graveto, pelo incentivo e parceria mesmo nos piores momentos. Ao amigo e parceiro de trincheira Antônio Carlos Mattar Munhoz, que dividiu momentos de alegria e tristeza em busca do mesmo objetivo.

À minha família: meus pais Giovani Nascimento e Regina Pereira dos Santos; a meus avós Idalgo Nascimento e Elenita Nascimento, Vital Pereira dos Santos e Irene Pereira dos Santos; aos meus irmãos Marina Bartel, Murilo Bartel e Giulia Medeiros Nascimento pelo apoio, inspiração e carinho. Agradeço especialmente a minha mulher, Ana Caroline Klemz, por ser a base sólida necessária para construção e conclusão desta etapa.

Uma única coisa deve importar ao Homem: permanecer de pé
entre as ruínas. (Julius Evola, 1934)

RESUMO

A inflamação continua sendo hoje um dos principais fatores agravantes de diferentes doenças e, como tal, é uma das grandes responsáveis pelo congestionamento de clínicas médicas e atendimento em saúde de forma geral. Os imidazóis, tanto naturais como sintéticos, são moléculas conhecidas pelo seu amplo espectro de efeitos biológicos, incluindo nestes a atividade anti-inflamatória. Nesta tese, o foco inicial foi triar dentre oito moléculas inéditas de imidazóis tetra substituídos sintetizadas na Universidade Federal de Santa Catarina, quais apresentariam efeito anti-inflamatório *in vitro*. Para tal, as oito moléculas foram testadas *in vitro* em cultura de macrófagos J774 estimulados com LPS, em concentrações não citotóxicas, frente a sua capacidade de inibir a secreção de metabólitos do óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias. Na sequência, as moléculas com efeito significativo foram testadas *in vivo* em modelo de pleurisia induzida pela carragenina. Dos sete imidazóis analisados nesta fase, um Fluorofenil-imidazol (8) se destacou, apresentando resultados promissores *in vitro*, inibindo a secreção de metabólitos do óxido nítrico e das citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), além de manter este padrão de efeito também *in vivo*, atenuando a migração de leucócitos e exsudação na cavidade pleural de camundongos que sofreram a pleurisia induzida pela carragenina. Somado a estes resultados, este Fluorofenil-imidazol reverteu o padrão de estresse oxidativo desencadeado pela carragenina na cavidade pleural, diminuindo de forma significativa a atividade da mieloperoxidase, superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase, além de reduzir a produção de metabólitos do óxido nítrico e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Na sequência, o Fluorofenil-imidazol também foi analisado novamente *in vitro* frente a sua capacidade de inibir a translocação da subunidade p65 do NF- κ B para o núcleo, também em macrófagos J774 estimulados por LPS e, nestes experimentos, esta molécula demonstrou efeitos inibitórios sobre este fator de transcrição. Partindo destes resultados de triagem, a segunda parte desta tese foi direcionada para análise da atividade do Fluorofenil-imidazol em modelo específico de lesão aguda pulmonar induzida por LPS *in vivo*, mimetizando as condições encontradas em pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, além de avaliar a toxicidade oral aguda deste composto em modelo *in vivo* sugerido pela OECD nº 423. Os resultados destas análises demonstram que o Fluorofenil-imidazol tem a capacidade de inibir a migração leucocitária e exsudação nos pulmões de camundongos instilados intranasalmente com LPS, além de manter a arquitetura pulmonar destes animais preservada. Somado a isto, o composto em questão diminui de forma significativa a atividade da enzima mieloperoxidase, assim como as concentrações de metabólitos de óxido nítrico e das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17, IFN γ e IL-10. Estes efeitos inibitórios se deram, ao menos em parte, a capacidade do Fluorofenil-imidazol de inibir a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B e da MAPK p38 no tecido pulmonar dos camundongos. Finalmente, os resultados relacionados a toxicidade oral aguda indicaram que esta molécula não exibe perfil tóxico em modelo de tratamento agudo, sendo sua LD₅₀ estimada pelo algoritmo da OECD nº 423 maior que 5000 mg/kg. Conclui-se desta forma que o Fluorofenil-imidazol é uma molécula com importante efeito anti-inflamatório, e testes específicos relacionados ao seu exato mecanismo de ação e toxicidade de doses repetidas possibilitariam avançar na pesquisa para desenvolvimento de um protótipo anti-inflamatório baseado em sua estrutura molecular.

Palavras chave: inflamação, imidazol e NF- κ B.

ABSTRACT

Inflammation continues to be one of the main aggravating factors of different diseases and, as such, is one of the main responsible for the congestion of medical clinics and health care in general. Imidazoles, both natural and synthetic, are molecules known for their broad spectrum of biological effects, including anti-inflammatory activity. In this thesis, the initial focus was to screen eight molecules of tetra substituted imidazoles synthesized at the Federal University of Santa Catarina, and analyze if any of it presented anti-inflammatory effect *in vitro*. To that end, the eight molecules were tested *in vitro* in culture of LPS-stimulated J774 macrophages at non-cytotoxic concentrations, against their ability to inhibit the secretion of nitric oxide metabolites and pro-inflammatory cytokines. Subsequently, molecules with significant effect were tested *in vivo* in a carrageenan-induced pleurisy model. Of the seven imidazoles analyzed at this stage, a Fluorophenyl imidazole (8) was highlighted, showing promising results *in vitro*, inhibiting the secretion of nitric oxide metabolites and cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β). This inhibitory pattern was maintained *in vivo*, attenuating leukocyte migration and exudation in the pleural cavity of mice that suffered carrageenan-induced pleurisy. In addition to these results, this Fluorophenyl imidazole reversed the oxidative stress pattern triggered by carrageenan in the pleural cavity, significantly reducing the activity of myeloperoxidase, superoxide dismutase, catalase and glutathione-S-transferase, along with the reduction on the production of oxide metabolites nitric and thiobarbituric acid reactive substances. Fluorophenyl imidazole was also analyzed again *in vitro* against its ability to inhibit the translocation of the p65 subunit of NF- κ B to the nucleus, also in LPS-stimulated J774 macrophages, and in these experiments this molecule demonstrated inhibitory effects on this transcription factor. Based on these screening results, the second part of this thesis was directed to the analysis of the activity of Fluorophenyl imidazole in a specific model of acute lung injury induced by LPS *in vivo*, mimicking the conditions found in patients with acute respiratory distress syndrome, and the acute oral toxicity of this compound in a *in vivo* model suggested by OECD No. 423. The results of these analyzes demonstrate that Fluorophenyl imidazole has the ability to inhibit leukocyte migration and exudation in the lungs of mice instilled with LPS intranasal, in addition to maintaining the pulmonary architecture of these animals preserved. In addition, the compound in question significantly decreases the activity of the myeloperoxidase enzyme, as well as the concentrations of nitric oxide metabolites and cytokines TNF- α , IL-6, IL-17, IFN γ and IL-10. These inhibitory effects were at least in part due to the ability of Fluorophenyl imidazole to inhibit the phosphorylation of the p65 subunit of NF- κ B and p38 MAPK in the lung tissue of mice. Finally, results related to acute oral toxicity indicated that this molecule does not exhibit a toxic profile in an acute treatment model, its LD₅₀ being estimated by the OECD algorithm no. 423 higher than 5000 mg/kg. It is concluded that Fluorophenyl imidazole is a molecule with an important anti-inflammatory effect, and specific tests related to its exact mechanism of action and toxicity of repeated doses would allow to advance the research for the development of an anti-inflammatory prototype based on its structure molecular.

Keywords: inflammation, imidazole and NF- κ B.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
- ANOVA – Análise de variância
- AP-1 – Proteína ativadora 1
- APCs – Células apresentadoras de antígenos
- BAFF – Fator ativador de células B
- Bcl-10 – Proteína linfoma de células B 10
- CAT – Catalase
- CC10 – Concentração de composto necessário para matar 10% das células viáveis
- CD40L – Ligante CD40
- COX 2 – Ciclooxigenase 2
- cPLA2 α - Fosfolipase A2 α citosólica
- DAMPs – Padrões moleculares associados a dano
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA – Ensaio imuno enzimático
- eNOS/NOS3 – Óxido nítrico sintase endotelial
- ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FAAH - Amida de ácido graxo hidrolase
- GPx – Glutathione peroxidase
- GSNOR - S-nitrosoglutathione reductase
- GST – Glutathione S-transferase
- Hsp27 – Proteína de choque térmico 27
- i.p. – via de administração intraperitoneal
- i.pl. – via de administração intra-pleural
- ICAM-1 – Molécula 1 de adesão intercelular
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-1 β – Interleucina 1 β
- IL-6 – Interleucina 6
- iNOS/NOS2 – Óxido nítrico sintase induzida
- I κ B α – Subunidade inibitória α do fator de transcrição nuclear κ B
- LBA – Lavado Broncoalveolar
- LOX – Lipoxigenase

LPS – Lipopolissacarídeo
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno p38
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
mPGES-1 - Sintase de prostaglandina E2 microssomal
MPO – Mieloperoxidase
MyD88 – Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxigenase
NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF- κ B - Fator nuclear κ B
NLR – Receptores do tipo NOD
nNOS/NOS1 – Óxido nítrico sintase neuronal
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
NO_x – Metabólitos do óxido nítrico
NRF-2 – Fator nuclear do tipo 2
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PDE4 - Fosfodiesterase 4
PRRs – Receptores reconhecedores de padrões
RANKL – Ligante de receptor ativador de NF- κ B
RLR – Receptores do tipo RIG-I
SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SOD – Superóxido dismutase
TGF- β – Fator de transformação do crescimento β
TLR – Receptores do tipo Toll
TNFSF3 – Linfotóxina B
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
VCAM-1 – Molécula 1 de adesão da célula vascular

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
CAPÍTULO 1	17
1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO	18
1.2 MODELOS INFLAMATÓRIOS <i>IN VIVO</i>: PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA & LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA PELO LPS	30
1.3 MODELOS DE TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>: OECD 423 – PROTOCOLO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL	32
1.4 IMIDAZÓIS	33
CAPÍTULO 2	36
2.1 INTRODUÇÃO	37
2.2 OBJETIVOS	38
2.2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
2.2.2.1 <i>In vitro</i> :	38
2.2.2.1 <i>In vivo</i> :	39
2.3 MÉTODOS	39
2.3.1 COMPOSTOS	39
2.3.2 CULTURA CELULAR	42
2.3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	42
2.3.4 ENSAIO DE INFLAMAÇÃO <i>IN VITRO</i> E DESENHO EXPERIMENTAL	43
2.3.5 QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO <i>IN VITRO</i>	43
2.3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS TNF- α , IL-6 E IL-1 β <i>IN VITRO</i>	43
2.3.7 ANIMAIS	44
2.3.8 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E EUTANÁSIA	44
2.3.9 INDUÇÃO DA PLEURISIA E DESENHO EXPERIMENTAL	44
2.3.10 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL	45
2.3.11 DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO	45
2.3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE	46
2.3.13 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO <i>IN VIVO</i> (NO _x)	46
2.3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	47

2.3.15	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)	48
2.3.16	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERSASES (GST)	48
2.3.17	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	48
2.3.18	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- α , IL-6 E IL-1 β	49
2.3.19	QUANTIFICAÇÃO DO P65 CITOSÓLICO	49
2.3.20	ANÁLISE DOS DADOS	49
2.4	RESULTADOS	50
2.4.1	IMIDAZÓIS INIBIRAM OS PARAMETROS INFLAMATÓRIOS <i>IN VITRO</i> EM MACRÓFAGOS J774.....	50
2.4.2	IMIDAZÓIS INIBIRAM A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA E FORMAÇÃO DE EXSUDATO NA CAVIDADE PLEURAL DE CAMUNDONGOS COM PLEUSIRISA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....	53
2.4.3	IMIDAZOL δ INIBIU OS PARAMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CAVIDADE PLEURAL DE CAMUNDONGOS COM PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA.....	55
2.4.4	IMIDAZOL δ ATENUOU A SECREÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMTÓRIAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA	57
2.4.5	IMIDAZOL δ INIBIU A TRANSMIGRAÇÃO DE P65 PARA O NÚCLEO EM MACRÓFAGOS J774 ESTÍMULADOS COM LPS.....	59
2.5	DISCUSSÃO	60
2.6	CONCLUSÃO	63
2.7	RESUMO GRÁFICO	64
CAPÍTULO 3	65
3.1	INTRODUÇÃO	66
3.2	OBJETIVOS	67
3.2.1	OBJETIVO GERAL.....	67
3.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
3.3	MÉTODOS	68
3.3.1	SÍNTESE DO FLUOROFENIL-IMIDAZOL	68
3.3.2	ANIMAIS	69

3.3.3	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E EUTANÁSIA	69
3.3.4.	LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS E DESENHO EXPERIMENTAL	70
3.3.5	CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL	71
3.3.6	DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO.....	71
3.3.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE	71
3.3.8	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO IN VIVO (NO _x)	72
3.3.9	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10.....	73
3.3.10	ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κ B E DA p38 MAPK	73
3.3.11	ANÁLISE HISTOLÓGICA	73
3.3.12	TOXICIDADE ORAL AGUDA – OECD N° 423	74
3.3.13	PARAMETROS HEMATOLÓGICOS.....	76
3.3.14	ANÁLISE DOS DADOS	76
3.4	RESULTADOS	76
3.4.1	FLUOROFENIL-IMIDAZOL SUPRIMIU A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E EXSUDAÇÃO PARA OS PULMÕES DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS	76
3.4.2	FLUOROFENIL-IMIDAZOL INIBIU A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E SECREÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO LBA E TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS	79
3.4.3	FLUOROFENIL-IMIDAZOL DIMINUIU A SECREÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO LBA DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS	81
3.4.4	FLUOROFENIL-IMIDAZOL INIBIU A FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κ B E DA p38 MAPK NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS.....	83
3.4.5	FLUOROFENIL-IMIDAZOL REDUZIU A PERDA DE ARQUITETURA PULMONAR DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS.....	85
3.4.6	FLUOROFENIL-IMIDAZOL NÃO CAUSA TOXICIDADE ORAL AGUDA.....	87

3.5	DISCUSSÃO	89
3.6	CONCLUSÃO	94
3.7	RESUMO GRÁFICO	95
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO I – Protocolos do Comitê de Ética no Uso de Animais	109
	ANEXO II – Artigos publicados referentes a tese	112
	ANEXO III – Artigos publicados em parceria durante o período de doutorado	114

APRESENTAÇÃO

A inflamação é um fenômeno protetor que ocorre geralmente em tecidos lesionados frente a um determinado estímulo. Estes estímulos podem ser um patógeno específico, uma lesão externa como um corte ou arranhão, ou até mesmo efeitos de produtos químicos e/ou radioativos. Sendo assim, o processo inflamatório existe para isolar e destruir agentes lesivos e preparar o tecido lesionado para subsequente reparos (GRANGER; SENCHENKOVA, 2010). Alguns pontos chave que podem caracterizar a inflamação são: vasodilatação, permeabilidade vascular, formação de exsudato, migração leucocitária para o sítio inflamatório, formação de espécies reativas de oxigênio e liberação de citocinas por células do sistema imune, bem como ativação de fatores de transcrição (NEWTON; DIXIT, 2012; SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Embora a inflamação seja um fenômeno de grande importância para defesa contra agentes externos e se faz extremamente necessária para evitar uma série de infecções e problema correlatos, sua ativação descontrolada e desarmoniosa leva ao agravamento de várias condições médicas conhecidas. A inflamação é, talvez, o fenômeno que mais contribui com o congestionamento do atendimento médico em sociedades industrializadas e, embora não seja em si a causa primária de doenças como aterosclerose, obesidade, câncer, doença pulmonar crônica obstrutiva e asma, contribui significativamente para suas patogêneses (NATHAN; DING, 2010).

Nos dias de hoje, o processo inflamatório é comumente tratado com medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) ou glicocorticoides, embora já existam outras classes destes agentes (ONG et al., 2007; WONGRAKPANICH et al., 2018). Entretanto, novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios vêm sendo estudados (tanto *in vitro* como *in vivo*) nos últimos anos com objetivo de aumentar a efetividade e segurança da terapia, principalmente em pacientes com doenças inflamatórias crônicas. As estruturas químicas destes candidatos vão servir como base molecular para o desenvolvimento de novos medicamentos. Quando um determinado composto expressa potencial ação anti-inflamatória pré-clínica *in vitro* este ainda precisa ser testado *in vivo*, uma vez que modelos *in vivo* mimetizam de forma mais eficiente as condições inflamatórias encontradas em seres humanos. São justamente compostos que apresentam bons resultados em modelos pré-clínicos que passam adianta para ensaios clínicos, onde, se promissores, podem se tornar novos fármacos.

Sendo assim, o objetivo central deste trabalho foi buscar um composto da classe dos imidazóis que apresentasse efeito anti-inflamatório satisfatório, ou seja, de forma eficaz e segura. Levando isto em consideração, esta tese está separada em três capítulos, onde cada um destes apresenta uma fase da realização deste trabalho.

O **primeiro capítulo** apresenta uma revisão da literatura abordando os temas principais abordados nesta tese, sendo eles: o processo inflamatório, modelos inflamatórios utilizados para triagem de novas moléculas com potencial efeito biológico e compostos imidazólicos.

O **segundo capítulo** se refere a resultados obtidos nos testes de triagem, nos quais foram testados oito imidazóis tetra-substituídos sintetizados e cedidos pelo Prof. Dr. Marcus Mandolesi de Sá e sua aluna de doutorado Thais Andreia Rossa do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Buscou-se neste momento avaliar a ação anti-inflamatória destes oito compostos imidazólicos inéditos *in vitro*, em concentrações não citotóxicas considerando suas atividades inibitórias sobre óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias e, na sequência, os compostos com ação significativa sobre estes parâmetros *in vitro*, foram testados *in vivo* no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos, avaliando-se sua capacidade de inibir influxo leucocitário, formação de exsudato, produção de mediadores relacionados ao estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias. Finalmente, o composto imidazólico mais efetivo nos experimentos *in vivo*, mostrou significativa capacidade de influenciar as concentrações de p65 citosólico (NF- κ B) em macrófagos estimulados com LPS.

O **terceiro capítulo** diz respeito aos testes realizados com o Flurofenil-imidazol (FI) selecionado na etapa de triagem, em um modelo murino de lesão aguda pulmonar induzida por LPS. Este modelo mimetiza as condições encontradas em pacientes com Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) desencadeada por sepse e, sendo assim, é um modelo específico desta doença. A atividade do Fluorofenil-imidazol foi avaliada frente a sua capacidade de inibir o influxo leucocitário e exsudação para o tecido pulmonar e lavado bronco-alveolar de animais que receberam instilação intranasal de LPS. Além disso, a capacidade de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase, bem como a liberação de metabólitos do óxido nítrico e das citocinas IL-6, TNF- α , IL-10, IFN γ e IL-17 também foram avaliadas. Ademais, buscou-se comprovar se o efeito inibitório sobre a subunidade p65 do NF- κ B constatado *in vitro* no segundo capítulo, seria mantida *in vivo*, e foi avaliado também a ação do FI sobre a fosforilação da proteína intracelular p38 MAPK. Finalmente, este capítulo da tese também apresenta análises toxicológicas utilizando protocolos sugeridos pela

Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), especificamente o protocolo nº 423, que diz respeito a testes de toxicidade aguda oral.

Ao final são apresentadas as considerações finais, levando em conta os resultados obtidos e as perspectivas futuras para continuidade desta linha de pesquisa envolvendo a ação farmacológica de derivados imidazólicos.

CAPÍTULO 1

1.1. PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório é caracterizado como uma cascata de fenômenos envolvendo o sistema imunológico e vascular em resposta a algum estímulo considerado nocivo pelo organismo. Este fenômeno tem como propósito, além da defesa do organismo, o reparo do tecido lesionado (ABDULKHALEQ et al., 2018; NEWTON; DIXIT, 2012).

No momento inicial da inflamação observa-se uma resposta de fase aguda, que possui duração variável, com liberação de diversos mediadores. Neste momento ocorre a migração de leucócitos do tipo polimorfonucleares e mononucleares para o sítio da lesão, os quais são atraídos pela ação de diferentes mediadores com funções quimiotáticas. A resposta desta fase inflamatória não é específica a um antígeno, e é parte importante da resposta imune inata (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014).

O sistema imune inato é então o principal sistema de defesa no que diz respeito a defesa primária contra infecções ou danos teciduais, e é constituído por barreiras epiteliais, células fagocíticas, células dendríticas, *natural killers*, e também pelo sistema complemento. Todos estes componentes do sistema imune inato são importantes para posterior ativação da resposta imune adaptativa que, diferente da resposta imune inata, é tardia e específica a um determinada antígeno (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; XIAO, 2017).

O padrão de resposta da imunidade inata pode ocorrer de duas formas simultaneamente: através da fagocitose de um determinado agente lesivo extracelular por células apresentadoras de antígenos (APCs) e, sequencialmente, processamento do mesmo e geração de peptídeos que são expostos via complexo maior de histocompatibilidade (MHC) II para reconhecimento destes por células do sistema imune adaptativo; e reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a dano (DAMPs) pelas células do sistema imune inato através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e resposta direta sobre estes padrões estimulantes (DE NARDO, 2015; GASTEIGER et al., 2017; WALSH; MILLS, 2013).

Como exemplos de PRRs podemos citar os receptores do tipo RIG-I (RLR), receptores tipo NOD (NLR) e ainda receptores do tipo *Toll* (TLR). Destes, o de maior destaque nas pesquisas relacionadas a imunidade inata é, sem sombra de dúvidas, o receptor do tipo *Toll*. No atual cenário científico tem-se conhecimento de dez diferentes tipos de TLRs em humanos e doze em camundongos, entretanto, todos consistem em proteínas transmembranas capazes de reconhecer PAMPs e DAMPs tanto no ambiente extracelular como em endolisossomas. Uma vez ativados, estes receptores (com exceção do TLR3) acoplam a proteína adaptadora

MyD88 e desencadeiam uma série de reações intracelulares, como fosforilações e ubiquitinações envolvendo diferentes proteínas que, como consequência, podem disparar a resposta imune inata (DE NARDO, 2015; NEWTON; DIXIT, 2012).

Por agirem como pivôs da imunidade inata e estarem intimamente relacionados na sucessão de eventos pró-inflamatórios, os TLRs e suas respectivas cascatas de sinalização vêm sendo amplamente estudados como potenciais alvos para tratamento de condições inflamatórias onde células da imunidade inata cumprem papel deletério. Como exemplo, a via de sinalização desencadeada pelo TLR4, classicamente ativada pelo LPS, é fundamental para ativação de fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), enzimas pró-inflamatórias como a fosfoinositídeo 3-cinase (PI3k) e proteínas cinases ativadas por mitógeno (p38, ERK, JNK). Embora o LPS seja o ativador clássico da via do TLR4, outros agentes flogísticos têm sido sugeridos como possíveis ativadores desta via de sinalização, a exemplo disto temos a carragenina. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado vastamente utilizado na indústria alimentícia como espessante, é capaz de ativar a via de sinalização do TLR4 além de causar um estresse oxidativo considerável no ambiente extracelular (BHATTACHARYYA et al., 2013; BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008; DE NARDO, 2015).

Dentre os leucócitos envolvidos na resposta inflamatória desencadeada pelo sistema imune inato e que desencadeiam a via de sinalização do TLR4 destacamos os macrófagos e neutrófilos. Macrófagos são leucócitos que se diferenciam de monócitos a partir do momento em que ingressam nos tecidos extra vasculares. Estes leucócitos podem acessar vários tipos de tecido sob condições inflamatórias ou não, e assumir diferentes funções e fenótipos, de acordo com os estímulos que recebem do microambiente (ARIEL et al., 2012). Na inflamação os macrófagos têm três funções principais: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação através da produção de várias citocinas e fatores de crescimento. Desta forma, é evidente o papel crítico que esta célula fagocítica do sistema imune inato tem no início, manutenção e resolução da inflamação (KOH; DIPIETRO, 2011).

Os macrófagos são ativados durante o processo inflamatório por citocinas como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), LPS, proteínas da matriz extracelular e outros mediadores químicos; e podem ser desativados por citocinas como a interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento β (TGF- β), e antagonistas de citocinas, que são geralmente produzidos pelos próprios macrófagos. Devido ao amplo leque de moléculas bioativas produzidas por macrófagos que participam de processos tanto deletérios como benéficos na inflamação, novos fármacos que agem sobre este leucócito e

seus respectivos produtos podem ser uma forma de controlar doenças inflamatórias (DAVIES; TAYLOR, 2015; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Já os neutrófilos merecem destaque nos momentos iniciais após a lesão, uma vez que estas são as primeiras células a chegar no sítio inflamatório. Estes leucócitos polimorfonucleares, que são a linha de frente no que diz respeito a defesa do organismo, são, frequentemente, associadas a danos teciduais causados por respostas exacerbadas. Sendo a inflamação tanto microbiana como estéril, a carga de mediadores gerados por neutrófilos ativados torna-se danosa não somente contra agentes invasores ou células mortas, mas acaba tornando-se perigosa para o tecido do indivíduo. Desta forma, a retirada de neutrófilos recrutados e ativados no sítio inflamatório, após a remoção do agente estranho, é um fator de extrema importância no que diz respeito a resolução da resposta inflamatória. Para tal fim, em condições normais, os neutrófilos presentes no sítio inflamatório desencadeiam o processo de morte celular por apoptose que resulta na conseqüente remoção de forma organizada de seus restos celulares por macrófagos e monócitos. A deficiência no processo de apoptose de neutrófilos e demais leucócitos no sítio inflamatório promove a inflamação crônica, que é uma das bases fisiológicas para diversas doenças (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; SCHMID-SCHONBEIN, 2006; SELDERS et al., 2017).

Os neutrófilos exercem sua função protetiva através da destruição dos agentes lesivos por meio de fagocitose e liberação de quimiocinas, citocinas, enzimas proteolíticas entre outras substâncias como espécies reativas de oxigênio (EROs). Em seu citoplasma os neutrófilos possuem três tipos de grânulos: os primários (azurófilos), secundários (específicos) e os terciários (gelatinase). Nos grânulos primários a enzima mieloperoxidase (MPO) destaca-se por sua atividade microbicida (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

A enzima MPO participa dos processos neutrofilicos de fagocitose, degranulação, além da formação de armadilhas extracelulares (NETs). Em seres humanos esta enzima pode representar até 7% do peso seco de um neutrófilo, sendo que em monócitos esta enzima não passa de não passa de 2,5% de seu peso seco (NUSSBAUM et al., 2012; PROKOPOWICZ et al., 2012). Para causar seu efeito danoso a agentes invasores, durante a fagocitose ocorre a formação de ERO através da ativação do sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH). A NADPH oxidase reduz o oxigênio molecular (O_2) ao radical ânion superóxido (O_2^-), que, por sua vez, é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é então responsável por destruir agentes invasores como bactérias diretamente, ou ainda através de sua conversão em íons hidroxila ou

ácido hipocloroso (HOCl) pela enzima MPO (WINTERBOURN; KETTLE, 2013) (**Figura 1**).

Embora possua ação benéfica no que diz respeito ao combate de microrganismos, a atividade contínua da MPO está relacionada ao dano tecidual, isto porque o ácido hipocloroso é capaz de iniciar reações de oxidação em lipídeos, no DNA e em lipoproteínas. Este dano vem sendo relacionado com diversas patologias pulmonares (asma, fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica), neurodegenerativas (mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esclerose múltipla) e reumáticas (artrite reumatoide), e, pelo menos em alguns casos, evidências experimentais e epidemiológicas estão disponíveis para sugerir que a reação de agentes oxidantes a partir da MPO é parte da causa. Além disso, a avaliação da atividade da MPO é uma ferramenta útil para avaliação indireta da presença de neutrófilos ativados no local da inflamação (DAVIES, 2011; ODOBASIC et al., 2014).

Assim como a MPO, a enzima superóxido-dismutase (SOD) também participa ativamente no processo de geração de espécies reativas de oxigênio, uma vez que é capaz de transformar o íon superóxido em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio por sua vez tem atividade danosa sobre os tecidos. Ainda assim, esta enzima é conhecida como “antioxidante”, uma vez que faz parte de uma cadeia enzimática (SOD, CAT, GPx, etc) responsável por diminuir a presença de espécies reativas de oxigênio no organismo (*scavenger*). Por este motivo, a SOD é capaz de ter sua atividade aumentada na presença de estímulos inflamatórios, como TNF- α e LPS, que, por sua vez, acabam por aumentar a produção de EROs. Sendo assim, um dos motivos para que o dano por EROs aconteça é justamente a produção exacerbada de EROs que suplanta a atividade *scavenger* das enzimas anti-oxidantes (MITTAL et al., 2014; WINTERBOURN; KETTLE, 2013) (**Figura 1**).

Nesta mesma linha encontra-se a enzima catalase (CAT). Esta enzima é responsável por transformar o peróxido de hidrogênio, outrora formado pela SOD, em H₂O e O₂, tendo então atividade antioxidante. Da mesma forma que a SOD, esta enzima está intimamente relacionada a formação e metabolização de espécies reativas de oxigênio e pode ter sua atividade aumentada na presença de estímulos inflamatórios ou indutores de estresse oxidativo, como a carragenina (DALMARCO et al., 2009; HALICI et al., 2007; MITTAL et al., 2014) (**Figura 1**).

Glutathione S-transferases (GST) são uma família de enzimas que atuam de forma central para adaptação celular diante do estresse oxidativo. Sua expressão é fortemente induzida por este fenômeno como mecanismo de defesa através da ligação de fatores de transcrição como NFR-2 e AP-1. Esta família de enzimas é responsável por exercer funções

protetivas na atividade de proteínas e peroxidação lipídica, que podem diretamente influenciar a susceptibilidade ao estresse oxidativo no organismo (SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2016) **(Figura 1)**.

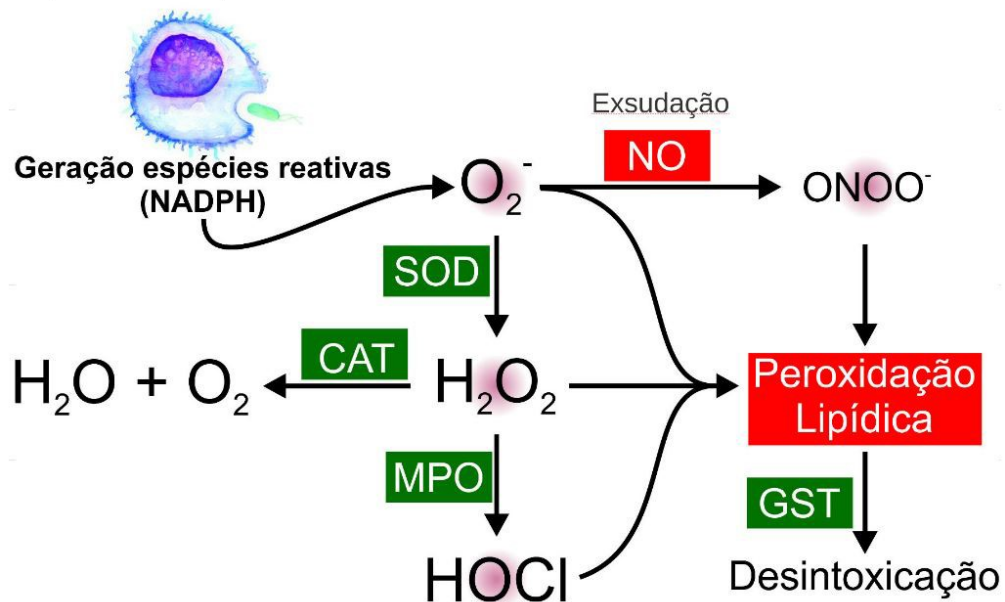
A liberação do gás solúvel óxido nítrico (NO) por células endoteliais e do sistema imune também merece destaque no contexto da inflamação. O NO participa de diversos processos biológicos como a regulação do tônus vascular, inflamação, neurotransmissão e apoptose (BOGDAN, 2015; TOUSOULIS et al., 2012).

Este gás solúvel é formado a partir da metabolização do aminoácido L-arginina e citrulina, em uma reação catalisada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas três isoformas da enzima NOS, duas delas são produzidas de forma constitutiva: a neuronal (nNOS, NOS1) e a endotelial (eNOS, NOS3), e uma terceira isoforma é sintetizada durante o processo inflamatório, sendo esta a isoforma induzida (iNOS, NOS2) (GHOSH; ERZURUM, 2011; LO FARO et al., 2014).

Em condições normais as concentrações de NO no ambiente extracelular é da ordem de ηM , e estas baixas concentrações tendem a favorecer efeitos benéficos deste gás solúvel. Porém, durante o processo inflamatório, a iNOS produz grande quantidade de NO (na ordem de μM), que são mantidas durante horas após o desencadeamento inicial da resposta inflamatória. Nestas maiores concentrações o NO tende a reagir com O_2 ou O_2^- e formar nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) além de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o peroxinitrito (ONOO^-), que tem efeito deletério sobre os tecidos (GHOSH; ERZURUM, 2011; RICCIARDOLO et al., 2004) **(Figura 1)**. Sendo assim, a função do NO depende de sua concentração e associação com outras moléculas.

Do resultado do desequilíbrio entre resposta antioxidante e pro oxidante resulta a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser descrita como um processo em que espécies reativas de oxigênio atacam lipídeos contendo ligações duplas carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poli-insaturados, resultando em radicais lipídicos peroxil e hidroperóxidos. Glicolipídeos, fosfolipídeos e colesterol também são alvos para dano e potencial modificação peroxidativa letal. Em resposta a peroxidação lipídica, e de acordo com as circunstâncias celulares específicas e capacidade de reparo, as células podem promover aumento de sua própria sobre vida ou induzir a morte celular. Sob média ou acentuada peroxidação lipídica a extensão do dano oxidativo sobrepõe a capacidade de reparo celular, e as células induzem apoptose ou necrose, ambos processos eventualmente levam a dano tecidual que facilita o desenvolvimento de várias patologias e acelera o envelhecimento (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014) **(Figura 1)**.

Figura 1. Enzimas e mediadores envolvidos no estresse oxidativo



As enzimas SOD, CAT, MPO e GST, bem como o gás solúvel óxido nítrico participam diretamente do processo inflamatório regulando a liberação de espécies reativas de oxigênio. Estas espécies reativas de oxigênio, quando em concentrações elevadas e desreguladas, podem causar dano tecidual através da peroxidação lipídica. CAT: catalase; GST: glutathiona-S-transferase; MPO: mieloperoxidase; NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase. Fonte: elaborado pelo autor.

Dentro dos mediadores que regulam a resposta imune no organismo, as citocinas, tanto pró como anti-inflamatórias, possuem papel crítico uma vez que tem efeito direto sobre as células. Citocinas são pequenas proteínas geradas e liberadas por células que são responsáveis pela intercomunicação e interação por estas mesmas células. O nome citocina é genérico, nomes mais específicos incluem linfocina (citocinas geradas por linfócitos), monocinas (citocinas geradas por monócitos), quimocinas (citocinas com ações quimiotáticas) e interleucinas (citocinas feitas por um determinado leucócito e com ação sobre outros leucócitos). As citocinas podem agir nas células que as secretaram (ação autócrina), nas células vizinhas (ação parácrina) ou em células distantes (ação endócrina). Existem evidências significativas demonstrando que certas citocinas e quimiocinas estão envolvidas não somente no disparo como também na persistência da resposta inflamatória e dor (CONLON; MILJKOVIC; WALDMANN, 2018; TURNER et al., 2014).

A interleucina 6 (IL-6) é considerada um dos reguladores centrais do processo inflamatório. Tanto em respostas a infecções como em inflamações crônicas, a IL-6 é produzida por uma grande variedade de células. Esta citocina é uma das principais indutoras de proteínas de fase aguda, além de controlar resposta de neutrófilos e monócitos após estímulos lesivos. A IL-6 é sintetizada a partir de estímulos por diversas vias de sinalização e fatores de transcrição, como o NF- κ B, a p38 MAPK e o sinal transdutor e ativador de

transcrição 3 (STAT3) (FIELDING et al., 2008; SON et al., 2008; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

Recentemente, a IL-6 foi identificada como uma proteína pivô na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em células T *helper* 17 (Th17), sendo as Th17 consideradas uma população de células estritamente pró-inflamatórias. Como consequência deste fato, o bloqueio direto da IL-6 ou de sua via de sinalização tem um impacto profundo sobre a resposta imune inata ou adaptativa. A produção defeituosa de IL-6 causa uma grande susceptibilidade a infecção de diversos patógenos em camundongos, mas também proteção tecidual em alguns modelos inflamatórios *in vivo* (HUNTER; JONES, 2015; NOWELL et al., 2003).

Não menos importante que a IL-6, o TNF- α é liberado por diversas células do sistema imune, porém macrófagos ativados e linfócitos T tendem a ser as células com maior liberação desta citocina. Em condições normais, o TNF- α não é detectável no organismo, mas encontra-se elevado em indivíduos com algum processo inflamatório estabelecido. Esta citocina tem a capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (E-selectina, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1). Em combinação com outras citocinas e proteínas o TNF- α pode regular o recrutamento de diferentes populações leucocitárias. Ainda, esta citocina pode ser gerada e ativar a via do NF- κ B, a p38 MAPK e STAT3 (BRADLEY, 2008; CAIN et al., 1999; DE JONG et al., 2012).

Como consequência do processo de ativação induzido pela liberação de TNF- α , os neutrófilos acabam tendo sua apoptose adiada, e ficam mais tempo no sítio inflamatório podendo agravar a lesão tecidual causada por estes leucócitos. Estudos já estabeleceram o envolvimento do TNF- α em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas o diabetes, a aterosclerose e a artrite reumatoide (COWBURN et al., 2004; KILPATRICK et al., 2006; TOUSSIROU; WENDLING, 2007; UNO et al., 2007; ZHANG; AN, 2007).

A citocina IL-1 β também é importante no contexto da inflamação uma vez que é liberada por macrófagos frente a processos lesivos, sejam estes infecciosos ou assépticos. Esta citocina atua diretamente sobre uma vasta gama de células do sistema imune, tanto de forma independente como em conjunto com demais proteínas sinalizadoras. A grande maioria das células não expressam esta citocina de forma constitutiva, sendo necessária ativação de um fator de transcrição, como o NF- κ B, via reconhecimento de algum DAMP ou PAMP para que então seja induzida a síntese de pró-IL-1 β . Dando sequência a resposta, para secreção da IL-

1 β faz-se necessária a ativação de um complexo de proteínas intracelulares conhecidas como inflamassoma. Em conjunto com as caspases, o inflamassoma é responsável por transformar a pró-IL-1 β em IL-1 β ativa, sendo que a forma ativa está pronta para ser secretada e exercer suas funções imunológicas, como: aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de prostaglandinas, secreção de quimiocinas além de angiogênese (IDRIS; GHAZALI; KOH, 2015; LAROCK; NIZET, 2015; OZAKI; CAMPBELL; DOYLE, 2015).

A citocina IL-17 possui hoje seis isoformas estruturais estabelecidas (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F), e como o nome sugere, a maioria delas é produzida em sua maior parte por linfócitos Th17 (salvo algumas exceções). Destas isoformas, a mais estudada e conhecida hoje é a IL-17A, tanto que quando se fala em IL-17 sem especificações de isoforma, subentende-se como IL-17A. Esta citocina pode ser produzida por linfócitos do tipo Th17, células $\gamma\delta$ T e algumas células do sistema imune inato, como macrófagos e natural killers. O papel desta citocina parece estar diretamente envolvido com defesa de mucosas, como a pele, cavidade oral, trato gastrointestinal e pulmões, agindo desta forma como um importante fator de defesa do hospedeiro em locais onde a grande exposição a potenciais invasores do organismo. Embora isoladamente não tenha uma grande capacidade de induzir a inflamação, quando secretada em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias, aumenta consideravelmente a concentração de mediadores secretados por leucócitos, bem como o próprio recrutamento destas células para o local da lesão. Isto se dá pois a IL-17 é capaz de ativar tanto a via do NF- κ B como das próprias MAPKs e, na presença de outras citocinas que também possuem esta capacidade, como o TNF- α e IL-6, acaba amplificando os sinais para uma resposta inflamatória (SHABGAH; FATTAHI; SHAHNEH, 2014; VELDHOEN, 2017).

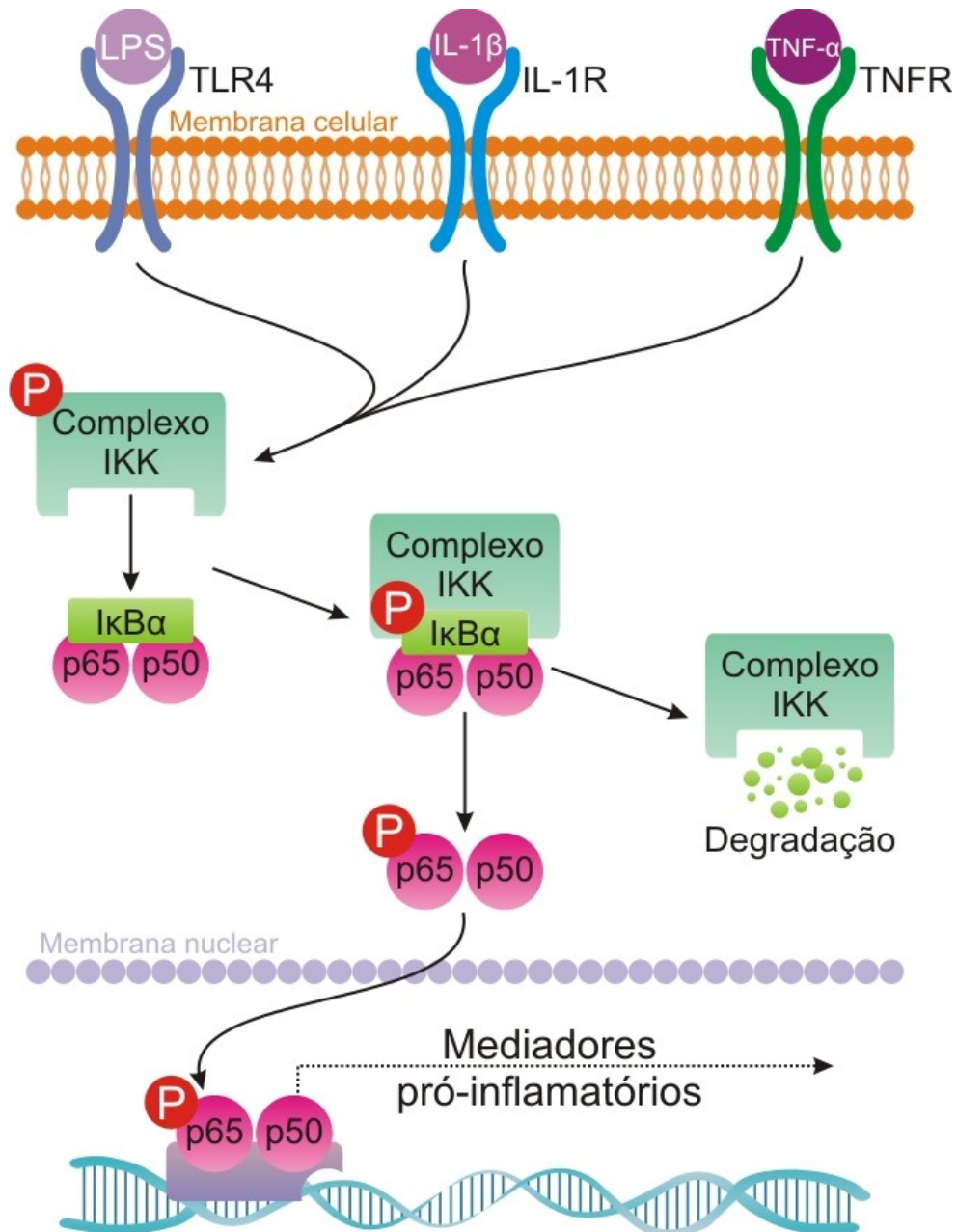
Os interferons (IFN) foram inicialmente descritos como fatores que agiam contra replicação viral em mamíferos. Talvez esta denominação inicial tenha se dado pois esta família de citocinas, quando secretada, não só acaba estimulando a liberação de outras citocinas e quimiocinas, como também acaba acumulando a função de expandir e ativar a população de células do tipo *natural killer* e induzir o processo de apresentação de antígeno. Desta família de citocinas, que conta com IFN do tipo I, II e III, o IFN- γ (única isoforma do tipo II) tem a capacidade de aumentar a potência da sinalização das células envolvidas na inflamação através, por exemplo, da ativação de macrófagos para exercerem funções microbicidas, já que induz a produção de óxido nítrico. Esta citocina, que é principalmente produzida e secretada por linfócitos T e *natural killers*, tem comprovada atividade estimulatória sobre a formação e liberação de quimiocinas, como CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (KOPITAR-JERALA, 2017; RAUCH; MÜLLER; DECKER, 2013).

A interleucina 10 (IL-10) é uma importante citocina pleiotrópica (apresentam efeitos múltiplos em mais de um tipo de célula) principalmente secretada por macrófagos, mas também por linfócitos Th1 e Th2, células dendríticas, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, monócitos e mastócitos. Esta citocina tem a capacidade de inibir a expressão de complexos maiores de histocompatibilidade classe II em monócitos e macrófagos, e a consequência principal disto é uma diminuição na resposta inflamatória através do controle secretório sobre a formação e liberação de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e (TNF- α). Embora tenha uma conhecida atividade anti-inflamatória, em células apresentadoras de antígeno, esta citocina atua principalmente com a função de gerar um sistema de feedback autócrino com a intenção inicialmente de limitar a inflamação através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, da restrição da apresentação de antígeno e influenciar o desenvolvimento de uma resposta imunológica adaptativa (SUBRAMANIAN; CHENG, 2012; TRIFUNOVIĆ et al., 2015).

Para liberação de mediadores inflamatórios faz-se necessário, na grande maioria dos casos, a ativação de fatores de transcrição. No que tange o processo inflamatório, o NF- κ B tem grande importância por participar ativamente no desenvolvimento e estabelecimento deste fenômeno. Este fator de transcrição é um regulador da resposta imunológica, além de controlar diferentes respostas ao estresse oxidativo e participar de alguns processos de diferenciação celular e apoptose. Em mamíferos encontram-se cinco proteínas membros da família no NF- κ B, são eles: RelA (p65), RelB e c-Rel, e as proteínas NF- κ B1 (p105) e NF- κ B2 (p100), que são respectivamente processadas em p50 e p52. As proteínas desta família agrupam-se em complexos diméricos para que exerçam suas funções (OECKINGHAUS; HAYDEN; GHOSH, 2011). Uma vez organizado em dímeros, este fator de transcrição ainda pode desencadear seus diferentes efeitos biológicos através de duas rotas de sinalização: a via canônica, ativada por produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β , ativando assim complexos contendo RelA (p65); e a via não canônica, ativada geralmente por citocinas da família do TNF (mas não o TNF- α), como a linfotóxina B (TNFSF3), o ligante CD40 (CD40L), o fator ativador de células B (BAFF) e ligante de receptor ativador de NF- κ B (RANKL), que resultam na ativação de complexos contendo RelB (SUN, 2017). O dímero p65/p50, ativado na via canônica, é o mais abundante nas células e encontra-se inativo no citoplasma celular quando associado a proteína inibidora “subunidade inibitória α do fator de transcrição nuclear κ B” (I κ B α). Através da degradação da I κ B α , mediada pela sua fosforilação desencadeada pelo complexo IKK, que ocorre a subsequente liberação e fosforilação da subunidade p65. A translocação do dímero p65/p50

(NF- κ B) para o núcleo é eminente neste momento, e uma vez no lá, a transcrição de mediadores pró-inflamatórios é iniciada (ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017) (Figura 2).

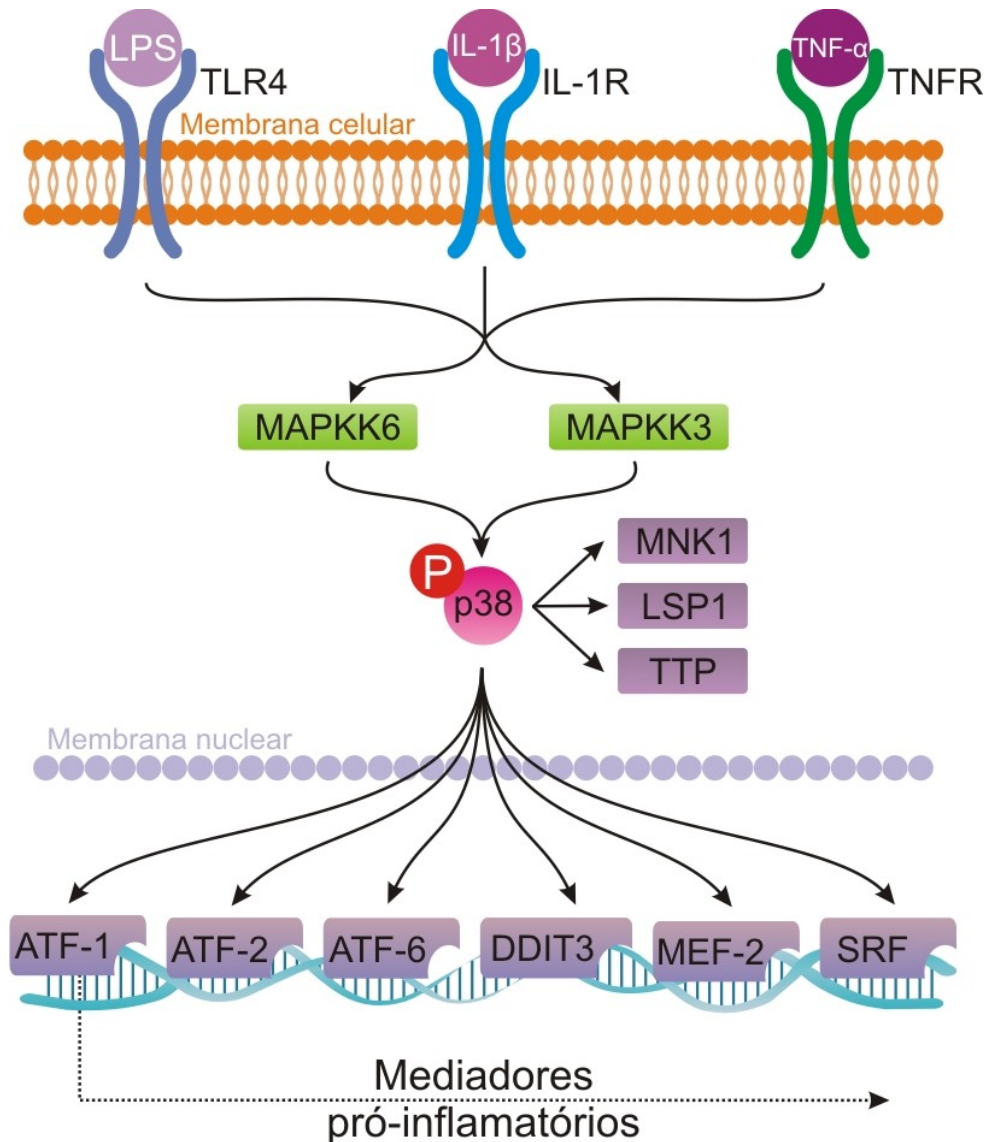
Figura 2. Via de sinalização do NF- κ B



No processo inflamatório, a via de sinalização do NF- κ B é ativada por diferentes receptores, entre estes estão receptores de IL-1, TNF- α e o TLR4. Durante o processo de ativação o complexo proteico IKK é ativado e fosforila a proteína inibitória I κ B α , que por sua vez será degradada deixando de exercer suas funções sobre as subunidades p65 e p50 do NF- κ B. Uma vez ativado e fosforilado o dímero p65/p50 se transloca para o núcleo celular realizando a transcrição nuclear de genes responsáveis por produzir citocinas pró-inflamatórias entre outros mediadores. IKK: proteína inibitória kappa B quinase; I κ B α : subunidade inibitória do fator de transcrição nuclear NF- κ B; IL-1 β : interleucina 1 β ; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeo; TLR4: receptor do tipo Toll-like 4; TNF- α : fator necrose tumoral alpha; TNFR: receptor de fator necrose tumoral. Fonte: Elaborado pela autor, adaptado de ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017.

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) também exercem importante papel na regulação de processos celulares homeostáticos, e a inflamação não foge à regra. Estas proteínas têm como principal função a regulação da diferenciação e proliferação de células do sistema imune, no contexto da inflamação. Destas cinases, podemos destacar a p38, por estar intimamente relacionada com a inflamação. (PASTUHOV; HISAMOTO; MATSUMOTO, 2015). Diferentes estímulos são capazes de desencadear a fosforilação e ativação da p38, tais como o estresse oxidativo, LPS, peptidoglicano, radiação ultravioleta e citocinas pro-inflamatórias. Ademais, esta proteína também participa ativamente nos processos de autofagia, apoptose e diferenciação celular (YANG et al., 2014). A p38 participa do processo inflamatório através da fosforilação direta de fatores de transcrição que agem como pivô no desencadeamento da inflamação; da regulação da estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) de citocinas; da regulação de proteínas responsáveis pela tradução do RNAm de citocinas e da regulação da ligação do NF- κ B com genes a serem transcritos (O'NEIL; AMMIT; CLARK, 2018; ZARUBIN; HAN, 2005). Para que a p38 exerça suas funções, um estímulo a nível de membrana celular deve desencadear a cascata de sinalização intracelular, a partir daí uma série de proteínas são ativadas resultado na fosforilação de duas MAP cinases cinases (MAPKK), que podem fosforilar a p38, são elas MAPKK3 e a MPAKK6. Após sua fosforilação, a p38 pode induzir fatores de transcrição e proteínas intracelulares como o fator ativador de transcrição (ATF-1/2/6), proteína ligante ao elemento de resposta de adenosina monofosfato cíclica AMPc, fator de resposta sérica (SRF), proteína específica de linfócitos 1, tristetraprolina e cinase interativa com MAPKs, os quais ativam a transcrição de genes que expressam moléculas de adesão (VCAM-1) e mediadores inflamatórios, tais como citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8), COX-2 e prostaglandinas E2 (PGE₂) (PASTUHOV; HISAMOTO; MATSUMOTO, 2015; YOKOTA; WANG, 2016; ZARUBIN; HAN, 2005). Por participar ativamente da inflamação, a p38 tornou-se alvo de pesquisa para desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (RASK-ANDERSEN et al., 2014) (**Figura 3**).

Figura 3. Via de sinalização da p38 MAPK



No processo inflamatório, a via de sinalização da p38 MAPK é ativada por diferentes receptores, entre estes estão receptores de IL-1, TNF- α e TLR4. As MAPKK3 e a MAPKK6 fosforilam a p38, embora outras quinases possam também ativar a p38. Após sua fosforilação a p38 induz diferentes fatores de transcrição como ATF-1/2/6, SRF, DDIT3 e MEF-2, fatores responsáveis pela liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, indução de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 e iNOS, e aumento na expressão de moléculas de adesão em neutrófilos. ATF-1/2/6: fatores de transcrição dependentes de AMP 1/2/6; DDIT3: fator de transcrição induzido por dano ao DNA 3; IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-1R: receptor de interleucina 1; LPS: lipopolissacarídeo; LSP1: proteína específica de linfócitos 1; MAPKK3: proteína quinase dupla ativada por mitógeno 3; MAPKK6: proteína quinase dupla ativada por mitógeno 6; MEF2: fator otimizador de miócitos 2; MNK1: quinase interativa com MAPKs 1; SRF: fator de resposta sérica; TLR4: receptor do tipo Toll-like 4; TNF- α : fator necrose tumoral alpha; TNFR: receptor de fator necrose tumoral; TTP: tristetraprolina. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de PASTUHOV; HISAMOTO; MATSUMOTO, 2015.

1.2. MODELOS INFLAMATÓRIOS *IN VIVO*: PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA & LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA PELO LPS

Modelos animais vêm sendo utilizados para estudo da inflamação e doenças autoimunes por mais de 80 anos. Já se tem conhecimento de que, embora sejam de extrema utilidade para estudo de doenças, estes modelos apresentam inevitavelmente diferenças significativas do fenótipo apresentado em humanos. Um exemplo disto é o fato de que várias doenças humanas não acontecem naturalmente em roedores e devem ser induzidas através de agentes flogísticos, como na asma, artrite, colite ulcerativa, etc. Desta forma, em modelos animais de inflamação, busca-se mimetizar a resposta inflamatória causada pela doença, como o influxo leucocitário, o estresse oxidativo e a destruição tecidual. Estes modelo tem gerados *insights* tanto no entendimento da fisiopatologia de doenças como na criação de novas terapias (WEBB, 2014).

Como já descrito, a inflamação aguda é caracterizada por diversos mediadores. O modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos ou ratos é de extrema utilidade para mimetizar a expressão destes mediadores. Este modelo é caracterizado pela massiva infiltração leucocitária (principalmente neutrófilos) na cavidade pleural, estresse oxidativo causado pela liberação de EROs e ERNs, liberação de citocinas, ativação de diferentes fatores de transcrição e consequente injúria pulmonar (CUZZOCREA et al., 2001; IMPELLIZZERI et al., 2011; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

A resposta inflamatória desencadeada pela administração intrapleural (i.pl) da carragenina neste modelo é bifásica. Em um primeiro momento (4 horas após administração da carragenina) uma resposta aguda é estabelecida, caracterizada pela massiva migração neutrofílica para cavidade pleural, além de uma grande exsudação devido ao aumento da permeabilidade vascular causada pelo processo inflamatório. Seguindo esta fase inicial, o modelo ainda oferece o estudo de uma fase tardia (48 horas após administração da carragenina), onde ocorre o início do remodelamento tecidual com a inversão no perfil leucocitário, ou seja, aumento de células mononucleares, porém ainda com grande exsudação (DALMARCO et al., 2009; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

A carragenina, um polissacarídeo altamente sulfatado obtido de algas vermelhas (Rodophyceae), tem a capacidade de ativar a resposta imune inata através da ativação das proteínas da via de sinalização do TLR4 ou pela formação extracelular de EROs. Ainda não se sabe exatamente qual mecanismo de interação da carragenina com o TLR4, mas fortes evidências demonstram que este agente flogístico interage diretamente com a sua via através

do estímulo da proteína intracelular Bcl-10 ativando, conseqüentemente, o fator de transcrição NF- κ B, MAPKs etc. Além disso, a carragenina também é capaz de reduzir as concentrações da proteína de choque térmico 27 (Hsp27) através da formação de EROs. A diminuição da Hsp27 está envolvida na ativação de cinases que, por sua vez, também relação com a ativação do NF- κ B e via das MAPKs (BHATTACHARYYA et al., 2013; BHATTACHARYYA; DUDEJA; TOBACMAN, 2008; DONG et al., 2006).

No lavado da cavidade pleural de animais que sofreram a indução da pleurisia pela carragenina é possível quantificar leucócitos, exsudação (proteínas), enzimas relacionadas ao processo inflamatório, metabólitos do NO e citocinas (ARRUDA-SILVA et al., 2014; LUZ et al., 2016; PEREIRA DOS SANTOS NASCIMENTO et al., 2016).

O modelo de lesão aguda pulmonar, como o próprio nome já o descreve, acaba por gerar uma grande lesão no tecido pulmonar do animal que sofre o desafio com agente flogístico. O desafio pode ser feito de forma direta através da instilação nasal ou intratraqueal de ácidos e LPS, indução de hiperóxia, deficiência de surfactantes, ou indireta, através de isquemia mesentérica, administração intravenosa de bactérias, LPS ou ácido oleico ou ainda ligação cecal. A partir do momento que o desafio desencadeia a resposta inflamatória, o animal passa a expressar sinais semelhantes aqueles encontrados em pacientes com a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Esta síndrome é caracterizada por um processo inflamatório pulmonar persistente acompanhado de grande permeabilidade vascular e massivo influxo leucocitário. Clinicamente já são descritos mais de 60 fatores desencadeantes desta síndrome, entretanto, estudos epidemiológicos demonstram que as principais causas são sepse, pneumonia, trauma e aspiração de conteúdo gástrico. Embora seja uma síndrome com altíssima taxa de mortalidade (40-60%), e mesmo pacientes que sobrevivem apresentem sérios problemas após a alta como diminuição da cognição, depressão ou estresse pós-traumático, a SDRA ainda não possui nenhuma terapia específica e efetiva para seu tratamento, dependendo totalmente de terapias de suporte para manejo dos pacientes (SIPAHI; ATALAY, 2014; YAN et al., 2016).

Neste sentido, o modelo de lesão aguda pulmonar induzida pela instilação intranasal de LPS mimetiza os sinais clínicos encontrados em pacientes com a forma da SDRA desencadeada pela sepse. Este modelo possibilita a pesquisa da liberação de parâmetros inflamatórios tanto no lavado broncoalveolar, como no tecido pulmonar, ou ainda em órgãos periféricos e sangue total dos animais, uma vez que o pulmão é um órgão extremamente vascularizado e parte do LPS instilado alcança o sistema circulatório dos animais. Uma vez em contato com células que possuem em sua superfície receptores reconhecedores de padrões

(PRRs), como o TLR-4, o LPS dispara uma série de fosforilações intracelulares capazes de ativar fatores de transcrição e proteínas intracelulares responsáveis pela formação, ativação e liberação de parâmetros inflamatórios. Como principais características deste modelo podemos citar o massivo influxo leucocitário para cavidade pulmonar (principalmente neutrófilos), o aumento da permeabilidade vascular com notável exsudação, a liberação de enzimas proteolíticas, mediadores envolvidos no estresse oxidativo e citocinas. O resultado da ativação e liberação destes fatores é o dano pulmonar com perda da arquitetura alveolar e consequente perda de função pulmonar, quando o estímulo inflamatório não é controlado (ALM et al., 2010; SIPAHI; ATALAY, 2014).

1.3. MODELOS DE TOXICIDADE *IN VIVO*: OECD 423 – PROTOCOLO DE TOXICIDADE AGUDA ORAL

O conhecimento detalhado da atividade de uma determinada substância com potencial atividade biológica compreende não somente os mecanismos e efeitos benéficos desta, como também a possibilidade desta substância de causar efeitos deletérios a quem a consome. A diferença entre o remédio e o veneno reside na dose, disse Paracelso, um dos pais da medicina, e não poderia estar mais correto. Para que um composto inédito se torne um medicamento o conhecimento detalhado de quais são as dosagens em que pode ser consumido sem grandes chances do aparecimento de efeitos tóxicos deve ser elucidado. Para isto, a toxicologia dispõe hoje de um vasto arsenal de protocolos com intuito de garantir que somente produtos químicos seguros cheguem ao mercado (MANDRIOLI; SILBERGELD, 2016; PARASURAMAN, 2011).

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), é uma organização internacional que procura fornecer uma plataforma para comparar políticas econômicas, solucionar problemas comuns e coordenar políticas domésticas e internacionais. Uma das funções deste órgão é fornecer protocolos relacionados a testes de novos produtos químicos (pesticidas, cosméticos, medicamentos), e alguns destes são específicos para que um determinado composto químico seja testado antes de definitivamente virar uma mercadoria. Os protocolos da OECD para teste de substâncias químicas são uma coleção de cerca de 150 dos mais relevantes testes internacionais usados pelos governos, indústria e laboratórios independentes para identificar e caracterizar potenciais perigos relacionados a substâncias químicas. Estes protocolos são ferramentas para profissionais, usadas primeiramente em testes de segurança regulatórios e subsequente notificação, registro e avaliação de produtos

químicos. Os protocolos também podem ser utilizados para seleção de compostos químicos candidatos para o desenvolvimento de novos produtos fármacos (OECD, 2002).

Compostos com atividade biológica conhecida devem, antes de serem utilizados por humanos, passar por testes de toxicidade aguda e crônica. Ou seja, estes compostos idealmente devem ser testados inicialmente para sua toxicidade em uma única dose e, na sequência, os testes devem levar em consideração doses repetidas. O intuito da realização do teste de toxicidade aguda oral é estimar uma dose letal para 50% da população testada (LD_{50}) para aquele determinado composto e, desta forma, predizer em qual faixa este composto pode causar danos a população exposta. Neste sentido, o protocolo OECD 423 fornece uma metodologia que estima a LD_{50} do composto pesquisado, bem como o classifica de acordo com o Sistema globalmente harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (GHS). O diferencial deste protocolo é o uso reduzido de animais, uma vez que o protocolo é um procedimento em passos com uso de 3 animais por etapa. Dependendo da mortalidade e/ou sinais que o animal apresenta, geralmente em 2 a 4 passos o teste já define uma faixa de LD_{50} para o composto. Este procedimento é reprodutível, usa uma quantidade pequena de animais quando comparado a outros métodos de toxicidade oral aguda e permite classificar substâncias tão bem quanto qualquer outro método. O método é baseado em avaliações biométricas com doses fixas, adequadamente escolhidas para permitir classificação das substâncias. O método foi adotado em 1996 e foi exaustivamente validado *in vivo* frente aos resultados de LD_{50} da literatura (AL-AFIFI et al., 2018; JONSSON et al., 2013; OECD, 2002).

1.4. IMIDAZÓIS

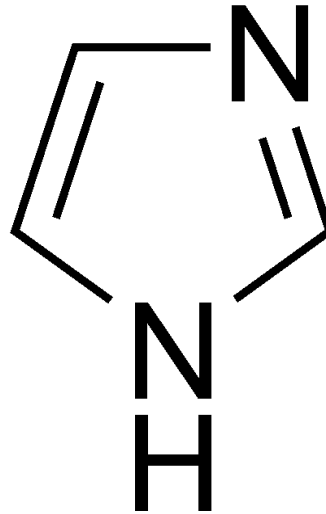
Desde sua descoberta em meados de 1840, a pesquisa e desenvolvimento de compostos baseados em imidazóis tem crescido e se desenvolvido rapidamente devido ao seu grande potencial de aplicação na indústria farmacêutica. Muitos fármacos baseados em imidazóis têm sido vitais nos tratamentos de diversos tipos de doenças, e novos compostos imidazólicos com valor medicinal estão sendo ativamente pesquisados por universidades e institutos do mundo (ZHANG et al., 2014).

O anel imidazólico, uma estrutura aromática de cinco átomos contendo dois nitrogênios, é um anel heterocíclico anfotérico e altamente polar (MOLINA; TÁRRAGA; OTÓN, 2012). Estes compostos existem em duas formas tautoméricas, nas quais o átomo de hidrogênio pode estar localizado em qualquer um dos dois átomos de nitrogênio. Ainda, o

anel heterocíclico de nitrogênio rico em elétrons pode não somente aceitar ou doar prótons, mas também formar diversas interações fracas rapidamente. Estas características estruturais dos anéis imidazólicos são benéficas para suas derivações e para rapidamente se ligarem como uma vasta gama de enzimas e receptores em sistemas biológicos, consequentemente exibindo grande leque de atividades biológicas. Inclusive, anéis imidazólicos são usualmente encontrados em produtos naturais e em algumas substâncias bioativas do metabolismo humano como histamina, vitamina B12, DNA e hemoglobina (BHATNAGAR; SHARMA; KUMAR, 2011; SHALINI; SHARMA; KUMAR, 2010) (**Figura 4**).

Comumente, para preparação de imidazóis tri- e tetra substituídos, utiliza-se a reação de Debus-Radziszewski. Reportada inicialmente por H. Debus em 1858 e otimizada por B. L. Radziszewski, esta reação consiste em uma condensação tricomponente entre um composto α -dicarbonilado, um aldeído e uma fonte de amônia, resultando em um imidazol 2,4,5-trissubstituído. Mais tarde, observou-se que, ao adicionar uma amina primária a esta reação, obtém-se uma molécula imidazolica totalmente substituída. Embora eficiente, esta reação apresenta limitações na preparação de outros derivados, frequentemente obtidos em baixos rendimentos devido à formação competitiva de subprodutos de reação, tais como o oxazol (MUNOZ; JUNIOR; SILVA, 2014; ROSSI et al., 2019). Diante disso, outras estratégias para síntese têm sido utilizadas para obtenção de imidazóis multissubstituídos (FOWLER, 1971). Dentre os blocos de construção mais utilizadas, tem-se os compostos carbonílicos α -halogenados, que podem ser utilizados em uma reação tetracomponente, em presença de uma amina, um aldeído e NH_4OAc , resultando em imidazóis tri- e tetrassubstituídos. Finalmente, para obtenção de imidazóis, pode utilizar-se também de acordo com a síntese de Van Leusen, empregando toluenossulfonilmetil isocianetos (TosMIC) em presença de uma amina e um aldeído (ADIB et al., 2009; GRACIAS; GASIECKI; DJURIC, 2005).

Figura 4. Núcleo imidazólico



Anel imidazólico, uma estrutura aromática de cinco átomos contendo dois nitrogênios, é um anel heterocíclico anfotérico e altamente polar. Fonte: https://pt.m.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Imidazole_structure.png. Acesso em 29 de novembro de 2018.

Atualmente a indústria farmacêutica já possui imidazóis disponíveis no mercado mundial para o tratamento de doenças como câncer (dacarbazine, zoledronicacid, azatioprina e tipifarnib), antifúngicos (clotrimazol, miconazol, cetoconazol e oxiconazol), antiparasitários (metronidazol, benzinidazol, ornidazol e secnidazol), anti-histamínicos (cimetidina, imetit, immepip e tioperamida), antineuropáticos (nafimidona, fipamezole e dexmedetomidine) e anti-hipertensivos (losartana, eprosartana e olmesartana) (BURNIER; WUERZNER, 2011; MISHRA; GANGULY, 2012; STEINMAN; BRUFISKY; OESTERREICH, 2012). Porém, diversas outras classes de fármacos estão sendo desenvolvidas para ações como antibacterianos, antituberculose, antivirais e anti-inflamatórios (ZHANG et al., 2014).

No que tange a ação anti-inflamatória, diversos compostos imidazólicos já demonstraram atividade inibitória sobre diferentes mediadores inflamatórios, como cicloxigenase 2 (COX-2), sintase de prostaglandina E2 microsossomal (mPGES-1), amida de ácido graxo hidrolase (FAAH), fosfolipase A2 α citosólica (cPLA2 α), S-nitrosoglutathion redutase (GSNOR), fosfodiesterase 4 (PDE4), lipoxigenase (LOX), fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) (ZHANG et al., 2014).

CAPÍTULO 2

2.1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um fenômeno que ocorre em tecidos que sofreram algum tipo de estímulo danoso, com intuito de proteger o hospedeiro contra diferentes tipos de agentes invasores. Este fenômeno age para isolar e destruir agentes invasores e preparar o tecido danificado para o subsequente reparo (GRANGER; SENCHENKOVA, 2010). Alguns eventos vasculares e celulares importantes ocorrem na inflamação que podem caracterizar este fenômeno. Um destes eventos é a vasodilatação, que aumenta a permeabilidade vascular e resultada na formação de exsudato e aumento da facilidade para migração de leucócitos dos vasos sanguíneos periféricos para o sítio inflamatório, com subsequente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e liberação de citocinas (BISWAS, 2016; SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Embora a inflamação seja um fenômeno importante na defesa do hospedeiro e é essencial para evitar uma série de infecções e problemas correlatos, sua ativação descontrolada e desarmoniosa leva ao agravamento de diversas condições patológicas. A inflamação é talvez o fenômeno que mais contribui para o congestionamento médico em sociedades industrializadas e, embora não seja a primeira causa de doenças como aterosclerose, obesidade, câncer, doença pulmonar crônica obstrutiva e asma, ela contribui significativamente para sua patogênese (NATHAN; DING, 2010).

De forma geral, uma substância farmacêutica pode ser classificada como uma biomolécula ou uma pequena molécula, de acordo com a sua estrutura e peso molecular (SAMANEN, 2013). Embora biomoléculas sejam largamente empregadas, especialmente nos mercados de câncer e doenças autoimunes, a necessidade de pequenas moléculas com maior potência e segurança é inquestionável. Isto ocorre em parte devido ao fato de que pequenas moléculas acabam sendo menos caras em termos de produção para indústria farmacêutica, quando comparadas a biomoléculas (HANKE et al., 2016). Entre as novas pequenas moléculas com ação anti-inflamatória, os imidazóis são conhecidos por sua capacidade de inibir diversas vias relacionadas a este fenômeno. O anel imidazólico está presente em diversos produtos naturais, no entanto, a maioria dos imidazóis usados na medicina moderna são sintéticos. Desde sua descoberta em meados de 1840, estes compostos vêm sendo utilizados em uma grande variedade de abordagens terapêuticas, como anticâncer, antifúngico, antibiótico, antituberculose, antiparasitário, anti-histamínico, anti-hipertensivo, antiobesidade e anti-inflamatório. Em relação a sua atividade anti-inflamatória, os compostos imidazólicos demonstram potencial efeito inibitório sobre diferentes parâmetros

inflamatórios, incluindo nestes o fator nuclear κ B (NF- κ B) e proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) (ZHANG et al., 2014).

Neste contexto, na primeira parte desta tese a hipótese a ser testada é se as moléculas tetrasubstituídas derivadas de imidazóis sintetizadas pela química Thais Rossa, orientada pelo professor Doutor Marcus Mandolesi Sá, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) apresentariam algum efeito anti-inflamatório. Para efetivamente testar esta hipótese avaliou-se, *in vitro*, o efeito dos imidazóis na secreção de importantes citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico. Na sequência, um estudo *in vivo* foi conduzido para elucidar se o efeito *in vitro* seria mantido. Finalmente, um ensaio *in vitro* foi conduzido com o imidazol que apresentou os melhores resultados, para verificar a habilidade deste em inibir a translocação para o núcleo celular do fator de transcrição NF- κ B.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos imidazólicos *in vitro*, em cultura de macrófagos J774, e *in vivo*, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina em camundongos.

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.2.1. *In vitro*:

- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos imidazólicos em cultura de macrófagos J774 e elucidar as suas CC_{10} ;
- Avaliar a capacidade dos compostos imidazólicos de inibir a produção dos metabólitos de óxido nítrico nas suas CC_{10} previamente avaliadas em cultura de macrófagos J774;
- Avaliar a capacidade dos compostos imidazólicos de inibir a produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β nas suas CC_{10} previamente avaliadas em cultura de macrófagos J774;
- Avaliar a atividade do composto imidazólico com maior eficácia *in vivo* sobre a concentração da subunidade p65 do NF- κ B no citosol de macrófagos.

2.2.2.1. *In vivo*:

- Avaliar a capacidade dos compostos imidazólicos em inibir a migração leucocitária e exsudação no lavado da cavidade pleural de camundongos que sofreram a pleurisia induzida pela carragenina;
- Avaliar a influência do composto imidazólico com maior eficácia na inibição da migração de leucócitos e formação de exsudato sobre a atividade das enzimas Mieloperoxidase (MPO), Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST) no lavado da cavidade pleural de camundongos que sofreram a pleurisia induzida pela carragenina;
- Avaliar a capacidade do composto imidazólico com maior eficácia na inibição da migração de leucócitos e formação de exsudato sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico nítrico/nitrato (NOx) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no lavado da cavidade pleural de camundongos que sofreram a pleurisia induzida pela carragenina;
- Avaliar a capacidade do composto imidazólico com maior eficácia na inibição da migração de leucócitos e formação de exsudato sobre as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β no lavado da cavidade pleural de camundongos que sofreram a pleurisia induzida pela carragenina.

2.3. MÉTODOS

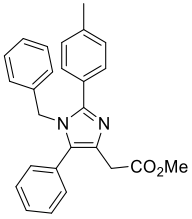
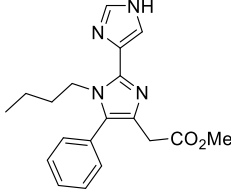
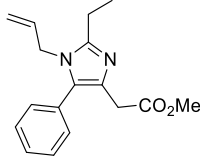
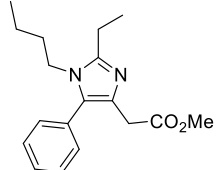
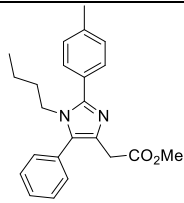
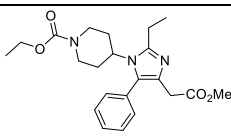
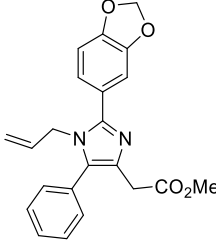
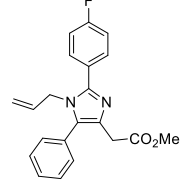
2.3.1. COMPOSTOS

Os compostos imidazólicos (pureza > 99%) utilizados no presente trabalho foram sintetizados e fornecidos pela química Thais Rossa, orientada pelo professor Doutor Marcus Mandolesi Sá, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (ROSSA et al., 2018).

Os sais foram dissolvidos em uma solução de salina estéril (0,9% NaCl) e dimetilsulfóxido 1% (DMSO) para uma concentração de 2,5 mg/mL como solução para estoque. Estas soluções foram aliquotadas e armazenadas em freezer -20 °C até o momento dos experimentos, quando foram dissolvidas em meio de cultura para os experimentos *in vitro*, ou salina estéril para os experimentos *in vivo*.

Os imidazóis foram numerados como: **1)** 1-benzil-5-fenil-2-(4-tolil)-1H-imidazol-4-acetato de metila; **2)** 1-butil-5-fenil-2-[4(5)-imidazoil]-1H-imidazol-4-acetato de metila; **3)** 1-alil-2-etil-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila; **4)** 1-butil-2-etil-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila; **5)** 1-butil-5-fenil-2-(4-tolil)-1H-imidazol-4-acetato de metila; **6)** 1-(1-etoxicarbonilpiperidina-4-il)-2-etil-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila; **7)** 1-alil-2-(3,4-metilenedioxifenil)-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila e **8)** 1-alil-2-(4-fluorofenil)-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila (Quadro 1).

Quadro 1. Estrutura química e características dos compostos imidazólicos

Número	Composto	Estrutura	P.M. e Fórmula
1	1-benzil-5-fenil-2-(4-tolil)-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₂ PM: 396,4900
2	1-butil-5-fenil-2-[4(5)-imidazol]-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₂ PM: 338,4110 g/mol
3	1-alil-2-etil-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂ PM: 284,3590
4	1-butil-2-etil-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₂ PM: 300,4020
5	1-butil-5-fenil-2-(4-tolil)-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₂ PM: 362,4730
6	1-(1-etoxicarbonilpiperidina-4-il)-2-etil-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O ₄ PM: 399,4910 g/mol
7	1-alil-2-(3,4-metilenedioxifenil)-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₄ PM: 376,4120 g/mol
8	1-alil-2-(4-fluorofenil)-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila		C ₂₁ H ₁₉ FN ₂ O ₂ PM: 350,3934 g/mol

2.3.2. CULTURA CELULAR

Macrófagos murinos J774 foram adquiridos do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de HEPES. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² de área para confluência a 37 °C em atmosfera úmida controlada de 5% de CO₂. A cada 2 dias, o processo de passagem era aplicado nas células e o meio trocado. Antes dos experimentos, o ensaio de exclusão com azul de Tripán foi conduzido para verificar a viabilidade celular. Os experimentos foram conduzidos entre a quinta e décima quinta passagem desta linhagem.

2.3.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O efeito citotóxico dos imidazóis foi avaliado pelo ensaio de Azul de Alamar (reazurina), com pequenas modificações (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994). Os macrófagos J774 (2 x 10⁴ células/poço) foram acondicionados em placas de 96 poços e incubados a 37 °C em estufa de CO₂ (5%) por 24 horas para aderência e confluência satisfatórias. Após o período de incubação, diferentes concentrações dos imidazóis (1-100 µM) foram adicionados aos poços em triplicata. Os controles receberam as mesmas concentrações de DMSO que foi utilizado para preparar as respectivas soluções dos imidazóis (≤ 1%). As células foram incubadas por mais 24 horas e, ao fim deste período, o meio foi substituído por uma solução de Azul de Alamar (1,5 mg/mL), seguido da incubação de 4 horas a 37 °C. A fluorescência de Azul de Alamar foi quantificada na respectiva excitação e emissão de 540 nm e 595 nm. A viabilidade celular do controle foi considerada 100%. A concentração citotóxica que matou 10% das células (CC₁₀) foi calculada por meio de uma análise de regressão não linear do logaritmo das concentrações utilizadas em função da resposta normalizada (percentual de células viáveis), utilizando o software Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

2.3.4. ENSAIO DE INFLAMAÇÃO *IN VITRO* E DESENHO EXPERIMENTAL

Para induzir um estado inflamatório nos macrófagos J774 as células foram cultivadas em placa de 12 poços (2×10^5 células/poço) por 24 horas para completa aderência e confluência. Quando aderência foi considerada adequada, as culturas foram divididas em grupos ($n = 3/\text{grupo}$) que foram: (a) **controle branco** (B, células não inflamadas), células pré-tratadas com veículo; (b) **controle negativo** (LPS, células inflamadas), células pré-tratadas com veículo; (c) **controle positivo** (Dex), células pré-tratadas com dexametasona ($10 \mu\text{M}$); e (d) **grupos experimentais** (tratamento com imidazóis), células pré-tratadas com imidazóis (CC_{10}). Após 1 h, as células foram estimuladas com LPS $1 \mu\text{g/mL}$ por 24 horas (exceto o grupo controle branco, que recebeu somente PBS estéril) e, em seguida, os sobrenadantes foram coletados para demais investigações sobre a secreção de metabólitos de óxido nítrico (NO_x) e citocinas pró-inflamatórias.

2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO *IN VITRO*

A concentração de nitrito na cultura celular foi medida como um indicador da presença de NO baseado na reação de Griess (GREEN et al., 1982). De forma resumida, $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante da cultura celular foi coletado 24 horas após estímulo com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), misturado com volume igual de reagente de Griess (sulfanilamida 1%, ácido fosfórico 5% e N-(1-naftil) etilenodiamina 0,1%), e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em 540 nm com interpolação de uma curva padrão de nitrito ($0\text{-}100 \mu\text{M}$ em DMEM), a produção de nitrito foi determinada e os resultados expressos em μM .

2.3.6. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 E IL- 1β *IN VITRO*

As concentrações das citocinas no sobrenadante das culturas celulares foram quantificadas utilizando kits de ELISA disponíveis comercialmente para as citocinas $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 (Peprotech, Rocky Hill, Nova Jersey, EUA) e IL- 1β (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os limites de detecção são $10\text{-}2500 \text{ pg/mL}$ para $\text{TNF-}\alpha$; $30\text{-}4000 \text{ pg/mL}$ para IL-6 e $10\text{-}2000 \text{ pg/mL}$ para IL- 1β . Os resultados foram expressos em pg/mL .

2.3.7. ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados camundongos albinos Swiss com 4-5 semanas de vida, fêmeas, pesando entre 25-30 g, todos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram ambientados por pelo menos 1 semana antes dos protocolos experimentais em instalações próprias no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI/UFSC) com ciclos de luz alternados (12/12 horas), temperatura controlada $20 \pm 2^\circ \text{C}$ e acesso livre a ração e água tratada.

Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob protocolo PP00965.

2.3.8. PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E EUTANÁSIA

Para os procedimentos que requeriam anestesia os animais foram anestesiados com uma solução de 0,05 mL de xilazina (15 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Após a administração dos agentes anestésicos aguardou-se pelo menos 10 minutos para aprofundamento da anestesia antes de serem aplicados os protocolos necessários.

Para eutanásia os animais foram anestesiados com a dose anestésica de xilasina e quetamina e, após devido aprofundamento da anestesia, receberam uma overdose (2 x dose anestésica i.p.) destes mesmos anestésicos por via submandibular (intravenosa, i.v.). Após o tempo médio de 5 minutos, os animais já haviam sofrido parada cardiorrespiratória causada pela overdose de anestésico.

2.3.9. INDUÇÃO DA PLEURISIA E DESENHO EXPERIMENTAL

A pleurisia foi induzida com uma única injeção intrapleural (i.pl) de 0,1 ml de uma solução de carragenina λ 1% em salina estéril 0,9% (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Inicialmente uma curva dose resposta foi definida. Para isto, no dia dos experimentos os animais foram randomizados e divididos em diferentes grupos ($n = 5-6/\text{grupo}$) e tratados 0,5 horas antes da indução da pleurisia (pré-tratamento). Os grupos eram: (a) **controle branco** (animal saudável), animais pré-tratados com veículo (1% DMSO) i.p.; (b) **controle negativo** (animais inflamados), animais pré-tratados com veículo (1% DMSO) i.p.; (c) **controle**

positivo (animais com tratamento padronizado), animais pré-tratados com dexametasona 0,5 mg/kg i.p.; ou (d) **grupos experimentais** (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com imidazóis na dose de 0,1, 1 ou 10 mg/kg i.p..

Após 0,5 h de do tratamento, todos os grupos receberam uma injeção i.pl. de uma solução 1% de carragenina no lado direito da cavidade torácica, exceto o grupo controle branco, que recebeu uma injeção i.pl. de salina estéril. Os animais sofreram eutanásia após 4 h, a cavidade pleural foi exposta e lavada com 1 mL de tampão fosfato salina (PBS, pH 7.2) em água destilada contendo heparina (20 IU/ml).

O lavado da cavidade pleural foi coletado e utilizado para quantificação de leucócitos totais e diferencial leucocitário, e exsudação. Na sequência, o lavado pleural foi aliqotado em tubos eppendorf e armazenado em freezer -80 °C para posterior análise.

Após a determinação da dose de cada composto que significativamente inibiu os parâmetros analisados inicialmente (influxo leucocitário e exsudação), as amostras do imidazol com maior eficácia foram utilizadas para avaliar a ação inibitória dos compostos sobre a atividade das enzimas MPO, SOD, CAT e GST e concentrações de NO_x, TBARs e citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

2.3.10. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL

Para contagem total de leucócitos foi utilizado um contador veterinário automatizado de leucócitos com parâmetros calibrados para camundongos (MINDRAY, BC2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas, as quais foram submetidas a coloração pela técnica de May-Grünwald-Giemsa e a contagem feita em microscópio ótico comum (x1000). Os resultados foram expressos em número total de células x 10⁶/mL.

2.3.11. DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO

Para quantificação de proteínas no exsudato utilizou-se a técnica de LOWRY et al., (1951). Em síntese, pipetou-se 5 μ l de amostra do lavado da cavidade pleural dos animais em uma placa de ELISA (96 poços) e foi adicionado 95 μ l de água destilada. Na sequência, 100 μ l de reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na₂CO₃ - 10%, sulfato de cobre: CuSO₄ 0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada) foi adicionado. Após a incubação de 10 minutos a temperatura ambiente

adicionou-se 50 µl de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água destilada), e estas amostras foram incubadas por 30 minutos. Finalmente, as amostras foram lidas em leitora de microplacas em comprimento de onda de 620 nm (Organon, Tckninca, Roseland, Nova Jersey, USA). Paralelamente utilizou-se diferentes concentrações de albumina para obter-se uma curva-padrão (0-40 mg/mL). Os resultados foram expressos em µg/mL.

2.3.12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Os ensaios para determinação da atividade da MPO foram realizados de acordo com BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, (1982). Após a coleta do lavado pleural, processamento (congelamento e descongelamento, e vortéx) e centrifugação com solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5%) (40000 x g por 15 minutos a 4° C) (Sorvall™ ST 40, Thermo Scientific®, Swedesboro, NJ, EUA), o sobrenadante (20 µl) foi coletado e imediatamente submetido a determinação da atividade da MPO. Com este objetivo, os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços onde foi adicionado 180 µl de solução de reação (0,167 mg/mL de *o*-dianisidina, 2 HCl e 0,0005% de H₂O₂). Após incubação de 15 minutos à 37° C, a reação enzimática foi interrompida com adição de 30 µl de azida sódica (NaN₃, 1%). Finalmente, as placas foram lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Tecknica, Roseland, Nova Jersey, EUA) ajustada para comprimento de onda de 450 nm. Uma curva padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7-140 um/ml) teve sua densidade ótica determinada, permitindo desta forma a quantificação dos valores desconhecido. Os resultados obtidos foram expressos em mUI/mL.

2.3.13. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO *IN VIVO* (NO_x)

As concentrações de NO foram indiretamente determinadas através da formação de seus metabólitos: nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻). Para tal, a metodologia de Griess foi empregada (GREEN et al., 1982). As amostras do lavado pleural (300 µl) foram desproteinizadas no dia dos experimentos com 30 µl de solução de sulfato de zinco (ZnSO₄, 20%). As amostras foram então incubadas em banho de gelo por 1 h, e foi então adicionado 6 µl de solução de hidróxido de sódio (NaOH, 2,5 N). Na sequência, as amostras foram

centrifugadas (300 x g por 15 minutos) obtendo-se um sobrenadante límpido. Dando continuidade, 100 µl dos sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio e diluídos em solução contendo 100 µl de solução saturada de cloreto de vanádio (VCl₃, 0,8%) e ácido clorídrico (HCl, 3%). Nestes mesmos tubos foram adicionados 100 µl de solução de Griess (composição: sulfonamida (C₆H₈N₂O₂S, 1%) ácido fosfórico (H₃PO₄, 5%) e N-(1-naftil) etilenodiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂, 0,1%)) e esta mistura foi incubada por 40 minutos a 37° C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). A reação de nitrito com este reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio de leitura das densidades óticas em uma placa de 96 poços, lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Tecknica, Roseland, Nova Jersey, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito (0-150 µM) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato através de regressão linear. Os resultados obtidos foram expressos em µM de nitrito/nitrato.

2.3.14. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD no lavado da cavidade pleural dos animais foi determinada conforme a metodologia descrita por MISRA; FRIDOVICH, (1972) modificado por BOVERIS et al., (1983). A reação de detecção da atividade desta enzima baseia-se na oxidação da adrenalina, por mudança de pH 2,0 para pH 10,0, o que tem por consequência a geração do ânion superóxido a partir do sistema xantina/xantina oxidase, e produz um cromóforo rosa, o adrenocromo. A partir do momento que as amostras de lavado da cavidade pleural foram colocadas na placa de ELISA de 96 poços, a enzima SOD presente na amostra diminuiu sua formação. Em cada poço da placa contendo as amostras e volume suficiente para 200 µL de tampão glicina (50 mM, pH 10,2), foram adicionados 5 µL de solução de adrenalina (60 mM, pH 2,0). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos a 480 nm, e curvas com 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD, sendo que uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. Os valores da SOD foram expressos em USOD/mL

2.3.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase foi realizada nas amostras de lavados da cavidade pleural utilizando a metodologia descrita por AEBI, (1984). A reação empregada é baseada na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (dissolvido em PBS) na presença da enzima CAT que esta apresenta nas amostras de lavado da cavidade pleural. A atividade da CAT foi determinada pela mudança nas absorbâncias a cada 30 seg., durante 3 minutos a 240 nm utilizando espectrofotômetro UV/visível (QUAALL). Os valores da CAT foram expressos em CAT/min/mL.

2.3.16. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERSASES (GST)

A atividade da enzima GST foi determinada no lavado da cavidade pleural dos animais, segundo metodologia descrita por HABIG; PABST; JAKOBY, (1974). Esta técnica emprega como princípio o uso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, para que a enzima GST presente na amostra, juntamente com a GSH, promova a conjugação CDNB-GSH. Esta reação foi monitorada a 340 nm por 60 seg. em espectrofotômetro UV/visível (QUAALL). Os valores de GST foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$.

2.3.17. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica desencadeada pela carragenina nas amostras do lavado da cavidade pleural foi realizada através da detecção de derivados de seus produtos de oxidação e de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BIRD; DRAPER, 1984). O protocolo consiste da reação dos produtos da peroxidação lipídica com ácido tiobarbitúrico produzindo uma base de Schiff de coloração rosa, que foi medida através de espectrofotômetro no comprimento de onda 535 UV/visível (CGB-916, GCB 40 Scientific Equipment, Dadenong, Austrália). As concentrações de TBARS foram expressas em $\text{mmol TBARS}/\text{mL}$.

2.3.18. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- α , IL-6 E IL-1 β

As concentrações das citocinas no lavado da cavidade pleural foram quantificadas utilizando kits de ELISA disponíveis comercialmente para as citocinas TNF- α , IL-6 (Peprotech, Rocky Hill, Nova Jersey, EUA) e IL-1 β (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Os limites de detecção são 10-2500 pg/mL para TNF- α ; 30-4000 pg/mL para IL-6 e 10-2000 pg/mL para IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.3.19. QUANTIFICAÇÃO DO P65 CITOSÓLICO

Para avaliar o efeito do imidazol 8 sobre a concentração da subunidade p65 do NF- κ B, macrófagos J774 (2×10^6 células) foram cultivados em placas de petri (30 mm x 15 mm) por 48 horas para aderência e confluência satisfatórias (a 37° C em atmosfera controlada com CO₂ 5% e umidificada). Na sequência, as células foram tratadas com imidazol 8 por 1 h na sua CC₁₀ (51 μ M), e em seguida, as células foram estimuladas com LPS 1 μ g/mL por 1 h. Então, as células foram colhidas com PBS gelado, acondicionadas em microtubos e lavadas 2 vezes com PBS gelado. A seguir, as células foram centrifugadas, os sobrenadantes foram descartados, o pellet celular foi gentilmente ressuspendido com 500 μ L de tampão hipotônico (NF- κ Bp65 total ELISA Kit #KHO0371, Invitrogen Corporation, Camarillo, California, USA) com inibidores de proteases e fosfatases (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), e incubados por 15 minutos em gelo. Após a incubação, 25 μ L de detergente (Triton X 10%) foi adicionado, as amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, e centrifugados por 10 minutos (1000 g a 4° C). O sobrenadante (fração citosólica) foi armazenado a 80° C para análise. A concentração de p65 total foi determinada utilizando kit comercial de ELISA, seguindo as instruções da empresa (Invitrogen Corporation, Camarillo, Califórnia, USA). Dexametasona 10 μ M foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína em cada amostra e expressados como pg/mg de proteína.

2.3.20. ANÁLISE DOS DADOS

Para as análises dos dados os softwares Excel 2013, SPSS 22 e Graphpad Prism 5.0 foram utilizados. Resultados experimentais paramétricos foram expressos em média \pm erro

padrão da média, e para dados não paramétricos utilizou-se mediana e seu range. Os resíduos dos dados foram analisados para sua normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade através do teste de Bartlett. Para dados paramétricos e homocedásticos utilizou-se ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Tukey. Dados paramétricos heterocedásticos foram analisados através de ANOVA-Welch seguido do teste *post-hoc* de Games-Howell. Dados não paramétricos foram analisados utilizando Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Dunn. Resultados com valores de p inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Ainda, o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi determinado para o óxido nítrico vs. exsudação.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. IMIDAZÓIS INIBIRAM OS PARAMETROS INFLAMATÓRIOS *IN VITRO* EM MACRÓFAGOS J774

O objetivo inicial foi triar compostos imidazólicos inéditos com atividade anti-inflamatória. Para este fim, avaliou-se a atividade inibitória *in vitro* destas moléculas sobre a produção NO_x, TNF- α , IL-6 e IL-1 β em concentrações em que não mais de 10% dos macrófagos J774 sofressem qualquer tipo de morte celular (CC₁₀). Cada uma das moléculas estudadas teve sua CC₁₀ determinada, e estas concentrações foram utilizadas para triar o efeito anti-inflamatório sobre os macrófagos, exceto a molécula **1**, que apresentou alta citotoxicidade para esta linhagem celular e por esta razão foi então descartada das análises seguintes (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração dos imidazóis que causa 10% de morte celular (CC₁₀) definida pelo método de azul de Alamar durante 24 h de tratamento.

Imidazol	CC ₁₀ (μ M)
1	< 1
2	43 \pm 2,3
3	71 \pm 1,9
4	62 \pm 1,9
5	20 \pm 1,7
6	78 \pm 2,3
7	49 \pm 2,9
8	51 \pm 1,7

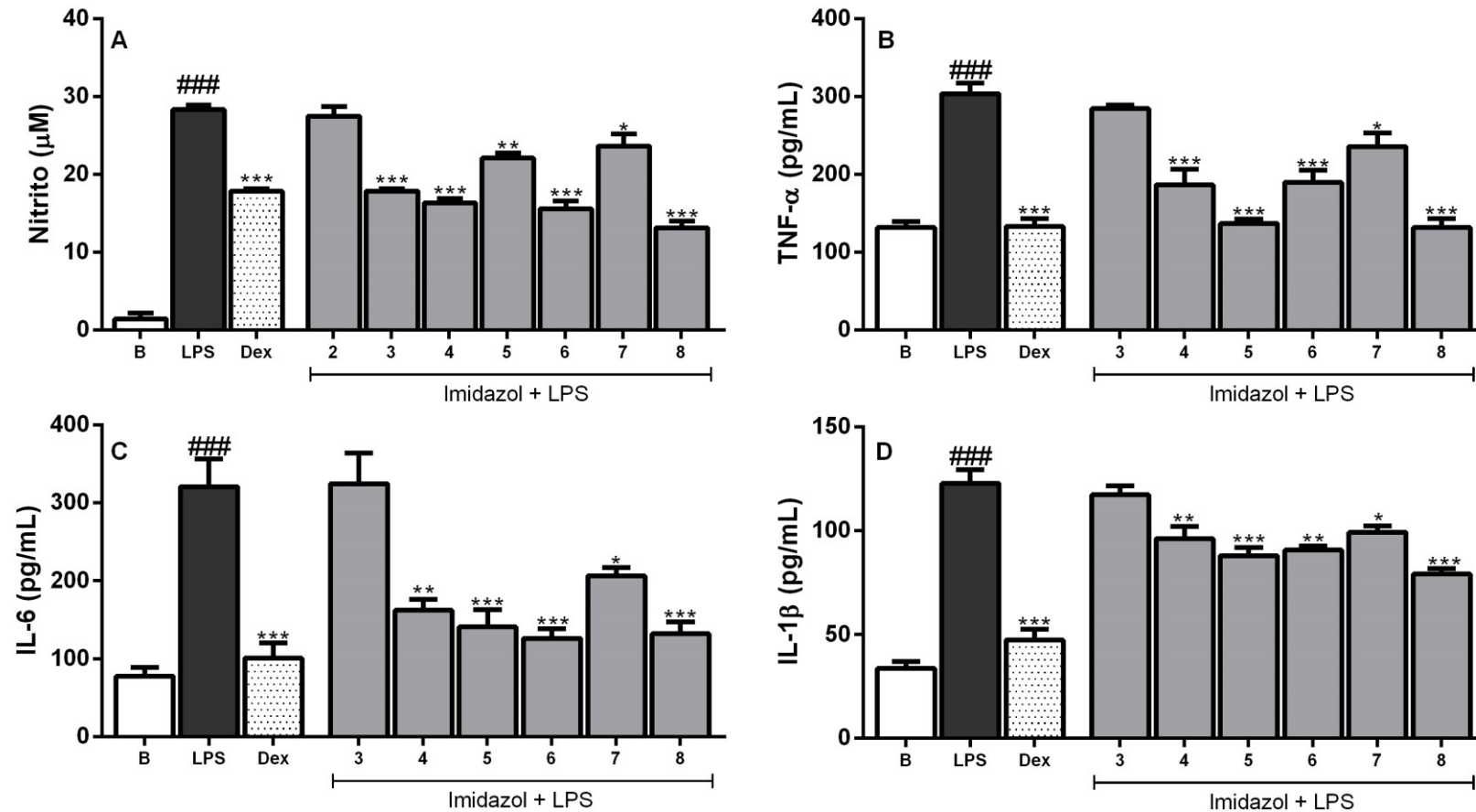
Dados expressos como média \pm SEM (n = 3)

Dando sequência, as sete moléculas remanescentes foram testadas para sua atividade inibitória sobre a produção de NO_x, e todos os imidazóis inibiram de forma significativa este mediador inflamatório nas suas CC₁₀ (% inibição - **3**: 36,9 ± 0,9; **4**: 42,2 ± 1,9; **5**: 21,9 ± 2,3; **6**: 44,9 ± 3,5; **7**: 16,5 ± 5,5 e **8**: 53,5 ± 3,1) (p < 0,01), exceto o imidazol **2** (p > 0,05), que então foi descartado das análises subsequentes (**Figura 5A**).

As seis moléculas restantes foram testadas quanto sua capacidade inibitória sobre três citocinas pró-inflamatórias. A respeito do TNF-α, cinco destas moléculas inibiram de forma significativa esta citocina pró-inflamatória (% inibição - **4**: 38,5 ± 6,6; **5**: 54,9 ± 1,7; **6**: 37,4 ± 5,1; **7**: 22,3 ± 5,8 e **8**: 56,6 ± 3,7) (p < 0,01). O imidazol **3** não foi capaz de inibir a secreção desta citocina significativamente (p > 0,05) (**Figura 5B**). A seguir, os seis imidazóis foram testados para sua capacidade inibitória também sobre a citocina IL-6. Assim como no TNF-α, somente cinco imidazóis inibiram significativamente a secreção de IL-6 (% inibição - **4**: 49,5 ± 4,3; **5**: 56,1 ± 6,9; **6**: 60,7 ± 3,9; **7**: 35,6 ± 3,2 e **8**: 58,8 ± 4,7) (p < 0,05). Novamente, o imidazol **3** não inibiu esta citocina (p > 0,05) (**Figura 5C**). Finalmente, os imidazóis foram testados para sua atividade inibitória sobre a secreção de IL-1β. Destes seis imidazóis, cinco demonstraram atividade inibitória de uma maneira significativa (% inibição - **4**: 21,7 ± 4,8; **5**: 28,3 ± 3,2; **6**: 26,2 ± 1,6; **7**: 19,3 ± 2,6 e **8**: 35,6 ± 2,3) (p < 0,05). O imidazol **3** não exerceu ação inibitória de forma significativa sobre esta citocina (p > 0,05) (**Figura 5D**).

Como esperado, a dexametasona (controle positivo) inibiu de forma significativa a secreção de NO_x, TNF-α, IL-6 e IL-1β na concentração de 10 μM (p < 0,001) (**Figura 5A, B, C e D**).

Figura 5. Efeito dos imidazóis sobre a secreção de nitrito, TNF- α , IL-6 e IL-1 β em macrófagos J774 estimulados por LPS.



Efeito dos imidazóis sintéticos administrados 1 hora antes do estímulo dos macrófagos J774 com LPS (1 μ g/mL) sobre a secreção de nitrito (A), TNF- α (B), IL-6 (C) e IL-1 β (D). B: macrófagos pré-tratados com veículo e estimulados com PBS; LPS: macrófagos pré-tratados com veículo e estimulados com LPS (1 μ g/mL); Dex: macrófagos pré-tratados com dexametasona (10 μ M) e estimulados com LPS (1 μ g/mL); Imidazóis: macrófagos pré-tratados com CC₁₀ predeterminada e estimulados com LPS (1 μ g/mL). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. N = 3/grupo. ### p < 0,001 comparado com o grupo B; *** p < 0,001, ** p < 0,01 e * p < 0,05 comparado com o grupo LPS.

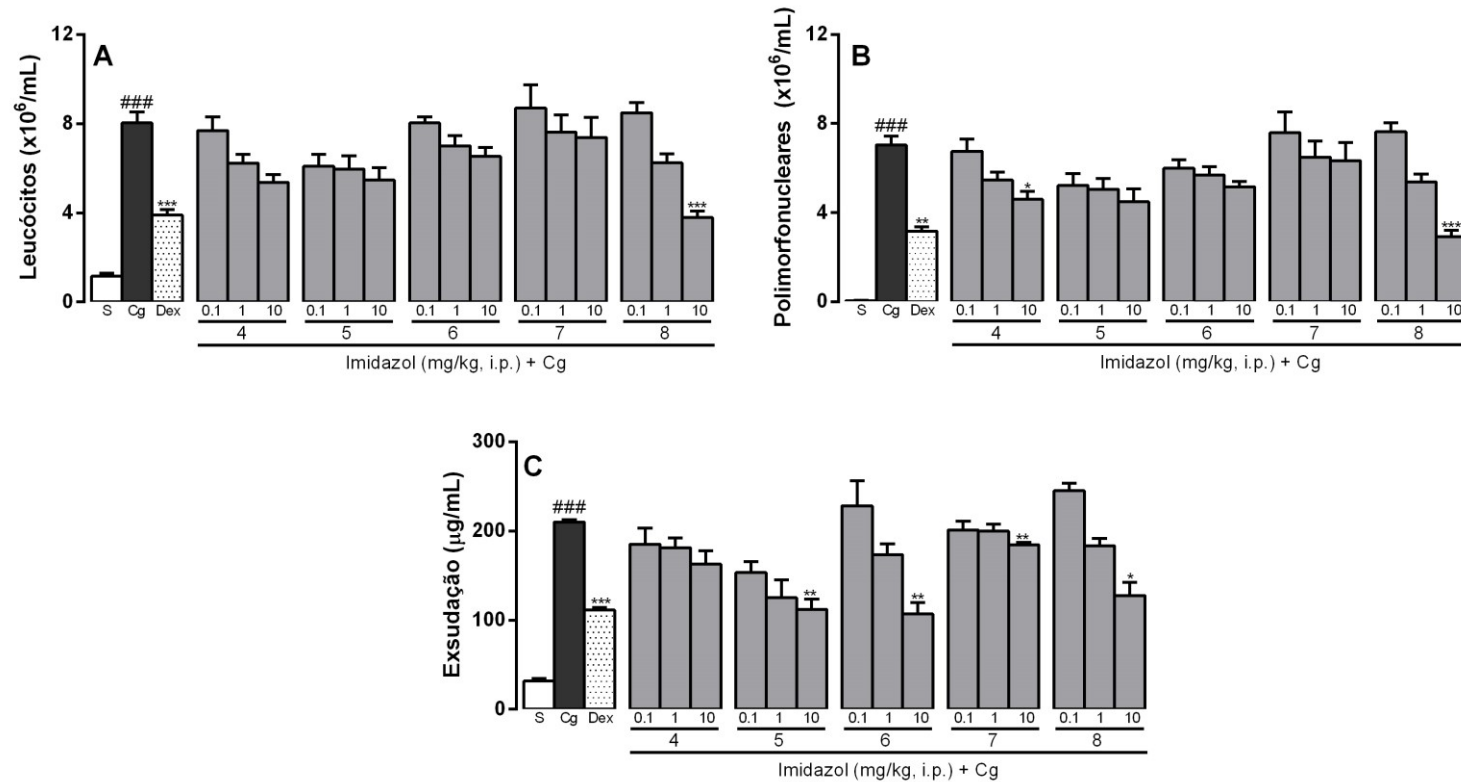
2.4.2. IMIDAZÓIS INIBIRAM A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA E FORMAÇÃO DE EXSUDATO NA CAVIDADE PLEURAL DE CAMUNDONGOS COM PLEUSIRISA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

Nos experimentos seguintes, foram selecionados os cinco imidazóis que mostraram atividade promissora *in vitro* por terem inibido a secreção de NO_x e citocinas pró-inflamatórias sem causar significativa morte celular, para testá-los *in vivo* no modelo de pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Os cinco imidazóis selecionados foram: **4**, **5**, **6**, **7** e **8**, e foram testados em três diferentes doses (0,1, 1 e 10 mg/kg).

A respeito da migração leucocitária, embora os cinco imidazóis tenham demonstrado tendência em inibir estas células consideravelmente para cavidade pleural, somente o imidazol **8**, na dose de 10 mg/kg, inibiu de forma significativa este fenômeno (% inibição - **8**: $52,9 \pm 3,7$) ($p < 0,001$) (**Figura 6A**). Esta inibição na migração leucocitária foi devido a capacidade desta molécula de inibir a migração de polimorfonucleares para cavidade pleural (% inibição - **8**: $58,3 \pm 4,0$) ($p < 0,001$). Embora o imidazol **4** não tenha demonstrado inibição significativa sobre a migração leucocitária total, esta molécula inibiu significativamente a migração de polimorfonucleares na dose de 10 mg/kg (% inibição - **4**: $34,5 \pm 5,0$) ($p < 0,05$) (**Figura 6B**). Dos cinco imidazóis testados, quatro destes demonstraram inibição estatisticamente significativa na dose de 10 mg/kg sobre a formação de exsudato após o desafio com a carragenina na cavidade pleural (% inibição - **5**: $46,6 \pm 5,5$; **6**: $49,1 \pm 6,3$; **7**: $12,2 \pm 1,3$ e **8**: $39,2 \pm 7,1$) ($p < 0,05$) (**Figura 6C**).

O controle positivo, dexametasona (0,5 mg/kg), inibiu a migração leucocitária (% inibição - $51,3 \pm 2,9$) ($p < 0,001$), devido a sua capacidade de atenuar a migração de polimorfonucleares para cavidade pleural (% inibição - $54,8 \pm 2,6$) ($p < 0,001$), e também inibiu a formação de exsudato após o desafio com o agente flogístico (% inibição - $46,9 \pm 1,3$) ($p < 0,001$) (**Figura 6A, B e C**).

Figura 6. Efeito dos imidazóis sobre a migração leucocitária e exsudação em animais submetidos a pleurisia induzida pela carragenina.



Efeito dos imidazóis sintéticos administrados 30 minutos antes do desafio dos camundongos com carragenina (1%) sobre a migração de leucócitos totais (A), polimorfonucleares (B) e extravasamento proteico (C) para cavidade pleural. S: (controle branco, animal saudável), animais pré-tratados com veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com salina; Cg: (controle negativo, animal inflamado), animais pré-tratados com veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%; Dex: (controle positivo, animal com tratamento padrão), animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%; Grupos experimentais: (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com compostos imidazólicos (0,1 – 10 mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo. ### < 0,001 comparado ao grupo S; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ comparado ao grupo Cg.

2.4.3. IMIDAZOL 8 INIBIU OS PARAMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CAVIDADE PLEURAL DE CAMUNDONGOS COM PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

O próximo passo foi avaliar o efeito do imidazol 8, o único imidazol que efetivamente inibiu os três parâmetros inflamatórios iniciais, sobre o estresse oxidativo. Observou-se que, na dose de 10 mg/kg, o imidazol 8 foi capaz de inibir com significância a atividade das enzimas: MPO (% inibição - $48,8 \pm 4,7$) ($p < 0,01$), GST (% inibição - $33,9 \pm 8,9$) ($p < 0,05$) e SOD (% inibição - $29,1 \pm 6,1$) ($p < 0,01$), e demonstrou uma tendência em reduzir a atividade da CAT, embora este efeito não tenha sido estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (**Tabela 2**).

Além disso, este imidazol foi capaz de reduzir de forma significativa as concentrações de NO_x (% inibição - $50,8 \pm 5,8$) ($p < 0,001$) e TBARS (% inibição - $59,3 \pm 8,6$) ($p < 0,001$). Ainda, uma correlação positiva forte e significativa foi observada entre a inibição da secreção de NO_x e a inibição do fenômeno exsudação ($r = 0,702$; $p < 0,001$) (**Tabela 2**).

O controle positivo (Dexametasona 0,5 mg/kg) inibiu todos os parâmetros oxidativos significativamente, como esperado ($p < 0,05$) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito do imidazol 8 sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Grupo	MPO^a (mU/mL)	GST^b (μmol/min/mL)	CAT^a (mmol/min/mL)	SOD^a (USOD/mL)	TBARS^a (mmol/mL)	NO^a (μM)
S	52,8 \pm 2,9	8,1 \pm 4,6	10,9 \pm 1,2	33,4 \pm 3,5	2,8 \pm 0,2	28,6 \pm 2,1
Cg	201,2 \pm 20,2	15,9 \pm 1,8	31,6 \pm 4,2	62,1 \pm 3,0	9,8 \pm 0,7	79,1 \pm 7,3
Dex	48,5 \pm 4,5***	9,1 \pm 3,2*	14,1 \pm 0,6*	40,9 \pm 3,6**	4,1 \pm 0,8***	46,4 \pm 5,4**
8	103 \pm 9,5**	10,6 \pm 5,4*	15,1 \pm 4,6	44,0 \pm 3,8**	3,9 \pm 0,8***	38,9 \pm 4,5***

S: (controle branco, animal saudável), animais pré-tratados com veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com salina; Cg: (controle negativo, animal inflamado), animais pré-tratados com veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%; Dex: (controle positivo, animal com tratamento padrão), animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%; 8: (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com compostos imidazólicos (0,1 – 10 mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%. Os resultados foram expressos como ^amédia \pm EPM ou ^bmediana \pm IQR. N = 5-6/grupo. *** p < 0,001, ** p < 0,01 e * p < 0,05 comparado ao grupo Cg.

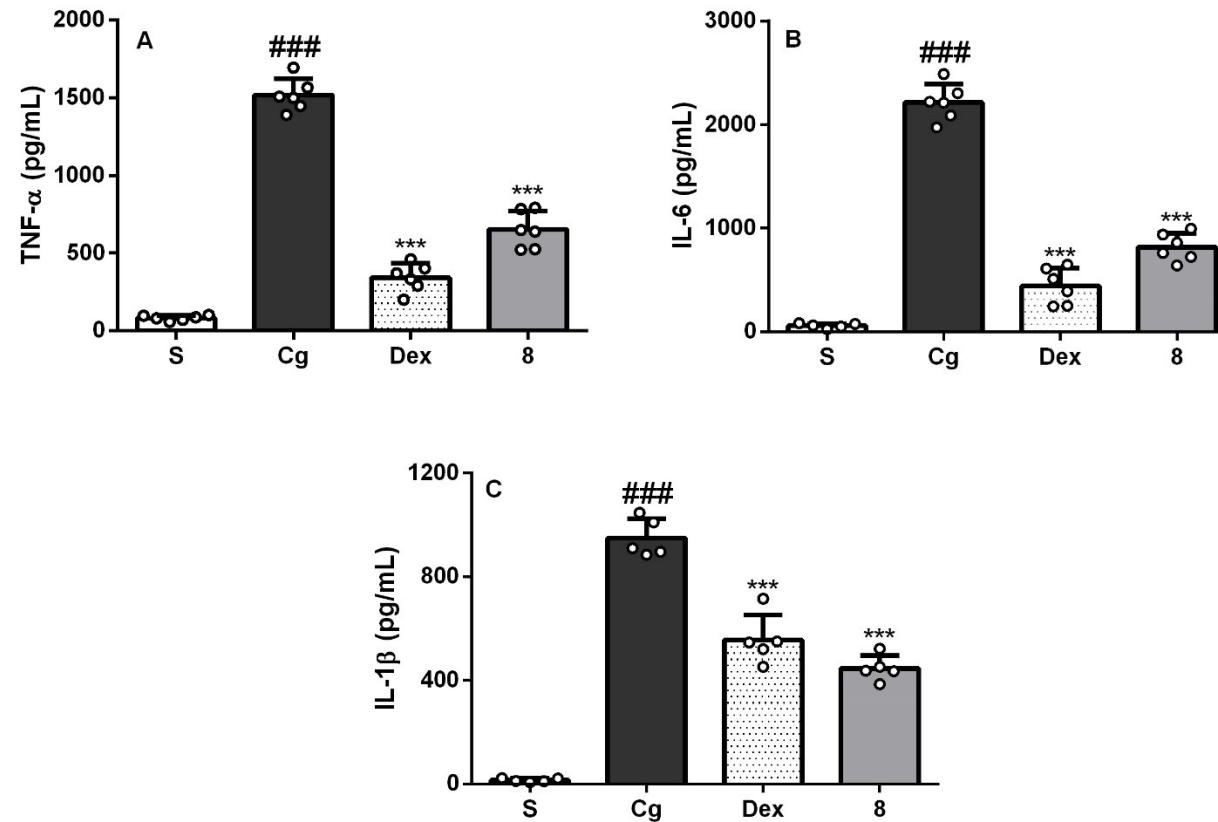
2.4.4. IMIDAZOL **8** ATENUOU A SECREÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMTÓRIAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA

Na sequência, analisou-se a capacidade do imidazol **8** na dose de 10 mg/kg em inibir as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-1 β , *in vivo*.

O imidazol **8** demonstrou atividade inibitória significativa sobre a secreção das três citocinas, neste modelo experimental: TNF- α (% inibição - $57,0 \pm 3,2$) ($p < 0,001$), IL-6 (% inibição - $63,0 \pm 2,5$) ($p < 0,001$) e IL-1 β (% inibição - $52,9 \pm 2,3$) ($p < 0,001$) (**Figura 7A, B e C**).

O controle positivo (Dexametasona) também inibiu de uma maneira significativa a secreção destas três citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β ($p < 0,001$) (**Figura 7A, B e C**).

Figura 7. Efeito do imidazol δ sobre as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β .

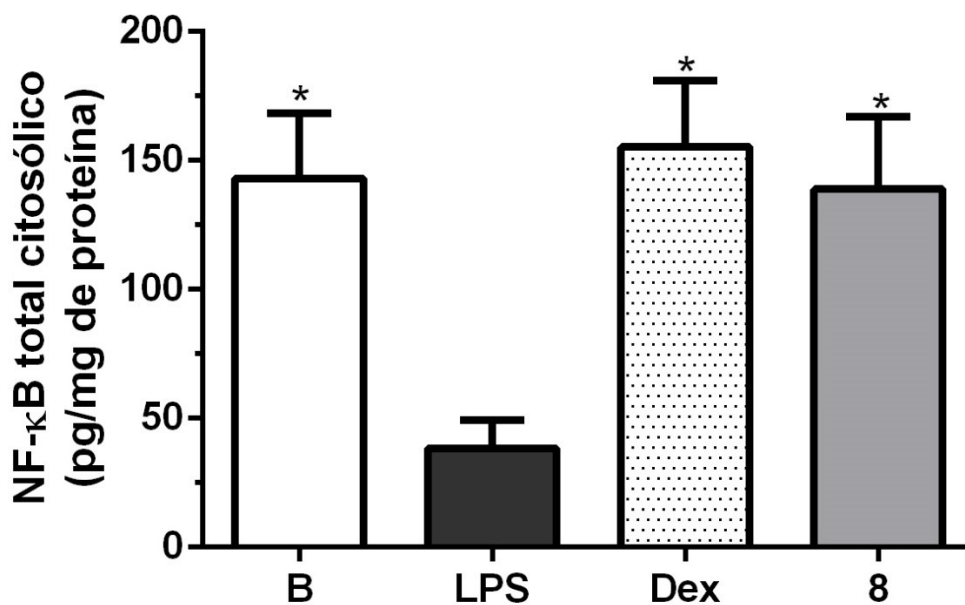


Efeito dos imidazóis sintéticos administrados 30 minutos antes do desafio dos camundongos com carragenina (1%) sobre a secreção de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) na cavidade pleural. S: (controle branco, animal saudável), animais pré-tratados com veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com salina; Cg: (controle negativo, animal inflamado), animais pré-tratados com veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%; Dex: (controle positivo, animal com tratamento padrão), animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%; 8: (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com imidazol 8 (10 mg/kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da indução da pleurisia com Cg 1%. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo. ### < 0,001 comparado ao grupo S; *** p < 0,001 comparado ao grupo Cg.

2.4.5. IMIDAZOL 8 INIBIU A TRANSMIGRAÇÃO DE P65 PARA O NÚCLEO EM MACRÓFAGOS J774 ESTIMULADOS COM LPS

Finalmente, após a confirmação de que o imidazol 8 possui importante efeito anti-inflamatório *in vivo*, realizou-se um ensaio para avaliar se estes efeitos observados poderiam estar ligados de alguma forma com a inibição da ativação do NF- κ B. Neste contexto, o imidazol 8 demonstrou significativo efeito sobre a translocação do p65 para o núcleo celular. Essa afirmação é baseada na habilidade deste imidazol em manter altas concentrações da subunidade p65 no citoplasma celular quando comparado ao controle negativo (% inibição - $69,9 \pm 6,1$) ($p < 0,05$). A dexametasona, o grupo controle positivo, também inibiu significativamente o a translocação do NF- κ B ($p < 0,05$) (**Figura 8**).

Figura 8. Efeito do imidazol 8 sobre o NF- κ B citosólico em macrófagos estimulados com LPS.



Efeito do imidazol 8 administrados 1 hora antes do estímulo dos macrófagos J774 com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) sobre a concentração da fração citosólica da subunidade p65 total do NF- κ B. B: macrófagos pré-tratados com veículo e estimulados com PBS; LPS: macrófagos pré-tratados com veículo e estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$); Dex: macrófagos pré-tratados com dexametasona ($10 \mu\text{M}$) e estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$); 8: macrófagos pré-tratados com imidazol 8 (CC_{10}) predeterminada e estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/mL}$). Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. $N = 3/\text{grupo}$. * $p < 0,05$ comparado com o grupo LPS.

2.5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, o objetivo central foi verificar se os compostos imidazólicos inéditos sintetizados pelo laboratório MESOlab do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina possuem alguma atividade anti-inflamatória, a exemplo de outros compostos imidazólicos usados na clínica hoje em dia (GOLDUST et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Com este objetivo, utilizou-se como triagem um modelo inflamatório com macrófagos J774 estimulados por LPS. Macrófagos J774, descritos pela primeira vez por RALPH; NAKOINZ, (1975), são células de uma linhagem murina estabelecida de um tumor espontâneo desenvolvido em camundongos BALB/c fêmeas, e tem sido utilizados frequentemente para avaliar atividade anti-inflamatória de compostos tanto naturais como sintéticos, devido a sua boa reprodutibilidade e aplicação neste tipo de modelo (JUSTO et al., 2015).

Primeiramente, testou-se a capacidade dos imidazóis em inibir a secreção de óxido nítrico e citocinas pro-inflamatórias em concentrações não citotóxicas, após o estímulo com LPS. Após a triagem inicial da citotoxicidade e efeito anti-inflamatório, cinco imidazóis (**4**, **5**, **6**, **7** e **8**), do total de oito testados, mantiveram perfis aceitáveis para serem testados *in vivo*. Todos os imidazóis que demonstraram atividade *in vitro* são tetra substituídos e possuem em sua estrutura química ao menos um radical fenil. Este resultado corrobora UMARANI et al., (2011), que demonstrou que uma série de imidazóis tetra substituídos possui atividade anti-inflamatória *in vitro*, por meio da inibição de enzimas lisossomais relacionadas com a inflamação em um método de desestabilização de membrana de eritrócitos humanos (UMURANI et al., 2011).

O próximo passo experimental foi analisar se a atividade anti-inflamatória *in vitro* destes cinco imidazóis seria mantida em um modelo *in vivo* de inflamação, no caso, a pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Neste contexto, os experimentos revelaram que somente o imidazol **8** demonstrou efeito significativo inibindo a contagem de leucócitos no lavado da cavidade pleural, e esta redução foi dada devido a inibição principalmente de polimorfonucleares. Embasando esta afirmação, o imidazol sintético SB203580, amplamente utilizado na pesquisa como um inibidor da p38 MAPK, tem a capacidade de diminuir o rolamento, migração transendotelial e quimiotaxia induzida por KC/CXCL1 de neutrófilos (XU; HOSSAIN; LIU, 2013).

Outro parâmetro inflamatório inibido pelo imidazol **8** foi a formação de exsudato. A concentração de exsudato está associada com o aumento na secreção de diversos mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, um fenômeno bem estabelecido no modelo da pleurisia induzida pela carragenina (CUZZOCREA et al., 2001; LUZ et al., 2016). REN et al., (2011) demonstrou que outro imidazol, neste caso um derivado 1-sulfonil substituído, também foi capaz de inibir a exsudação, em um modelo de edema de pata em ratos.

Além disso, os resultados revelaram que o imidazol **8** inibiu a secreção de NO_x paralelamente a formação de exsudato, evidencia que reforça a correlação entre a grande produção de NO_x pela ação da iNOS, comum em condições inflamatórias, e formação de exsudato, observado em nossos experimentos *in vivo* ($r = 0,702$; $p < 0,001$). Grandes quantidades de NO produzido pela iNOS agem no endotélio, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, facilitando o extravasamento proteico e formação de exsudato (DOS REIS et al., 2014; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). A inibição de iNOS por imidazóis não é novidade, já que alguns imidazóis utilizados como antifúngicos hoje em dia tem atividade inibitória comprovada sobre esta enzima (WOLFF et al., 1993).

Após o estímulo inflamatório inicial, o estabelecimento de uma característica inflamatória conhecida como estresse oxidativo começa a exercer influência sobre o sítio da lesão e sistemicamente. Esse fenômeno é responsável pelo desequilíbrio homeostático entre elementos antioxidantes e pró-oxidantes, e como consequência a condição inflamatória pode ser agravada (BISWAS, 2016). Entre estes mediadores, a MPO merece destaque por ser uma enzima que participa no processo fagocítico dos neutrófilos e é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), previamente gerado pela SOD, em ácido hipocloroso (HOCl). Embora a MPO tenha efeito benéfico no que tange a defesa do organismo contra microrganismos, a atividade incessante e desequilibrada desta enzima está intimamente relacionada com dano tecidual, uma consequência do estresse oxidativo (NUSSBAUM et al., 2012; ODOBASIC et al., 2014; WINTERBOURN; KETTLE, 2013). Neste contexto, os resultados demonstraram que o imidazol **8** apresentou capacidade em reduzir a atividade da MPO, fato também observado por SILVA et al., (2013), que constatou que o imidazol natural epiisopiloturina, teve efeito inibitório sobre a atividade da MPO em um modelo murino de edema de pata induzido pela carragenina (SILVA et al., 2013).

A respeito da defesa anti-oxidante, as GSTs são uma família de enzimas desintoxicante que possui papel central na resposta celular ao estresse oxidativo, e sua expressão é fortemente induzida por este fenômeno (DALMARCO et al., 2009; SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2016). Assim como a GST, a SOD e a CAT também merecem destaque. Estas

duas enzimas são conhecidas como “scavenger” de ERO, ou seja, células vão sofrer estresse oxidativo quando a capacidade destas enzimas é superada pelo aumento de produção de espécies reativas. Além disso, a SOD e a CAT podem também ter suas atividades aumentadas em condições inflamatórias agudas (DALMARCO et al., 2009; HALICI et al., 2007; MITTAL et al., 2014). Na sessão de resultados a atividade destas três enzimas foram estimuladas pela injeção da carragenina na cavidade pleural dos camundongos, porém o pré-tratamento dos animais com o imidazol **8** foi capaz de reverter este aumento na atividade. Este efeito é provavelmente consequência da atividade inibitória do imidazol **8** sobre a migração leucocitária, que por sua vez são os principais responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio com intuito de destruir agentes invasores em condições inflamatórias. Indiretamente esta redução de leucócitos no sitio inflamatório diminuiu a necessidade da atividade de enzimas antioxidantes (DALMARCO et al., 2009). Além disso, o desequilíbrio entre a degeneração oxidativa e as defesas antioxidantes resulta na peroxidação das membranas lipídicas, mais uma consequência da exacerbada geração de ERO causada pela inflamação (BISWAS, 2016; THOMAS; WITTING; DRUMMOND, 2008). Os resultados revelaram uma redução na peroxidação lipídica quando camundongos foram pré-tratados com imidazol **8**, outro sinal importante do efeito anti-inflamatório desta molécula, e corroborando os resultados de inibição da migração leucocitária, ativação e redução indireta na atividade das enzimas anti-oxidantes. Na mesma direção, SORRENTI et al., (2006) demonstrou resultados similares quando concentrações de hidroperóxido lipídico foram reduzidos em amostras de plasma humano tratados com derivados de imidazóis sintetizados pelo seu grupo de pesquisa.

As citocinas são pequenas proteínas geradas por diferentes populações celulares e são a chave para comunicação celular durante a inflamação (BECHER; SPATH; GOVERMAN, 2016). Dentre estas moléculas, o TNF- α , a IL-6 e a IL-1 β são as principais responsáveis pela comunicação inicial após do estímulo inflamatório, e a sua inibição são alvo para desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias (NAVARRO-MILLÁN; SINGH; CURTIS, 2012; PAZYAR; FEILY; YAGHOobi, 2012; SCOTT, 2014). Os resultados demonstraram que o imidazol **8** inibiu a secreção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β de forma significativa nos experimentos *in vitro*, e este padrão inibitório foi mantido quando o mesmo imidazol foi testado no modelo inflamatório *in vivo*. Corroborando os achados, em experimentos conduzidos por LAUFER; ZIMMERMANN; RUFF, (2004), foi demonstrado que outros imidazóis sintéticos, também tetra-substituídos, possuem a capacidade de inibir tanto o TNF- α como a IL-1 β em células do sangue total de humanos estimulados com LPS.

Além disso, ZHOU et al., (2010) demonstrou que o imidazol comercial SB203580 tem a habilidade de suprimir o desenvolvimento de endometriose *in vivo*, e este efeito foi atribuído pelos autores à capacidade de diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e fatores proteolíticos deste composto.

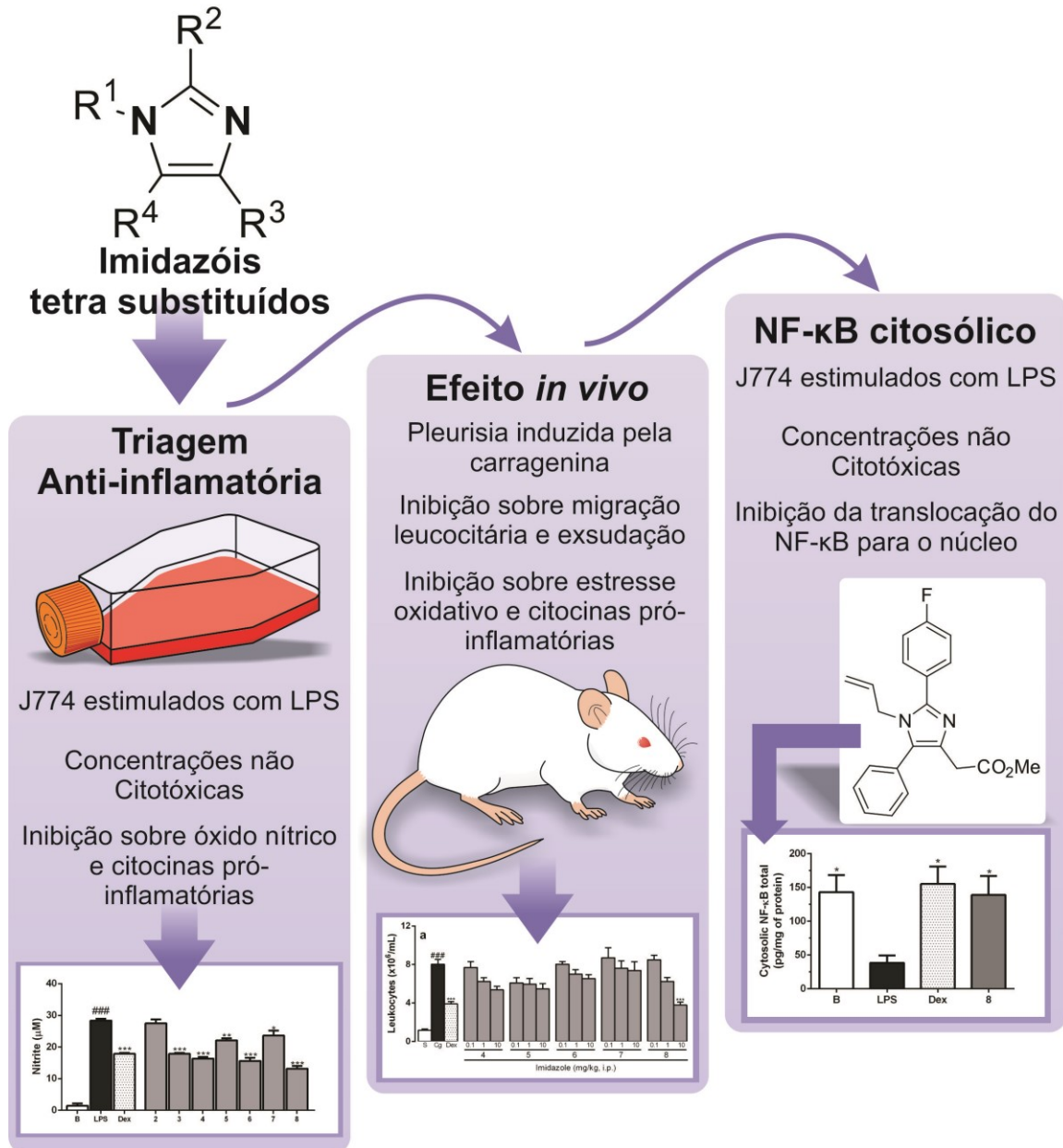
A ativação da via de sinalização do TLR4-NF- κ B pelo LPS é o alvo central de diversos estudos, e está bem elucidado nos dias de hoje por ser o eixo central de processos de resposta inflamatória na imunidade inata. Uma vez ativado pelos LPS, o TLR4 dispara uma resposta intracelular levando a fosforilação e degradação da I κ B e, como consequência, a transmigração do NF- κ B (dímero p65/p50) para o núcleo da célula. No núcleo, este fator de transcrição exerce sua função biológica promovendo a produção de mediadores pró-inflamatórios (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016; LAWRENCE, 2009). Neste sentido, observou-se que macrófagos J774 tratados com o imidazol **8** tiveram concentrações da subunidade p65 no citoplasma celular semelhante a de macrófagos não inflamados, ou macrófagos estimulados com LPS porém tratados com dexametasona, diferente das concentrações observada em macrófagos inflamados e sem tratamento. Com este resultado, pode-se sugerir que o imidazol **8** inibiu a translocação nuclear da subunidade p65, mantendo o NF- κ B inativo no citoplasma celular. Neste sentido, CUSHING et al., (2011) desenhou uma série de quinolona-imidazóis como inibidores do NF- κ B, justamente pela capacidade destes compostos em inibir a translocação do NF- κ B utilizando estudos de relação estrutura atividade, e demonstrando o interesse científico e potencial de moléculas derivadas de imidazóis como inibidores deste fator de transcrição.

2.6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o composto imidazólico **8**, um Fluorofenil-imidazol tetra substituído, possui importante atividade anti-inflamatória tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efeito biológico é, ao menos em parte, causado pela habilidade desta molécula de inibir a translocação para o núcleo da subunidade p65 do NF- κ B, e desta forma, a secreção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores pró-inflamatórios é diminuída. A consequência desta diminuição de citocinas pró-inflamatórias é a inibição da migração leucocitária e a redução significativa do estresse oxidativo. Neste universo, o imidazol **8**

exerce potencial promissor como protótipo para o desenvolvimento de um novo anti-inflamatório.

2.7. RESUMO GRÁFICO



CAPÍTULO 3

3.1. INTRODUÇÃO

Como mencionado no capítulo anterior, a inflamação continua sendo hoje uma das principais responsáveis por problemas relacionados ao congestionamento em clínicas médicas, já que este fenômeno está envolvido em diversos processos patológicos como síndromes metabólicas, condições neurodegenerativas e doenças infecciosas (CATRYSSÉ; VAN LOO, 2017; CHITNIS; WEINER, 2017; POLAT et al., 2017; ZHANG; ZHU; LI, 2017). Quanto mais informações pesquisadores reúnem a respeito de doenças específicas, mais a inflamação parece estar envolvida nestas patologias. Sendo assim, a busca contínua por novos anti-inflamatórios com a intenção de produzir medicamentos eficientes e seguros para doenças específicas é extremamente necessária (BOTZ; BÖLCSKEI; HELYES, 2017; HANKE et al., 2016).

Neste cenário, a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma condição inflamatória caracterizada por hipoxemia aguda e infiltrado celular massivo, com dano alveolar difuso após um determinado estímulo (UMBRELLO et al., 2016). A taxa de mortalidade em pacientes com a forma severa de SDRA é maior que 45%, e pacientes que conseguem sobreviver apresentam grande risco de complicações como depressão, estresse pós traumático e declínio cognitivo (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017). Normalmente a SDRA é dividida em duas fases principais: a fase exsudativa e a fase fibrótica. Na fase exsudativa, que é também a fase inicial desta síndrome, ocorre edema alveolar e infiltração celular composta majoritariamente por neutrófilos e macrófagos. Em condições onde a SDRA é indiretamente desencadeada por um processo infeccioso, como na sepse, a ativação dos TLR4 pelo LPS presente na membrana celular de bactérias gram negativas dispara uma resposta intracelular nas células pulmonares residentes que resulta na ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e MAPKs, como a p38. Por este motivo, citocinas pró-inflamatórias, enzimas e outros mediadores são gerados, ativados e secretados (CAPELOZZI et al., 2017; FANG et al., 2017). Embora diversas abordagens farmacológicas vem sendo pesquisadas e desenvolvidas para SDRA nos últimos anos, até o momento não houve sucesso neste sentido com um fármaco que apresente tanto segurança quanto eficácia (BOYLE; SWEENEY; MCAULEY, 2013; THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017).

Imidazóis são conhecidos pelos seus efeitos biológicos múltiplos nos mais variados sistemas experimentais. Existem hoje disponíveis no mercado uma série de moléculas derivadas de imidazóis utilizados por médicos no mundo inteiro para tratar doenças como câncer, infecções fúngicas e hipertensão. Além disso, estas moléculas polivalentes estão

sendo utilizadas como base para o desenvolvimento de fármacos visando doenças onde o processo inflamatório é o protagonista (ZHANG et al., 2014). No primeiro capítulo desta tese uma série de imidazóis tetra-substituídos foram triados *in vitro*, em macrófagos J774 estimulados com LPS, e *in vivo* em modelo inflamatório murino da pleurisia induzida pela carragenina. Os resultados demonstram que desta série, o Fluorofenil-imidazol (imidazol **8**) foi capaz de inibir com significância todos os parâmetros inflamatórios testados, e este efeito foi atribuído pelo menos em parte a capacidade desta molécula de inibir a translocação do NF- κ B para o núcleo após estímulo (NASCIMENTO et al., 2018).

Neste capítulo a hipótese central é que este mesmo Fluorofenil-imidazol seria capaz de manter sua atividade anti-inflamatória *in vivo* em um modelo de lesão aguda pulmonar induzida por LPS, condições experimentais estas que mimetizam os mediadores expressos na SDRA. Além disso, a influência da fosforilação do NF- κ B e da p38 MAPK também foram investigados. Finalmente, o Fluorofenil-imidazol foi testado em modelo de toxicidade oral aguda, de acordo com o protocolo da OECD nº 423, para determinar a segurança preliminar desta molécula.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória do Fluorofenil-imidazol *in vivo*, em modelo murino de lesão aguda pulmonar induzida por LPS, e avaliar sua toxicidade oral aguda de acordo com protocolo da OECD nº 423.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade do Fluorofenil-imidazol de inibir a migração leucocitária e exsudação no lavado broncoalveolar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS;
- Avaliar a capacidade do Fluorofenil-imidazol em inibir a atividade da mieloperoxidase (MPO) no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS;

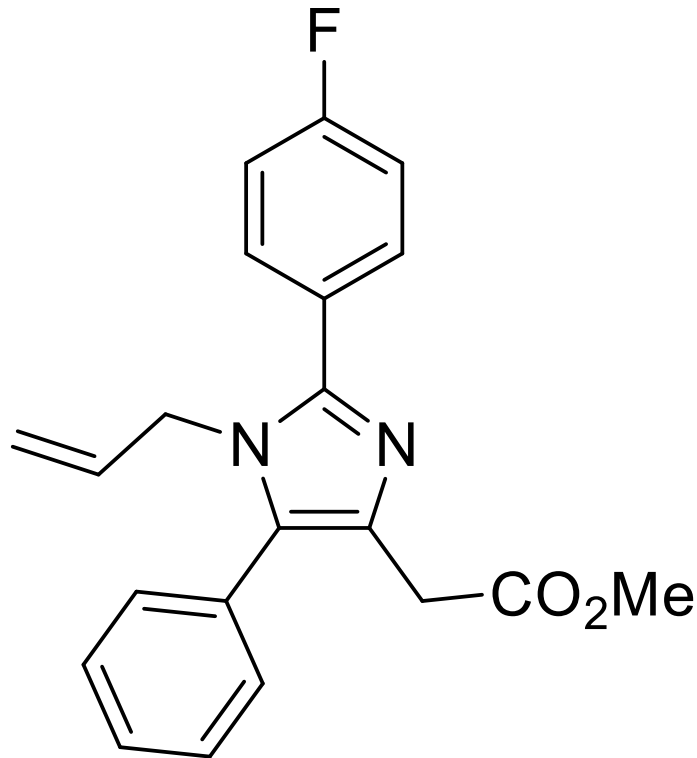
- Avaliar a capacidade do Fluorofenil-imidazol em inibir a secreção de metabólitos do óxido nítrico (NO_x) no lavado broncoalveolar e tecido pulmonar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS;
- Avaliar a capacidade do Fluorofenil-imidazol em inibir a secreção das citocinas IL-10, IL-17, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-6 no lavado broncoalveolar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS;
- Avaliar o efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a arquitetura pulmonar em camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS;
- Avaliar o efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a fosforilação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e da p38 MAPK no tecido pulmonar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS;
- Avaliar a toxicidade oral aguda do Fluorofenil-imidazol em protocolo sugerido pela OECD n° 423, avaliando mortalidade, ganho de peso, relação peso órgão, e hemograma.

3.3. METODOS

3.3.1. SÍNTESE DO FLUOROFENIL-IMIDAZOL

O Fluorofenil-imidazol (1-alil-2-(4-fluorofenil)-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila) (pureza > 99%) utilizados no presente trabalho foi sintetizado e fornecido pela química Thais Rossa, orientada pelo professor Doutor Marcus Mandolesi Sá, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (ROSSA et al., 2018) (**Figura 9**). O sal foi dissolvido em uma solução de salina estéril (0,9% NaCl) e dimetilsulfóxido 1% (DMSO) para uma concentração de 2,5 mg/mL como solução para estoque. Esta solução foi alíquotada e armazenada em freezer $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento dos experimentos, quando foi dissolvida em salina estéril para concentração adequada.

Figura 9. Estrutura química do Fluorofenil-imidazol



Estrutura química do Fluorofenil-imidazol (1-aliil-2-(4-fluorofenil)-5-fenil-1H-imidazol-4-acetato de metila).

3.3.2. ANIMAIS

Os experimentos de inflamação e toxicologia foram conduzidos utilizando camundongos albinos Swiss machos com 6 semanas de vida pesando 25-30 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram ambientados por ao menos 1 semana antes dos protocolos experimentais em instalações próprias no Laboratório de Pesquisa em Imunologia (LAPI/UFSC) com ciclos de luz alternados (12/12 horas), temperatura controlada $20 \pm 2^\circ \text{C}$ e acesso livre a ração e água tratada. Os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob protocolo nº 6118110417 e nº 6363260718.

3.3.3. PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E EUTANÁSIA

Para os procedimentos que requeriam anestesia os animais foram anestesiados com uma solução de 0,05 mL de xilazina (15 mg/kg) e quetamina (75 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Após a administração dos agentes anestésicos aguardou-se pelo menos

10 minutos para aprofundamento da anestesia antes de serem aplicados os protocolos necessários.

Para eutanásia os animais foram anestesiados com a dose anestésica de xilasina e quetamina e, após devido aprofundamento da anestesia, receberam uma overdose (2 x dose anestésica i.p.) destes mesmos anestésicos por via submandibular (intravenosa, i.v.). Após o tempo médio de 5 minutos, os animais já haviam sofrido parada cardiorrespiratória causada pela overdose de anestésico.

3.3.4. LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS E DESENHO EXPERIMENTAL

O dano pulmonar que ocorre na SDRA foi experimentalmente reproduzido nos camundongos através de uma instilação intranasal de LPS (5 mg/kg) dissolvido em salina estéril, conforme descrito por SZARKA et al., (1997) com modificações. Em síntese, no dia dos experimentos os animais foram randomizados e separados em diferentes grupos (n = 6 animais/grupo) e tratados de acordo com seu grupo 1 hora antes da indução da lesão pulmonar (pré-tratamento). Os grupos consistiam de: a) **controle branco** (animais saudáveis), animais pré-tratados com veículo (1% DMSO) por via oral; b) **controle negativo** (animais inflamados), animais também pré-tratados com veículo (1% DMSO) por via oral; c) **controle positivo** (animais com tratamento padronizado), animais pré-tratados com dexametasona 5 mg/kg por via oral; d) **grupos experimentais** (animais tratados com Fluorofenil-imidazol), animais pré-tratados com Fluorofenil-imidazol 3, 10 ou 30 mg/kg por via oral. As doses estabelecidas de imidazóis foram baseadas em resultados obtidos nos experimentos realizados na etapa de triagem do estudo (Capítulo 1) (NASCIMENTO et al., 2018).

Após 1 hora do tratamento adequado para cada grupo, os animais foram anestesiados e receberam LPS intranasal 5 mg/kg (instilado 0,025 mL em cada narina), exceto o grupo controle branco, que recebeu salina estéril por via intranasal. Os animais foram observados e mantidos em posição de decúbito dorsal com inclinação de 45° até que se recuperassem do protocolo anestésico.

Após 12 horas da instilação do LPS, os animais sofreram morte indolor assistida através de uma overdose de xilasina e quetamina, e o lavado broncoalveolar (LBA) e tecido pulmonar foram coletados. O LBA foi coletado através de uma incisão na traqueia e canulação dos pulmões utilizando um cateter 22G. Os pulmões foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS estéril contendo 1% de citrato de sódio. Em seguida, as amostras de LBA e tecido

pulmonar foram aliqüotadas em micro tubos, a contagem celular foi realizada e, na sequência, as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C para análises seguintes.

3.3.5. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS E DIFERENCIAL

A contagem de leucócitos totais foi realizada utilizando câmara de Neubauer, diluindo as amostras em solução de Türk. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas, as quais foram submetidas a coloração pela técnica de May-Grünwald-Giemsa e a contagem feita em microscópio ótico comum (x1000). A contagem total e diferencial de leucócitos foram expressas em células x 10⁵/mL.

3.3.6. DETERMINAÇÃO DA EXSUDAÇÃO

Para quantificação de proteínas no exsudato utilizou-se a técnica de LOWRY et al., (1951). Em síntese, pipetou-se 5 µl de amostra do LBA dos animais em uma placa de ELISA (96 poços) e foi adicionado 95 µl de água destilada. Na sequência, 100 µl de reagente de Lowry (25% de CTC: carbonato de sódio: Na₂CO₃ - 10%, sulfato de cobre: CuSO₄ 0,1%, tartarato duplo Na/K 0,2%; 25% de SDS a 10%; 20% de NaOH 0,8 N e 30% de água destilada) foi adicionado. Após a incubação de 10 minutos a temperatura ambiente adicionou-se 50 µl de reagente de Folin (40% de Reativo de Folin 1 N, 20% de Reativo de Folin 2 N e 40% água destilada), e estas amostras foram incubadas por 30 minutos. Finalmente, as amostras foram lidas em leitora de microplacas em comprimento de onda de 620 nm (Organon, Tckninca, Roseland, Nova Jersey, USA). Paralelamente utilizou-se diferentes concentrações de albumina para obter-se uma curva-padrão (0-40 mg/mL). Os resultados foram expressos em µg/mL.

3.3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

Os ensaios para determinação da atividade da MPO foram realizados de acordo com BRADLEY et al., (1982). Após a coleta LBA e tecido pulmonar (homogenato), processamento (congelamento e descongelamento, e vortéx) e centrifugação com solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5%) (40000 x g por 15 minutos a 4° C)

(Sorvall™ ST 40, Thermo Scientific®, Swedesboro, NJ, EUA), o sobrenadante (20 µl) foi coletado e imediatamente submetido a determinação da atividade da MPO. Com este objetivo, os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços onde foi adicionado 180 µl de solução de reação (0,167 mg/mL de o-dianisidina, 2 HCl e 0,0005% de H₂O₂). Após incubação de 15 minutos à 37° C, a reação enzimática foi interrompida com adição de 30 µl de azida sódica (NaN₃, 1%). Finalmente, as placas foram lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Technica, Roseland, Nova Jersey, EUA) ajustada para comprimento de onda de 450 nm. Uma curva padrão com atividades conhecidas da MPO (0,7-140 um/ml) teve sua densidade ótica determinada, permitindo desta forma a quantificação dos valores desconhecido. Os resultados obtidos foram expressos em mUI/mL para o LBA e mUI/mg por miligrama de proteína para o tecido pulmonar.

3.3.8. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO IN VIVO (NO_x)

As concentrações de NO foram indiretamente determinadas através da formação de seus metabólitos: nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻). Para tal, a metodologia de Griess foi empregada (GREEN et al., 1982). As amostras de LBA e tecido pulmonar (homogenato) foram desproteinizadas no dia dos experimentos com uma solução de sulfato de zinco (ZnSO₄, 20%). As amostras foram então incubadas em banho de gelo por 1 h, e foi então adicionado 6 µl de solução de hidróxido de sódio (NaOH, 2,5 N). Na sequência, as amostras foram centrifugadas (300 x g por 15 minutos) obtendo-se um sobrenadante límpido. Dando continuidade, 100 µl dos sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio e diluídos em solução contendo 100 µl de solução saturada de cloreto de vanádio (VCl₃, 0,8%) e ácido clorídrico (HCl, 3%). Nestes mesmos tubos foram adicionados 100 µl de solução de Griess (composição: sulfonamida (C₆H₈N₂O₂S, 1%) ácido fosfórico (H₃PO₄, 5%) e N-(1-naftil) etilenodiamina (C₁₂H₁₆Cl₂N₂, 0,1%)) e esta mistura foi incubada por 40 minutos a 37° C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). A reação de nitrito com este reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio de leitura das densidades óticas em uma placa de 96 poços, lidas em uma leitora de microplacas (Organon, Technica, Roseland, Nova Jersey, EUA) no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito (0-150 µM) também tiveram as densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato através de regressão linear. Os

resultados obtidos foram expressos em μM de nitrito/nitrato para o LBA e $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína para o tecido pulmonar.

3.3.9. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10

As concentrações das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10 no LBA foram determinadas através da técnica de citometria de fluxo (BD Biosciences FACSVerse flow cytometer®, San Jose, California, EUA) utilizando kit comercial (Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 kit®, San Jose, California, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Os dados foram analisados através de software FCAP Array® software e os resultados foram expressos em pg/mL.

3.3.10. ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κB E DA p38 MAPK

As amostras de tecido pulmonar foram processadas em tampão de lise celular com intuito de extrair do tecido o conteúdo intracelular (Novex Life Technologies®, Carlsbad, California, EUA). Um kit comercial de ELISA foi utilizado seguindo as recomendações de uso do fabricante para avaliar a relação de fosfo-p65/total-p65 (phospho-NF- κB , Invitrogen by Thermo Fisher®, Waltham, Massachusetts, EUA; NF- κB p65 (total) Novex Life Technologies®, Carlsbad, California, EUA) e fosfo-p38/total-p38 (Phospho-p38 α RD Systems®, Minneapolis, Minnesota, EUA; p38 MAPK (total) Novex Life Technologies®, Carlsbad, California, EUA). A quantidade de proteínas totais foi avaliada utilizando metodologia de Lowry, e as amostras foram ajustadas para 60 μg de proteína por poço na placa de ELISA. Uma leitora de placas de ELISA (Organon Teknika®, Roseland, New Jersey, USA) foi utilizada no comprimento de onda de 450 nm para avaliar os resultados. Os resultados foram expressos em relação de fosfo-p65/total-p65 por miligrama de proteína e relação de fosfo-p38/total-p38 por miligrama de proteína.

3.3.11. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os pulmões dos camundongos foram retirados 12 horas após o desafio com LPS, lavados em PBS, e fixados em solução de formalina 10% (v/v) por 48 horas. Os tecidos foram desidratados em uma série de soluções com concentrações crescentes de etanol seguido de

xileno, e na sequência incluídos em parafina e cortados em secções de 3 µm (LEICA-Instruments® CM3050, Nussloch, Baden-Württemberg, Alemanha). Em seguida, as secções foram coradas com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia (200x). A classificação de dano pulmonar foi realizada de acordo com LIU et al., (2014), levando em consideração o grau de distorção do parênquima do tecido alveolar. O sistema de *score* utilizado foi: 0) normal, 1) espessura aumentada em < 50% do septo interalveolar; 2) espessura aumentada em > 50% do septo interalveolar; 3) espessura aumentada em < 50% do septo interalveolar e presença de neutrófilos dentro do espaço alveolar; 4) infiltração consolidada de neutrófilos com distorção da arquitetura alveolar. A média do score foi reportada para cada campo da microscopia.

3.3.12. TOXICIDADE ORAL AGUDA – OECD N° 423

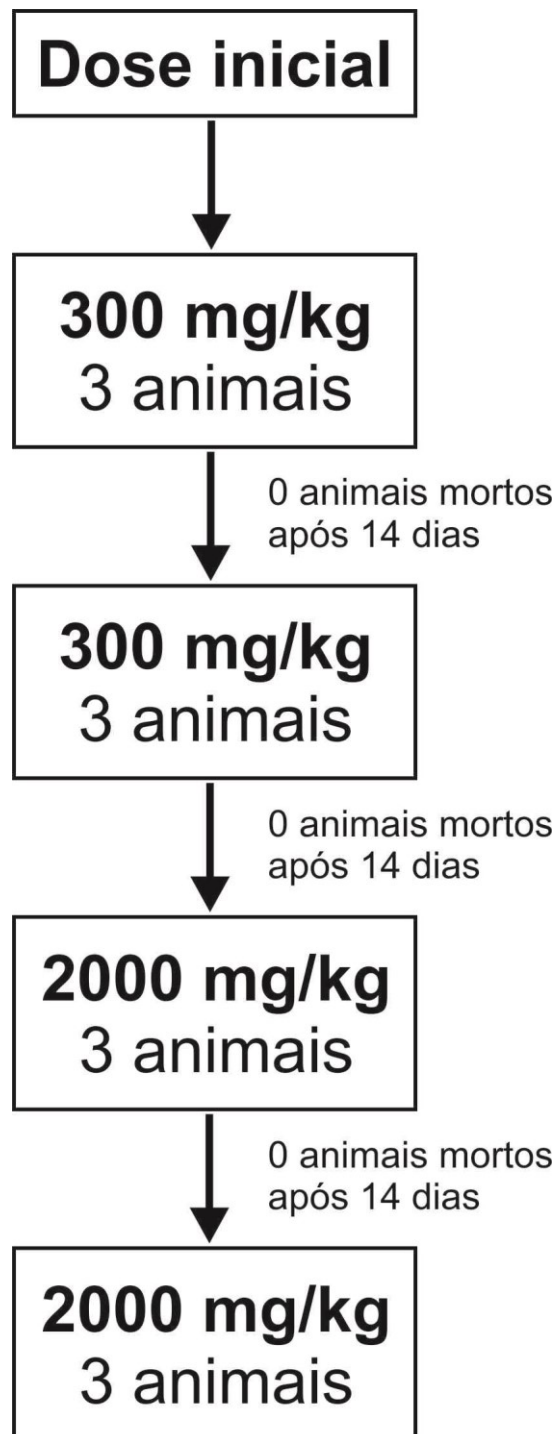
O teste de toxicidade oral aguda foi conduzido de acordo com o protocolo n° 423 da OECD para teste de substâncias químicas (OECD, 2002). Embora a OECD sugira o uso de fêmeas para este protocolo devido a uma ligeira maior sensibilidade para avaliações toxicológicas deste sexo, como os experimentos de inflamação foram todos conduzidos em camundongos machos deu-se preferência para testar a toxicidade oral aguda em machos para dar continuidade a lógica metodológica.

O número mínimo de animais foi utilizado em cada passo, como sugerido pelo procedimento em etapas do protocolo. Devido ao fato do Fluorfenil-imidazol ser uma molécula inédita e não haver dados preliminares a respeito de sua toxicidade, a OECD n° 423 sugere que os experimentos iniciem com a dose de 300 mg/kg. Em cada passo, os animais foram observados quanto a apresentação de sinais clínicos de toxicidade e mortalidade durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas (especialmente nas primeiras 4 horas), e todo dia uma vez ao dia até o fim dos 14 dias do protocolo experimental. No dia 14, os animais sofreram morte indolor assistida com uma overdose de xilazina e quetamina e foram submetidos a um exame patológico das vísceras a procura de sinais de toxicidade. Amostras de sangue também foram coletadas momentos antes da eutanásia para análise do hemograma dos animais.

O Fluorfenil-imidazol na dose de 300 mg/kg foi utilizado como dose de início (n = 3). Como nenhum sinal de toxicidade foi apresentado em nenhum dos animais, o segundo grupo (n = 3) recebeu a mesma dose, e novamente nenhum sinal de toxicidade foi apresentado. O terceiro grupo (n = 3) recebeu a dose de 2000 mg/kg do Fluorfenil-imidazol,

como sugerido pelo protocolo, e nenhum animal apresentou sinais de toxicidade também nesta dose. Finalmente, o último grupo recebeu a dose de 2000 mg/kg e nenhum sinal foi percebido (**Figura 10**). Paralelamente, um grupo de animais recebeu o veículo do Fluorofenilimidazol para ser avaliado como grupo controle.

Figura 10. Fluxograma utilizado para protocolo OECD nº 423



Fonte: elaborado pelo autor.

3.3.13. PARAMETROS HEMATOLÓGICOS

As amostras de sangue dos animais foram coletadas no dia 14, momentos antes da eutanásia, e EDTA 0.5 M foi utilizado como anticoagulante (Synth®, Diadema, São Paulo, Brasil). Os parâmetros hematológicos foram analisados imediatamente após a coleta das amostras utilizando um contador de células automatizado veterinário ajustado para parâmetros de camundongos (Mindray®, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os parâmetros analisados foram: leucócitos totais (Leu), linfócitos (Linf), monócitos (Mon), granulócitos (Gran), eritrócitos (Eri), hemoglobina (HGB), hematócrito (HTC), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM), amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW).

3.3.14. ANALISE DOS DADOS

Para as análises dos dados os softwares Excel 2013, SPSS 22 e Graphpad Prism 5.0 foram utilizados. Resultados experimentais paramétricos foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os resíduos dos dados foram analisados para sua normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk, e a homocedasticidade através do teste de Bartlett. Para dados paramétricos e homocedásticos utilizamos ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Tukey. Dados paramétricos heterocedásticos foram analisados através de ANOVA-Welch seguido do teste post-hoc de Games-Howell. Resultados com valores de p inferior a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

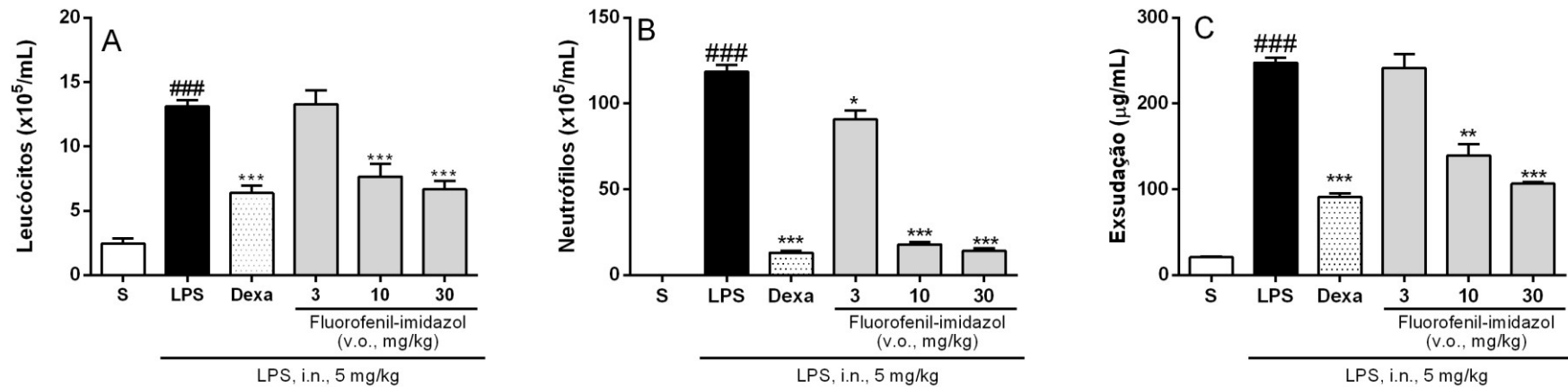
3.4. RESULTADOS

3.4.1. FLUOROFENIL-IMIDAZOL SUPRIMIU A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E EXSUDAÇÃO PARA OS PULMÕES DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

Os resultados demonstram que o Fluorofenil-imidazol foi capaz de inibir com significância o influxo de leucócitos para os pulmões de camundongos desafiados com LPS nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $41,5 \pm 7,6$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $49,2 \pm 5,1$) ($p < 0,001$) (**Figura 11A**). Este efeito é ainda mais claro quando somente a população de neutrófilos é analisada, já que estes leucócitos foram inibidos nas doses de 3 mg/kg (% inibição: $41,5 \pm 7,6$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $49,2 \pm 5,1$) ($p < 0,001$) (**Figura 11B**).

inibição: $23,3 \pm 4,3$) ($p < 0,05$), 10 mg/kg (% inibição: $84,9 \pm 1,1$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $87,9 \pm 1,2$) ($p < 0,001$) (**Figura 11B**). Em relação a exsudação, o Fluorofenilimidazol inibiu significativamente este parâmetro inflamatório nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $43,7 \pm 5,2$) ($p < 0,01$) e 30 mg/kg (% inibição: $56,9 \pm 0,9$) ($p < 0,001$) (**Figura 11C**). O controle positivo usado nestas análises, a dexametasona na dose de 5 mg/kg, inibiu tanto leucócitos totais como neutrófilos e a exsudação com significância ($p < 0,001$) (**Figura 11A, B e C**).

Figura 11. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a migração de leucócitos e exsudação no lavado bronco alveolar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS



Efeito do Fluorofenil-imidazol administrado 1 hora antes do desafio dos camundongos com LPS instilado intranasal (5 mg/kg) sobre a migração de Leucócitos totais (A), Neutrófilos (B) e Exsudação (C) no lavado broncoalveolar. S: (controle branco, animal saudável), animais pré-tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação de salina estéril por via intranasal; LPS: (controle negativo, animal inflamado), animais pré-tratados com veículo por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal; Dexa: (controle positivo, animal com tratamento padrão), animais pré-tratados com dexametasona (5 mg/kg) por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal; Fluorofenil-imidazol: (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com Fluorofenil-imidazol (3, 10 e 30 mg/kg) por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo. ### < 0,001 comparado ao grupo S; *p < 0,05, p < 0,01 e *** p < 0,001 comparado ao grupo LPS.

3.4.2. FLUOROFENIL-IMIDAZOL INIBIU A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E SECREÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO LBA E TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

Somado aos resultados do Fluorofenil-imidazol sobre a migração leucocitária e exsudação, este imidazol tetra substituído inibiu a atividade da enzima MPO presente no LBA nas doses de 3 mg/kg (% inibição: $21,4 \pm 3,9$) ($p < 0,05$), 10 mg/kg (% inibição: $65,9 \pm 2,8$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $67,4 \pm 4,2$) ($p < 0,001$). Este mesmo efeito ocorreu no tecido pulmonar dos animais nas doses de 3 mg/kg (% inibição: $28,6 \pm 5,6$) ($p < 0,001$), 10 mg/kg (% inibição: $51,3 \pm 4,9$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $60 \pm 2,1$) ($p < 0,001$). A secreção de NO_x também foi significativamente diminuída no LBA dos camundongos que sofreram desafio com LPS intranasal nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $50 \pm 6,3$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $65,3 \pm 4,9$) ($p < 0,001$), e este efeito seguiu o mesmo padrão inibitório no tecido pulmonar, com inibição significativa nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $41,5 \pm 7,8$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $48,7 \pm 3,5$) ($p < 0,001$) (**Tabela 3**).

Como esperado, a dexametasona na dose de 5 mg/kg inibiu de forma significativa a atividade da MPO e secreção de NO tanto no LBA como no tecido pulmonar ($p < 0,001$) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a mieloperoxidase (MPO) e metabólitos do óxido nítrico (NO_x) no LBA e tecido pulmonar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS

Grupo (tratamento)	Parâmetro			
	MPO no LBA (mUI/mL)	MPO no tecido pulmonar (mUI/mg de proteína)	NO _x no LBA (µM)	NO _x no tecido pulmonar (µM/mg de proteína)
S (veículo)	2,39 ± 0,76	6,40 ± 0,79	14,90 ± 1,98	26,92 ± 5,04
LPS (veículo)	146,79 ± 5,92	202,38 ± 4,77	76,07 ± 2,17	96,26 ± 4,91
Dexa (5 mg/kg)	49,74 ± 3,42 ***	64,12 ± 4,26 ***	29,29 ± 3,23 ***	50,41 ± 3,19 ***
FI (3 mg/kg)	115,35 ± 5,81 **	144,48 ± 11,28 ***	78,76 ± 1,92	97,20 ± 6,10
FI (10 mg/kg)	49,97 ± 4,12 ***	98,57 ± 9,96 ***	38,03 ± 4,77 ***	56,33 ± 7,55 ***
FI (30 mg/kg)	47,82 ± 6,26 ***	80,95 ± 4,37 ***	26,40 ± 3,78 ***	49,37 ± 3,35 ***

S: (animais saudáveis), animais tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com salina estéril; LPS: (animais inflamados), animais tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com LPS (5 mg/kg) em salina estéril; Dexa: (animais com tratamento padrão), animais tratados com dexametasona 5 mg/kg por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com LPS (5 mg/kg) em salina estéril; FI: (animais com tratamento experimental), animais tratados com Fluorofenil-imidazol 3, 10 ou 30 mg/kg mg/kg por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com LPS (5 mg/kg) em salina estéril. Cada grupo representa a média ± erro padrão da média; n = 5-6/grupo. **p < 0,01 e ***p < 0,001.

3.4.3. FLUOROFENIL-IMIDAZOL DIMINUIU A SECREÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO LBA DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

O Fluorofenil-imidazol foi capaz de reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias no LBA de animais que sofreram a lesão aguda induzida por LPS. A secreção de TNF- α foi reduzida significativamente somente na dose de 30 mg/kg (% inibição: $61,1 \pm 5,3$) ($p < 0,001$). Diferente do TNF- α , a IL-6 foi reduzida de forma significativa nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $71,7 \pm 6,3$) ($p < 0,001$) e 30 mg/kg (% inibição: $76,6 \pm 4,3$) ($p < 0,001$). O mesmo padrão inibitório foi observado na IL-17, que foi inibida de forma significativa nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $55,7 \pm 10,2$) ($p < 0,01$) e 30 mg/kg (% inibição: $74,7 \pm 4,5$) ($p < 0,001$). O mesmo ocorreu com IFN γ , que foi reduzido significativamente pelo pré-tratamento com Fluorofenil-imidazol em ambas as doses, a de 10 mg/kg (% inibição: $24,2 \pm 5,1$) ($p < 0,05$) e 30 mg/kg (% inibição: $53,4 \pm 6,1$) ($p < 0,001$). Embora uma visível tendência de declínio nas concentrações de IL-10 tenha sido notada no LBA de animais pré-tratados com Fluorofenil-imidazol, nenhuma diferença estatística foi detectada na análise de dados desta citocina ($p > 0,05$) (**Tabela 4**).

O tratamento padrão, dexametasona 5 mg/kg, foi capaz de inibir a secreção de todas as citocinas analisadas ($p < 0,05$) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a secreção de IL-10, IL-17, TNF- α , IFN γ e IL-6 no LBA de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS

Grupo (tratamento)	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-17 (pg/mL)	IFNγ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
S	1,61 \pm 0,44	0,46 \pm 0,07	3,95 \pm 0,96	0,19 \pm 0,06	29,12 \pm 4,23
LPS (5 mg/kg)	3691,00 \pm 268,34	3063,85 \pm 275,82	22,83 \pm 1,57	1782,00 \pm 126,58	136,98 \pm 16,48
Dexa (5 mg/kg)	957,60 \pm 178,45 ***	182,64 \pm 128,31 ***	5,55 \pm 1,70 ***	147,00 \pm 13,25 ***	72,63 \pm 6,80 *
FI (3 mg/kg)	3917,20 \pm 343,35	2254,14 \pm 215,86	23,85 \pm 2,69	1830,00 \pm 84,15	120,86 \pm 11,52
FI (10 mg/kg)	2778,60 \pm 354,74	866,75 \pm 192,17 ***	10,11 \pm 2,34 **	1350,00 \pm 90,41 *	114,74 \pm 13,25
FI (30 mg/kg)	1435,20 \pm 195,38 ***	718,07 \pm 133,13 ***	5,78 \pm 1,03 ***	830,60 \pm 109,63 ***	92,57 \pm 9,36

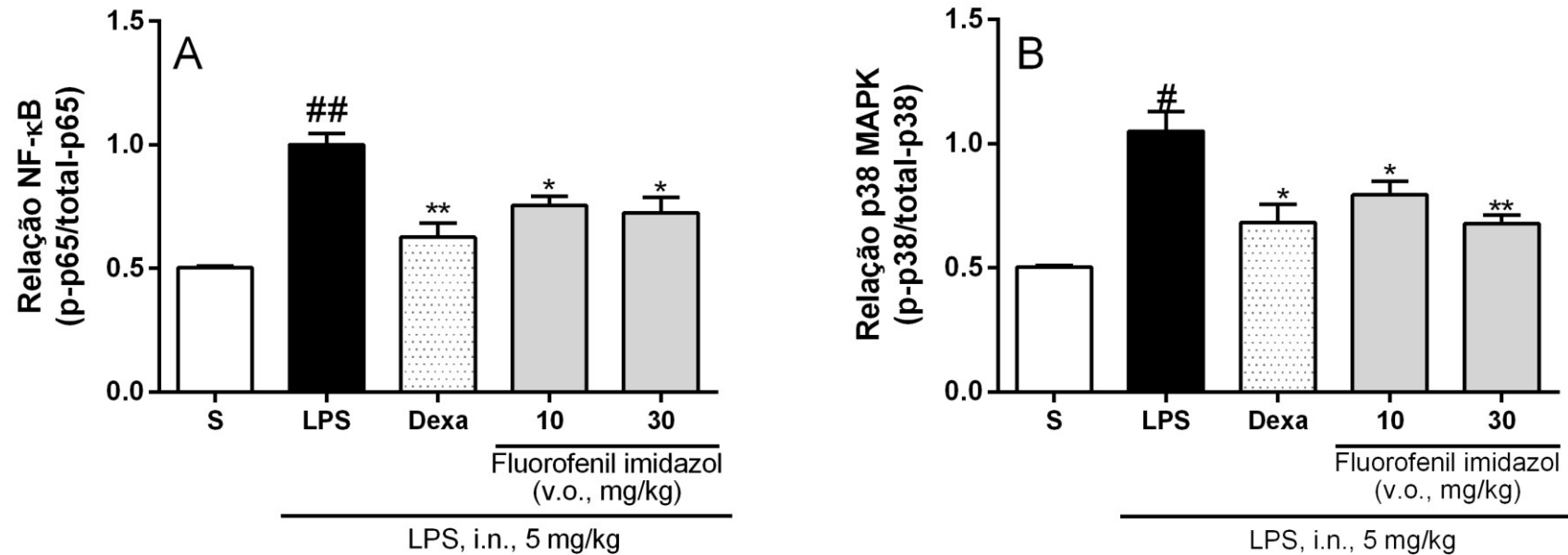
S: (animais saudáveis), animais tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com salina estéril; LPS: (animais inflamados), animais tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com LPS (5 mg/kg) em salina estéril; Dexa: (animais com tratamento padrão), animais tratados com dexametasona 5 mg/kg por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com LPS (5 mg/kg) em salina estéril; FI: (animais com tratamento experimental), animais tratados com Fluorofenil-imidazol 3, 10 ou 30 mg/kg mg/kg por via oral 1 hora antes da instilação intranasal com LPS (5 mg/kg) em salina estéril. Cada grupo representa a média \pm erro padrão da média; n = 5-6/grupo. **p < 0,01 e ***p < 0,001.

3.4.4. FLUOROFENIL-IMIDAZOL INIBIU A FOSFORILAÇÃO DA SUBUNIDADE p65 DO NF- κ B E DA p38 MAPK NO TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

Em relação as vias de sinalização intracelulares, o Fluorofenil-imidazol reduziu a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B no tecido pulmonar dos camundongos, quando comparados ao controle negativo, nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $24,6 \pm 3,8$) ($p < 0,05$) e 30 mg/kg (% inibição: $27,5 \pm 6,3$) ($p < 0,05$) (**Figura 12A**). O mesmo perfil inibitório ocorreu em relação a p38 MAPK, a qual foi inibida nas doses de 10mg/kg (% inibição: $20,6 \pm 5,4$) ($p < 0,05$) e 30 mg/kg (% inibição: $32,2 \pm 3,5$) ($p < 0,05$) (**Figura 12B**). Esta inibição ocorreu no conteúdo total da célula, ou seja, tanto no citoplasma quanto no núcleo, uma vez que todo conteúdo celular foi extraído ao se obter o homogenato pulmonar.

O controle positivo, dexametasona 5 mg/kg, inibiu significativamente a fosforilação tanto da subunidade p65 do NF- κ B como de p38 MAPK ($p < 0,05$) (**Figura 12A e B**).

Figura 12. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B e da p38 MAPK no tecido pulmonar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS

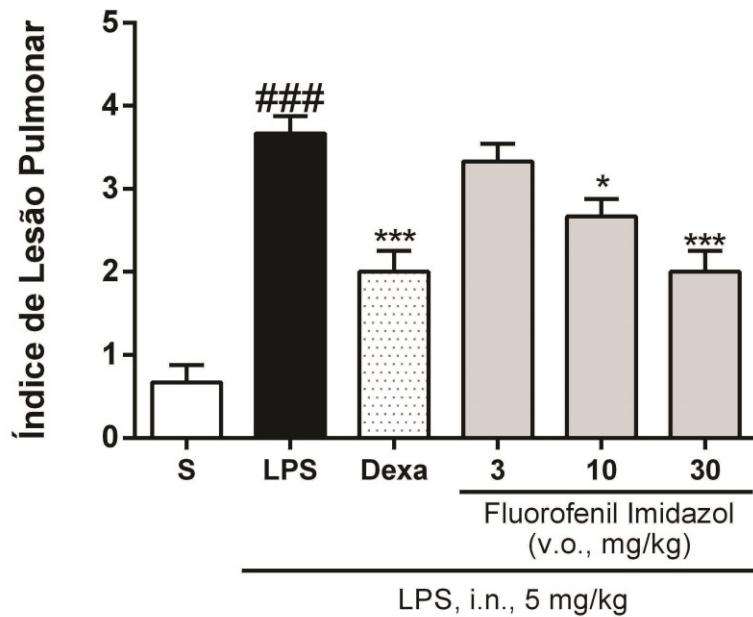
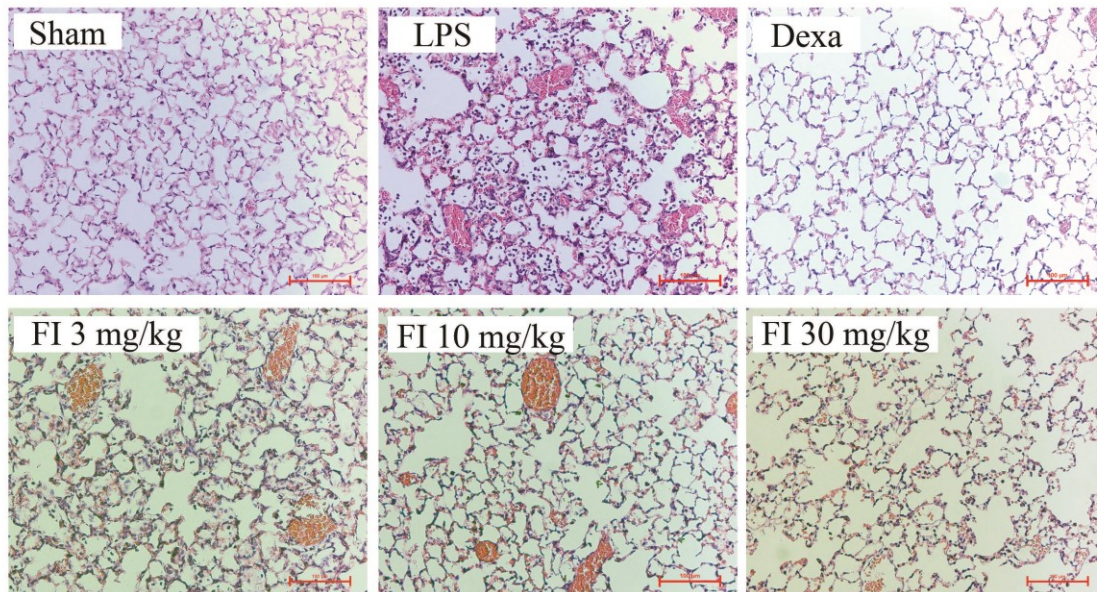


Efeito do Fluorofenil-imidazol administrado 1 hora antes do desafio dos camundongos com LPS instilado intranasal (5 mg/kg) sobre a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B (A) e da p38 MAPK (B) no tecido pulmonar. S: (controle branco, animal saudável), animais pré-tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação de salina estéril por via intranasal; LPS: (controle negativo, animal inflamado), animais pré-tratados com veículo por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal; Dexa: (controle positivo, animal com tratamento padrão), animais pré-tratados com dexametasona (5 mg/kg) por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal; Fluorofenil-imidazol: (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com Fluorofenil-imidazol (10 e 30 mg/kg) por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. N = 5-6/grupo. #p < 0,05 e ##p < 0,01 comparado ao grupo S; *p < 0,05 e **p < 0,01 comparado ao grupo LPS.

3.4.5. FLUOROFENIL-IMIDAZOL REDUZIU A PERDA DE ARQUITETURA PULMONAR DE CAMUNDONGOS QUE SOFRERAM LESÃO AGUDA PULMONAR INDUZIDA POR LPS

A indução da lesão aguda pulmonar por LPS causou migração massiva de leucócitos para os alvéolos, com conseqüente perda da arquitetura normal pulmonar. O pré-tratamento com Fluorofenil-imidazol reduziu com significância esse dano pulmonar nas doses de 10 mg/kg (% inibição: $27,3 \pm 6,3$) ($p < 0,05$) e 30 mg/kg (% inibição: $45,5 \pm 7,7$) ($p < 0,001$) (**Figura 13**). A dexametasona na dose de 5 mg/kg também diminuiu com significância o dano pulmonar causado pela instilação de LPS ($p < 0,001$) (**Figura 13**).

Figura 13. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre a arquitetura pulmonar de camundongos que sofreram a lesão aguda pulmonar induzida por LPS



Efeito do Fluorofenil-imidazol administrado 1 hora antes do desafio dos camundongos com LPS instilado intranasal (5 mg/kg) sobre a arquitetura pulmonar. S: (controle branco, animal saudável), animais pré-tratados com veículo por via oral 1 hora antes da instilação de salina estéril por via intranasal; LPS: (controle negativo, animal inflamado), animais pré-tratados com veículo por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal; Dexa: (controle positivo, animal com tratamento padrão), animais pré-tratados com dexametasona (5 mg/kg) por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal; Fluorofenil-imidazol: (animais tratados com imidazóis), animais pré-tratados com Fluorofenil-imidazol (3, 10 e 30 mg/kg) por via oral 1 hora da instilação de LPS 5 mg/kg por via intranasal. Os resultados foram expressos como média ± EPM. N = 5-6/grupo. ###p < 0,001 comparado ao grupo S; *p < 0,05 e ***p < 0,001 comparado ao grupo LPS.

3.4.6. FLUOROFENIL-IMIDAZOL NÃO CAUSA TOXICIDADE ORAL AGUDA

O tratamento oral com Fluorofenil-imidazol não demonstrou sinais de toxicidade em nenhuma das duas doses analisadas (300 mg/kg e 2000 mg/kg) após a administração por via oral. Durante os 14 dias após o tratamento, os animais ganharam peso normalmente, sem nenhuma anormalidade perceptível e sem mudanças significativas quando comparados ao grupo controle. Após a eutanásia, a necropsia não indicou nenhuma anormalidade macroscópica nos órgãos analisados. Além disso, nenhuma mudança significativa foi observada na relação peso/órgão dos animais tratados com Fluorofenil-imidazol comparados ao grupo controle, que recebeu apenas veículo como tratamento (**Tabela 5**). A respeito dos parâmetros hematológicos nenhuma mudança significativa foi apresentada tanto no leucograma como no hemograma (**Tabela 6**).

Tabela 5. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre o peso e relação peso/órgão em camundongos tratados de acordo com protocolo OECD nº 423

Grupo (Tratamento)	Parâmetro							
	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Coração (% m.c.)	Pulmões (% m.c.)	Rim direito (% m.c.)	Rim esquerdo (% m.c.)	Baço (% m.c.)	Fígado (% m.c.)
Controle (veículo)	26,80 ± 0,34	36,78 ± 0,11	0,47 ± 0,01	0,79 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,91 ± 0,02	0,53 ± 0,01	5,66 ± 0,29
FI (300 mg/kg)	27,27 ± 0,21	36,18 ± 0,39	0,43 ± 0,01	0,76 ± 0,01	0,93 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,49 ± 0,02	5,67 ± 0,25
FI (2000 mg/kg)	27,00 ± 0,36	37,75 ± 0,42	0,45 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,96 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,53 ± 0,02	5,96 ± 0,21

Controle: (animais saudáveis), animais tratados com veículo por via oral e observados por 14 dias; FI (300 mg/kg): (animais tratados com Fluorofenil-imidazol), animais tratados com Fluorofenil-imidazol por via oral (300 mg/kg) e observados por 14 dias; FI (2000 mg/kg): (animais tratados com Fluorofenil-imidazol), animais tratados com Fluorofenil-imidazol por via oral (2000 mg/kg) e observados por 14 dias. Cada grupo representa a média ± erro padrão da média; n = 6/grupo.

Tabela 6. Efeito do Fluorofenil-imidazol sobre o hemograma de camundongos tratados de acordo com protocolo OECD nº 423

Grupo (tratamento)	Parâmetro										
	Leu (x 10 ⁹ /L)	Linf (x 10 ⁹ /L)	Mon (x 10 ⁹ /L)	Gran (x 10 ⁹ /L)	Eri (x10 ¹² /L)	HGB (g/L)	HTC (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/L)	RDW (%)
Controle (veículo)	12,08 ± 0,51	9,46 ± 0,28	0,36 ± 0,02	2,26 ± 0,27	7,57 ± 0,27	122,4 ± 4,4	42,58 ± 1,79	56,24 ± 0,39	16,14 ± 0,14	287,4 ± 3,88	12,78 ± 0,42
FI (300 mg/kg)	13,52 ± 0,42	10,33 ± 0,27	0,35 ± 0,02	2,83 ± 0,15	7,02 ± 0,21	120,0 ± 3,1	44,00 ± 1,72	62,55 ± 0,96	17,07 ± 0,39	274,0 ± 8,91	13,12 ± 0,29
FI (2000 mg/kg)	11,48 ± 0,45	8,73 ± 0,52	0,35 ± 0,03	2,40 ± 0,23	7,18 ± 0,32	112,7 ± 5,3	39,53 ± 1,75	55,13 ± 0,47	15,57 ± 0,10	284,3 ± 1,85	12,15 ± 0,23

Controle: (animais saudáveis), animais tratados com veículo por via oral e observados por 14 dias; FI (300 mg/kg): (animais tratados com Fluorofenil-imidazol), animais tratados com Fluorofenil-imidazol por via oral (300 mg/kg) e observados por 14 dias; FI (2000 mg/kg): (animais tratados com Fluorofenil-imidazol), animais tratados com Fluorofenil-imidazol por via oral (2000 mg/kg) e observados por 14 dias. Cada grupo representa a média ± erro padrão da média; n = 6/grupo.

3.5. DISCUSSÃO

Desde a sua primeira caracterização por ASHBAUGH et al., (1967), a SDRA vem sofrendo diversas atualizações, e tem sido foco central da pesquisa de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Não há dúvidas que houve progresso no que tange a abordagem terapêutica e tratamento deste processo inflamatório, entretanto, as taxas de mortalidade ainda continuam muito aquém do desejado pelos profissionais de saúde. Mesmo com todo foco e interesse global no estudo desta síndrome, ainda não há uma terapia farmacológica efetiva, e terapias de suporte ainda são as principais ferramentas que parecem controlar razoavelmente as taxas de mortalidade (FAN; BRODIE; SLUTSKY, 2018; THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017).

A inflamação é uma das principais causas das altas taxas de mortalidade em pacientes com a SDRA. Embora a inflamação seja um fenômeno protetor no contexto de preservação do hospedeiro, a ativação desequilibrada e desarmoniosa deste fenômeno traz consequências trágicas tanto sistemicamente como para o sítio inflamatório. A SDRA é desencadeada por dano direto aos pulmões, como contusões ou aspiração de gases irritantes; ou dano indireto, como no caso de pacientes com sepse, trauma não torácico ou pacientes com grande área do corpo queimada (THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017). Os macrófagos alveolares, uma vez estimulados por um determinado insulto, recrutam neutrófilos e macrófagos circulantes para os pulmões com intuito de erradicar o agente lesivo. O fato é que estes leucócitos que migram para os pulmões fazem parte do conjunto de parâmetros que estimulam a ativação e secreção de uma grande série de mediadores inflamatórios, e nisso incluem-se proteases, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, eicosanoides, fosfolípidios e citocinas, que acabam por desencadear e, em alguns casos, perpetuar a inflamação. A consequência deste microambiente desequilibrado e estressado é a morte de células pulmonares epiteliais do tipo 2, que em condições de homeostasia são responsáveis por manter as funções pulmonares sintetizando e secretando surfactantes e controlando a troca de fluidos pulmonares (HAN; MALLAMPALLI, 2015).

A instilação intranasal de LPS em camundongos causa migração leucocitária massiva para os pulmões, uma característica também observada em pacientes com SDRA. Como descrito no segundo capítulo, o Fluorofenil-imidazol demonstrou efeito anti-inflamatório em um modelo murino de pleurisia induzida pela carragenina (NASCIMENTO et al., 2018). No presente capítulo, o mesmo perfil inibitório sobre os leucócitos foi percebido no LBA e tecido pulmonar dos camundongos, mesmo com a modificação da via de administração, sendo na

primeira parte do trabalho por via intraperitoneal e, no presente capítulo, por via oral. Este fato não foi surpresa, uma vez que a estrutura química do Fluorofenil-imidazol não apresenta nenhuma violação das 5 regras de Linpinski, que são: a molécula não apresentar mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio, não apresentar mais do que 10 aceptores de ligações de hidrogênio, a massa molecular deve ser menor que 500 daltons e o coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) não deve ser superior a 5 (POLLASTRI, 2010).

WILLIAMS; MAIER, (1992) demonstraram que o imidazol comercialmente disponível chamado cetoconazol, tem a capacidade de inibir a produção de leucotrieno B4 e tromboxano B2 por macrófagos alveolares de coelhos após estímulo com endotoxina. O autor sugere que este efeito poderia ser útil para prevenir a SDRA em pacientes com sepse, por diminuir a infiltração neutrofílica nos pulmões. Desde então, o cetoconazol foi testado por THOMPSON, (2000) e não foi capaz de manter sua eficácia demonstrada em testes pré-clínicos nos testes clínicos conduzidos, embora o autor reforce que mesmo não tendo o efeito esperado no contexto da inflamação, o cetoconazol é seguro por não causar efeitos tóxicos em doses muito maiores que as indicadas para terapia convencional. Ainda assim, o interesse em moléculas derivadas de imidazóis com efeito anti-inflamatório que poderiam ser benéficas para pacientes com condições inflamatórias só aumentou na última década (ZHANG et al., 2014). Um exemplo disto é o alcaloide derivado de imidazol epiisopiloturina, que possui atividade anti-inflamatória comprovada por SILVA et al., (2013), e que também demonstrou atividade sobre a migração de granulócitos para o colon de ratos que sofreram colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico, em modelo de doença de Crohn (RODRIGUES DE CARVALHO et al., 2018).

A migração massiva de leucócitos para os pulmões dos camundongos causa outra característica comum da SDRA: o edema pulmonar. Os resultados demonstram que o Fluorofenil-imidazol foi capaz de reduzir o extravasamento de exsudato nos pulmões de camundongos que sofreram desafio com LPS instilado intranasalmente. Este resultado não foi surpresa, uma vez que os neutrófilos são os principais responsáveis pela produção e secreção de mediadores inflamatórios que eventualmente podem romper as barreiras pulmonares, tanto epitelial como endotelial, e podem causar perda da arquitetura pulmonar. Os resultados de tal ruptura é o extravasamento de líquido para os pulmões, e consequente hipóxia com perda de função respiratória. Ademais, GONZALES; LUCAS; VERIN, (2015) demonstrou que a porcentagem de neutrófilos nos pulmões de pacientes está diretamente relacionada com alterações na pressão arterial parcial de O_2 (PaO_2) no edema causado pela SDRA.

Como qualquer outro processo patológico em que os neutrófilos são a principal população de células envolvida, na SDRA a geração de EROs e ERNs por estes leucócitos tem papel importante no efeito deletério causado pela inflamação (KELLNER et al., 2017). A seção de resultados do presente capítulo mostra que animais que sofreram indução da lesão aguda pulmonar e que foram pré-tratados com Fluorofenil-imidazol tiveram a atividade da MPO e secreção de metabólitos de NO diminuídos em ambos o LBA e tecido pulmonar. A MPO é uma enzima presente nos grânulos primários azurófilos de neutrófilos e é responsável pela transformação de peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, que por sua vez tem forte efeito bactericida (WINTERBOURN; KETTLE, 2013). O NO é um gás solúvel que participa em diversos processos fisiológicos e homeostáticos, entretanto, também possui papel protetivo quando leucócitos e células epiteliais secretam esse mediador em grandes concentrações e, principalmente, quando este gás solúvel reage com superóxido para formar peróxinitrito, outra molécula com forte poder bactericida (GHOSH; ERZURUM, 2011). Embora ambos os mediadores sejam importantes na defesa do hospedeiro contra moléculas estranhas, a expressão exagerada de ambos certamente causará danos ao tecido, e consequente perda de função caso o processo não seja devidamente controlado e resolvido (GHOSH; ERZURUM, 2011; ODOBASIC et al., 2014). A redução significativa tanto na MPO como no NO_x descrita nos resultados são presumivelmente uma consequência do poder de inibição do Fluorofenil-imidazol sobre a migração de leucócitos para os pulmões, já que neutrófilos e macrófagos são uma das principais fontes de MPO ativada e também produzem grandes concentrações de NO, e, neste contexto, são diretamente relacionados ao aumento do estresse oxidativo e dano tecidual (HAMIDZADEH et al., 2017; SELDERS et al., 2017).

O processo de sinalização que recruta células do sistema imune para o sítio onde o dano ocorre depende majoritariamente da produção e secreção de pequenas proteínas conhecidas como citocinas. Diferentes estímulos danosos requerem o engajamento de células específicas, e este recrutamento específico é em partes mediado por citocinas distintas (TURNER et al., 2014). A IL-6 e o TNF- α estão diretamente envolvidos com processos inflamatórios agudos. Além disso, ambas as citocinas são biomarcadores para modelos de SDRA experimental e também, em alguns casos, na clínica (CAPELOZZI et al., 2017). Os resultados mostram que o pré-tratamento com Fluorofenil-imidazol diminuiu de forma significativa a secreção destas duas citocinas. Este fato corrobora a diminuição da migração leucocitária para os pulmões dos camundongos, já que o TNF- α é um dos principais fatores ativadores de moléculas de adesão em neutrófilos, e a IL-6 é uma citocina conhecida por otimizar a quimiotaxia nestes mesmo leucócitos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013;

WRIGHT et al., 2014). A concentração de IFN γ também foi diminuída pela ação do Fluorofenil-imidazol. Esta citocina age como um imunomodulador e, como tal, pode ter efeito tanto anti-inflamatório como pró-inflamatório, dependendo da condição específica e contexto em que a é secretada. No contexto da lesão aguda pulmonar, a diminuição da secreção de IFN γ tem como consequência a menor expressão de Fator Tecidual, que por sua vez, quando em concentrações menores em pacientes com SDRA induzida pela sepse, está diretamente relacionado com melhores prognósticos (BASTARACHE et al., 2011; CHU, 2011; XUE et al., 2015). O mesmo ocorre com a IL-17 que também estava com concentrações diminuídas após o tratamento com Fluorofenil-imidazol. Esta citocina é crucial para o recrutamento neutrofilico após lesões infecciosas, pois promove a produção e secreção de quimiocinas como CXCL-8, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11 e CXCL10. Como já explanado, embora a quimiotaxia de neutrófilos seja de extrema importância para proteção do hospedeiro, o custo da migração exagerada e incessante destas células pode ser o dano tecidual. Ainda mais, as altas concentrações de IL-17 são associadas a inflamação alveolar e péssimos prognósticos em pacientes com SDRA (MIKACENIC et al., 2016). A citocina IL-10 foi a única que não sofreu inibição com significância estatística pelo Fluorofenil-imidazol, embora uma tendência para inibição pode ser claramente notada nos resultados. Esta tendência inibitória pode ser causada pela diminuição no recrutamento de leucócitos, já que neutrófilos são produtores significativos de IL-10 durante condições sépticas. Além do mais, a instilação intranasal de LPS no presente modelo causa sepse, uma vez que o LPS alcança a circulação após absorção pulmonar (KASTEN; MUENZER; CALDWELL, 2010).

Fatores de transcrição são controladores de diversos fenômenos biológicos, e a inflamação não é exceção à regra. Uma vez que um PAMP ou DAMP estimula um receptor específico uma cadeia intracelular de fosforilações é disparada, e a orquestra da inflamação começa. Um destes fatores de transcrição, e talvez o mais estudado ainda nos dias de hoje, é o NF- κ B. Assim que a via deste fator é ativada, a fosforilação de proteínas intracelulares leva a degradação da proteína inibitória I κ B, que fica acoplada ao dímero p65/p50 (NF- κ B). Quando o dímero p65/p50 encontra-se livre da I κ B, ele transloca-se para o núcleo da célula, onde começa suas funções biológicas transcrevendo informações para geração, ativação e secreção de mediadores inflamatórios como citocinas e enzimas (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016; LAWRENCE, 2009). No capítulo 2 desta tese, demonstrou-se que o Fluorofenil-imidazol tem a habilidade de inibir a translocação do NF- κ B para o núcleo de macrófagos J774 estimulados com LPS (NASCIMENTO et al., 2018). Os resultados do presente capítulo demonstram que o Fluorofenil-imidazol foi capaz de manter o padrão de resposta inicialmente

demonstrado *in vitro*, agora *in vivo*, em modelo murino de lesão aguda pulmonar induzida por LPS.

A p38 MAPK é uma proteína intracelular que exerce algumas atividades sobre a produção de citocinas e proliferação/sobrevivência celular, e como consequência disto, esta proteína pode ter papel chave no início e desenvolvimento de doenças de cunho inflamatório (FISK et al., 2014; SINGH, 2013). Esta MAPK tem sido alvo de diversos ensaios clínicos, já que em estudos pré-clínicos seus inibidores específicos demonstram resultados promissores em modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (ANAND et al., 2011; FISK et al., 2018; PATNAIK et al., 2016). Somado a isto, grande parte dos inibidores de p38 presentes no mercado hoje em dia são pequenas moléculas derivadas de imidazóis, como a SB202190, SB203580 e PD169316. Os resultados demonstram que o Fluorofenil-imidazol inibiu com significância a fosforilação da p38 MAPK *in vivo*. Estes achados corroboram a tendência mundial de pesquisa de anti-inflamatórios em utilizar compostos imidazólicos, principalmente tri e tetra substituídos, com intuito de inibir a fosforilação e consequente ativação da via de sinalização da p38 MAPK (BRACHT et al., 2010; DE LUCA, 2006; LAUFER et al., 2008; ZHANG et al., 2014).

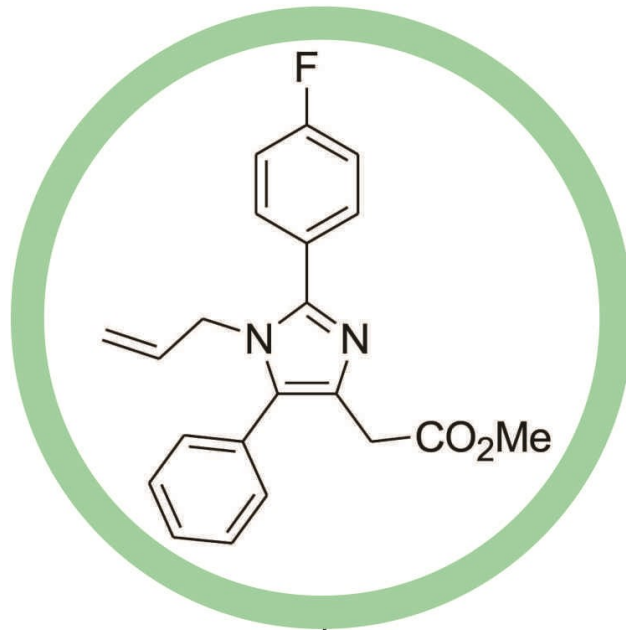
Finalmente, o protocolo da OECD nº 423 para testes de produtos químicos referente a sua toxicidade oral aguda é um método de extrema utilidade para triagem de segurança de novas moléculas com potencial atividade biológica. Os resultados gerados por este protocolo são preliminares no que diz respeito a real segurança do uso de moléculas, mas servem como base para os próximos passos a respeito de toxicidade crônica da molécula em questão (doses repetidas). Somado aos resultados de efeito anti-inflamatório, o Fluorofenil-imidazol não demonstrou nenhum sinal de toxicidade mesmo em doses dez vezes maiores que as utilizadas para os ensaios de inflamação, onde apresentou significativo efeito. De acordo com a OECD nº 423, o Fluorofenil-imidazol é considerado um composto não classificável, pelo GHS, já que nenhum animal morreu e tampouco demonstrou sinais de irritabilidade durante a realização dos protocolos. O GHS considera compostos que não apresentam toxicidade nos testes como não classificáveis pois considera-se que nenhum composto é totalmente isento de doses tóxicas. Além disso, o *cut-off* de LD₅₀ sugerido pelo algoritmo da OECD nº 423 é maior que 5000 mg/kg de peso corporal para os camundongos.

3.6. CONCLUSÃO

O Fluorofenil-imidazol demonstra um importante efeito anti-inflamatório em protocolo específico de doença pulmonar, no caso a lesão aguda pulmonar induzida por LPS, mimetizando o microambiente pulmonar encontrado em pacientes com SDRA induzida por sepse. Este efeito anti-inflamatório é em parte causado pela habilidade deste imidazol tetra substituído de inibir importantes vias de sinalização intracelulares: a via da p38 MPAK e do NF- κ B. A consequência desta inibição é a diminuição na secreção/ativação de mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico e mileoperxodase), levando ao declínio na migração de leucócitos e amortecimento do dano e perda da arquitetura pulmonar. Além disso, esta molécula demonstrou-se segura em testes preliminares de toxicidade oral aguda, muito embora mais estudos no campo da toxicologia sejam necessários para afirmar sua segurança total, como por exemplo teste com doses repetidas.

3.7. RESUMO GRÁFICO

Fluorofenil Imidazol

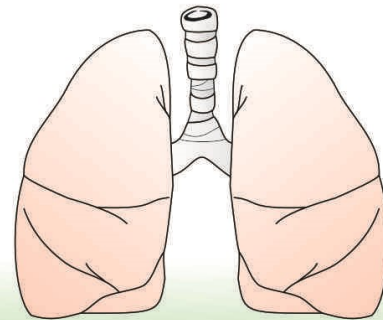


OECD nº 423
Toxicidade Oral Aguda

$LD_{50} > 5000$ mg/kg
GHS: não classificado

Lesão aguda pulmonar induzida por LPS
(instilação intranasal)

Pré-tratamento
oral (1 h)



LBA & Tecido pulmonar

Inibição:

Migração leucocitária
Exsudação
Perda de arquitetura pulmonar
Atividade da MPO
Secreção de NO
Liberação de citocinas
Fosforilação de p38 MAPK e NF-κB

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados nos capítulos 2 e 3 referentes aos testes anti-inflamatórios conduzidos com o Fluorofenil-imidazol (inicialmente denominado imidazol 8) deixam claro que esta molécula tem a capacidade de inibir de forma significativa mediadores de extrema importância para disparo e perpetuação de condições inflamatórias frente a pelo menos dois diferentes agentes flogísticos em dois diferentes modelos: a carragenina em modelo de pleurisia, e o LPS em modelo de lesão aguda pulmonar. Dentre estes mediadores, que foram significativamente inibidos, podemos citar especialmente enzimas envolvidas no estresse oxidativo, citocinas e proteínas intracelulares como o fator de transcrição NF- κ B e a p38 MAPK.

Vale lembrar que os imidazóis são moléculas polivalentes, e que, como tal, podem apresentar um amplo espectro de atividades biológicas. Não são raras as moléculas com efeito anti-inflamatório que também apresentam outros efeitos farmacológicos, como analgésico e antipirético, e neste sentido o Fluorofenil-imidazol talvez possa ser analisado também frente a outros modelos fora do âmbito da inflamação. Recentemente, na Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Bioquímica, um artigo científico foi publicado nesta linha. Quando CASTRO e colaboradores (2016) demonstraram que o Albendazol, outra molécula da classe dos imidazóis utilizado como antiparasitário, demonstrou atividade antitumoral promovendo a fragmentação de DNA e induzindo apoptose de células de linhagem tumoral.

As perspectivas futuras para análise desta molécula no curto prazo são a aplicação de mais testes de segurança, buscando analisar seu perfil tóxico em modelos de doses repetidas, conforme protocolos da OECD n 407 e 408. Embora os resultados de toxicidade oral aguda tenham sido animadores, somente os resultados de doses repetidas (toxicidade crônica) poderão atestar de forma mais sólida a real segurança da molécula em questão.

Em conjunto aos testes de toxicidade, a ideia no futuro no médio e longo prazo é analisar o mecanismo de ação preciso pelo qual o Fluorofenil-imidazol exerce o efeito biológico em questão. Para tal, os estudos serão focados em ferramentas de biologia molecular, buscando elucidar em qual local exato da via do NF- κ B e das MAPKs existe o bloqueio de sinalização inflamatória.

REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary world**, v. 11, n. 5, p. 627–635, 2018.
- ADIB, M. et al. A one-pot, four-component synthesis of N-substituted 2,4-diarylimidazoles. **Synlett**, n. 20, p. 3263–3266, 2009.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M. J.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, abr. 1994.
- AL-AFIFI, N. A. et al. Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 2018.
- ALM, A. S. et al. Variation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in eight strains of mice. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 171, n. 2, p. 157–164, 2010.
- ANAND, P. et al. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor dilmapirod in neuropathic pain following nerve injury. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 10, p. 1040–1048, 2011.
- ARIEL, A. et al. Macrophages in inflammation and its resolution. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 324, 1 nov. 2012.
- ARRUDA-SILVA, F. et al. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF-kappaB activation. **International Immunopharmacol**, v. 19, n. 2, p. 334–341, 2014.
- ASHBAUGH, D. G. et al. Acute respiratory distress in adults. **Lancet**, v. 2, n. 7511, p. 319–323, 1967.
- AYALA, A.; MUNOZ, M. F.; ARGELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.
- BASTARACHE, J. A. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α act synergistically to up-regulate tissue factor in alveolar epithelial cells. **Experimental Lung Research**, v. 37, n. 8, p. 509–517, 2011.
- BECHER, B.; SPATH, S.; GOVERMAN, J. Cytokine networks in neuroinflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 49–59, 2016.
- BHATNAGAR, A.; SHARMA, P. K.; KUMAR, N. A review on “imidazoles”: Their chemistry and pharmacological potentials. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 268–282, 2011.

- BHATTACHARYYA, S. et al. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10-deficient mice. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 397642, 2013.
- BHATTACHARYYA, S.; DUDEJA, P. K.; TOBACMAN, J. K. Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 7–8, p. 973–982, 2008.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 299–305, 1984.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161–178, 2015.
- BOTZ, B.; BÖLCSKEI, K.; HELYES, Z. Challenges to develop novel anti-inflammatory and analgesic drugs. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 2017.
- BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 227, n. 2, p. 534–541, 1983.
- BOYLE, A. J.; SWEENEY, R. M.; MCAULEY, D. F. Pharmacological treatments in ARDS; a state-of-the-art update. **BMC Medicine**, 2013.
- BRACHT, C. et al. Synthesis and biological testing of N-aminoimidazole-based p38 α MAP kinase inhibitors. **ChemMedChem**, v. 5, n. 7, p. 1134–1142, 2010.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149–160, 2008.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618–622, 1982.
- BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315–327, 2014.
- BURNIER, M.; WUERZNER, G. Pharmacokinetic evaluation of losartan. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 7, n. 5, p. 643–649, 2011.
- CAIN, B. S. et al. p38 MAPK inhibition decreases TNF-alpha production and enhances postischemic human myocardial function. **The Journal of surgical research**, v. 83, n. 1, p.

7–12, 1999.

CAPELOZZI, V. L. et al. Molecular and immune biomarkers in acute respiratory distress syndrome a perspective from members of the pulmonary pathology society. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 12, p. 1719–1727, 2017.

CASTRO, L. S. E. P. W. et al. Albendazole as a promising molecule for tumor control. **Redox Biology**, v. 10, p. 90–99, 2016.

CATRY SSE, L.; VAN LOO, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B. **Trends in Cell Biology**, 2017.

CHITNIS, T.; WEINER, H. L. **CNS inflammation and neurodegeneration**. Journal of Clinical Investigation. **Anais...**2017

CHRISTIAN, F.; SMITH, E.; CARMODY, R. The Regulation of NF- κ B Subunits by Phosphorylation. **Cells**, v. 5, n. 1, p. 12, 2016.

CHU, A. J. Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 1–30, 2011.

CONLON, K. C.; MILJKOVIC, M. D.; WALDMANN, T. A. Cytokines in the Treatment of Cancer. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, jun. 2018.

COWBURN, A. S. et al. The survival effect of TNF- α in human neutrophils is mediated via NF- κ B-dependent IL-8 release. **Eur J Immunol**, v. 34, n. 6, p. 1733–1743, 2004.

CUSHING, T. D. et al. A novel series of IKK β inhibitors part I: Initial SAR studies of a HTS hit. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 1, p. 417–422, 2011.

CUZZOCREA, S. et al. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 7, p. 1187–200, 2001.

DALMARCO, E. M. et al. Antioxidant effects of mycophenolate mofetil in a murine pleurisy model. **Transpl. Immunol.**, v. 22, n. 1–2, p. 12–17, 2009.

DAVIES, L. C.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages: Then and now. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 541–548, 2015.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J Clin Biochem Nutr**, v. 48, n. 1, p. 8–19, 2011.

DE JONG, P. R. et al. STAT3 regulates monocyte TNF- α production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

DE LUCA, L. Naturally occurring and synthetic imidazoles: their chemistry and their biological activities. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, n. 1, p. 1–23, 2006.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181–189, 2015.

DONG, W. et al. The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26029–26040, 2006.

DOS REIS, G. O. et al. Croton antisyphiliticus Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 115–126, 2014.

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute respiratory distress syndrome: Advances in diagnosis and treatment. **JAMA**, v. 319, n. 7, p. 698, 2018.

FANG, W. et al. Modulation of mitogen-activated protein kinase attenuates sepsis-induced acute lung injury in acute respiratory distress syndrome rats. **Molecular Medicine Reports**, 2017.

FIELDING, C. A. et al. IL-6 Regulates Neutrophil Trafficking during Acute Inflammation via STAT3. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 3, p. 2189–2195, 2008.

FISK, M. et al. Therapeutic potential of p38 MAP kinase inhibition in the management of cardiovascular disease. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 14, n. 3, p. 155–165, 2014.

FISK, M. et al. The p38 mitogen activated protein kinase inhibitor losmapimod in chronic obstructive pulmonary disease patients with systemic inflammation, stratified by fibrinogen: A randomised double-blind placebo-controlled trial. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, 2018.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, 2012.

FOWLER, F. W. Synthesis and Reactions of 1-Azirines. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 13, n. C, p. 45–76, 1971.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 3, p. 281–6, 2005.

GASTEIGER, G. et al. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. **Journal of Innate Immunity**, 2017.

GHOSH, S.; ERZURUM, S. C. Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 11, p. 1008–1016, 2011.

GOLDUST, M. et al. Clinical study of sertaconazole 2% cream vs. hydrocortisone 1% cream in the treatment of seborrheic dermatitis. **Annals of parasitology**, v. 59, n. 3, p. 119–123, 2013.

GONZALES, J.; LUCAS, R.; VERIN, A. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Mechanisms and Perspective Therapeutic Approaches. **Austin J Vasc Med.**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2015.

GRACIAS, V.; GASIECKI, A. F.; DJURIC, S. W. Synthesis of fused bicyclic imidazoles by sequential van Leusen/ring-closing metathesis reactions. **Organic Letters**, v. 7, n. 15, p. 3183–3186, 2005.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA, E. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. In: **Inflammation and the Microcirculation**. San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HALICI, Z. et al. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. **European Journal of Pharmacology**, v. 566, n. 1–3, p. 215–221, 2007.

HAMIDZADEH, K. et al. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. 1, p. 567–592, 2017.

HAN, S.; MALLAMPALLI, R. K. The Acute Respiratory Distress Syndrome: From Mechanism to Translation. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 3, p. 855–860, 2015.

HANKE, T. et al. Small molecules with anti-inflammatory properties in clinical development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 157, p. 163–187, 2016.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, 2015.

IDRIS, A.; GHAZALI, N. B.; KOH, D. Interleukin 1 β -A Potential Salivary Biomarker for Cancer Progression? **Biomarkers in cancer**, v. 7, n. 7, p. 25–9, 2015.

IMPELLIZZERI, D. et al. Effect of apocynin, a NADPH oxidase inhibitor, on acute lung inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 5, p. 636–648, 2011.

JONSSON, M. et al. Application of OECD Guideline 423 in assessing the acute oral toxicity of moniliformin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 27–32, 2013.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 390, out. 2015.

KASTEN, K. R.; MUENZER, J. T.; CALDWELL, C. C. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 28–31, 2010.

KELLNER, M. et al. ROS signaling in the pathogenesis of Acute Lung Injury (ALI) and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 967p. 105–137.

KILPATRICK, L. E. et al. Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. **J Leukoc Biol**, v. 80, n. 6, p. 1512–1521, 2006.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. e23, 2011.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.

KOPITAR-JERALA, N. The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. **Frontiers in Immunology**, 2017.

LAROCK, C. N.; NIZET, V. Inflammasome/IL-1 β responses to streptococcal pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, 2015.

LAUFER, S. A. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel tri- and tetrasubstituted imidazoles as highly potent and specific ATP-mimetic inhibitors of p38 MAP kinase: Focus on optimized interactions with the enzyme's surface-exposed front region. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4122–4149, 2008.

LAUFER, S. A.; ZIMMERMANN, W.; RUFF, K. J. Tetrasubstituted imidazole inhibitors of cytokine release: Probing substituents in the N-1 position. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 25, p. 6311–6325, 2004.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009a.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **About Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2009b.

LIU, M. W. et al. Effect of salidroside on lung injury by upregulating peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in septic rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 6, p. 1446–1456, 2014.

LO FARO, M. L. et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide**, v. 41, p. 38–47, 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUZ, A. B. G. et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 165–172, 2016.

MANDRIOLI, D.; SILBERGELD, E. K. Evidence from toxicology: The most essential science for prevention. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 1, p. 6–11, 2016.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of

neutrophils. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 181–218, 2014.

MIKACENIC, C. et al. Interleukin-17A Is Associated with Alveolar Inflammation and Poor Outcomes in Acute Respiratory Distress Syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 44, n. 3, p. 496–502, 2016.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001.

MISHRA, R.; GANGULY, S. Imidazole as an anti-epileptic: an overview. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 12, p. 3929–3939, 2012.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, maio 1972.

MITTAL, M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.

MOLINA, P.; TÁRRAGA, A.; OTÓN, F. Imidazole derivatives: A comprehensive survey of their recognition properties. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 1711, 2012.

MUNOZ, J.; JUNIOR, J.; SILVA, F. Radziszewski Reaction: An Elegant, Easy, Simple and Efficient Method to Synthesise Imidazoles. **Current Organic Synthesis**, v. 11, n. 6, p. 824–834, 2014.

NASCIMENTO, M. V. P. S. et al. A Novel Tetrasubstituted Imidazole as a Prototype for the Development of Anti-inflammatory Drugs. **Inflammation**, abr. 2018.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 2010.

NAVARRO-MILLÁN, I.; SINGH, J. A.; CURTIS, J. R. Systematic Review of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis: A New Biologic Agent Targeting the Interleukin-6 Receptor. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 4, 2012.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 3, 2012.

NOWELL, M. A. et al. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 6, p. 3202–9, 2003.

NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: A Leukocyte-Derived Protagonist of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 121003062117006, 2012.

O'NEIL, J. D.; AMMIT, A. J.; CLARK, A. R. MAPK p38 regulates inflammatory gene expression via tristetraprolin: Doing good by stealth. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2018.

ODOBASIC, D. et al. Endogenous myeloperoxidase is a mediator of joint inflammation and damage in experimental arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 4, p. 907–917, 2014.

OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. In: **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. 630. ed. Paris: OECD Publishing, 2002.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 695–708, 2011.

ONG, C. K. S. et al. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clinical Medicine and Research**, v. 5, n. 1, p. 19–34, 2007.

OZAKI, E.; CAMPBELL, M.; DOYLE, S. L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 15–27, 2015.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74, 2011.

PASTUHOV, S. I.; HISAMOTO, N.; MATSUMOTO, K. MAP kinase cascades regulating axon regeneration in *C. elegans*; **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 91, n. 3, p. 63–75, 2015.

PATNAIK, A. et al. A first-in-human phase I study of the oral p38 MAPK inhibitor, ralimetinib (LY2228820 Dimesylate), in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 5, p. 1095–1102, 2016.

PAZYAR, N.; FEILY, A.; YAGHOUBI, R. An overview of interleukin-1 receptor antagonist, anakinra, in the treatment of cutaneous diseases. **Current clinical pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 271–275, 2012.

PEREIRA DOS SANTOS NASCIMENTO, M. V. et al. Inhibition of the NF-κB and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 38, n. 5, p. 344–352, 2016.

POLAT, G. et al. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 49, n. 1, p. 53–58, 2017.

POLLASTRI, M. P. Overview on the rule of five. **Current Protocols in Pharmacology**, 2010.

PROKOPOWICZ, Z. et al. Neutrophil myeloperoxidase: Soldier and statesman. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 60, n. 1, p. 43–54, 2012.

RALPH, P.; NAKOINZ, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. **Nature**, v. 257, n. 5525, p. 393–394, 1975.

RASK-ANDERSEN, M. et al. Advances in kinase targeting: Current clinical use and clinical trials. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2014.

RAUCH, I.; MÜLLER, M.; DECKER, T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. **JAK-STAT**, v. 2, n. 1, p. e23820, 2013.

REN, Y. J. et al. Synthesis and Potent Biological Activity of 1-Sulfonyl Substituted Imidazole and Benzo[d]imidazole Compounds. **Advanced Materials Research**, v. 236–238, p. 2570–2573, 2011.

RICCIARDOLO, F. L. et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 731–765, 2004.

RODRIGUES DE CARVALHO, L. et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenosulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 278–285, 2018.

ROSSA, T. A. et al. Multicomponent Synthesis of Structurally Diverse Imidazoles Featuring Azirines, Amines and Aldehydes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2018, n. 30, p. 4171–4177, 2018.

ROSSI, R. et al. Catalytic Synthesis of 1,2,4,5-Tetrasubstituted 1H-Imidazole Derivatives: State of the Art. **Advanced Synthesis and Catalysis**, 2019.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 3, p. 811–819, 1996.

SAMANEN, J. Similarities and differences in the discovery and use of biopharmaceuticals and small-molecule chemotherapeutics. In: **Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development**. Oxford, UK: Elsevier, 2013. p. 161–203.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, F. J. et al. Detoxifying enzymes at the cross-roads of inflammation, oxidative stress, and drug hypersensitivity: Role of glutathione transferase P1-1 and aldose reductase. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. AUG, 2016.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93–131, 2006.

SCOTT, L. J. **Etanercept: a review of its use in autoimmune inflammatory diseases** *Drugs*, 2014.

SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regenerative Biomaterials**, v. 4, n. 1, p. 55–68, 2017.

SHABGAH, A. G.; FATTAHI, E.; SHAHNEH, F. Z. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, 2014.

SHALINI, K.; SHARMA, P.; KUMAR, N. Imidazole and its biological activities: A review. **Chem. Sin**, v. 1, n. 3, p. 36–47, 2010.

- SILVA, V. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from pilocarpus microphyllus. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1071–1077, 2013.
- SINGH, D. P38 inhibition in COPD; cautious optimism. **Thorax**, v. 68, n. 8, p. 705–706, 2013.
- SIPAHI, E. Y.; ATALAY, F. Experimental Models of Acute Lung Injury. **Eurasian Journal of Pulmonology**, v. 16, p. 69–77, 2014.
- SON, Y.-H. et al. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 71–77, 2008.
- SORRENTI, V. et al. Imidazole derivatives as antioxidants and selective inhibitors of nNOS. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 45–50, 2006.
- STEINMAN, R. A; BRUFISKY, A. M.; OESTERREICH, S. Zoledronic acid effectiveness against breast cancer metastases - a role for estrogen in the microenvironment? **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 5, p. 213, 2012.
- SUBRAMANIAN, S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and autoimmune disease. **Critical reviews in immunology**, v. 32, n. 1, p. 23–63, 2012.
- SUN, S. C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 545–558, 2017.
- SZARKA, R. J. et al. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation. **Journal of Immunological Methods**, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, 2014.
- THOMAS, S. R.; WITTING, P. K.; DRUMMOND, G. R. Redox Control of Endothelial Function and Dysfunction: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 10, p. 1713–1766, 2008.
- THOMPSON, B. T. Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 15, p. 1995–2002, 2000.
- THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 6, p. 562–572, 2017.
- TOUSOULIS, D. et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current vascular pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 4–18, 2012.

TOUSSIROT, E.; WENDLING, D. The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. **Expert Opin Pharmacother**, v. 8, n. 13, p. 2089–2107, 2007.

TRIFUNOVIĆ, J. et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression - A review. **Biochemia Medica**, 2015.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 2014.

UMARANI, N. et al. Exploring the effects of newer three component aminobenzylated reactions of triphenyl imidazole motif as potent antimicrobial and anti-inflammatory agents. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 62–65, 2011.

UMBRELLO, M. et al. Current Concepts of ARDS: A Narrative Review. **International journal of molecular sciences**, 2016.

UNO, S. et al. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 3, p. 596–601, 2007.

VELDHOEN, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. **Nature Immunology**, 2017.

WALSH, K. P.; MILLS, K. H. G. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 11, p. 521–530, 2013.

WEBB, D. R. Animal models of human disease: inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 1, p. 121–130, 2014.

WILLIAMS, J. G.; MAIER, R. V. Ketoconazole inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in acute lung injury (adult respiratory distress syndrome). **Surgery**, v. 112, n. 2, p. 270–277, 1992.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 18, n. 6, p. 642–660, 2013.

WOLFF, D. J. et al. Calmodulin-dependent nitric-oxide synthase. Mechanism of inhibition by imidazole and phenylimidazoles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 13, p. 9425–9429, 1993.

WONGRAKPANICH, S. et al. A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. **Aging and Disease**, v. 9, n. 1, p. 143, 2018.

WRIGHT, H. L. et al. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 53, n. 7, p. 1321–1331, 2014.

XIAO, T. S. Innate immunity and inflammation. **Cellular & molecular immunology**, v. 14, n. 1, p. 1–3, jan. 2017.

XU, N.; HOSSAIN, M.; LIU, L. Pharmacological Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases Affects KC/CXCL1-Induced Intraluminal Crawling, Transendothelial Migration, and Chemotaxis of Neutrophils In Vivo . **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 290565, 4 mar. 2013.

XUE, M. et al. Diagnostic and prognostic utility of tissue factor for severe sepsis and sepsis-induced acute lung injury. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, 2015.

YAN, Z. et al. Rapamycin attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibition of Th17 cell proliferation in mice. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

YANG, Y. et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 352371, 2014.

YOKOTA, T.; WANG, Y. P38 MAP kinases in the heart. **Gene**, 2016.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, 2005a.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005b.

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

ZHANG, L. et al. Comprehensive Review in Current Developments of Imidazole-Based Medicinal Chemistry. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 2, p. 340–437, 2014.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, v. 168, n. 1–2, p. 37–57, 2017.

ZHANG, Q.; ZHU, B.; LI, Y. Resolution of cancer-promoting inflammation: A new approach for anticancer therapy. **Frontiers in Immunology**, 2017.

ZHOU, W. D. et al. SB203580, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, suppresses the development of endometriosis by down-regulating proinflammatory cytokines and proteolytic factors in a mouse model. **Human Reproduction**, v. 25, n. 12, p. 3110–3116, 2010.

ANEXO I – Protocolos do Comitê de Ética no Uso de Animais

Modelo: Pleurisia Induzida pela Carragenina

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00965
Título
Metodologias in vivo utilizadas no laboratório de pesquisa em Imunologia (CCS/UFSC).
Data de Entrada
09/04/2015

Resultado:
Aprovado
Data/Prazo
19/06/2015

Considerações
Ofício nº 46/CEUA/PROPESQ/2015
Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA
Ao(à): Prof(a) Dr(a) Eduardo Monguilhott Dalmarco, Laboratório de Pesquisa em Imunologia

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de cinco mil e duzentos e sessenta e um sessenta camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério central

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 23/09/2019

Data 23/06/2015

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

Modelo: Instilação intranasal de LPS em camundongos



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo instilação intranasal de LPS em camundongos ", protocolada sob o CEUA nº 6118110417, sob a responsabilidade de **Eduardo Monguilhott Dalmarco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 04/08/2017.

We certify that the proposal "Intranasal LPS instillation in mice ", utilizing 534 Heterogenics mice (534 males), protocol number CEUA 6118110417, under the responsibility of **Eduardo Monguilhott Dalmarco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 08/04/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2017](#) a [08/2021](#)

Área: [Ciências da Saúde](#)

Modelo: Toxicidade Aguda Oral (OECD n° 423)



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modelo de Toxicidade Aguda Oral (OECD 423) ", protocolada sob o CEUA nº 6363260718, sob a responsabilidade de **Eduardo Monguilhott Dalmarco e equipe; Eduarda Fraton; Eduarda Mohr; Marcus Vinícius Pereira dos Santos Nascimento; Yeo Jim Moon** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 08/10/2018.

We certify that the proposal "Oral acute toxicity model (OECD 423) ", utilizing 476 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6363260718, under the responsibility of **Eduardo Monguilhott Dalmarco and team; Eduarda Fraton; Eduarda Mohr; Marcus Vinícius Pereira dos Santos Nascimento; Yeo Jim Moon** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 10/08/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2018](#) a [04/2022](#)

Área: [Ciências da Saúde](#)

ANEXO II – Artigos publicados referentes a tese

Revista Inflammation – JCR 2.884

Inflammation, Vol. 41, No. 4, August 2018 (© 2018)
DOI: 10.1007/s10753-018-0782-y



ORIGINAL ARTICLE

A Novel Tetrasubstituted Imidazole as a Prototype for the Development of Anti-inflammatory Drugs

Marcus Vinicius P. S. Nascimento,¹ Antonio C. M. Munhoz,¹ Lais C. Theindl,² Eduarda Talita B. Mohr,¹ Najla Saleh,¹ Eduardo B. Parisotto,³ Thaís A. Rossa,⁴ Ariane Zamoner,³ Tania B. Creczynski-Pasa,⁵ Fabíola B. Filippin-Monteiro,² Marcus M. Sá,⁴ and Eduardo Monguilhott Dalmarco^{2,6}

Abstract— Although inflammation is a biological phenomenon that exists to protect the host against infections and/or related problems, its unceasing activation results in the aggravation of several medical conditions. Imidazoles, whether natural or synthetic, are molecules related to a broad spectrum of biological effects, including anti-inflammatory properties. In this study, we screened eight novel small molecules of the imidazole class synthesized by our research group for their *in vitro* anti-inflammatory activity. The effect of the selected molecules was confirmed in an *in vivo* inflammatory model. We also analyzed whether the effects were caused by inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factor transmigration. Of the eight imidazoles tested, methyl 1-allyl-2-(4-fluorophenyl)-5-phenyl-1*H*-imidazole-4-acetate (**8**) inhibited nitric oxide metabolites and pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6, and IL-1 β) secretion in J774 macrophages stimulated with LPS. It also attenuated leukocyte migration and exudate formation in the pleural cavity of mice challenged with carrageenan. Furthermore, imidazole **8** reverted the oxidative stress pattern triggered by carrageenan in the pleural cavity by diminishing myeloperoxidase, superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase activities and reducing the production of nitric oxide metabolites and thiobarbituric acid-reactive substances. Finally, these effects can be attributed, at least in part, to the ability of this compound to prevent

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10753-018-0782-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

¹ Postgraduation Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil

² Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

³ Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 88040-970, Brazil

⁴ Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, Brazil

⁶ To whom correspondence should be addressed at Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil. E-mail: eduardo.dalmarco@ufsc.br



Original article

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



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

^a Postgraduation program in Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

^b Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

^c Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Turin, Via Nizza 52, 10126, Torino, Italy

^d Department of Clinical Analysis, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Imidazole
Inflammation
In vivo
NF- κ B
p38 MAPK
ARDS

ABSTRACT

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO III – Artigos publicados em parceria durante o período de doutorado

Inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy.

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed US National Library of Medicine National Institutes of Health

Advanced Search Help

Format: Abstract Send to

Immunopharmacol Immunotoxicol. 2016 Oct;38(5):344-52. doi: 10.1080/08923973.2016.1203929. Epub 2016 Jul 6.

Inhibition of the NF- κ B and p38 MAPK pathways by scopoletin reduce the inflammation caused by carrageenan in the mouse model of pleurisy.

Pereira Dos Santos Nascimento MV¹, Arruda-Silva F², Gobbo Luz AB¹, Baratto B¹, Venzke D³, Mendes BG¹, Eröde TS¹, Geraldo Pizzolatti M³, Dalmarco EM^{1,4}.

Author information

Abstract

Natural products have long been used worldwide as therapeutic agents, but it is only recently, in response to the new challenges posed by global population aging, that interest in research into potentially therapeutic natural products has reemerged. In this context, coumarins, chemical compounds found in plants that have known anti-inflammatory activity, are promising candidates for the development of new drugs. In this study we test the effect of scopoletin, a coumarin found in several plant species, on carrageenan-induced inflammation in the mouse model of pleurisy. Initially, the effects of scopoletin on leukocyte migration and exudate concentrations were evaluated at three different doses (0.1, 1 and 5 mg/kg) and time (0.5–4 h before pleurisy). In the next step, we chose the lowest dose capable of inhibiting the inflammatory parameters (1 mg/kg), in order to analyze the myeloperoxidase and adenosine deaminase activities, the nitric oxide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β levels in the fluid leakage, and the p65 subunit of NF- κ B and p38 MAPK phosphorylation. Scopoletin at a dose of 1 mg/kg was able to significantly reduce cell migration and exudation to the pleural fluid ($p < 0.01$). Scopoletin at the same dose also decreased the myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities and nitric oxide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β levels ($p < 0.01$). In addition, it significantly reduced p65 and p38 phosphorylation in the mouse lungs ($p < 0.01$). Our results reinforce that scopoletin has important anti-inflammatory activity, and shows, that this effect can be attributed to the ability of this compound to inhibit the phosphorylation of NF- κ B and p38 MAPK.

KEYWORDS: Airway inflammation; anti-inflammatory; mice; pleurisy; scopoletin

Full text links
View full text

Save items
Add to Favorites

Similar articles
7-prenyloxi-6-methoxycoumarin from *Polygala sabulosa* A.W. | [Inflamm Allergy Drug Targets. ...]
Calea uniflora Less. attenuates the inflammatory response to carrage [Int Immunopharmacol. 2017]
Modulatory effect of *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. in a murine model of pleurisy [J Ethnopharmacol. 2015]
Anti-inflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy [Transpl Immunol. 2006]
Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation [Int Immunopharmacol. 2014]

See reviews...
See all...

The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a urine model of pleurisy

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed US National Library of Medicine National Institutes of Health PubMed Advanced Search Help

Format: Abstract Send to

[Int Immunopharmacol.](#) 2016 Jul;36:165-172. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.027. Epub 2016 May 4.

The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy.

Luz ABG¹, da Silva CHR², Nascimento MVPS³, de Campos Facchin BM⁴, Baratto B⁵, Fróde TS⁶, Requinatto FH⁷, Dalmarco EM⁸.

Author information

Abstract

Ilex paraguariensis is a native plant from Southern America, where it is used as a beverage. In traditional medicine, it is used to treat many diseases including inflammation. However, we do not yet know precisely how this effect occurs. We therefore evaluated its anti-inflammatory effect in a murine model of pleurisy. The standardized CE, BF and ARF fractions, Caf, Rut and CGA were able to reduce leukocyte migration, exudate concentration, MPO and ADA activities and NOx levels. Moreover, *I. paraguariensis* also inhibited the release of Th1/Th17 pro-inflammatory cytokines, while increasing IL-10 production and improving the histological architecture of inflamed lungs. In addition, its major compounds decreased p65 NF- κ B phosphorylation. Based on our results, we can conclude that *I. paraguariensis* exerts its anti-inflammatory action by attenuating the Th1/Th17 polarization in this model. This fact suggests that the use of this plant as a beverage can protect against Th1/Th17 inflammatory diseases.

KEYWORDS: Anti-inflammatory; Carrageenan; *Ilex paraguariensis*; Pleurisy; Th1/Th17 polarization

PMID: 27155392 DOI: [10.1016/j.intimp.2016.04.027](#)

[Indexed for MEDLINE] [Free full text](#)

[f](#) [t](#) [v](#)

Full text links

ELSEVIER
OPEN ACCESS

Save items

☆ Add to Favorites

Similar articles

[Polygala molluginifolia A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation \[Int Immunopharmacol. 2014\]](#)

[Calea uniflora Less. attenuates the inflammatory response to carrage \[Int Immunopharmacol. 2017\]](#)

[Modulatory effect of Senecio brasiliensis \(Spreng\) Less. in a mur \[J Ethnopharmacol. 2015\]](#)

Review Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. [J Ethnopharmacol. 2011]

Review Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on cher [J Food Sci. 2007]

[See reviews...](#)
[See all...](#)

ESI-MS² and Anti-inflammatory Studies of Cyclopropanic triterpenes. UPLC-ESI-MS and MS² Search of Related Metabolites from *Donella ubanguiensis*



Phytochemical
Analysis

[Explore this journal >](#)

Research Article

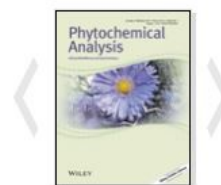
ESI-MS² and Anti-inflammatory Studies of Cyclopropanic Triterpenes. UPLC-ESI-MS and MS² Search of Related Metabolites from *Donella ubanguiensis*

Louis P. Sandjo [✉](#), Marcus V.P. dos Santos Nascimento, Layzon A.L. da Silva, Antonio C.M. Munhoz, Luiz A.E. Pollo, Maique W. Biavatti, Bonaventure T. Ngadjui, Till Opatz, Tania S. Fröde [✉](#)

First published: 14 December 2016 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/pca.2640 [View/save citation](#)

Cited by (CrossRef): 0 articles [↻ Check for updates](#) [⚙ Citation tools ▼](#)




[View issue TOC](#)
Volume 28, Issue 1
January/February 2017
Pages 27–41

Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae)

Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 7 (04), pp. 168-173, April, 2017

Available online at <http://www.japsonline.com>

DOI: 10.7324/JAPS.2017.70425

ISSN 2231-3354 

Phytochemical study and anti-inflammatory effect of *Psychotria stenocalyx* (Rubiaceae)

Gustavo Silva Queiroz¹, Ana Beatriz Gobbo Luz², Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento², Sergio Scherrer Thomasi³, Antonio Gilberto Ferreira⁴, Eduardo Monguilhott Dalmarco², Ines Maria Costa Brighente^{1*}

¹Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil.

²Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil.

³Department of Chemistry, Federal University of Lavras, Lavras – MG, Brazil.

⁴Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, São Carlos – SP, Brazil.

Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits





Food Chemistry

Volume 247, 1 May 2018, Pages 56-65



Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits

Larissa Jeremias Duarte ^{a, 1}, Vitor Clasen Chaves ^{b, 1}, Marcus Vinicius Pereira dos Santos Nascimento ^a, Eunice Calvete ^c, Mingchuan Li ^d, Elisa Ciraolo ^d, Alessandra Ghigo ^d, Emilio Hirsch ^d, Claudia Maria Oliveira Simões ^b, Flávio Henrique Reginatto ^b, Eduardo M. Dalmarco ^a  

 **Show more**

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.015>

[Get rights and content](#)

Cytotoxicity, antiprotozoal, and anti-inflammatory activities of eight curry powders and comparison of their UPLC–ESI-QTOF-MS chemical profiles

Journal of the
**Science of
Food and Agriculture**



Research Article

Cytotoxicity, antiprotozoal, and anti-inflammatory activities of eight curry powders and comparison of their UPLC–ESI-QTOF-MS chemical profiles

Louis P. Sandjo✉, Stephane Zingue, Marcus V. P. dos Santos Nascimento, Milene H. de Moraes, Geison Vicente, Solomon K. S. Amoah, Eduardo M. Dalmarco, Tania S. Frode ... [See all authors](#) ✓

First published: 26 November 2018 | <https://doi.org/10.1002/jsfa.9512>

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/jsfa.9512.

PDF TOOLS SHARE