

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS COMPOSTOS
SINTÉTICOS DA CLASSE DOS NITROESTIRENOS

MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA

MANAUS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS COMPOSTOS
SINTÉTICOS DA CLASSE DOS NITROESTIRENOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula de Araújo Boleti

MANAUS-AM

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586a Silva, Márcia de Jesus Amazonas da
Atividade anti-inflamatória de novos compostos sintéticos da
classe dos nitroestirenos / Márcia de Jesus Amazonas da Silva.
2016
116 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima
Coorientadora: Ana Paula de Araújo Boleti
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Atividade anti-inflamatória. 2. Citotoxicidade. 3. Nitroestirenos.
4. Pleurisia. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE NOVOS
COMPOSTOS SINTÉTICOS DA CLASSE DOS NITROESTIRENOS”

MÁRCIA DE JESUS AMAZONAS DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.




Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Coordenador do PPGCF


Apresentada perante a banca examinadora composta pelos professores:



Prof. Dr. Emerson Silva Lima (UFAM) - Presidente e orientador



Prof.ª Dr.ª Lirlândia Pires de Sousa (UFMG) – Membro externo



Prof.ª Dr.ª Aya Sadahiro (UFAM) - Membro interno

Manaus, 29 de Abril de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação em primeiro lugar a Deus por seu amor misericordioso e fiel. Aos meus pais Selina Amazonas e Manoel de Jesus por suas lutas diárias e trabalho em prol de oferecer a melhor educação na criação de seus filhos. Meu irmão Marcelo de Jesus por toda sua superação e perseverança, aos meus sobrinhos Eva Sophia e Messias Emanuel por me trazerem esperança e alegria todos os dias. E ao meu amor André Chaves por sua amizade, incentivo, companheirismo nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido sabedoria e força todos os dias para seguir em frente. Aos meus pais por seu amor incondicional e por terem me ensinado os valores humanos inestimáveis e generosos que carrego em minha vida. Ao meu irmão por seu companheirismo e dedicação comigo, meus sobrinhos por trazerem tranquilidade ao meu coração. Meu namorado por suas palavras sábias nas horas mais incertas e todo seu apoio.

À Universidade Federal do Amazonas por ter me concedido a oportunidade de cursar o mestrado. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, docentes, discentes, parcerias universitárias UFMG, UNIFAP e UFPA, corpo técnico que contribuíram para o desenvolvimento direto e indiretamente na execução deste projeto.

Ao meu grande mestre e orientador Prof. Dr. Emerson Silva Lima por toda sua paciência, sabedoria e discernimento para dirigir com coerência este trabalho. A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Ana Paula Araújo Boleti por todo seu conhecimento, dedicação, atenção a mim fornecidos.

A agência de financiamento CAPES por ter me concedido bolsa durante esse período para o desenvolvimento e realização deste projeto.

Aos meus colegas de laboratório (Biophar) que estiveram na labuta todos os dias comigo.

Aos meus colegas egressos do mestrado por todas as nossas superações e conquistas.

E aos meus amigos (as) que estiveram comigo na caminhada com todo seu apoio na concretização de mais um sonho.

Meus sinceros agradecimentos.

Honestidade é o primeiro capítulo do

Livro da Sabedoria

(Thomas Jefferson)

RESUMO

A inflamação é um processo fisiológico que se inicia em resposta a uma infecção ou dano aos tecidos. É um mecanismo direcionado ao reparo tecidual após a lesão e consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares que tem como objetivo a remoção de tecidos danificados e a geração de outros novos. Nessa cascata é observado o aumento da permeabilidade microvascular, seguido pela adesão e infiltração de células no local da lesão, apoptose celular e crescimento de novos tecidos e vasos sanguíneos. Os nitroestirenos são um grupo de compostos constituído por anel aromático ligado a uma cadeia do grupo nitro (NO_2). Eles têm sido estudados por apresentar diversas atividades biológicas tais como anti-apoptótica, antiplaquetária e antimicrobiana, entretanto poucas pesquisas têm sido realizadas quanto à atividade anti-inflamatória desses compostos. O objetivo deste estudo foi avaliar atividade anti-inflamatória de quatro novos compostos da classe dos nitroestirenos (NPA, 7B, 7D e 7E) em ensaios *in vitro/in vivo*. Inicialmente, os compostos foram submetidos a ensaio *in vitro* em modelo de macrófagos murino ativados por lipopolissacarídeo (LPS) e fibroblastos de pulmão humano MRC5, a fim de avaliar a capacidade citotóxica desses compostos. Logo em seguida, foram avaliados quanto à inibição de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), dosagem da citocina $\text{TNF-}\alpha$ e avaliação da expressão de proteínas envolvidas com o processo inflamatório. Para avaliar o processo anti-inflamatório agudo *in vivo* foi realizado ensaios de indução do edema por carragenina em peixe Zebrafish e o modelo de pleurisia induzido por LPS em camundongos. Os quatro novos compostos testados apresentaram atividade citotóxica em célula J774A.1 e MRC5 quando testados nas concentrações (3.12-25 $\mu\text{g/mL}$). Para THP-1 a atividade citotóxica foi a partir da concentração 10 $\mu\text{g/mL}$. Todos os compostos inibiram a produção de óxido nítrico em macrófago ativado por LPS, entretanto somente NPA apresentou uma possível concentração-resposta significativa nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Este mesmo composto também reduziu os níveis de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e ERK 1/2 em células THP-1. O NPA também possivelmente inibiu o edema induzido por carragenina em peixe Zebrafish e a migração de leucócitos na cavidade pleural de camundongos através da inibição das vias de sinalização intracelular $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e ERK 1/2 em ensaios *in vivo*. Em conclusão, compostos testados neste estudo não somente apresentaram atividade citotóxica significativa, como também demonstraram um excelente potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo*, provavelmente por atuação de inibição das vias $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e ERK 1/2. Os dados obtidos foram importantes para exploração da atividade biológica destes novos compostos e sua possível aplicação na terapêutica de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: anti-inflamatório, 1-nitro-2-feniletano, citotoxicidade, pleurisia, macrófagos.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological process that begins in response to infection or tissue damage. It is a mechanism focusing on tissue repair after injury and consists of a cascade of cellular and microvascular events that aims to remove damaged tissue and generation of new ones. In this cascade is observed an increasing in microvascular permeability, followed by adhesion and cell infiltration at the site of injury, apoptosis, and growth of new tissue and blood vessels. The nitrostyrene is a group of compounds consisting of an aromatic ring linked to a chain of the nitro group (NO₂). It has been studied by having various biological activities such as anti-apoptotic, anti-platelet or anti-microbial, although few studies have been made for the anti-inflammatory activity of these compounds. The aim of this study was to evaluate anti-inflammatory activity of four new compounds from the class of nitrostyrene (NPA, 7B, 7D and 7E) in *in vitro/in vivo* assays. Initially, the compounds were submitted to *in vitro* testing in a murine macrophages model activated by lipopolysaccharide (LPS) and MRC5 human lung fibroblast in order to assess the cytotoxic potential of such compounds. Shortly thereafter, they were evaluated for inhibition of nitric oxide (NO·), for dosage of the cytokine TNF- α and evaluation of the expression of proteins involved in the inflammatory process. To evaluate the acute inflammatory process *in vivo* was performed edema induction by carrageenan tests on zebrafish model of LPS-induced pleurisy in mice. The four new compounds tested showed cytotoxic activity on J774A.1 and MRC5 cell when tested in the concentrations (3.12-25 μ g/ml). For THP-1 cytotoxic activity was starting concentration of 10 μ g/ml. All compounds inhibited nitric oxide production by macrophages activated by LPS but only the NPA showed a possibly significant concentration-response at the concentrations of 10 and 20 μ g/ml. This same compound also reduced TNF- α , NF- κ B and ERK 1/2 levels in THP-1 cells. The NPA possibly also inhibited the carrageenan-induced edema in Zebrafish fish and leukocyte migration into the pleural cavity of mice by inhibiting the intracellular signaling pathways NF- κ B and ERK 1/2 in *in vivo* assays. In conclusion, compounds tested in this study not only presented significant cytotoxic activity, as also showed an excellent *in vitro/in vivo* anti-inflammatory potential, most likely by acting in the inhibition of NF- κ B and ERK 1/2 pathways. Data were important to explore the biological activity of these novel compounds and their possible application in the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: anti-inflammatory, 1-nitro-2-phenylethene, cytotoxicity, pleurisy, macrophages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo de resposta inflamatória a uma lesão.....	20
Figura 2 -	Ativação das vias de sinalização intracelular induzidas por LPS.....	22
Figura 3 -	Estrutura química de nitroestireno 1-nitro-2-feniletano.....	29
Figura 4 -	Planta <i>Aniba canelilla</i>	30
Figura 5 -	Estrutura química do nitroestireno 1-nitro-2-feniletano.....	30
Figura 6 -	Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios programados para o projeto.....	39
Figura 7 -	Derivação dos nitroestirenos.....	40
Figura 8 -	Plataforma Zebrafish - Laboratório de Pesquisa em Fármaco – Universidade Federal do Amapá.....	51
Figura 9 -	Lâminas histológicas em Zebrafish – coloração H&E.....	53
Figura 10 -	Efeito dos nitroestirenos sobre a viabilidade de macrófago murino J774A.1 exposto a tratamento em diferentes concentrações 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 e 25 µg/mL após 24 horas de tratamento com os nitroestirenos NPA (A), 7B (B), 7D (C), 7E (D) e padrão Doxorrubicina (E).	59
Figura 11 -	Efeito dos nitroestirenos sobre a viabilidade de fibroblastos normal de pulmão humano MRC5 exposto a tratamento em diferentes concentrações 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL após 24 horas de tratamento NPA (A), 7B (B), 7D (C), 7E (D) e padrão Doxorrubicina (E).	61
Figura 12 -	Efeito concentração-resposta do NPA sobre a viabilidade de macrófagos murino J774A.1 em diferentes concentrações 1, 5, 10 e 20 µg/mL.	62
Figura 13 -	Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e tratamento com NPA em diferentes concentrações 1, 5, 10 e 20 µg/mL e dexametasona 20 µg/mL.	62

- Figura 14 -** Células de macrófago murino J774A.1 testadas com o nitroestireno NPA nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e controle negativo DMSO em ensaio colorimétrico de MTT. 63
- Figura 15 -** Ensaio concentração-resposta dos compostos nitroestirenos. A quantificação de nitrito foi mensurada em sobrenadantes de células de macrófagos murino J774A.1 estimulados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS utilizando Reagente de Griess. 64
- Figura 16 -** Análise do efeito concentração-resposta do NPA nas concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na produção de TNF- α utilizando macrófagos humano THP-1 ativados por LPS. 65
- Figura 17 -** Efeito do NPA sobre a expressão do mediador inflamatório iNOS e de moléculas-chaves de vias de sinalização da inflamação p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e p-ERK1/2 no ensaio dose-reposta em células THP-1 ativadas com LPS. 66
- Figura 18 -** Efeito do NPA no edema induzido por carragenina em peixe Zebrafish após 4h de tratamento. Análise foi realizada entre a variação da porcentagem de aumento do edema *versus* análise de composto NPA. 68
- Figura 19 -** Imagens histológicas dos órgãos rins, intestino e fígado de peixe Zebrafish em cortes longitudinais expostos a subsequentes tratamentos com (n=5 peixes/grupo). 69
- Figura 20 -** Efeito do composto nitroestireno NPA em modelo de pleurisia induzida por LPS. 70
- Figura 21 -** Mecanismo de ação do composto nitroestireno NPA 85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Principais atividades farmacológicas dos nitroestirenos abordados na literatura. 32
- Tabela 2** - Parâmetros histológicos utilizados para análise do fígado de Zebrafish exposto ao nitroestireno NPA. 54
- Tabela 3** - Parâmetros histológicos utilizados para análise do rim de Zebrafish exposto ao nitroestireno NPA. 55
- Tabela 4** - Parâmetros histológicos utilizados para análise do intestino de Zebrafish exposto ao nitroestireno NPA. 56
- Tabela 5** - Citotoxicidade (CI_{50}) dos nitroestirenos quando comparados ao fármaco padrão doxorubicina testados em linhagens celulares de macrófago murino J774A.1 e fibroblasto normal de pulmão humano MRC5. 61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
AP-1	Proteína de ativação 1
COXs	Ciclooxigenases
COX-1	Ciclooxigenases 1
COX-2	Ciclooxigenases 2
CO₂	Dióxido de carbono
DPM	Desvio media padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂O	Água destilada
H₃PO₄	Ácido fosfórico
IFN	Interferon
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
iNOS	Síntase induzível de óxido nítrico
JAK	Janus cinase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteína cinase ativada por mitógeno
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NF-κB	Fator nuclear kappa β
NO\cdot	Óxido nítrico
NaNO₃	Nitrato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PGE₂	Prostaglandina E ₂

PLA₂	Fosfalipase A ₂
RNA	Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio
STAT	Transdutoras de sinais e ativadoras da transcricionais
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TLRs	Receptores tipo Toll
α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
μM	Micromolar
°C	Graus Celcius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Inflamação	20
2.1.1 Aspectos gerais	20
2.2 Mediadores do Processo Inflamatório	21
2.3 Compostos semi-sintéticos com atividade anti-inflamatória	28
2.4 Nitroestirenos	29
2.5 Nitroestirenos com propriedades terapêuticas.....	33
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38

3.2	Objetivos Específicos	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Delineamento Experimental	39
4.2	Obtenção das Amostras	40
4.3	Células	41
4.3.1	Ensaio de Viabilidade celular	42
4.3.1.1	Método Alamar blue	42
4.3.1.2	Ensaio de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT)	43
4.3.2	Inibição da ativação de macrófagos	44
4.3.3	Quantificação de nitrito	45
4.3.4	Quantificação da citocina TNF- α	46
4.3.5	Avaliação da expressão e ativação de proteínas por Western blot	46
4.3.5.1	Dosagem de proteínas totais nos lisados celulares	46
4.3.5.2	Western blot para análise da expressão de iNOS e da ativação de vias sinalizadoras intracelulares	47
4.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	48
4.4.1	Animais em estudo	48
4.4.2	Ensaio em peixe zebrafish <i>Danio rerio</i>	48
4.4.3	<i>Danio rerio</i>	49
4.4.4	Manutenção e acondicionamento dos peixes	51
4.4.5	Administração do 1-nitro-2-feniletano NPA	52
4.4.5.1	Indução do edema por carragenina em zebrafish	52

4.4.5.2 Avaliação histopatológica	53
4.4.6 Avaliação do NPA em modelo de pleurisia induzido por LPS	56
4.4.6.1 Contagem total e diferencial de células	56
4.5 Análise Estatística	58
5. RESULTADOS	59
5.1 Avaliação dos nitroestirenos sobre a viabilidade celular	59
5.2 Efeito dos nitroestirenos sobre inibição de óxido nítrico (NO [·])	63
5.3 Efeito do NPA sobre quantificação de TNF- α	65
5.4 Avaliação do NPA sobre expressão de proteínas	66
5.5 Resposta do NPA no ensaio de edema em modelo <i>in vivo</i> utilizando peixe Zebrafish	67
5.6 Avaliação do NPA em modelo de pleurisia induzido por LPS <i>in vivo</i>	70
6. DISCUSSÃO	72
6.1 Avaliação dos nitroestirenos sobre a viabilidade celular	72
6.2 Efeito dos nitroestirenos sobre inibição de óxido nítrico (NO [·])	74
6.3 Efeito do NPA sobre a inibição da produção da citocina TNF- α em macrófago humano THP-1 ativado por LPS	75
6.4 Avaliação do efeito do NPA na fosforilação, ativação da expressão de proteínas envolvidas na inflamação	77
6.5 Efeito do NPA no edema induzido por carragenina em peixe Zebrafish	80
6.6 Avaliação do efeito do NPA em ensaio de migração celular em camundongos	82
6.7 Possível mecanismo de ação do nitroestireno NPA	85

7. CONCLUSÕES	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	115
Certificado Comitê de Ética no Uso de Animais – UNIFAP	115
Certificado Comitê de Ética no Uso de Animais - UFMG	116

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta imunitária essencial que permite a sobrevivência durante a infecção ou lesão e mantém a homeostase dos tecidos sob uma variedade de condições nocivas (MEDZHITOV, 2010). É uma série complexa de acontecimentos celulares e moleculares que estão envolvidos no processo inflamatório incluindo a dilatação de arteríolas, vênulas e capilares, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de fluídos contendo proteínas do plasma, bem como a migração de leucócitos para a área inflamada (LEONG et al., 2014; ZHOU et al., 2007).

A inflamação também pode ser definida como uma resposta normal e essencial a quaisquer estímulos nocivos que ameaça o hospedeiro e podem variar de uma resposta localizada para uma mais generalizada (CHEN et al., 2015). As respostas inflamatórias podem ser excessivas em termos de magnitude e/ou duração e podem, portanto resultar em dor, dano tecidual ou inflamação crônica quando não devidamente resolvido num prazo adequado (DEL-ÁNGEL et al., 2015).

Durante o processo inflamatório células do sistema imunológico (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos) são recrutadas para o local da lesão para iniciar a resposta inflamatória (KUNDU & SURH, 2008). Dentre estas, os macrófagos destacam-se como importantes células efetoras, atuando em linhas de defesa contra a invasão microbiana, reconhecendo e eliminando células tumorais e agressivas (KLIMP et al., 2002; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os nitroestirenos são um grupo de compostos que apresentam como principal característica anel aromático ligado a uma cadeia do grupo nitro (NO₂), sendo reconhecida por ser uma estrutura química essencial neste tipo de composto e um

padrão conformacional para sua atividade biológica (CALHEIROS et al., 2004). Esses nitroestirenos são constantemente retratados por sua capacidade antitumoral, pró-apoptótica, potencial para inibição de proteínas fosfatases, inibidores potentes/seletivos da telomerase humana em células cancerosas além de apresentarem atividade citotóxica, antifúngica e antibacteriana (KAAP et al., 2003; CARTER et al., 2002).

Neste sentido quatro novas estruturas moleculares dos nitroestirenos foram sintetizadas e testadas para diferentes atividades farmacológicas. O estudo teve como objetivo investigar a atividade anti-inflamatória dos nitroestirenos NPA, 7B, 7D e 7E utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*, considerando que há poucos relatos descritos na literatura que mostram a possível atividade anti-inflamatória dos nitroestirenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação

2.1.1 Aspectos gerais

A inflamação é uma resposta natural do organismo a alguns estímulos nocivos, como células danificadas, invasão de patógenos, ação de agentes químicos, físicos, microrganismo, lesão térmica ou mecânica (MEDZHITOV, 2008). Apresenta sinais macroscópicos clássicos que podem ser clinicamente definidos como rubor, calor, edema, dor e perda de função (LAWRENCE & FONG, 2010). É um processo complexo que envolve a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, extravasamento de plasma, em alguns casos ativação de cascatas de coagulação e migração celular principalmente de neutrófilos como ilustrado a Figura 1 (GHOSH et al., 2014; WANG et al., 2013)

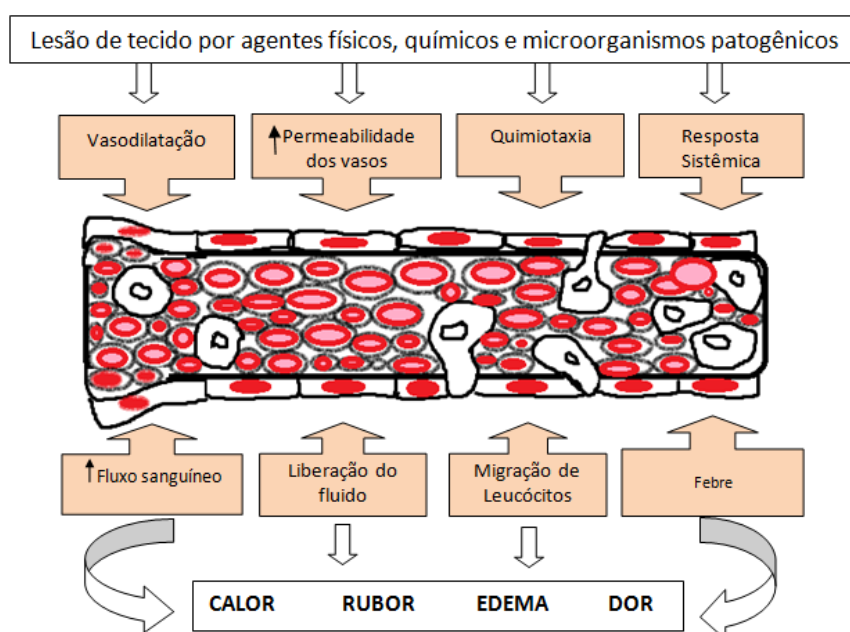


Figura 1 – Modelo de resposta inflamatória a uma lesão

Fonte: Adaptado de Russell Kightley, 2013.

As fases da inflamação podem ser caracterizadas em: aguda e crônica. A resposta inflamatória aguda apresenta eventos de curta duração ocorrendo em horas ou dias com predomínio de neutrófilos, enquanto a resposta crônica se desenvolve em longa duração com predomínio de linfócitos, macrófagos e plasmócitos (NUCCI et al., 2012; CIEMNIECK et al., 2016).

A inflamação aguda pode ser desencadeada por infecção ou lesão do tecido envolvendo componentes sanguíneos (plasma/leucócitos) com produção de inúmeros mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas e produtos de cascata proteolítica (NIU et al., 2015). Em contrapartida, a fase crônica pode seguir-se à inflamação aguda ou iniciar-se insidiosamente como uma resposta de baixo grau e latente, que pode desencadear alguns tipos de patologias crônicas limitantes tais como artrite reumatóide, osteoartrite, fibrose pulmonar, esclerose múltipla, psoríase e aterosclerose (KIM et al., 2013; ALDAWSARI et al., 2016; CHUNG, 2012).

2.2 Mediadores do Processo Inflamatório

O início do processo inflamatório é desencadeado pela interação entre os receptores de superfície celular (também conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões), tais como os receptores semelhantes à Toll (TLR4 ou TLR2) e seus ligantes, e ácido teicóico os quais são derivados de produtos bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS) em macrófagos e outras células do sistema imunológico. Como consequência, mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE₂), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL- β) são produzidos (KIM et al., 2013; YANG; ZHAO; TIAN, 2016).

Esses receptores desempenham um papel fundamental na defesa contra agentes invasores após ligação de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (REN et al., 2015). O receptor TLR4 é um dos mais bem estudados membros da família TLRs que protege o organismo contra infecções bacterianas e regulam a resposta inflamatória. A ativação desses receptores TLRs em macrófagos/monócitos induz numerosas respostas celulares e moleculares (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004). Alterações morfológicas, produção de mediadores inflamatórios, como também aumentos na fagocitose, captação, migração e adesão são as respostas primárias destas células para patógenos exógenos (ROUGERIE et al., 2013).

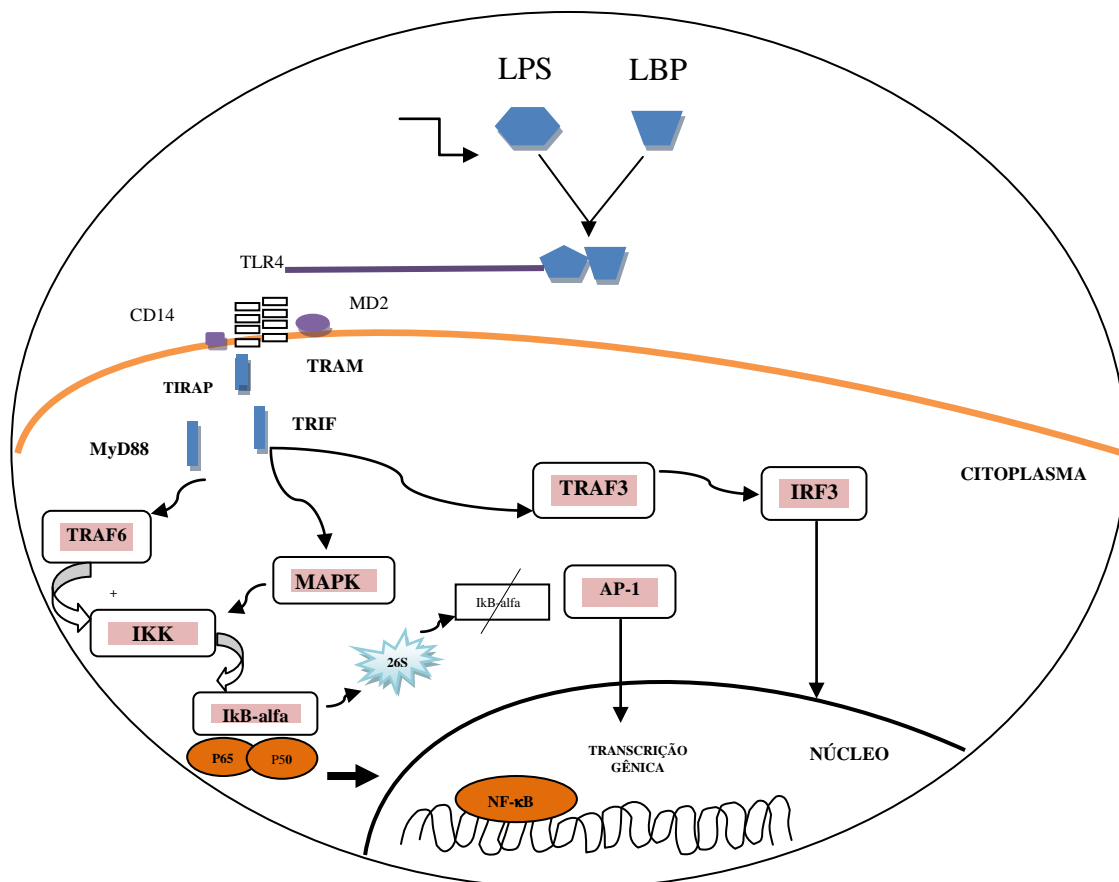


Figura 2 – Ativação das vias de sinalização intracelular induzido por LPS. LBP-proteína ligante de LPS, LPS-lipopolissacarídeo, TLR4-receptor semelhante ao Toll, MD2-proteína mielóide diferenciadora 2, CD4-proteína de membrana, TRIF-ligados a

molécula adaptadora TIR, TRAM-relacionado a molécula adaptadora TRIF, IRF3 – fator regulatório do interferon 3, MAPK-proteína quinase ativada por mitógeno, AP1-proteína ativadora 1, NF- κ B-fator nuclear Kappa B, p65 e p50-dímeros ativadores, IKK-proteína quinase, I κ B α -proteína inibitória Kappa B.

Fonte: Adaptado de Goh et al., 1998.

O lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas. Esta endotoxina desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios como mostra a Figura 2. Liga-se ao receptor Toll-like (TLR4) sendo um importante ativador de macrófagos (JOO et al., 2014; JERALA ROMAN, 2007; WU et al., 2016).

O reconhecimento do LPS é mediado por moléculas como LBP proteína ligante de LPS, do inglês; *Lipopolysaccharide Binding Protein* e a proteína CD14 que pode apresentar-se sob a forma solúvel ou ancorada a membrana celular (CD14s e CD14m, respectivamente) (LU; YEH; OHASHI, 2008). As proteínas LBP, MD-2 e CD14 ligantes do LPS atuam como proteínas auxiliares na sua forma solúvel responsáveis por transferir LPS para o receptor TLR4 e a proteína MD2. Esses eventos são importantes para interação do receptor com agente lesivo e sua eliminação (POLISSI; SPERANDEO, 2014; INDUSMITA ROUSTRAY & SHAKIR ALI, 2016).

Em decorrência à lesão tecidual, uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém uma resposta do hospedeiro projetado para "cura" dos tecidos atingidos (BORGES et al., 2014). Para este fim, envolve a ativação e migração dirigida de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) a partir do sistema venoso para os locais de danos juntamente com os mastócitos teciduais (SEO et al., 2016).

Quando os neutrófilos chegam ao foco de inflamação ficam ativados tanto pelo contato direto com os agentes patogênicos como por ação de citocinas secretadas por células do tecido residente para eliminação do microorganismo invasor, liberando assim

o conteúdo dos seus grânulos tóxicos, os quais incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), proteinase, catepsina G e elastase (SAGNIA et al., 2014; CHENG et al., 2016).

Tendo em vista o desenvolvimento do processo inflamatório, leucócitos e mediadores como a interleucina IL-1 β e o fator de necrose tumoral TNF- α , migram para o local da lesão para iniciar a resposta inflamatória (KIM; HWANG; PARK, 2014). Com isso, efeitos imediatos destes mediadores conduzem a um exsudato local inflamatório com proteínas plasmáticas e leucócitos atravessando vênulas pós-capilares e tecidos extracelulares para o local da inflamação (ODAKA et al., 2015; WANG et al., 2016).

Esses mediadores estão divididos em sete grupos de acordo com suas particularidades e propriedades bioquímicas em peptídeos vasoativos, aminas vasoativas, mediadores lipídicos, citocinas, fragmentos de componentes do complemento, enzimas proteolíticas e quimiocinas (SADEGHI et al., 2014). Mediadores derivados de células como as aminas vasoativas histamina e serotonina são pré-formados e armazenados em grânulos de mastócitos, plaquetas e basófilos circulam no plasma como precursores inativos e são produzidas imediatamente em resposta a estimulação por indutores da inflamação, ambas ocasionam dilatação das arteríolas e aumento a permeabilidade das vênulas (OH et al., 2015).

Quando as células são ativadas por diversos estímulos tais como produtos microbianos e vários mediadores da inflamação, o ácido araquidônico (AA) da membrana celular é rapidamente convertido por enzimas para a produção de prostaglandinas (PGE₂) e leucotrienos (LT) (OYEBANJI et al., 2014). Os mediadores derivados do AA são chamados de *eicosanóides* os quais são sintetizados por duas classes de enzimas tais como ciclooxigenases e lipoxigenases (PARK, 2014).

Segundo Khloya et al., (2015) existem duas formas da enzima ciclooxigenase: ciclooxigenase 1 (COX-1), constitutivamente expressa em vários tipos de células e ciclooxigenase 2 (COX-2), induzida por uma variedade de estímulos, dentre estes os ésteres de forbol, polissacarídeos lipossomais, fatores de crescimento e citocinas; essas enzimas são responsáveis pela produção de prostaglandinas. Já as lipoxigenases são responsáveis pela produção de leucotrienos os quais são quimioatraentes por efeitos vasculares (HUSAIN et al., 2016). Existem três lipoxigenases sendo a via 5-lipoxigenase 5-LOX predominante nos neutrófilos com função de converter o AA a ácido 5-hidroxicicosatetraenoico o qual é quimiotático para neutrófilos e precursor de leucotrienos (ZNATI et al., 2014; VERDAM et al., 2015).

Em consequência da infiltração celular, ocorre a liberação de óxido nítrico $\text{NO}\cdot$ induzida pela óxido nítrico sintase NOS, a qual é considerada uma mediadora e reguladora na patogênese de doenças inflamatórias que envolvem a aterosclerose, diabetes, artrite reumatóide, choque séptico, diabetes, rejeição de transplantes e esclerose múltipla (DZOYEM & ELOFF 2015).

Em virtude da resposta inflamatória, há o aumento da expressão do gene iNOS com a produção excessiva de óxido nítrico $\text{NO}\cdot$ por períodos prolongados, mediante a exposição de macrófagos ao LPS bacteriano (KORHONEN et al., 2005). Assim, essa produção exagerada invade o tecido normal circulante da área afetada juntamente com outros ânions superóxidos $\text{O}_2\cdot^-$, peróxido de hidrogênio H_2O_2 e radical hidroxila $\text{OH}\cdot$, os quais agem como radicais ativos prejudicando assim a função celular normal. Por outro lado o $\text{NO}\cdot$ promove a vasodilatação, reduz a agregação e adesão plaquetária, inibe o recrutamento de leucócitos e adicionalmente comporta-se como inibidor do componente celular das respostas inflamatórias (PÂNZARIU et al., 2016).

A óxido nítrico síntese (NOS) é a enzima responsável pela síntese do NO· e está presente no citosol (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). É sintetizado pelo aminoácido L-arginina numa reação catalítica de enzimas NOS, esta conversão requer nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato NADPH, tetrahidrobiopterina BH₄, flavina adenina dinucleotídeo FAD, flavina mononucleotídeo FMN, grupo heme e oxigênio O₂ como co-fatores (COOKE, 2002).

Existem três diferentes isoformas de NO· caracterizadas: NOS neural (nNOS ou NOS I), constitutiva e expressa em neurônios, cérebro e SNC, SNP é calmodulina dependente; NOS induzível (iNOS ou NOS II) induzida por LPS, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ (GABOURY; KUBES; KANWAR, 1993). A iNOS não depende de cálcio para tornar-se ativa, porém sua síntese de mRNA é necessária para sua atividade e não é detectada na forma basal (LOWENSTEIN & SNYDER, 1992). A NOS endotelial (eNOS ou NOS III) é expressa nas células endoteliais vasculares em condições basais, o aumento da concentração de cálcio intracelular (Ca²⁺) estabiliza a ligação da calmodulina em eNOS e nNOS e ativa a enzima a produzir NO· (FORSTERMANN et al., 1994).

O dano tecidual e infecção resulta em uma resposta inflamatória local e expressa os efeitos benéficos de iNOS. A quantidade de NO· produzida pode determinar se ele vai apresentar efeito protetor ou tóxico (COOKE, 2002). Várias vias de sinalização tem sido analisadas e reguladas pela expressão de iNOS. A importância dessas vias conduz a ativação de fatores de transcrição como NF- κ B e STAT-1 (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 1980).

Já as citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral TNF- α e interleucina 1 β , correspondem as citocinas que medeiam a inflamação sua produção se dá principalmente por macrófagos ativados (KLIMP et al., 2002). Apesar da natureza

complexa de sua função, as citocinas podem ser classificadas amplamente como pró-inflamatórias: IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , e anti-inflamatória: IL-10 (KUNDU & SURH, 2008).

Tomando-se por base as citocinas como interleucinas ILs e o fator de necrose tumoral TNF- α , fatores de diferenciação e de crescimento estão ligados a membranas de pequenas moléculas de proteínas que regulam diversos processos fisiológicos tais como crescimento, desenvolvimento, diferenciação e cicatrização de feridas na resposta imune. A sinalização de citocinas é iniciada por ligação de citocinas a receptores específicos de células, seguidos pela ativação intracelular de cinases como Janus cinase ativada JAK, fosfatidilinositol-3-cinase PI3K, AKT, IKK e MAP cinase, com subsequente ativação de fatores de transcrição STAT, NF- κ B e AP-1 (ROSA et al., 2014; CUONG et al., 2015).

Durante as respostas inflamatórias, um grande número de sinais intracelulares e extracelulares, receptores de antígenos e citocinas pró-inflamatórias ativa a Janus cinase JAK, as STATs, MAPKs e fator de transcrição nuclear kappa β NF- κ B (XIE et al., 2012). Mesmo essas vias de sinalização sendo importantes para regular as funções fisiológicas do organismo sob condições normais, estas vias quando ativadas de maneira excessiva estão associadas a uma desordem inflamatória e imunológica.

O fator de transcrição nuclear NF- κ B tem papel importante em diversas funções celulares como inflamação, sobrevivência celular, apoptose, proliferação de células cancerígenas, aumento da angiogênese e na imunidade inata/adquirida. (GASPARINI et al., 2014).

O fator de transcrição nuclear NF- κ B promove a expressão em macrófagos de genes envolvidos com a inflamação como citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão celular, COX-2 e várias proteínas como a mieloperoxidase MPO está última irá

remodular os tecidos para a degradação de proteínas de matrix extracelular (POMARI, 2014). Esta via NF- κ B desempenha um papel extraordinário na cascata inflamatória e encontra-se no citoplasma das células, onde são retidas por meio da interação de proteínas inibitórias $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ de localização citoplasmática (FALCON et al., 2016).

A ativação de NF- κ B requer a fosforilação da proteína $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ pela IKK2, principalmente de p50, p65 e c-REL (KARIN et al., 2002). Estudos genéticos, farmacológicos e bioquímicos evidenciam que os constituintes da via NF- κ B são importantes alvos para o tratamento de várias doenças inflamatórias, e em razão dessa hipótese, a descoberta de moléculas com a capacidade de inibir a via tem relevância considerável (HUANG et al., 2015; CIEMNIECKI; LEWIS; GUPTON; STENGER, 2016).

2.3 Compostos semi-sintéticos com atividade anti-inflamatória

Compostos semi-sintéticos têm sido estudados por apresentar inúmeras atividades biológicas, estruturas químicas conformacionais e de fácil modificação molecular, como é o caso das peridonas, importante família de compostos heterocíclicos com significativo interesse na química medicinal em muitos anos devido seu espectro de atividades biológicas tal como anti-fúngica, anti-câncer, anti-viral, anti-diabética, antioxidante e anti-inflamatória (HELAL et al., 2015).

Outros exemplos de compostos semi-sintéticos com atividade biológica foram descritos por Bhat et al., (2009) que avaliou atividade anti-inflamatória de vinte e três derivados sintéticos do pinitol, dos quais três compostos apresentaram capacidade de supressão da citocina TNF- α inibindo 50% da sua expressão, assim foram apresentados por possuir atividade inibitória potente comparado ao padrão rolipram em neutrófilos tratados *in vitro* na concentração de 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Em um estudo descrito por Park; Jun; Kim, (2014) derivados de licochalcona B, (E)-3-(3,4-dihidroxi-2-metoxifenil)-1-(2,4-dihidroxi-fenil)prop-2-en-1-one (DPP) foram sintetizados a fim de realizar ensaios *in vitro* utilizando macrófagos murinos RAW 264.7 induzido por LPS. O composto DPP na concentração de 20 μM , inibiu a produção de NO^{\cdot} de maneira dose-dependente e de citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição do fator de ativação nuclear $\text{NF-}\kappa\text{B}$ em células RAW 264.7 induzidos por LPS.

Como mencionado anteriormente, vários compostos semi-sintéticos já foram identificados por apresentar atividade anti-inflamatória, como é o caso de 1,8-naftiridina-3-carboxamida, composto a partir do qual foi realizado várias sínteses de sua molécula e realizado ensaios *in vitro* para comprovar atividade anti-inflamatória. Seis dos compostos apresentaram inibição $> 50\%$ de $\text{IL-1}\beta$ na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, embora inibição $> 50\%$ foi observado em IL-6 em cinco dos compostos na concentração 1 e 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (KUMAR et al., 2009).

2.4 Nitroestirenos

Os nitroestirenos são compostos que apresentam um grupo *nitro* (NO_2) característico (Figura 3), predominando para a configuração *E* (trans) do grupo nitro e fenil com ligação estruturalmente dupla em cadeia de carbono (CALHEIROS et al., 2004).

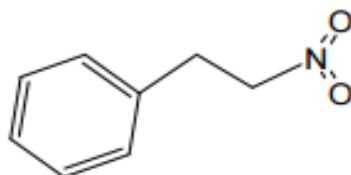


Figura 3 - Estrutura química do nitroestireno 1-nitro-2-feniletano

Fonte: Elaborado no programa ChemDraw

1-nitro-2-feniletano, cuja estrutura é apresentada na (Figura 3), é o principal constituinte da planta *Aniba canelilla* HBK Mez (Figura 4), espécie da família Lauraceae conhecida popularmente como “casca preciosa”. Espécie histórica na região amazônica desde 1540 durante viagem de Pizarro e Orelana, e nos Andes durante expedição de Humbolt e Bonpland's em 1800 em Orinoco. Possuem propriedades antioxidantes, antinoceptivas, cardiovascular e vasorelaxante, utilizada na medicina popular como anti-espasmódico, estimulante digestivo e com propriedades carminativas importantes (SILVA et al., 2014).



Figura 4 – Ilustração da planta *Aniba canelilla*

Fonte: http://www.kew.org/science/tropamerica/imagetdatabase/large1/cat_single1-209.htm

Compostos como de metileugenol e eugenol foram identificados na *Aniba canelilla* na fração óleo bem como 1-nitro-2-feniletano na planta *Ocotea pretiosa*, (SIQUEIRA et al., 2010). Em estudos anteriores, alcalóides tipo benzil-tetra-hidroisoquinolina e tetra-hidro-protoberberina foram identificados na *Aniba canelilla* com propriedades anti-fúngicas (SILVA et al., 2007).

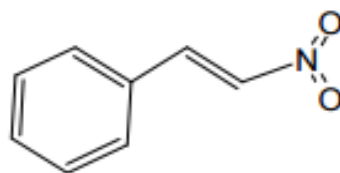


Figura 5 - Estrutura química do nitroestireno 1-nitro-2-feniletano

Fonte: Elaborado no programa ChemDraw

Diversos estudos comprovaram que os nitroestirenos a exemplo do composto nitrofeniletano (Figura 5), tem apresentado propriedades biológicas relevantes e pertencem à classe de compostos com características peculiares quanto à síntese de diversas classes químicas dentre estes nitroalcanos, cetonas, aldeídos, hidroxilaminas e aminas (NEGISHI et al., 1988). Entretanto, quando conjugados são excelentes aceitadores da reação de Michael frente a reagentes organometálicos e vitamina C (SINGH et al., 2012).

Por outro lado, também já foram demonstrados que esses compostos possuem propriedade de inibição da telomerase humana, inibição da agregação plaquetária, propriedades anti-fúngicas, antibacteriana, efeitos pró-apoptóticos e atividade anti-hipertensiva. (KIM et al., 2003; HSIEH et al., 2010; MIKAMI, YAZAWA, MAEDA, 1991; MILHAZES et al., 2006; CHEN et al., 2015; ARRUDA et al., 2014, respectivamente).

Com base em pesquisas bibliográficas, verificaram-se várias atividades farmacológicas envolvendo os nitroestirenos, conforme mostra a tabela 1 a qual resume suas principais publicações.

Tabela 1 – Principais atividades farmacológicas dos nitroestirenos abordadas na literatura

NITROESTIRENO	ATIVIDADE	RESULTADO	REFERÊNCIA
3-hidroxi-4-metoxi-β-metil-β-nitroestireno (CYT-Rx20)	- Atividade plaquetária e citotoxicidade de células de câncer de mama	- Inibiu agregação plaquetária e morte celular através da via MEK/ERK dos genes Beclin-1	HUNG et al, 2016
1-((E)-2-nitrovinil) benzeno (NTS1) 1-nitro-3((E)-2-nitrovinil) benzeno (NTS2)	- Ação pró-apoptótica em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> no desenvolvimento mielóide	- Estimulou a diferenciação e expansão de células progenitoras <i>in vitro</i> ; melhorou a reconstituição mielóide após depleção da medula óssea induzida por quimioterapia.	BARTELS et al., 2014
8-metoxi-3-nitro-2-(4-clorofenil)-2H-clomeno	- Ação anti-cancerígena do composto	- Composto apresentou atividade citotóxica <i>in vitro</i> em células MCF-7.	RAHMANI-NEZHAD et al., 2014)
3,4-metilenodioxo-β-nitroestireno (MNS)	- Inibição de células de osteosarcoma humano	- MNS diminuiu a motilidade em células osteosarcoma humano em 72-76% e formação de colônia 95-100%	MESSERSCHMITT et al., 2012
3-hidroxi-4-metoxi-β-metil-β-nitroestireno	- Propriedade antibacteriana, correlação entre estrutura atividade (SAR)	- Apresentou ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i>) e potencial correlação entre potencial redox (Ep)	MILHAZES et al., 2006
3-(3,5-diclorofenoxi)-nitroestireno (DPNS)	- Atividade de inibição da telomerase humana em modelos <i>in vitro</i> de células do câncer cervical humano HeLa	- Apresentou efeito inibitório em 50% das células de cancer cervical ligando-se a sítios distintos da telomerase	KIM et al., 2003
1,2-dimetoxi-4-(2-nitroetil) benzeno	- Ação anti-fúngica do nitroestireno	- Apresentou atividade anti-fúngica de 88% contra dermatófito <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	MIKAMI et al., 1991

2.5 Nitroestirenos com propriedades terapêuticas

Nitroestirenos da classe dos nitrocompostos são agentes com diversas aplicações na medicina clínica e preventiva, dentre estes podemos citar os anti-hipertensivos (nifedipina, nifedipina e nisoldipina), antibacterianos (cloranfenicol, nifuroxazida), anti-inflamatórios (nimesulida), anti-neoplásicos (nitracina), sedativos (nitrazepan, flunitazepam), imunossuppressores (azatioprina), anti-histamínicos H-2 (nizatidina, ranitina), anti-parasitários (metronidazol, tinidazol, benzinidazol, nirfutimox) e anti-anginosos (nitroglicerina, tetranitrato de eritritila, dinitrato de isorssobida) (KATZUNG, 2001; KAMAL et al., 2007; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009).

Segundo Wang et al., (2006) os compostos nitroestirenos desempenham diferentes atividades biológicas, como é o caso do composto derivado 3,4-metilenedioxi- β -nitroestireno (MNS) o qual apresentou inibição da agregação plaquetária, propriedades anti-câncer e prevenção da ativação da integrina α II β 3. Neste contexto, ensaios de adesão e invasão celular foram realizados para verificar atividade anti-câncer do composto MNS em linhagens celulares MDA-MB-231, MDA-MB-468 e Hs578T de adenocarcinoma mamário. Conforme as análises, os dados constataram que, MNS inibiu as propriedades metastáticas *in vitro* na concentração de 5 μ M, reduzindo a invasão de células MDA-MB-231 a 93%, o tratamento com MNS impediu a fosforilação de FAK (tirosinase cinase) e paxilina, as quais são envolvidas com a migração celular. Em vista desses resultados, MNS pode ser considerado um potente agente anticancerígeno em patologias como câncer de mama triplo negativo (CHEN et al., 2015).

Conforme as informações acima, já foram comprovadas efeitos pró-apoptóticos dos compostos nitroestirenos em que se verificaram a inibição da enzima fosfatase

serina/threonina (PP2A), fosfolipase A2, telomerase e tirosinase cinase (Src, Syk, FAK) (FATHI, 2000; KAAP et al., 2000; KIM et al., 2003, respectivamente). Ensaios utilizando células de cordão umbilical e da medula óssea foram realizados para verificar atividade pró-apoptótica em células tumorais, utilizando derivados nitroestirenos NTS1 ((1-((E)-2-nitrovinil) e NTS2 (1-nitro-3((E)-2-nitrovinil) benzeno em modelos *in vitro/in vivo* na mielogênese. Os compostos estimularam a diferenciação e expansão de células progenitoras *in vitro*, melhoraram a reconstituição mielóide após depleção da medula óssea induzida por quimioterapia *in vivo*. Efeitos que foram acompanhados da desfosforilação com aumento da expressão de C/EBP α , como também evidenciado atividade de inibição da via inflamatória de p38 MAPK (BARTELS et al., 2014).

Outro exemplo de composto foi descrito por Arruda et al., (2014), os quais realizaram ensaios para comprovar o efeito vascular de 1-((E)-2-nitro-vinil)-benzeno (β -nitroestireno) sintetizado a partir do composto 1-nitro-2-feniletano. Após administração intravenosa de 1-nitro-2-feniletano, para induzir efeitos hipotensores/bradicardizantes bifásicos em camundongos normotensos ou espontaneamente hipertensos (SHRs), observou-se efeito vasodilatador na resposta hipotensiva de 1-nitro-2-feniletano, obtendo rápido efeito vasorrelaxante significativo do endotélio com 10 $\mu\text{g/mL}$ e CI_{50} de 10.47 $\mu\text{g/mL}$, efeito inibitório nas concentrações testadas de 10 e 3 $\mu\text{g/mL}$ no endotélio intacto e endotélio desnudo, respectivamente. Com esses achados, o composto apresentou particularidades relaxantes imediata tornando-o um fármaco promissor com características anti-hipertensivas.

Hsieh e colaboradores (2010) realizaram estudo com quarenta derivados do composto nitroestireno 4-*O*-benzoil-3-metoxi- β -nitroestireno, os quais foram avaliados atividade antiplaquetária, no entanto somente cinco exibiram aumento da atividade induzidos por trombina e colágeno. Os derivados BMNS, C19 e C24 foram capazes de

inibir a ativação da glicoproteína (GP) IIb/IIIa, contudo esses resultados corroboram com a hipótese de que BMNS e seus derivados sejam bons candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos antiplaquetários.

De acordo com trabalhos descritos por He et al., (2014), a ativação do inflamassoma NLRP3 induz estímulos aos quais estão associadas à infecção bacteriana, aterosclerose, diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer. Mediante esta abordagem, o composto 3,4-metilenedioxi- β -nitroestireno (MNS) foi avaliado quanto sua capacidade de inibição da ativação do inflamassoma NLRP3. Resultados reportaram que MNS inibiu NLRP3 quanto à sua atividade ATPase *in vitro*, secreção da interleucina-1 β em macrófagos derivados da medula óssea (BMDMs), secreção de fator de necrose tumoral TNF- α , interleucina IL-18, caspase-1 e cinase Src/FAK. Quanto à citotoxicidade em ensaio da lactato desidrogenase LDH, MNS apresentou características preventivas na indução de ATP/nigericina. Em razão dessas análises, estudos bioquímicos sobre o mecanismo de ação dos nitroestirenos no inflamassoma NLRP3 podem contribuir para a construção de novos alvos terapêuticos que possam intervir na ativação inapropriada do inflamassoma NLRP3 (YUAN et al., 2014).

Conforme Petit et al., (2009) a atividade antimicrobiana, antineoplásica, antitubulínica foram avaliados em derivados do β -nitroestirenos 3-metoxi-4,5-metilenodioxi, este nitroestireno promoveu a inibição da polimerização tubulínica em linhagem de células de câncer humano, com notável atividade antibacteriana em ensaios na presença da bactéria Gram-negativa *Neisseria gonorrhoeae*. Por Espectrometria de Raman foi avaliado análise conformacional dos análogos: 1,2-dihidroxibenzeno (catecol), 3,4-dihidroxibenzaldeído, β -metil-estireno, β -metil- β -nitroestireno (MeNS), 3,4-dihidroxi- β -nitroestireno e 3,4-dihidroxi- β -metil- β -nitroestireno e constatado

isomeria conformacional dos compostos favorecida pela associação de grupos radicais β na variação potencia/energia dos derivados com elétrons disponíveis.

Silva e colaboradores (2007) analisaram atividade antioxidante do 1-nitro-2-feniletano componente majoritário da *Aniba canellila*, obtido a partir do óleo da casca do caule com 99% de pureza por cromatografia em coluna de sílica. Este composto foi avaliado nas concentrações de 110, 225, 445, 1125 e 1400 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, e o resultado de inibição do DPPH variou entre 32.38 a 93.06%, por outro lado o extrato da casca foi avaliado nas concentrações de 2, 4 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ onde foi notado que a determinação de inibição de DPPH variou entre 29.81 a 92.64%. Os valores obtidos foram de (4.37 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da amostra TWEA e (4.44 ± 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) TWEB esses valores foram equivalentes ao padrão Trolox (4.67 ± 0.3 $5\mu\text{g}/\text{mL}$) indicando que os compostos apresentam alta atividade antioxidante comparado ao padrão.

Em um estudo descrito por Vale et al., (2013) no ensaio de edema de pata induzido por dextrana, o nitroestireno 1-nitro-2-feniletano (NPE) nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg foi capaz de prevenir a formação do edema em comparação ao padrão ciproheptadina, avaliados nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Em paralelo ao ensaio de edema de pata induzido por carragenina, NPE nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg também preveniu o edema em relação ao padrão indometacina nos tempos de 2, 3, 4 e 5 h.

Lima e colaboradores (2009) verificaram atividade analgésica do nitroestireno 1-nitro-2-feniletano, o composto reduziu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de maneira dose-dependente nas concentrações de 15, 25 e 50 mg/kg. Já no ensaio da placa quente, o composto não influenciou a latência em saltos ou lambeduras nos animais sinais verticais da primeira fase, sugerindo assim uma possível ação periférica do composto. No teste da formalina o nitroestireno inibiu a lambedura nos

animais respondendo a efeitos antinoceptivos na segunda fase. Desta forma o composto apresentou característica de ação analgésica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória de novos compostos sintéticos da classe dos nitroestirenos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar atividade anti-inflamatória dos nitroestirenos *in vitro*;
- Verificar atividade anti-inflamatória *in vivo* dos nitroestirenos;
- Verificar possíveis mecanismos de ação para a atividade anti-inflamatória dos nitroestirenos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

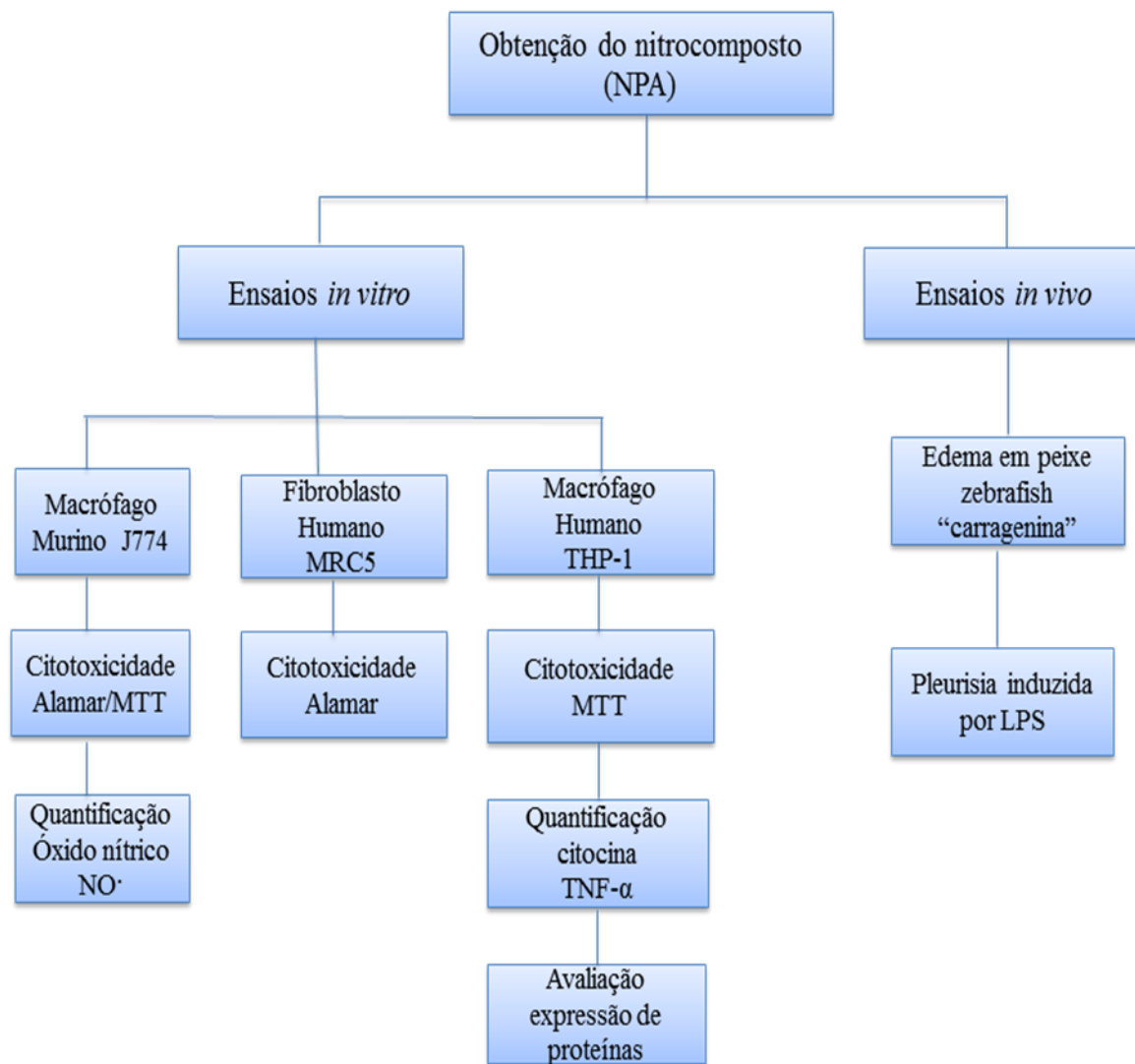


Figura 6: Organograma de planejamento e elaboração dos ensaios programados para o projeto.

4.2 Obtenção das Amostras

Quatro novos derivados nitroestirenos 1-nitro-2-feniletano (NPA), 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (7B), 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7D) e 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano (7E) foram sintetizados no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará - UFPA e cedidos pelo Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges aos quais foram derivados quatro nitrocompostos a partir da molécula precursora *1-nitro-2-feniletano* com rendimentos satisfatórios (VALE, 2011). Após ensaios experimentais, avaliou-se a capacidade anti-inflamatória do nitrocomposto 1-nitro-2-feniletano NPA sendo o mesmo selecionado para a continuidade dos experimentos. A derivação dos componentes está representada em esquema como segue abaixo.

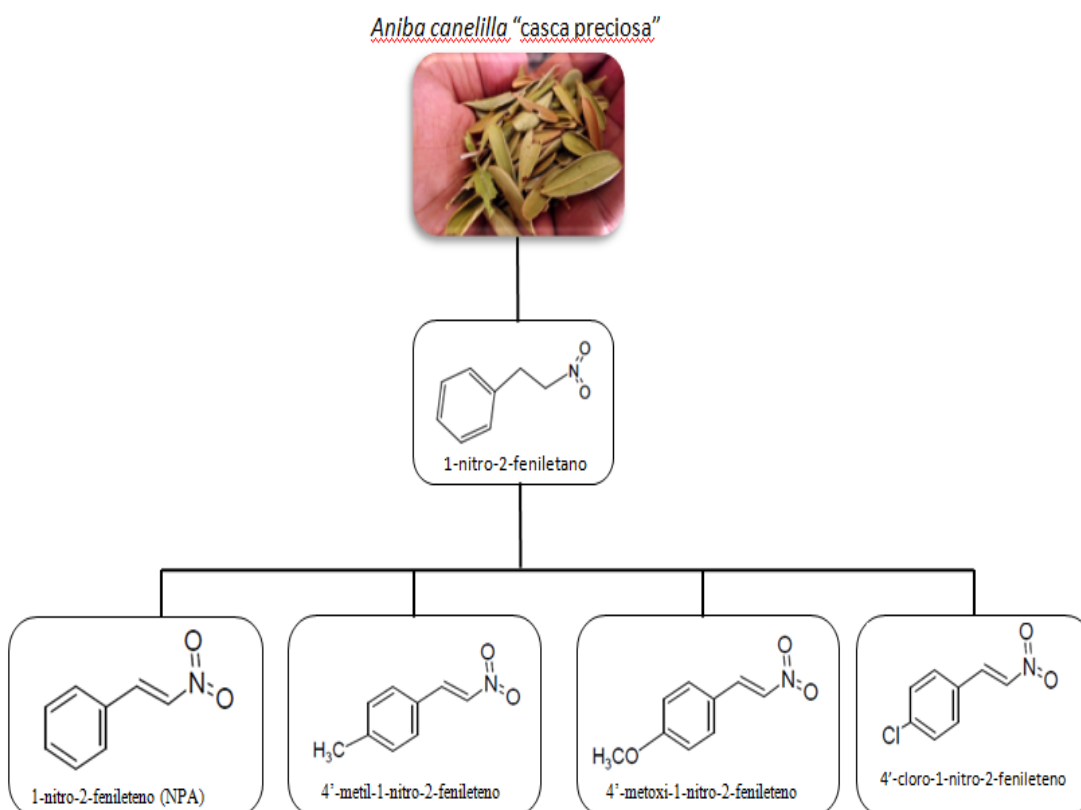


Figura 7: Derivação dos nitroestirenos

4.3 Células

Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas células de fibroblastos de pulmão humano (MRC5) adquiridos a partir da *American Type Culture Collection*[®], EUA - ATCC e macrófagos da ascite de camundongos *Mus musculus* (J774A.1) que foram gentilmente cedidos pela Dra Patrícia Puccinelli Orlandi FIOCRUZ-MANAUS. Estas células foram mantidas em estufa bacteriológica à 37° C em atmosfera de 5% de CO₂ em *Meio Eagle Modificado por Dulbecco high glucose* DMEM - MRC5 e *Roswell Park Memorial Institute* RPMI 1640 - J774A.1 todos suplementados com 10% soro fetal bovino - SFB (*GIBCONN by life technologie*), e acrescentado de 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (*GIBCONN by life technologie*) estas células foram cultivadas no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas – UFAM. Já as células de macrófagos diferenciados de sangue periférico humano (THP-1) foram mantidos sob condições adequadas no Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG sob a supervisão da Prof^a Dr^a Lirlândia Pires de Sousa.

Células monocíticas humana da linhagem THP-1 (TIB202[®], *American Type Culture Collection*[®], EUA) foram cultivadas em meio RMPI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Cultilab, Brasil) a 37° C, mantendo-se em atmosfera de CO₂ a 5%. Para diferenciação de monócitos a macrófagos, estas células foram plaqueadas na concentração 2x10⁶/mL de célula e adicionado acetato de forbolmiristato (PMA) obtendo-se a concentração final de 10 ng/mL. Após adição do PMA, a suspensão foi transferida para placa de cultura de 24 poços (TPP, Suíça), transferindo-se 500 µL da suspensão celular para cada poço 10⁶cél./poço. Com o intuito de eliminar as células não aderidas, após 24 h de incubação o sobrenadante de cada poço foi substituído por meio RMPI 1640 (Cultilab, Brasil) enriquecido com 1% de

SFB. As células foram incubadas por 16 h em placa de 96 poços em condições de cultivo a 37° C, mantendo-se atmosfera de CO₂ a 5%. A cada poço foram adicionados 10⁶ células obtendo-se um volume final de 100 µL por poço.

4.3.1 Ensaio de Viabilidade celular

4.3.1.1 Método Alamar blue

Inicialmente foi realizado a citotoxicidade dos compostos por Alamar blue dos nitroestirenos NPA, 7B, 7D e 7E, a fim de determinar as concentrações não tóxicas dos compostos para seguimento aos ensaios. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. A citotoxicidade foi avaliada pelo método Alamar blue segundo Nakayama et al., (1997), utilizando-se fibroblastos de pulmão humano (MRC5) e macrófagos da ascite de camundongos *Mus musculus* J774A.1. Essas células foram plaqueadas na concentração de 0,5 x 10⁴ células/poço com um volume final de 100 µL por poço.

Observada às 24 h de incubação e aderência, as células foram tratadas com os compostos previamente diluídos em Dimetilsulfóxido DMSO (Sigma-Aldrich, Alemanha) 10 mg/mL, e em seguida testados nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL em MRC5 e as concentrações de 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 µg/mL em J774A.1. O ensaio foi realizado em triplicata por um tempo de tratamento de 24 h, utilizando-se como controle positivo Doxorrubicina (Sigma-Aldrich, Alemanha) fármaco padrão de morte e realizada curva nas mesmas concentrações e controle negativo DMSO 0,5% e a seguir deixados em incubadora de CO₂.

Decorrido o tempo de tratamento foi adicionado 10 μL de uma solução preparada com (950 μL de meio de cultura + 50 μL resazurina 0,4%), e em seguida esperou-se o tempo de metabolização designado para cada linhagem celular conforme protocolo, de 2 h para MRC5 e 3 h para J774A.1, em seguida realizou-se a leitura de fluorescência em aparelho de microplaca (DTX-800 Beckman Coulter) na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão. O cálculo foi realizado conforme fórmula abaixo.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{F_t \times 100}{\Delta F_b}$$

Onde:

F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina)

ΔF_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina)

Os resultados de porcentagem de viabilidade celular acima de 90% foi considerado aceitável para substâncias não tóxicas.

Os valores de CI_{50} foram calculados em programa de estatística GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.1.2 Ensaio de Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT)

O ensaio colorimétrico do Brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Brasil Ltda) foi realizado de acordo com Mosmann (1983), baseado na redução enzimática do MTT para formação de cristais de formazan pela mitocôndria e enzimas desidrogenases celulares. As células de macrófagos murino J774A.1 foram plaqueadas na

concentração de 1×10^6 células/poços em placas de 96 poços e deixadas em incubadora de CO_2 em atmosfera de 37°C por 24 h, após esse período as células foram expostas as concentrações de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do composto nitroestireno NPA por 24 h.

Após o tempo de incubação a 37°C o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 100 μL de PBS 0,1 M com pH 7.4, em seguida adicionado 100 μL de MTT (1:1 mg/mL) diluído em meio de cultura RPMI 1640 e incubado por 3 h a 37°C , decorrido esse tempo as células foram ressuspensas com DMSO:isopropanol (1:1) em cada poço e finalmente as placas foram agitadas delicadamente em um agitador orbital por 15 minutos a temperatura ambiente para solubilização dos cristais de formazan originados a partir da reação do MTT com enzimas mitocondriais em células viáveis.

Na última etapa a densidade óptica dos poços foi medida em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) em 570 nm e os valores de absorbância das células tratadas com o NPA foram comparados com os valores de absorbância obtidos a partir das células controle sem tratamento. Este mesmo experimento também foi realizado em parceria com a Universidade de Minas Gerais utilizando-se macrófago de origem humana THP-1 na concentração de 2×10^6 células/poço, nas concentrações supracitadas do composto nitroestireno NPA, como controle positivo foi utilizado 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dexametasona (Sigma-Aldrich, Alemanha) e células sem LPS como controle negativo do experimento.

4.3.2 Inibição da ativação de macrófagos

Células de macrófago murino J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placa de 96 poços. Após o tempo de incubação de 24 h das células a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 , o meio foi retirado e adicionado meio RPMI suplementado com 1% de SFB com volume final de 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, a seguir as células foram estimuladas com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli* sorotipo

0111:B4 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e tratadas com os compostos nitroestirenos NPA, 7B, 7D e 7E nas concentrações de 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado meio RPMI 1640 enriquecido com LPS e como controle negativo meio RPMI 1640 sem LPS. As células foram incubadas por 24 h a 37°C, 5% de CO₂, e o sobrenadante celular foi coletado para a análise de óxido nítrico NO[·] e alíquotas foram congeladas a -20°C para posterior análise das citocinas.

4.3.3 Quantificação de nitrito

A produção de óxido nítrico (NO[·]) foi mensurada pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito, utilizando o reagente de Griess. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Alemanha) em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com Naftil-1-etilenodiamina (Merck, Alemanha) formando um composto azo estável de coloração púrpura para assim ser quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (GREEN et al., 1982).

Para a determinação da produção de óxido nítrico, 50 µL do sobrenadante celular foi submetido à reação com igual volume dos reagentes de Griess (sulfanilamida + naftil). Para o preparo destes reagentes foram utilizadas soluções estoque de naftil-1-etilenodiamina 0,1% dissolvido em água destilada H₂O e de sulfanilamida a 1% dissolvida em ácido fosfórico H₃PO₄ (CFQ - Química) a 5%. Anteriormente ao uso as soluções foram adicionadas na proporção 1:1 formando o reagente de Griess.

Após o período de incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio NaNO₃ 15 µM até 1000 µM. Esta etapa do experimento foi realizado no

Laboratório da Cultura de Célula da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Amazonas-UFAM.

4.3.4 Quantificação da citocina TNF- α

Para este ensaio foi utilizado sobrenadante de células de macrófago humano THP-1 que foram congeladas após experimentos anteriores e realizados testes para a quantificação de TNF- α utilizando o kit ELISA duo set, DY210 (R&D Systems, EUA). A metodologia empregada foi através do ensaio imunoenzimático (ELISA) seguidas às recomendações do fabricante. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

4.3.5 Avaliação da expressão e ativação de proteínas por Western blot

Para avaliação da expressão da ativação de proteínas foi realizado o ensaio de Western blot com a utilização de células de macrófago humano THP-1 na concentração de 1×10^6 células/mL ou células obtidas do lavado pleural de animais. Estas células foram tratadas com o composto nitroestireno NPA nas concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ seguido à incubação com 100 ng/mL de LPS por um tempo de 24 h. Após este período, as células foram lisadas em 70 μL de tampão de lise (100 mM Tris/HCl pH 8.0 acrescido de 200 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1 mM NaVO_3 , 0.5% (p/v) nonidet NP-40, 10% glicerol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 25 mM NaF, leupeptina, aprotinina) seguida por incubação em banho de gelo por 15 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 12000 RPM a 4°C, o sobrenadante foi separado e as proteínas totais foram dosadas utilizando método de Bradford (1976).

4.3.5.1 Dosagem de proteínas totais nos lisados celulares

Para realizar a dosagem de proteínas totais das células lisadas foi utilizado o kit *Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories)* baseado no método de Bradford. O ensaio foi realizado em uma microplaca de 96 poços (NUNC), e consistiu na adição de 2 μL de cada amostra a 200 μL do corante diluído 5 vezes em água destilada em duplicatas. Paralelamente foi realizada uma curva padrão utilizando como solução padrão BSA 1 mg/mL. Após 5 minutos de incubação, a leitura foi feita em espectrofotômetro (*Spectra Max 190, Molecular Devices*) a 595 nm. A absorbância das amostras foi comparada com a absorbância da curva com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados foram expressos em mg/mL.

4.3.5.2 Western blot para análise da expressão de iNOS e da ativação de vias sinalizadoras intracelulares

Os extratos protéicos totais 50 μg foram desnaturados misturando-se a amostra com tampão (10% SDS, 10% β -mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.250M Tris/HCl pH 6.8) e a mistura mantida a 100°C por 5 minutos. Os extratos protéicos foram fracionados em gel de 10% de poliacrilamida/SDS e transferidos para membrana de nitrocelulose (*Hybond[®] ECL[®], GE Healthcare*). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0.1% contendo 5% de leite em pó desnatado, lavadas com PBS-Tween e incubadas com o anticorpo de interesse a 4°C *overnight*. Os anticorpos utilizados foram anti as formas fosforiladas das proteínas I κ B- α , ERK 1/2 (Cell Signaling Technology) e anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Após nova lavagem com PBS/Tween, procedeu-se a incubação com o respectivo anticorpo secundário ligado à peroxidase durante 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas, incubadas em solução reveladora ECL-Plus (*GE Healthcare*), expostas contra filme de raio X (*Hyperfilm ECL, GE Healthcare*) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak) de acordo com indicações do

fabricante.

4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*

4.4.1 Animais em estudo

Para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* foram utilizados dois tipos de animais para o ensaio: peixe da espécie *Danio rerio* conhecido como “zebrafish” e camundongos da espécie *Mus musculus* Balb/C.

Os ensaios em peixe zebrafish foram conduzidos em parceria com a Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, sob supervisão do Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, enquanto que os experimentos em camundongos sucederam-se na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG sob supervisão da Prof^a Dr^a Lirlândia Pires de Sousa.

4.4.2 Ensaio em peixe zebrafish *Danio rerio*

O referido projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá – CEAU/UNIFAP com registro de protocolo n°0022/2015. Os experimentos e análises em zebrafish foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Fármacos do Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Amapá.

4.4.3 *Danio rerio*

Peixes da espécie *Danio rerio* certificados foram adquiridos da empresa Acqua New Aquários e Peixes LTDA ME situada em Itagassu-PE, sob o protocolo de autorização de uso n° 526140011289802 de 07 de Maio de 2014, com registro no IBAMA n° 82957, sendo transportado por via aérea até a cidade de Macapá pela empresa GOLLOG Serviços de Cargas Aéreas, protocolo de envio n° 12700094619755, os mesmos foram mantidos em quarentena na Plataforma de Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos.

Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo de água doce tropical originário do nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal (SHIN & FISHMAN, 2002). Têm sido extensivamente adotado no estudo de processos biológicos incluindo inflamação e infecção. Este modelo apresenta as vantagens de fácil manutenção, baixo custo, fácil reprodutibilidade, alta fecundidade podendo atingir até 200 embriões a cada sete dias, claridade óptica, fertilização externa, transparência nos estágios embrionário/larval, disponibilidade de um conjunto de ferramentas moleculares permitindo alterações genéticas que simulam doenças humanas (PULAK, 2015; PEREIRA et al., 2011).

Segundo Villefranc; Amigo; Lawson (2007) seu genoma apresenta pelo menos 70% de homologia com ser humano. Além disso, tem se destacado como um modelo promissor para doenças relacionadas ao envelhecimento em avaliação de genes relacionados à longevidade (BRUGMAN, 2016). Amplamente aceito para investigar doenças humanas neurodegenerativas, hematopoiéticas, cardiovasculares e metabólicas (GALINDO VILLEGAS, 2015).

Semelhanças estruturais, funcionais e genéticas levaram vários grupos para a construção de modelos de doenças humanas que foram utilizadas em abordagens de

rastreio fenotípico para a descoberta de drogas e ensaios de toxicologia (MODY & VEGF, 2003). Em sua fase larval foi usado para estudar uma variedade crescente de agentes patogênicos bacterianos, incluindo o *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, e *Listeria spp.*; estudos de patogenia de doenças fúngicas, incluindo infecções por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* como também investigações do vírus da gripe A e vírus Chikungunya.

Este modelo permite uma excelente qualidade de imagens *in vivo* e *ex vivo*, oferecendo a escolha entre várias técnicas poderosas, como a microscopia confocal fluorescente ou microscopia de vídeo ao vivo (JAFFE; THIBERGE; BISHOP, 2010). Também a tecnologia automatizada tem sido apresentada neste modelo como alternativa para *screening* rápido, confiável, de baixo custo e em curto prazo mediante tecnologia de rastreio de alto rendimento HTS e VAST (WALTON et al., 2015).

No modelo zebrafish, o uso de baixas concentrações como por exemplo, em (μg e/ou μM) dos compostos podem ser analisadas se comparado ao modelo clássico da inflamação “edema de pata” em roedores que são necessárias concentrações em (mg), valores significativos quando se trata de substâncias isoladas e/ou sintetizadas (RENSHAW & TREDE, 2012). Assim, o modelo de zebrafish apresenta-se como uma alternativa eficaz e segura nos ensaios, apresentando como entre outras a vantagem do de baixas doses (cálculo baseado no peso corporal do peixe) em comparação aos modelos tradicionais, sendo dessa forma sugerido como modelo ideal para pesquisa de novas drogas entre outras pesquisas aplicadas (MORALES FÉNERO; COLOMBO FLORES; CÂMARA, 2016; CHAKRABORTY et al., 2014).

4.4.4 Manutenção e acondicionamento dos peixes

Os animais foram mantidos na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, (Figura 8) em condições de temperatura entre de $26\pm 10^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, em ciclo de luz 10 horas claro/14 horas escuro e utilização de água normatizada pela ISO 96. Com o objetivo da padronização da água em questão foram adicionados $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (117.6 mg/L), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (49.3 mg/L), NaHCO_3 (25.9 mg/L) e cloreto de potássio (2.3 mg/L) para manutenção dos peixes.

Esses animais foram acondicionados em reservatórios do tipo tanque de vidro como ilustra a (figura 8), constituído por água desmineralizada misturada com água não clorada 16:1, adicionada de NaCl a uma condutividade de cerca de $275 \mu\text{S}$ (132 mg L^{-1}). As concentrações em (mg/L^{-1}) dos íons predominantes na água do tanque mãe são: SO_4^{2-} 4.25, Na^{+} 43.19, NO_3^{-} 0.09, Mg_2^{+} 0.75, K^{+} 0.21, Cl^{-} 63.93, Ca_2^{+} 5.31, e HCO_3^{-} 19.31, total de $\sim 137 \text{ mg/L}^{-1}$.

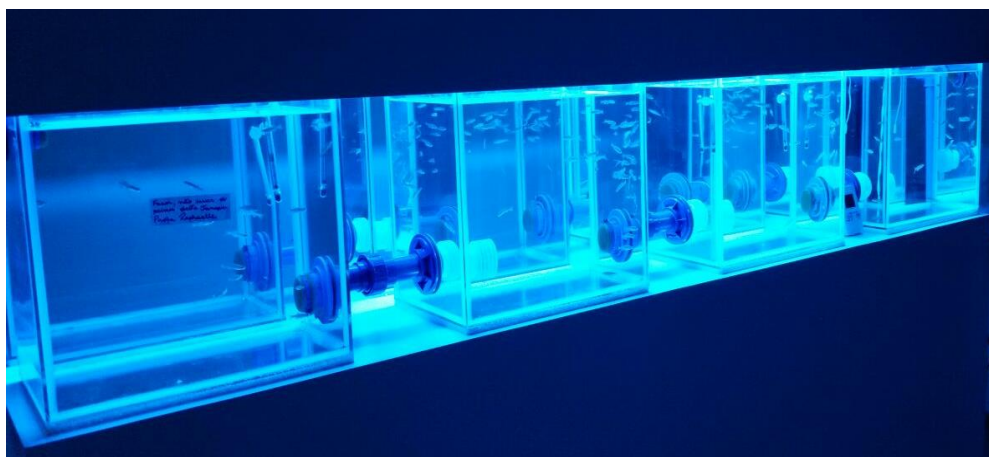


Figura 8 – Plataforma Zebrafish. Laboratório de Pesquisa em Fármaco – Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Fonte: própria

Para adaptação dos animais o foto período foi de 10:14 (luz:escuro) em que o período de luz foi iniciado ao nascer do sol artificial. O nascer do sol foi realizado aumentando gradualmente a tensão da lâmpada luminosa fraca por 10 minutos antes da

intensidade luminosa na sala e os aquários eram iluminados com 95-105 Lux a partir de uma fonte de luz artificial.

Os peixes adultos machos e fêmeas foram alimentados com ração comercial duas vezes ao dia e tratados de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de experimentação.

4.4.5 Administração do 1-nitro-2-feniletano NPA

O NPA foi dissolvido em veículo contendo (30 μ L DMSO + 30 μ L Kollifor + 940 μ L solução salina 0.9%). Como controle negativo, foi administrado 20 μ L solução fisiológica a 0.9% e drogas como carragenina 1% (Carrageenan Kappa, Sigma) e dexametasona (Decadron Injetável, Aché) dissolvidas e diluídas diretamente em solução salina a 0.9%. A dose administrada do NPA foi de 10 mg/kg e o volume administrado para cada peixe foi calculado conforme o peso, a dexametasona foi administrada na concentração de 0.5 mg/kg, enquanto que o volume de carragenina administrada por via intraperitoneal foi estabelecida a 20 μ L/kg.

4.4.5.1 Indução do edema por carragenina em zebrafish

O modelo de edema em peixes da espécie *Danio rerio* foi realizado de acordo com protocolo estabelecido por Huang et al., (2014) com modificações. Inicialmente foram selecionados peixes adulto machos de 6-8 meses de idade pesando entre 0.392 a 0.658 mg/kg provenientes da Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, esses animais foram separados em 4 grupos (n=3 peixes/grupo) para a execução do experimento. A medida do volume

do edema foi realizado utilizando pletismômetro (Ugo Basile 7140), registrando o tempo zero antes da administração da carragenina e após 4 h de desenvolvimento do edema. Grupos de animais foram tratados inicialmente com NPA 10mg/kg e após 1 h de tratamento foi administrado 20 μ L de carragenina a 1% diluída em solução salina 0.9%, como controle negativo foi administrado 20 μ L de solução fisiológica e como controle positivo dexametasona 0.5 mg/kg via intraperitoneal.

4.4.5.2 Avaliação histopatológica

Para a avaliação histopatológica (figura 9), amostras dos diferentes grupos experimentais empregados no ensaio do edema por carragenina foram preparadas, seguindo a técnica descrita por Souza (2015), e os padrões morfológicos foram descritos para: intestino, fígado e rins, seguindo a técnica descrita por Poleksic; Mitrovic-Tutundzic (1994).



Figura 9 – Lâminas histológicas em Zebrafish – coloração H&E
Fonte: própria

Tabela 2 – Parâmetros histológicos utilizados para análise de fígado de zebrafish exposto ao nitroestireno NPA

ESTÁGIO	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS
	a) Alterações nos hepatócitos
I	Desarranjo dos cordões hepáticos
I	Perda ou atipia do contorno celular
I	Perda ou atipia do contorno nuclear
I	Aumento do volume celular
I	Aumento do volume nuclear
II	Atrofia nuclear
I	Intensa vacuolização citoplasmática
II	Vacuolização nuclear
I	Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos
II	Degeneração citoplasmática
II	Degeneração nuclear
II	Rompimento celular
I	Diminuição do glicogênio
I	Estagnação biliar
	b) Alterações nos vasos sanguíneos
I	Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos
II	Hiperemia
II	Ruptura de vasos
I	Aumento do volume relativo dos vasos
	c) Alterações nos canalículos biliares
II	Degeneração dos canalículos biliares
	d) Estágio terminal
III	Necrose (focal ou total)

Critérios baseados em Rigolin-Sá (1998).

Tabela 3 - Parâmetros histológicos utilizados para análise de rim de zebrafish exposto ao nitroestireno NPA

ESTÁGIO	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS
	a) Alterações no tecido linfóide
I	Perda do contorno celular ou contorno celular atípico
	b) Alterações nos glomérulos e túbulos renais
I	Degeneração hialina tubular leve
II	Degeneração hialina tubular severa
I	Hipertrofia das células tubulares
I	Desorganização tubular
I	Desorganização glomerular
II	Degeneração tubular
II	Degeneração glomerular
I	Aumento do espaço da cápsula de Bowman
I	Diminuição do espaço da cápsula de Bowman
I	Dilatação dos capilares glomerulares
II	Degeneração citoplasmática das células tubulares
II	Degeneração nuclear das células tubulares
I	Presença de túbulos em regeneração ou de “novos néfrons”
I	Obstrução tubular
I	Aumento do lúmen tubular
II	Presença de tecido linfóide na cápsula de Bowman
ESTÁGIO	Diminuição da frequência relativa de glomérulos
	c) Alterações nos vasos sanguíneos
I	Dilatação dos vasos sanguíneos
	Hiperemia
I	Ruptura dos vasos sanguíneos
II	d) Estágio terminal
I	Necrose

Critérios baseados em Rigolin-Sá (1998) e Takashima & Hibiya (1995).

Tabela 4 - Parâmetros histológicos utilizados para análise de intestino de zebrafish exposto ao nitroestireno NPA

ESTÁGIO	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS
I	Hipertrofia e hiperplasia Atrofia Infiltração de leucócitos
II	Edema
III	Vacuolização Necrose (picnose, cariólise e carioréx) Degeneração celular

Crítérios baseados em Bernet e colaboradores (1999).

As imagens microscópicas foram capturadas por microscópio óptico Olympus modelo BX41 com três posições trinocular com objetivas de 4, 10, 40 e 100x acoplado a câmera científica Opticam.

4.4.6 Avaliação do NPA em modelo de pleurisia induzido por LPS

Camundongos foram pré-tratados com injeção intrapleural de NPA ou dexametasona ambos na dose 5.1 $\mu\text{M}/\text{kg}$. Em seguida os animais foram desafiados com LPS (*E. coli*/O:111:B4) 250 ng/cavidade ou solução salina NaCl 0.9%. Posteriormente, as células foram recuperadas da cavidade pleural lavando-se esta cavidade 2 vezes com 1 mL de PBS contendo EDTA 1 mM.

4.4.6.1 Contagem total e diferencial de células

Células da cavidade pleural foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga (*ThermoScientific*) e o sedimento celular ressuspenso em 200 μL de BSA 3% (p/v) diluído em PBS 1x. Uma alíquota das células foi diluída 10x na solução de lise de hemácias (Solução de Turk - *Imbralab*) e em seguida com câmara de Newbauer foi

realizada a contagem total de células. A partir dessa contagem, as células foram citocentrifugadas a 450 rpm por 5 minutos, utilizando preparações em lâminas de citospin (Shandon III) com as células ressuspensas em 100 µL de BSA, de forma que a lâmina contivesse aproximadamente 100 mil células. Após a secagem das lâminas, estas lâminas foram coradas com o método de *May-Grunwald-Giemsa* utilizando o kit Panótico Rápido (*LB Laborclin*), para a realização da contagem diferencial de células no microscópio óptico no aumento de 100 vezes. As células foram diferenciadas em mononucleares (macrófagos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células a cada contagem.

4.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Os ensaios foram analisados pelo teste de comparações Dunnett's e a análise de variância ANOVA para comparação de mais de duas médias. O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados paramétricos e não-paramétricos foram calculados através do programa de estatística GraphPad Prisma (versão 5.0).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação dos nitroestirenos sobre a viabilidade celular

Inicialmente quatro novos compostos NPA, 7B, 7D e 7E foram testados nas concentrações de 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ em linhagem de macrófago murino J774A.1, a fim de averiguar a interferência desses compostos na viabilidade dessas células e se esses causariam alguma toxicidade por meio do método de Alamar blue, conforme ilustrado na (figura 10).

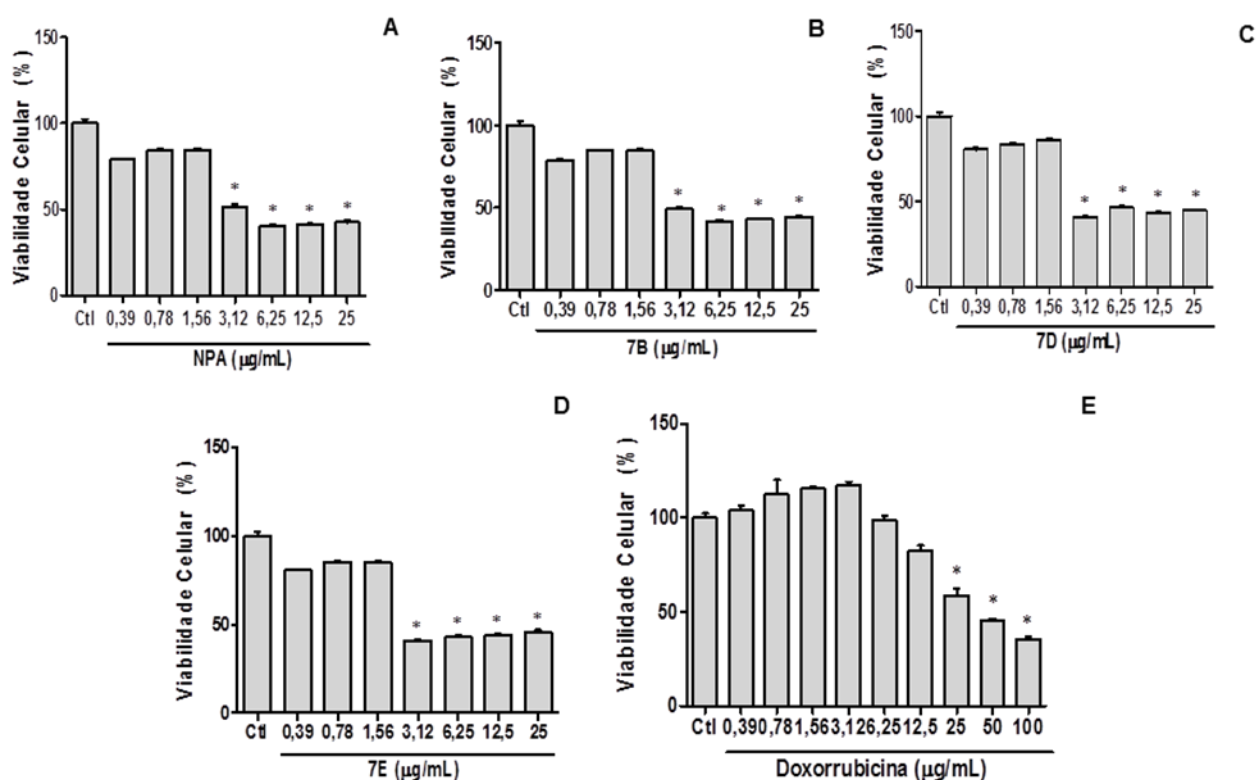


Figura 10 – Efeito dos nitroestirenos sobre a viabilidade de macrófagos murino J774A.1 expostos ao tratamento com diferentes concentrações 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas de tratamento com os nitroestirenos NPA (A), 7B (B), 7D (C), 7E (D) e padrão Doxorubicina (E). Os resultados estão expressos como (média \pm D.P.M) da porcentagem de células viáveis comparado ao controle de três experimentos independentes. Os valores de CI_{50} dos compostos foram calculados por regressão não-linear utilizando os testes estatísticos ANOVA/Dunnett's. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle. Software GraphPad Prism (versão 5.0) foi utilizado para análise estatística.

Os compostos supracitados obtiveram o valor da Concentração Inibitória de 50% como observado na tabela 5. Foi observado que os nitroestirenos testados nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram toxicidade para macrófagos murino comparado ao controle negativo somente com DMSO. Quando comparado ao fármaco padrão de indução de morte, Doxorubicina, nas concentrações 0.39-100 $\mu\text{g/mL}$, os nitroestirenos apresentaram toxicidade na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ o mesmo observado com fármaco padrão. Por outro lado, as menores concentrações dos nitroestirenos 0.39, 0.78 e 1.56 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram potencial de citotoxicidade na linhagem testada, tornando-se estas concentrações seguras para os ensaios posteriores. Assim, deixa claro que a atividade citotóxica desses compostos está relacionada à exposição às maiores concentrações, da mesma forma que Doxorubicina nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Em contrapartida, os nitroestirenos também foram testados nas concentrações de 3.12, 6.25, 12.5, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em células normais de pulmão humano MRC5, como controle negativo foi utilizado somente DMSO e controle positivo padrão Doxorubicina nas concentrações 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ como ilustra a (figura 11).

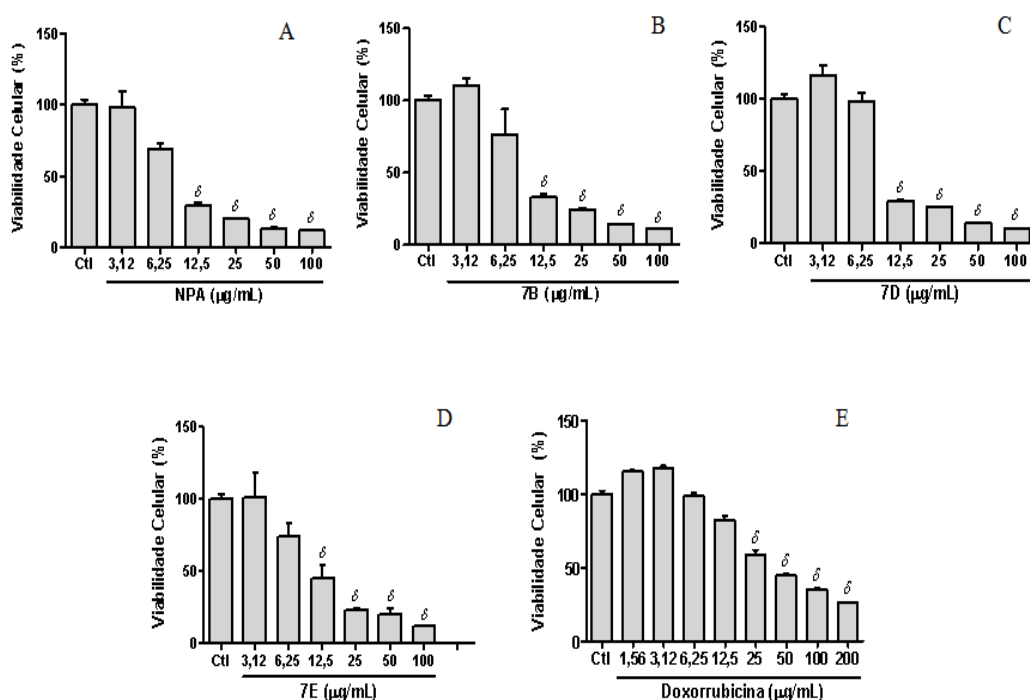


Figura 11 – Efeito dos nitroestirenos sobre a viabilidade de fibroblastos normal de pulmão humano MRC5 exposto a tratamento em diferentes concentrações 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 e 100 µg/mL após 24 horas de tratamento NPA (A), 7B (B), 7D (C), 7E (D) e padrão Doxorubicina (E). Os resultados estão expressos como (média±D.P.M) da porcentagem de células viáveis comparado ao controle de três experimentos independentes. Os valores de CI_{50} dos compostos foram calculados por regressão não-linear utilizando os testes estatísticos ANOVA/Dunnett's. $^{\delta}p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao controle. Software GraphPad Prism (versão 5.0) foi utilizado para análise estatística.

Tabela 5 – Citotoxicidade (CI_{50}) dos nitrocompostos com fármaco padrão doxorubicina testados em linhagens celulares de macrófago murino J774A.1 e fibroblasto normal de pulmão humano MRC5, o intervalo de confiança está representado entre os parênteses.

Compostos	CI_{50} (µg/mL)	
	J774A.1	MRC5
NPA	1.826 (1.487-2.241)	7.075 (5.273 – 9.492)*
7B	1.768 (1.278-3.929)	6.727 (3.837 – 11.78)
7D	1.421 (0.9879-2.043)	8.513 (7.450 – 9.728)
7E	1.528 (1.113-2.099)	6.893 (1.817 – 26.14)
Doxorubicina	16.12 (12.55 – 20.70)	16.12 (12.55 – 20.70)

*intervalo de confiança

Notou-se que todos os compostos NPA, 7B, 7D e 7E nas concentrações acima de 12.5 µg/mL apresentaram perfil de citotoxicidade e somente as concentrações 3.12 e 6.25 µg/mL não influenciaram a viabilidade de células normais quando comparadas ao controle negativo. Em todos os compostos a concentração de 12.5 µg/mL foi mais tóxica que o padrão de morte Doxorubicina na mesma concentração, apresentando assim redução significativa na viabilidade de células normais com CI_{50} 8.8, 7.4, 7.1, 7.2 µg/mL dos compostos NPA, 7B, 7D e 7E, respectivamente em um tempo de tratamento de 24 h.

Somente o composto NPA foi testado em macrófago de origem humana THP-1 e macrófago murino J774A.1 ambas linhagens de células testadas nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL do nitroestireno, sendo dessa vez utilizado o ensaio de viabilidade celular por MTT. Em macrófago murino o tempo de tratamento foi de 24 h, enquanto em células de macrófagos humano esse tempo correspondeu a 4 h de tratamento e esta última ativada com 100 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS). Como controle negativo, células não tratadas com o composto foram comparadas como

também o controle positivo correspondente a Doxorubicina nas concentrações 0.39-100 $\mu\text{g/mL}$ como ilustra as (figuras 12 e 13). Em concomitante aos experimentos foram capturadas imagens fotográficas nas concentrações supracitadas de macrófago murino, a fim de observar o comportamento morfofocelar e possível interferência do composto NPA na viabilidade celular como observado na (figura 14).

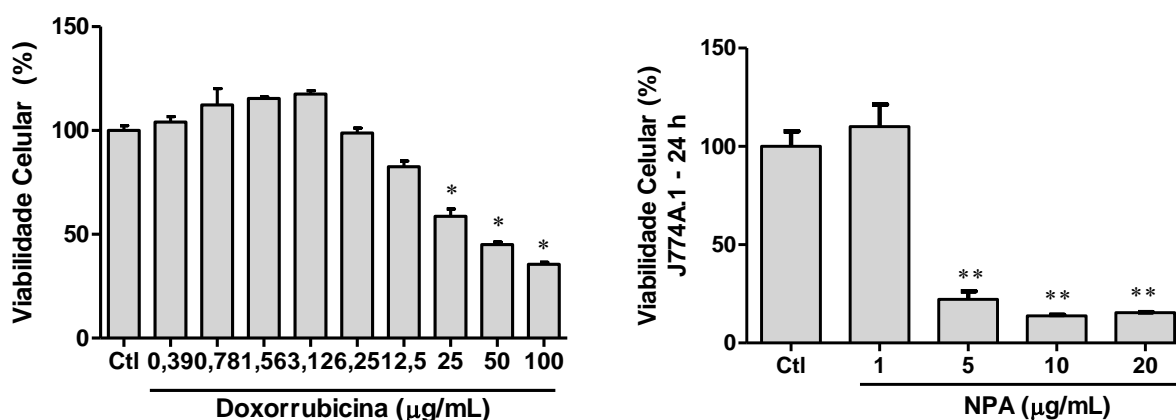


Figura 12 – Efeito concentração-resposta do NPA sobre a viabilidade de macrófagos murino J774A.1 em diferentes concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Ensaio realizado em triplicata e analisado em parâmetros dos testes de ANOVA/Dunnett's em (média \pm D.P.M). O valor de $**p < 0,01$ foi considerado significativo. Os dados foram analisados em Software GraphPad Prism (versão 5.0).

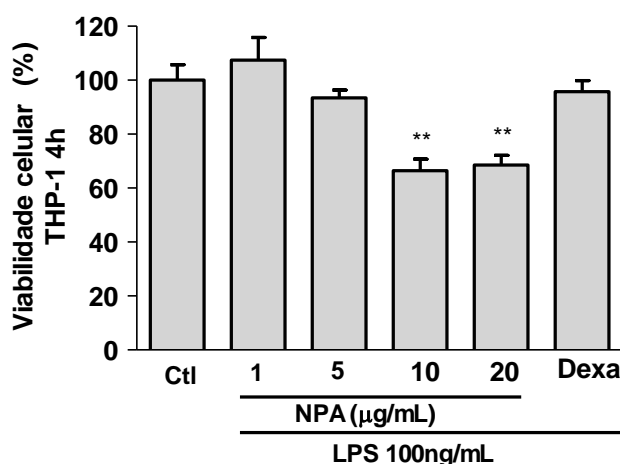


Figura 13 – Viabilidade de células THP-1 após ativação com LPS e tratamento com NPA em diferentes concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ e dexametasona 20 $\mu\text{g/mL}$. Os dados estão expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (média \pm EPM). $**p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle os dados foram realizados no programa de estatística Software GraphPad Prism (versão 5.0).

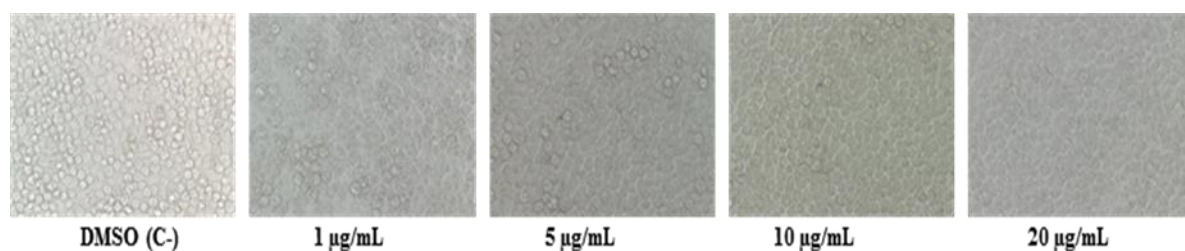


Figura 14 – Células de macrófago murino J774A.1 testadas com o nitroestireno NPA nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL e como controle negativo DMSO em ensaio colorimétrico de MTT. Fotos capturadas de microscópio de inversão LEICA DCF 310 FX em objetiva de 40x.

Foi constatado que, nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL NPA quando testado em macrófago murino apresentou potencial de citotoxicidade na linhagem observada comparado ao controle negativo com DMSO (figura 12), e apenas a concentração de 1 µg/mL não apresentou toxicidade, já o padrão Doxorubicina apresentou toxicidade nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. Em macrófagos THP-1 estimulado com 100 ng/mL de LPS, observamos que nas concentrações de 10 e 20 µg/mL apresentaram toxicidade comparada com o controle negativo. Nas imagens capturadas por visualização microscópica (figura 14), observamos diminuição no número de células a partir da concentração 10, 20 e 5 µg/mL comparado ao controle DMSO em células J774A.1.

5.2 Efeito dos nitroestirenos sobre inibição de óxido nítrico (NO \cdot)

Neste estudo os nitroestirenos foram avaliados quanto à capacidade de inibição da produção de NO \cdot em linhagem de macrófago murino J774A.1 ativado com 1 µg/mL de LPS. Os compostos NPA, 7B, 7D e 7E foram testados nas concentrações de 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL e utilizado como controle positivo o LPS, como controle negativo somente meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB e fármaco padrão Dexametasona testado nas concentrações de 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 e 20 µg/mL como mostra a (figura 15).

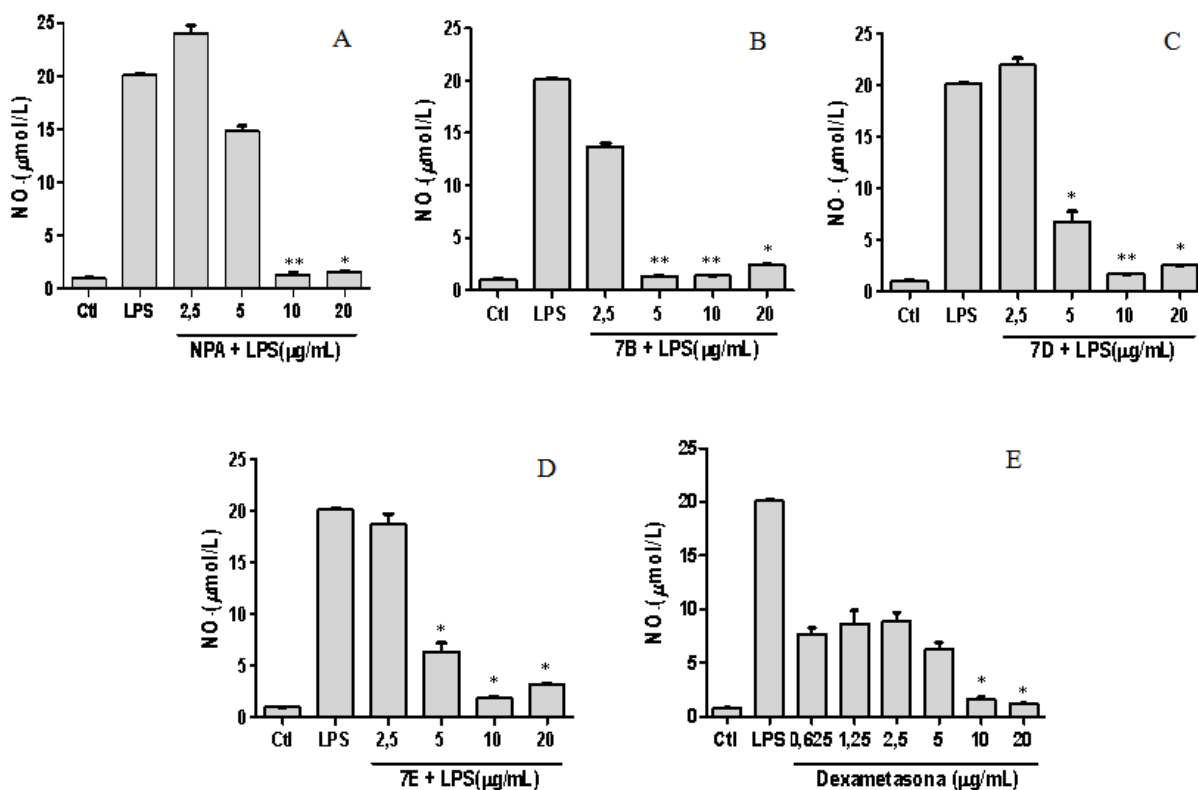


Figura 15 – Ensaio concentração-resposta dos compostos nitroestirenos. A quantificação de nitrito foi mensurada em sobrenadantes de macrófagos murino J774A.1 estimulados por 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS utilizando reagente de Griess. NPA (A), 7B (B), 7D (C), 7E (D) e padrão Dexametasona (E). Testes ANOVA/Dunnett's foram utilizados para análise entre os grupos. Os valores de * $p < 0.05$, quando comparado ao controle (com LPS) e ** $p < 0.001$ controle (sem LPS) foram considerados estatisticamente significativos. O ensaio foi realizado em triplicata e analisado como (média \pm D.P.M) em Software GraphPad Prism (versão 5.0).

Verificou-se que os compostos NPA, 7B, 7D e 7E apresentaram uma possível capacidade de inibição da produção de óxido nítrico nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$ e $p < 0.001$), enquanto que a concentração de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou inibição de $\text{NO}\cdot$ quando comparados ao padrão Dexametasona e controle negativo LPS.

5.3 Efeito do NPA sobre quantificação de TNF- α

Em seguimento aos ensaios, o NPA foi avaliado quanto à capacidade de inibição da citocina pró-inflamatória TNF- α e verificar quais possíveis vias de sinalização intracelular o referido composto poderia está inibindo. Assim sendo, o NPA foi testado nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ em sobrenadante de célula de macrófago humano THP-1 estimulado com 100 ng/mL de LPS, como controle positivo células com LPS e negativo sem LPS, o fármaco padrão de escolha foi Dexametasona na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ como observado na (figura 16).

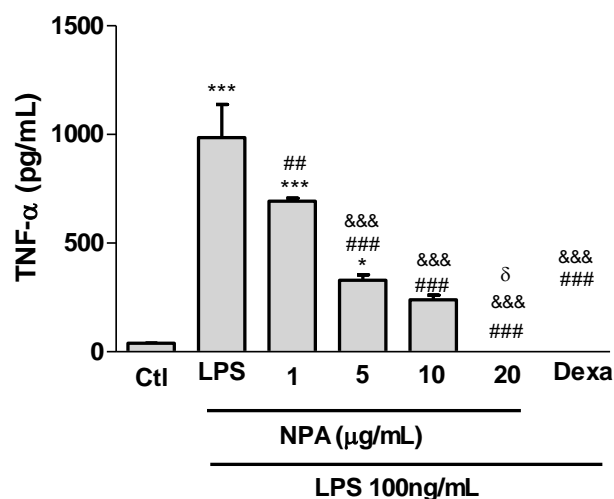


Figura 16 – Análise do efeito concentração-resposta do NPA nas concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ na produção de TNF- α utilizando macrófagos humano THP-1 ativados por LPS. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle (sem LPS). ### $p < 0.01$ quando ao grupo com LPS. &&& $p < 0.01$ quando comparado ao NPA 1 $\mu\text{g/mL}$. δ $p < 0.05$ quando comparado ao NPA 5 $\mu\text{g/mL}$.

Com base nos resultados fornecidos observamos que todas as concentrações 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$, como ilustra a (figura 16), foram capazes de reduzir a produção de TNF- α comparado ao controle LPS de maneira concentração-dependente. Nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ a capacidade de reduzir a produção da citocina TNF- α foi ainda mais significativa se comparado ao LPS, no entanto estas mesmas

concentrações apresentaram toxicidade quando avaliadas em ensaio de viabilidade por MTT, outra concentração investigada de 5 $\mu\text{g/mL}$ apresentou também redução de TNF- α comparado a Dexametasona, apenas concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ não foi equivalente ao padrão.

5.4 Avaliação do NPA sobre expressão de proteínas

Após ensaio de redução de TNF- α foi investigado por qual via de sinalização intracelular esse composto poderia inibir. Dessa maneira, o composto nitroestireno NPA foi avaliado nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ em ensaios por Western blot. Como controle interno foi utilizado β -actina e a fosforilação das proteínas P- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e P-ERK 1/2 avaliadas em blots conforme observado na (figura 17).

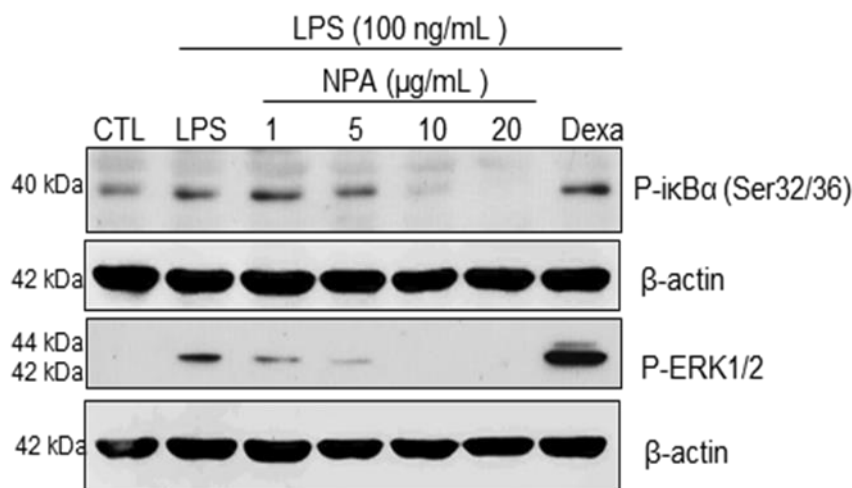


Figura 17 – Efeito do NPA sobre a expressão do mediador inflamatório iNOS e de moléculas-chaves de vias de sinalização da inflamação (P- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e P-ERK1/2) no ensaio dose-reposta em células THP-1 ativadas com LPS. Como controle interno, as membranas foram avaliadas com anti- β -actina. Ensaio realizado com sobrenadantes de células coletados ao final de experimentos realizados anteriormente. Os blots acima ilustrados foram realizados após extração de células de poços em quadruplicata.

Foi observado redução significativa de TNF- α nas concentrações 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ tanto na via P-ERK 1/2 quanto P- $\text{I}\kappa\text{B}$ expostas nas mesmas concentrações,

quando comparados ao controle positivo tratado com LPS e fármaco padrão de referência Dexametasona, apenas a concentração de 1 µg/mL não houve redução dos níveis de TNF-α como observados na (figura 17). Quando avaliado na via de sinalização intracelular P-ERK 1/2 foi observado à mesma resposta supracitada quando avaliadas as concentrações 10 e 20 µg/mL, entretanto as concentrações 1 e 5 µg/mL apresentaram-se com média capacidade anti-TNF-α enfatizando resposta do nitroestireno NPA de maneira concentração-dependente nesta via após aumento sucessivo das concentrações.

5.5 Resposta do NPA no ensaio de edema em modelo *in vivo* utilizando peixe Zebrafish

Neste estudo o NPA também foi avaliado quanto à sua capacidade anti-edematogênica em peixe da espécie *Danio rerio* conhecido como Zebrafish. Grupos de (n=5 peixes/grupo) foram utilizados para o ensaio, Dexametasona foi utilizado como fármaco padrão, carragenina como agente flogístico desencadeador da inflamação, controle negativo grupo com 5 peixes administrados somente com solução fisiológica a 0.9% e o composto nitroestireno NPA testado na concentração de 10 mg/kg em um tempo de tratamento de 4 h como ilustrado na (figura 18).

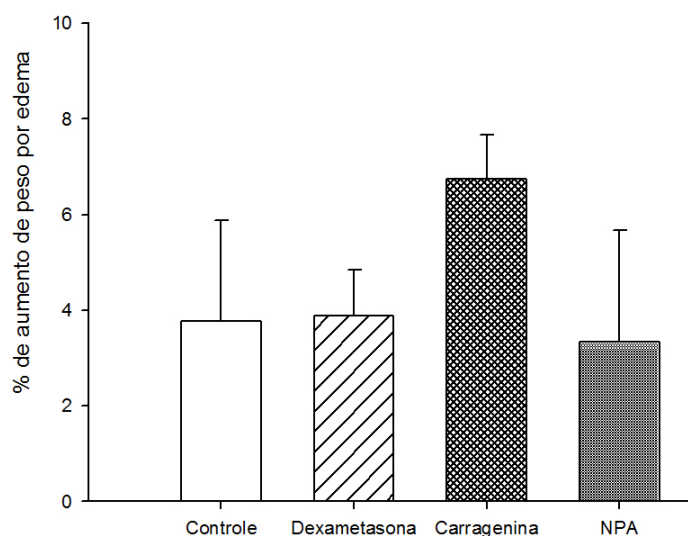


Figura 18 – Efeito do NPA no edema induzido por carragenina em peixe Zebrafish *Danio rerio* após 4h de tratamento. Análise foi realizada entre a variação da porcentagem de aumento do edema *versus* análise de composto NPA testado na concentração de 10 mg/kg. Dexametasona (0.5 mg/kg) foi utilizado como padrão e carragenina (20 mg/kg) como agente indutor da inflamação. Análise estatística foi realizada através do programa de estatística SigmaStat.

Como ilustrado na imagem acima o NPA obteve resposta estatisticamente significativa ou equivalente de grau anti-edematogênica após 4 h de tratamento da mesma forma que o padrão Dexametasona no mesmo tempo, após ação da carragenina em induzir o processo inflamatório.

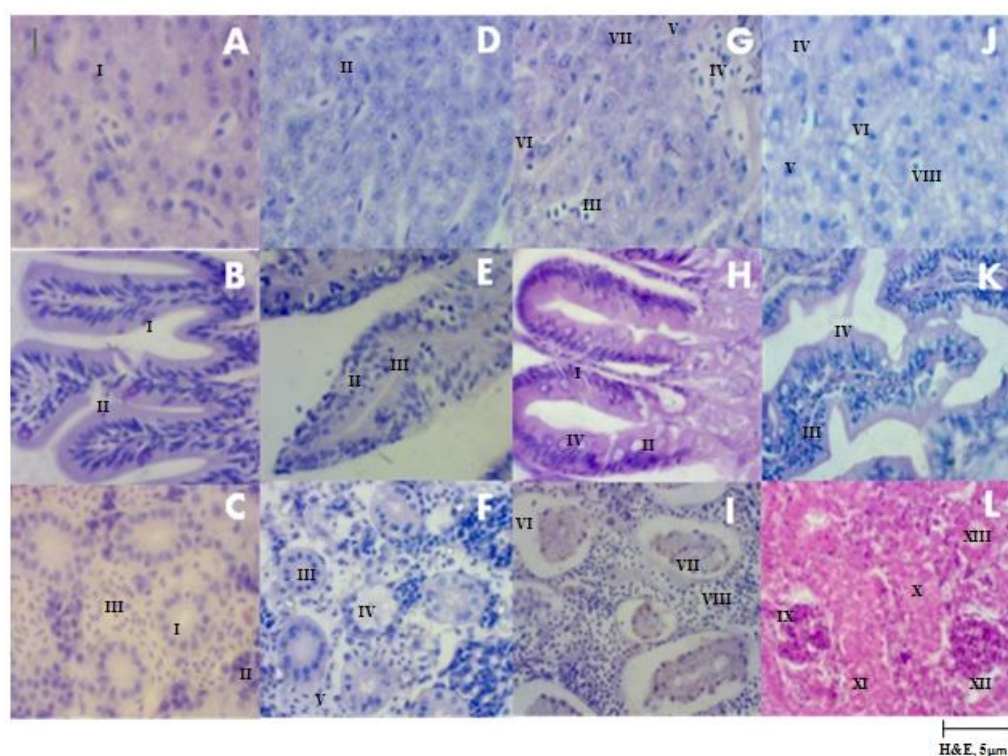


Figura 19 – Imagens de alguns órgãos de *Danio rerio* em cortes longitudinais expostos a subsequentes tratamentos com (n=5 peixes/grupo). (A) fígado normal de zebrafish com presença de hepatócitos [I], (D) fígado tratado com padrão dexametasona 0,5mg/mL, aumento singular em tamanho e frequência de hepatócitos [II], (G) fígado inflamado com vacuolização do citoplasma [III], infiltração de leucócitos [IV], degeneração nuclear [V], atipia do contorno nuclear [VI] e núcleos binucleóides [VII], (J) fígado exposto ao tratamento com NPA 10mg/mL, intensa vacuolização do citoplasma [VIII], degeneração nuclear [V], diminuição do glicogênio [IX], atipia do contorno nuclear [VI], (B) intestino normal, microvilosidades intestinais [I], epitélio colunar simples [II], (E) intestino tratado com dexametasona, infiltração de leucócitos [II], vilo [III], (H) intestino inflamado tratado com carragenina (I) infiltração de leucócitos, (II) edema e hiperemia, células caliciformes [IV] (K) intestino tratado com NPA infiltração de leucócitos [III] e contornos vesiculares [IV]. (C) rim normal com presença de túbulo distal [I], glomérulo [II], tecido linfóide [III], (F) rim tratado com padrão dexametasona, túbulo distal [III], aumento do lúmen tubular [IV], tecido linfóide [V], (I) rim inflamado aumento do espaço da cápsula de Bowman [VI], degeneração hialina [VII], tecido linfóide [VIII], (L) degeneração glomerular [IX], túbulo proximal [X], degeneração da hialina tubular [XI], aumento do espaço de Bowman [XII], espaço intercapsular [XII] e aumento do lúmen tubular [XIII], coloração H&E e cortes em 5µm.

Após o ensaio de edema, os animais foram submetidos à análise histopatológica como segue a (figura 19). Nesta etapa foram avaliados os cortes histológicos dos órgãos como: rins, fígado e intestino, seguindo-se os critérios avaliativos de Rigolin-Sá (1998), Takashima & Hibiya (1995) e Bernet e colaboradores (1999) como mostra as tabelas 2, 3 e 4.

Pode-se observar que houve infiltração de leucócitos e vacuolização citoplasmática em tecido inflamado, atípia e degeneração nuclear. Em todos os órgãos antes do tratamento, não foi identificado qualquer alteração histológica. A infiltração de leucócitos e presença de células caliciformes foi predominante no intestino dos animais tratados com o composto NPA. O aumento do número de hepatócitos no fígado foi marcante após tratamento com carragenina, além de abundante infiltração de leucócitos no mesmo órgão. Nos rins foi observado degeneração glomerular após tratamento com o nitroestireno.

5.6 Avaliação do NPA em modelo de pleurisia induzido por LPS *in vivo*

O NPA foi avaliado quanto à capacidade de inibir a migração de leucócitos na cavidade pleural de camundongos. Assim, foi testado aos animais 5.1 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de NPA igual concentração do fármaco padrão Dexametasona, após 1 h foi administrado LPS, agente indutor da inflamação, e 8 h após foi coletado o lavado pleural e realizado a contagem total e diferencial de leucócitos os quais foram utilizados como parâmetros marcados da resposta inflamatória.

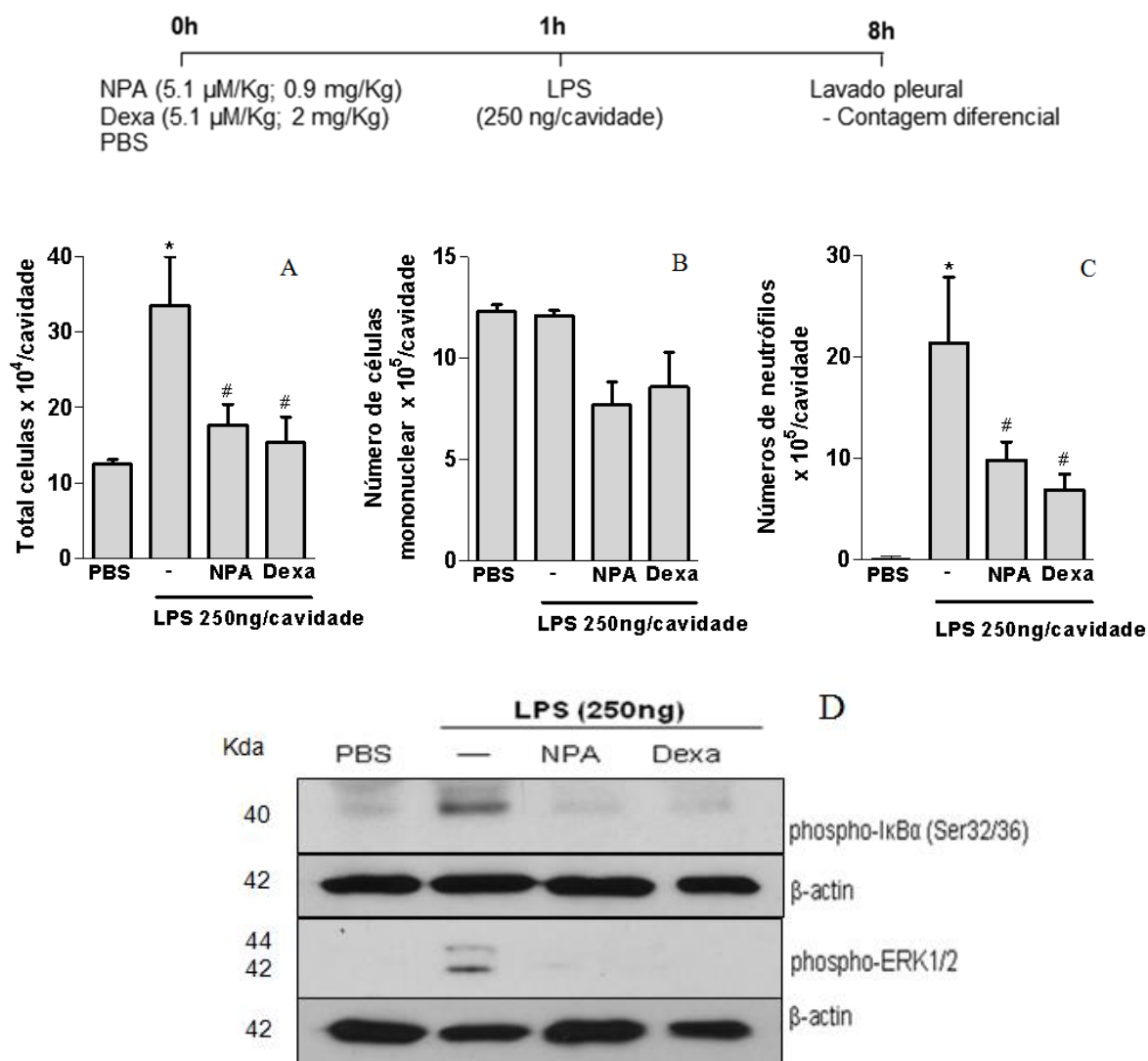


Figura 20 - Efeito do NPA em modelo de pleurisia induzida por LPS. Um grupo de animais foi tratado com dexametasona (dexa) para fins comparativos. Camundongos Balb/C foram tratados com NPA ou Dexa (5.1 $\mu\text{M}/\text{Kg}$, i.p.) e após 1h foram injetados com PBS ou LPS (250 ng/cavidade, i.pl.) e as células que migraram para a cavidade pleural foram coletadas após 7h de estímulo inflamatório. As células do

lavado pleural foram processadas para contagem total (A) e diferencial (B e C) e análise da expressão da forma fosforilada de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ e ERK 1/2 por Western blot (D). Os resultados são expressos como o número de células/cavidade e são mostrados como média \pm SEM de 4 animais em cada grupo. * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com animais injetados com PBS. Para controle da quantidade de proteína aplicada nas diferentes canaletas, as membranas foram incubadas com anti- β -actina.

Como observado na (figura 20-A) o NPA foi capaz de reduzir leucócitos totais da mesma maneira que o padrão dexametasona, assim como na inibição de neutrófilos (figura 20-B) com resposta equivalente a dexametasona e valores estatisticamente significativos. Quando avaliado a resposta em células mononucleares os valores não foram estatisticamente significativos. No ensaio de Western blot (figura 20-D) este nitroestireno foi capaz de inibir as vias NF- κ B e ERK 1/2 repetindo a mesma resposta que quando avaliado em macrófago humano THP-1.

6. DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta local do organismo a uma lesão sendo uma reação de defesa para eliminar ou limitar a propagação do agente prejudicial. A formação do edema, infiltração de leucócitos e formação de granuloma são, entre outros, algumas das respostas observadas no processo inflamatório. Entretanto, quando a inflamação deixa de ser controlada pelo corpo resulta em várias condições para o desenvolvimento de doenças como cardiovasculares, auto-imunes, asma e câncer. Muitos agentes anti-inflamatórios advêm de fontes naturais, outros de formulações sintéticas produzidas em laboratório as quais são utilizados na medicina como terapêuticos (OYEBANJI & ORIDUPA, 2014).

6.1 Avaliação dos nitroestirenos sobre a viabilidade celular

O presente trabalho propôs investigar a possível atividade anti-inflamatória de novos compostos da classe dos nitroestirenos. Assim esses compostos foram testados quanto sua capacidade de induzir toxicidade em células de macrófago murino e fibroblastos de pulmão humano no Laboratório de cultura de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Em paralelo a estes experimentos, outros ensaios foram realizado no grupo de pesquisa liderado pela Prof^a Dr^a Lirlândia Pires de Sousa–UFMG onde ensaios em macrófagos humanos THP-1 com o nitroestireno NPA foram realizados.

Esse perfil de citotoxicidade já foi abordado há algum tempo como descrito por Hsieh e colaboradores (2010) os quais destacaram que as propriedades citotóxicas dos β -nitroestirenos induzem de maneira peculiar os efeitos anti e pro apoptóticos em linhagens de células de câncer. A ligação insaturada nitro-olefínica dos β -nitroestirenos

tem sido reconhecida como um fragmento essencial na sua bioatividade, podendo interagir com proteína celular cisteína sulfidrilos via mecanismo de adição de Michael.

Em continuidade aos experimentos no estudo, os nitroestirenos NPA, 7B, 7D e 7E também apresentaram toxicidade nas maiores concentrações como visto na (figura 11) de células normais de pulmão humano MRC5, enquanto que as menores concentrações não apresentaram qualquer influência na viabilidade dos fibroblastos. Nota-se que a CI_{50} dos nitroestirenos tratados nas duas linhagens celulares não foi superior ao fármaco padrão Doxorubicina após 24 h de tratamento como observado na tabela 5. Nesta análise podemos destacar que não houve diferença entre tipos de linhagem celular a ação tóxica desses compostos, em ambas as linhagens celulares MRC5 e J774A.1 o perfil de citotoxicidade foi característico nas maiores concentrações testadas. As maiores concentrações também apresentaram citotoxicidade em THP-1 vista a diferentes períodos de incubação célula/composto como observado na (figura 13).

Outros estudos corroboram com a capacidade citotóxica da classe desses nitroestirenos como os de Xu e colaboradores (2012), onde retrataram que a toxicidade dessa classe de composto é deliberadamente dependente da proporção e posição de grupos estruturais nitro a anéis aromáticos. Neste contexto, na análise experimental com o nitrocomposto, megazol, agente tripanocida, foi descontinuada devido à toxicidade e mutagenicidade demonstrado nos ensaios *in vivo* (CARVALHO, 2003). Não obstante, o estudo de Wermuth (2000) abordou o efeito tóxico do nitrocomposto cloranfenicol, um conhecido antibacteriano que pode causar anemia aplásica e discrasias sanguíneas dependendo da dose e tempo em uso. Silva e colaboradores (2007) também avaliaram a citotoxicidade, dessa vez utilizando óleo essencial da *Aniba canelilla* rico em 1-nitro-2-feniletano precursor dos compostos sintéticos em estudo, e os resultados evidenciaram a

citotoxicidade do óleo na LC_{50} ($20.37 \pm 0.99 \mu\text{g/mL}^{-1}$) em ensaio de citotoxicidade utilizando larvas.

No acompanhamento morfológico de células da linhagem J774A.1 as diferentes concentrações testadas do NPA reduziram significativamente o quantitativo de células comparadas ao controle negativo de células não tratadas como observado na (figura 14).

Essa capacidade tóxica predominante nessa classe de compostos está relacionada à posição estrutural do grupo nitro frente à ligação com anéis aromáticos e a biorredução enzimática que resulta na formação de radicais livres com toxicidade direta para células bacterianas e parasitárias (KATZUNG, 2001; KAPPUS, 1986; MÜLLER, 1986). A biorredução enzimática *in vivo* do grupo nitro pode estar relacionada ao provável mecanismo de ação desses compostos e a interação dos produtos com biomoléculas essenciais de fungos, bactérias e parasitas (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009). Outro provável mecanismo de ação dos nitroestirenos é através da alquilação biorredutiva, onde o agente alquilante na reação descende da ativação endógena na proporção de redução do grupo nitro e subsequentes grupos hidroxila ou até amina, dessa forma o grupo nitro atuará como acceptor de elétrons na reação (ALMEIDA, 2009; VIODÈ et al., 1998).

6.2 Efeito dos nitroestirenos sobre inibição de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$)

Neste estudo foi observado o efeito dos compostos nitroestirenos NPA, 7B, 7D e 7E sobre a inibição da produção de $\text{NO}\cdot$ em macrófagos murino J774A.1 ativados por LPS. Em geral, pode-se observar que todos os compostos obtiveram a capacidade de inibir a produção de $\text{NO}\cdot$ em macrófago murino nas concentrações testadas, porém o

mecanismo não foi totalmente esclarecido, tendo em vista que não foi possível realizar a análise da expressão de mRNA da proteína iNOS por Western blot e/ou pela técnica de reação em cadeia de polimerase na linhagem de macrófago murino. A iNOS quando expressa libera maiores concentrações de NO \cdot . A influência da citotoxicidade dos compostos podem ter sido preponderante no ensaio, visto que as maiores concentrações testadas, apontaram maior porcentagem de inibição de NO \cdot e maior perfil de citotoxicidade.

O presente trabalho é apontado como o pioneiro neste estudo de inibição da produção de óxido nítrico NO \cdot direcionado aos novos compostos sintéticos NPA, 7B, 7D e 7E. Contudo a continuidade dos ensaios se faz necessário para a elucidação do mecanismo de inibição de iNOS e o sucessiva inibição de NO \cdot .

6.3 Efeito do NPA sobre a inibição da produção da citocina TNF- α em macrófago humano THP-1 ativado por LPS

O NPA também foi avaliado quanto à capacidade em reduzir a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α na linhagem celular de macrófago humano THP-1 estimulado por LPS. Todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir a atividade desta citocina se comparadas ao controle positivo de células tratadas somente com LPS como demonstra a (figura 16), além disso, as maiores concentrações apresentaram resposta ainda melhor que as demais, considerando dessa forma que o presente composto NPA apresenta resposta anti-TNF- α de maneira concentração-dependente.

TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória, sintetizada como uma proteína transmembrana com massa molecular de 26 kDa, passa por uma clivagem antes de ser liberada para a circulação como uma molécula solúvel (FALEIRO; ARAUJO;

VARAVALHO, 2011). Pertence a uma categoria de moléculas denominadas monocinas secretadas por macrófagos e ativadas por vários tipos de estímulos, inclusive por produtos bacterianos, acometendo vários processos patológicos (HANTEL et al., 2016).

Atua via dois receptores celulares específicos: o receptor 1 (TNFR1-p60) de 55 kDa e o receptor 2 (TNFR2-p80) de 75 kDa (BLASER; DOSTERT; BRENNER, 2016). A ativação via receptor TNFR1 é responsável pela maioria dos efeitos do TNF- α , desencadeando uma série de eventos intracelulares que resultam na ativação principalmente de fatores de transcrição (HANTEL, 2016). No núcleo, o NF- κ B se liga ao DNA e induz a transcrição de vários produtos de genes que regula a proliferação, invasão, inflamação, apoptose e metástase. TNF- α tem papel dúbio com mecanismos pro e anti-apoptóticos (ERKASAP, 2016), participa de uma ampla gama de atividades biológicas incluindo inflamação, crescimento, diferenciação e apoptose e é capaz de regular a expressão de outras citocinas (POLGREEN et al., 2016).

Estes resultados corroboram com os de Azevedo e colaboradores (2010), que utilizaram um nitrocomposto, Golimumabe, como novo alvo terapêutico anti-TNF- α no tratamento da artrite reumatóide, artrite psoriásica e espondilite anquilosante, após ensaios dose-resposta com pacientes submetidos a tratamento em longo prazo das doenças supracitadas. A atividade anti-TNF- α também foi descrita em estudo realizado por Harada; Okajima; Uchiba, (2006) os quais utilizaram Dalteparina, molécula de baixo peso molecular que tem sido eficaz no tratamento de coagulação intravascular. Neste estudo foi observado que Dalteparina apresentou atividade anti-TNF- α em ensaio utilizando ratos Wistar submetidos à isquemia e perfusão de fígado, para tanto este composto não somente reduziu a atividade da citocina TNF- α como também aumentou a produção de prostaciclina endotelial.

Os trabalhos descritos na literatura abordam a inibição da NF- κ B como mecanismo de ação principal do AAS por bloquear a fosforilação de I κ B inibindo o sítio de ação de IKKB e impedindo a expressão de diferentes genes, desta maneira diferentes grupos de pesquisa começaram a investigar se outras substâncias farmacológicas desta classe também possuíam o mesmo efeito inibitório deste fator em concentrações compatíveis com os utilizados na terapêutica, visto que outros nitrocompostos como sulfasalazina, trifusal, ibuprofeno, tepoxalina, indometacina também se apresentam como inibidores de NF- κ B.

6.4 Avaliação do efeito do NPA na fosforilação, ativação da expressão de proteínas envolvidas na inflamação

Com base nos resultados anti-TNF- α do nitroestireno NPA o ensaio de fosforilação de proteínas por Western blot, foi realizado para averiguar por quais vias de sinalização intracelular o fármaco seria capaz de atuar. Tendo em vista que macrófagos ativado por produtos bacterianos são capazes de ativar e dirigir diversas vias de sinalizar intracelular, o presente estudo foi direcionado para inibição da ativação das vias NF- κ B e ERK 1/2 após ensaio em macrófago humano THP-1 ativado por LPS.

A inibição de via de sinalização NF- κ B foi observada nas maiores concentrações (10 e 20 μ g/mL) como observado na (figura 17), onde pode ser notado a redução na expressão de P-I κ B α (Ser32/36), proteína específica que associa os dímeros NF- κ B formando trímeros (p50/p65/I κ B) impedindo que o NF- κ B se ligue ao DNA quando dentro do núcleo, além disso, essa forma trimérica obriga a retenção deste complexo no citoplasma. Em seguida, as menores concentrações não interferiram nos blots gerados no experimento.

A NF- κ B é uma proteína reguladora na expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B. Atualmente sabe-se que este fator está envolvido na transcrição de diversos genes envolvidos na resposta imunoinflamatória, entre eles genes envolvidos na apoptose e na transformação neoplásica celular (LUO et al., 2015). Pode ser ativado por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral TNF- α , interleucina 1 β , fatores ativadores de linfócitos T e B, lipopolissacarídeo bacteriano, proteínas virais, fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (KOIDE et al., 2015).

Quando livre a NF- κ B promove a regulação da expressão de múltiplos genes envolvidos na resposta inflamatória, incluindo moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, E-selectina, enzimas como COX-2, 5-LOX, cPLA e iNOS. E a maior parte das citocinas como IL-1 β , IL-6, GM, G-CSF e quimiocinas como IL-8, RANTES, MCP-1 e eotaxina (PATEL et al., 2015).

Nos resultados apresentados a redução nos níveis de P- κ B pode estar relacionado à degradação de κ B α e redução da translocação do NF- κ B para o núcleo da célula, outro mecanismo sugerido é a inibição antagônica por interações proteína-proteína dentro do núcleo, semelhante ao mecanismo dos glicocorticóides onde o receptor dos glicocorticóides se liga ao NF- κ B impedindo que este fator se ligue ao sítio específico do DNA, seqüestrando a porção p65 associada a PKAc, inibindo dessa forma a fosforilação do RNA polimerase II ou inibindo o NF- κ B associado a atividade histona acetiltransferase pela via histona desacetilase (NISSEN & YAMAMOTO, 2000).

Esses resultados corroboram com os de Zeng e colaboradores (2015), onde utilizaram derivados nitroestirenos para avaliar o efeito pleiotrópico de Retinóide X Receptor- α (RXR α) genes amplamente implicados no desenvolvimento de câncer da mesma forma que representam alvos intrigantes para a prevenção e tratamento do

câncer. Efeito sinérgico entre derivados nitroestirenos e estes genes revelaram a capacidade de inibir a ativação da via NF- κ B de maneira dose-dependente através da translocação nuclear de p65, degradação de ikB e fosforilação de IKK α/β , os derivados nitroestirenos Z-10 e Z-12 inibiram de forma significativa a redução da citocina TNF- α em linhagens de célula cancerosas MCF-7 e HEK293T testado neste mesmo estudo.

Neste estudo foi observado que as concentrações testadas do NPA foram capazes de exercer efeito anti-TNF- α por meio da inibição da via de sinalização P-ERK 1/2 comparados ao controle positivo de células expostas ao LPS e β -actina controle interno da reação. O possível mecanismo de ação se dá através da desfosforilação por fosfatases específicas, sendo que desta maneira a forma desfosforilada retorna ao citoplasma e se associa novamente a MEK 1/2. Dentre as fosfatases que desativam, ERK estão MKP/1 (CL-100), MKP3 (Pyst-1) que podem desfosforilar o motivo Thr (P)-Glu-Tyr(P) de ERK 1/2 ativadas, desta maneira a translocação da ERK para o núcleo fica dificultada e ativadores de transcrição como p90^{rsk}, fatores de transcrição como Elk-1 e Ets-1, proteínas adaptadoras como Sos, receptores de fatores de crescimento e de estrogênios deixam de serem transcritos.

MAPKs são um grupo de enzimas citoplasmáticas da família das proteínas quinases serina-treonina aos quais transmitem os sinais mitogênicos de diferenciação celular (ALIAGA et al., 1999). Segundo Pearson e colaboradores (2001), essas enzimas são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, tais como LPS, hipóxia e liberação de citocinas inflamatórias também regulam atividades celulares tais como expressão de genes, diferenciação celular, embriogênese, mitose, movimento, metabolismo e morte programada (JOHNSON & LAPADAT, 2002).

As três principais MAPKs que participam do mecanismo de sinalização, incluem a via ERK, p38 e JNK, as quais têm sido identificadas nas células dos

mamíferos (COWAN & STOREY, 2003), estão envolvidas na via de transdução de sinais que conduz a regulação de mediadores inflamatórios via ativação do fator de transcrição NF- κ B. A ativação da MAPK-p38 e JNK está geralmente associada à apoptose, enquanto que ERK 1/2 ativadas possuem função protetora, ou seja de inibir a atividade da apoptose (CROSS et al., 2000; YUE et al., 2000). ERK 1 e 2 são expressas amplamente e estão envolvidas na regulação de mitose, meiose e funções pós-mitóticas em células diferenciadas (JOHNSON & LAPADAT, 2002).

6.5 Efeito do NPA no edema induzido por carragenina em peixe Zebrafish

O objetivo deste experimento foi avaliar a resposta do NPA em reduzir o edema induzido por carragenina em Zebrafish e a possível atividade anti-inflamatória do NPA como ilustra a (Figura 18). Assim sendo, o NPA testado na concentração única de 10 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente o edema após 4 h de tratamento, essa resposta foi equivalente ao padrão dexametasona se comparados ao controle negativo, indicando dessa forma atividade anti-edematogênica do NPA como mostra a (Figura 18), entretanto não foi possível esclarecer por qual mecanismo de ação o fármaco atua, visto que a dosagem de citocinas pró-inflamatórias envolvidas no inflamação como iNOS e TNF- α não foram mensuradas por ensaio de Western blot e/ou reação em cadeia de polimerase PCR.

Poucas informações se têm a respeito do edema induzido por carragenina em zebrafish por se tratar de um modelo recente e em fase de padronização até mesmo na literatura internacional. Neste sentido, o presente estudo também tem caráter pioneiro estudando os efeitos de compostos desta classe neste modelo. Grande parte das informações trata-se das propriedades imunoestimulantes de I-carragenina e κ -carragenina em peixes teleósteos contra infecção bacteriana (CHENG et al., 2007).

Sabe-se que a injeção local de λ -carragenina induz inflamação local aguda em roedores e pode contribuir com a mesma resposta em zebrafish (FUJIKI et al., 1997). Estudos realizados por Timu & Robert (1977) verificaram a formação de granuloma, resposta inflamatória histopatológica em peixe teleosteo após administração de carragenina.

Nos estudos de Huang et al., (2014) foi abordado pela primeira vez o estudo do edema abdominal induzido por carragenina em modelo zebrafish em diferentes grupos de tratamento. A indução do edema foi constatada após os tempos de 8, 16 e 24 h com progressão significativa da área abdominal e a posterior análise da expressão de proteínas pró-inflamatórias envolvidas na inflamação como TNF- α e iNOS por Western blott, além da avaliação da proteína mieloperoxidase (MPO) e marcadores de leucócitos em tecido inflamado, análise histopatológica também foi inserida para comprovar a inflamação por carragenina no tecido abdominal em zebrafish adulto.

Após resposta inflamatória da carragenina, seguiu-se com o experimento na segunda fase onde também foi comprovado atividade anti-edematogênica de metilpredinisona (MP) e anticorpo anti-TNF- α além da inibição de iNOS, TNF- α , MPO e marcadores de leucócitos envolvidos na inflamação. Desta forma, ressalta-se que a resposta inflamatória em modelo zebrafish induz sintomas típicos da inflamação como inchaço, aumento de citocinas inflamatórias e leucócitos embora estes mesmos parâmetros sejam pertinentes no modelo clássico de edema de pata em roedores. Assim, com esses resultados relevantes, o modelo zebrafish pode contribuir da mesma forma como os modelos em roedores como mais um modelo *in vivo* de screening de drogas com todas as suas vantagens abordadas.

Nas análises histopatológicas do estudo foram observadas células caliciformes indicando absorção do composto pelo intestino. No fígado a atipia dos hepatócitos e vacuolização citoplasmáticas observadas juntamente com diminuição de glicogênio

podem ser segundo Rigolin-Sá (1998) aumento da quantidade de lipídeos combinado com agentes tóxicos que por ventura se acumulariam nos hepatócitos. As degenerações nucleares nos hepatócitos indicam o elevado grau de hepatotoxicidade de NPA. O aumento da infiltração de leucócitos nos órgãos tratados é característico de reação inflamatória como observado após tratamento com carragenina e NPA. Aumento/diminuição da cápsula de Bowman, degeneração glomerular e dilatação dos capilares podem comprometer a filtração renal de acordo com Takashima; Hibiya (1995) observadas com o tratamento de NPA.

Neste estudo pesquisas futuras como a dosagem de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e iNOS por Western blott são imprescindíveis para descrever por qual mecanismo e/ou via de sinalização intracelular o NPA pode está atuando neste modelo zebrafish e assim ratificar com mais detalhe essa resposta anti-edematogênica apresentada e retratando também a necessidade do estudo de toxicidade que este composto apresentou nas análises histológicas em estudo.

6.6 Avaliação do efeito do NPA em ensaio de migração celular em camundongos

Neste experimento, grupos de camundongos Balb/C foram previamente tratados com NPA e dexametasona ambos na concentração de 5.1 μ M/kg. Após 1 h de tratamento, foram desafiados com LPS 250 ng/cavidade e após 8 h realizado o lavado pleural para contagem dos leucócitos em modelo de pleurisia induzido por LPS.

Assim, foi observado na (figura 20), a capacidade do NPA em inibir a migração em leucócitos totais, leucócitos mononucleares e neutrófilos. Os resultados foram estatisticamente significativos se comparados ao controle LPS com valores de $p < 0.05$ e $p < 0.001$ e ao padrão dexametasona. Essa capacidade em inibir a migração leucocitária para cavidade pleural está relacionada à inibição das vias NF- κ B e ERK

1/2, como observado na (figura 20-D), em ensaio de Western blot utilizando β -actina como controle interno da reação.

Neste ensaio, foi observado que o NPA atua impedindo a translocação do NF- κ B para o núcleo da célula, coordenado pela degradação proteossômica da proteína I κ B α via de fundamental importância na transcrição de genes de citocinas envolvidas na resposta inflamatória e migração leucocitária, outra via de sinalização que foi bloqueada é a ERK 1/2, possivelmente através da desfosfatação de fosfatases específicas impedindo-a de chegar ao núcleo da célula e iniciar nova transcrição gênica como observado no ensaio da quantificação da citocina TNF- α . Por fim, NPA inibiu a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório no modelo experimental de pleurisia induzida por LPS, sugerindo modulação na expressão de moléculas de superfície celular e/ou produção de citocinas/quimiocinas importantes para o processo de migração de leucócitos para o sítio inflamado.

O modelo da pleurisia foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR, 1956) e mais tarde reproduzido em cobaias (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1989) e camundongos (HENRIQUES et al.,1990). Este modelo possibilita a avaliação da exsudação, migração celular, bem como a participação de diversos mediadores como citocinas e enzimas. Na pleurisia a inflamação é caracterizada pelo aumento exacerbado de leucócitos do tipo neutrófilos e da exsudação 4 h após a administração do LPS na cavidade pleural. Dessa forma, na cavidade pleural de animais inflamados, ocorre a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios como citocinas, espécies reativas de oxigênio, bradicinina, substância P e histamina (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; DA CUNHA et al., 2001; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Os neutrófilos são as primeiras células sanguíneas a serem recrutadas para o tecido lesionada contribuindo para destruição do patógeno e cicatrização do tecido

(MEDZHITOV, 2010). Esse recrutamento pode ser iniciado por fatores derivados de hospedeiro como citocinas, quimiocinas, metaloproteinases e componentes microbianos como LPS, este último liga-se ao receptor do tipo Toll e desencadeia a ativação de diversas vias de sinalização intracelular como MAPK, AP-1, STAT, IRF3 sendo a via NF- κ B uma das principais vias ativadas, ao qual promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

No ensaio dirigido por Cailhier et al., (2006) observaram que macrófagos da cavidade pleural quando estimulados com LPS, produzem níveis elevados de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Essas citocinas são de extrema importância para o início da fase aguda da inflamação, induzindo a expressão de moléculas de adesão nos leucócito e células endoteliais, que conseqüentemente facilitam a diapedese de leucócitos, além de induzirem a produção de proteínas de fase aguda (MEDZHITOV, 2010).

Nos estudos de Yeh et al, (2008) o modelo de pleurisia induzido por ratos demonstrou inibir neutrófilos no lavado broncoalveolar e da concentração de NO \cdot exalado, utilizando inibidores de iNOS seletivos e não seletivos, da mesma forma que o inibidor da NOS aminoguanidina reduziu as concentrações séricas de NO \cdot e TNF- α .

Trabalhos dirigidos por Sousa et al., (2010) foi constatado que AMP cíclico promovido pelo tratamento de rolipram (inibidor PDE4), foi capaz de promover a resolução da inflamação induzida pela apoptose de eosinófilos e neutrófilos via mecanismo dependente da ativação de caspases, e da inibição de algumas vias de sinalização na sobrevivência celular.

6.7 Possível mecanismo de ação do nitroestireno NPA

Com base na resposta anti-TNF- α do composto nitroestireno NPA, o ensaio de inibição da ativação de vias de sinalização intracelular foi necessário para a continuidade dos experimentos. Neste contexto, observou-se que o composto nitroestireno NPA inibiu as vias de sinalização NF- κ B provavelmente pela capacidade do composto em impedir a translocação do NF- κ B para o núcleo da célula, após degradação da proteína $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, e em paralelo bloqueando a via ERK 1/2 na transcrição gênica no núcleo da célula como observado na (figura 21).

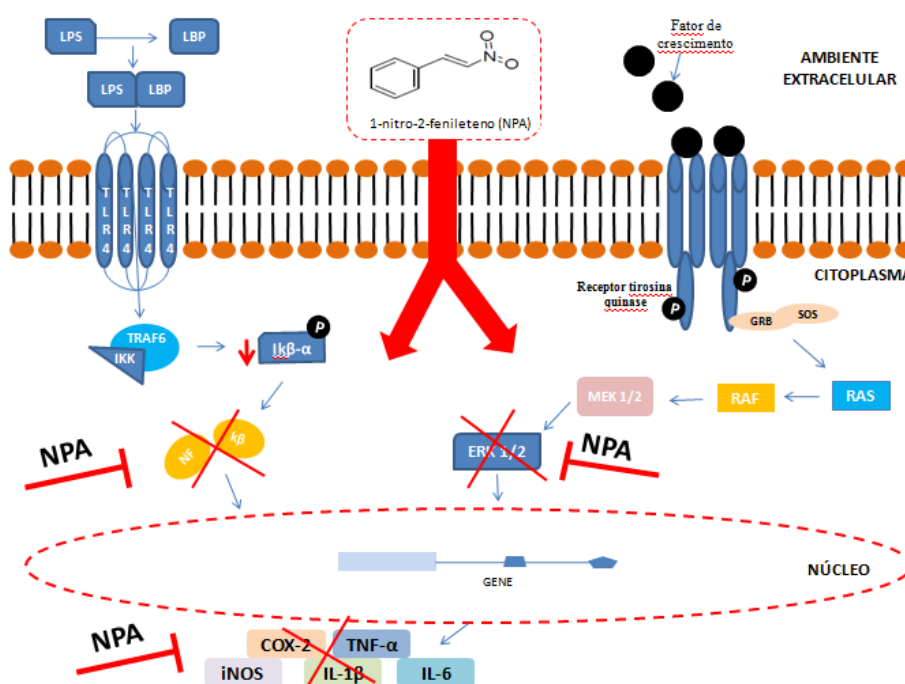


Figura 21 – Mecanismo de ação do composto nitroestireno NPA

Assim sendo, podemos retratar uma possível ação anti-inflamatória do composto NPA atuando de forma peculiar na inibição das vias de sinalização NF- κ B e ERK 1/2 .

7. CONCLUSÕES

Os compostos nitroestirenos testados apresentaram citotoxicidade significativa nas células de macrófago murino J774A.1 e fibroblasto de pulmão humano MRC5. Além disso, o composto nitroestireno NPA foi capaz de inibir ativação de macrófagos por LPS, quando monitorado a diminuição dos níveis de óxido nítrico e fator de necrose tumoral em macrófago murino e humano, respectivamente. Essa resposta está relacionada com a inibição das vias envolvidas na resposta inflamatória como NF- κ B e ERK 1/2.

Nos ensaios *in vivo*, o NPA foi capaz de reduzir o edema induzido por carragenina em peixe zebrafish da mesma forma que inibiu a migração de leucócitos em modelo de pleurisia em camundongos, o qual foi relacionado também à inibição das vias de sinalização NF- κ B e ERK 1/2 avaliadas pelo método de Western blot.

Com base nos experimentos realizados, pode-se propor que o provável mecanismo de ação anti-inflamatória destes compostos pode está relacionado à inibição das vias de sinalização intracelular NF- κ B e ERK 1/2, as quais participam da produção de outras moléculas inflamatórias.

Por fim, o presente estudo trata-se do primeiro trabalho o qual aborda atividade biológica desses compostos. Entretanto, novos estudos serão necessários a fim de elucidar os efeitos tóxicos abordados e tentar caracterizar melhor essa atividade anti-inflamatória apresentada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAWSARI, F.S.; AGUIAR, R.P.; WIIRZLER, L.A.M.; ORTIZ, R.S.; ALJUHANI, N.; CUMAN, R.K.N.; FRANCO, J.L.M.; SIRAKI, A.G.; MARTÍNEZ, C.A.V. Anti-inflammatory and antioxidant properties of a novel resveratrol salicylate hybrid analog. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25 jan. 2016.

ALMEIDA, L.V. **Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de 2-[5-nitrotiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4 oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2009. Universidade de São Paulo – USP.

ARRUDA BARBOSA, L.; RODRIGUES, K.M.S.; SOUZA-NETO, F.C.V.; DUARTE, G.P.; BORGES, R.S.; MAGALHAES, P.J.C.; LAHLOU, S. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 55–62, nov. 2014.

AZEVEDO, V.F.; FAVRETTO, L.G.; JUNIOR, M.A.S. Golimumabe : um novo agente anti-TNF. **Revista Médica**, v. 3, p.130-133, 2010.

BARTELS, M.; CALGAROTTO, A.K.; MARTENS, A.C.; MASO, V.; SILVA, S.L.; BIERINGS, M.B.; QUEIROZ, M.L.S.; COFFER, P.J. Differential effects of nitrostyrene derivatives on myelopoiesis involve regulation of C/EBP α and p38MAPK activity. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90586, jan. 2014.

BERNET, D. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, jan. 1999.

BORGES, F.R.M.; SILVA, M.D.; CORDOVA, M.M.; SCHAMBACH, T.R.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, p. 144-150, 2014.

BHAT, K.A.; SHAH, B.A.; GUPTA, K.K.; PANDEY, A.; BANI, S.; TANEJA, S.C. Semi-synthetic analogs of pinitol as potential inhibitors of TNF-alpha cytokine expression in human neutrophils. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 7, p. 1939–43, 1 abr. 2009.

BLASER, H.; DOSTERT, C.; MAK, T.W.; BRENNER, D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, p. 1–13, jan. 2016.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principal of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUGMAN, S. The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. **Developmental & Comparative Immunology**, p. 1-11, fev. 2016.

CAILHIER, J.F.; SAWATZKY, D.A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, D.; LANG, R.A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J.; HUGHES, J. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 5, p. 540-547, Mar 1 2006.

CALHEIROS, R.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M.P.M. β -Nitrostyrene derivatives a conformational study by combined Raman spectroscopy and ab initio MO calculations. **Journal of Molecular Structure**, v. 692, n. 1-3, p. 91–106, abr. 2004.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v. 26, n. 3, 2003.

CARTER, K. C.; FINNON, Y. S.; DAEID, N. N.; ROBSON, D. C.; WADDELL, R. The effect of nitroestylene in cell proliferation and macrophage immune responses. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 24, p. 187, 2002.

CIEMNIECKI, J.A.; LEWIS, C.P.; GUPTON, J.T.; STENGER, K.F. Effects of a Pyrrole based, microtubule depolymerizing compound on RAW 264.7 macrophages. **Chemico Biological Interactions**, v. 246, p. 63–68, jan. 2016.

COWAN, K.J.; STOREY, K.B. Mitogen activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **Journal of Experimental Biology**. v. 206, n. 7, p. 1107-1115, apr. 2003.

COOKE, J.P. Nitric oxide and angiogenesis. **Circulation**, v. 105, n. 18, p. 2133–2135, 7 maio 2002.

CUONG., T.D.; HUNG, T.M.; LEE, J.S.; WEON, K.Y.; WOO, M.H.; MIN, B.S. Anti-inflammatory activity of phenolic compounds from the whole plant of *Scutellaria indica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 5, p. 1129–34, 1 mar. 2015.

CHAKRABORTY, P.; SARASWAT, G.; KABIR, S. N. α -Dihydroxychalcone-glycoside (α -DHC) isolated from the heartwood of *Pterocarpus marsupium* inhibits LPS induced MAPK activation and up regulates HO-1 expression in murine RAW 264.7 macrophage. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 277, n. 1, p. 95–107, 15 may. 2014.

CHEN, W.; GE, X.; XU, F.; ZHANG, Y.; LIU, Z.; PAN, J.; SONG, J.; DAI, Y.; ZHOU, J.; FENG, J.; LIANG, G. Design, synthesis and biological evaluation of paralleled Aza resveratrol-chalcone compounds as potential anti-inflammatory agents for the treatment of acute lung injury. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 15, p. 2998–3004, 1 ago. 2015.

CHEN, I.H.; CHANG, F.R.; WU, Y.C.; KUNG, P.H.; WU, C.C. 3,4-Methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits adhesion and migration of human triple-negative breast cancer cells by suppressing β 1 integrin function and surface protein disulfide isomerase. **Biochimie**, v. 110, p. 81–92, mar. 2015.

CHENG, J.; MA, T.; LIU, W.; WANG, H.; JIANG, J.; WEI, Y.; TIAN, H.; ZOU, N.; ZHU, Y.; SHI, H.; CHENG, X.; WANG, C. In *in vivo* evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activities of compound *Muniziqi granule* in experimental animal models. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 20, 2016.

CHENG, A.C; TU, C.W; CHEN, Y.Y; NAN, F.H; CHEN, J.C. The immunostimulatory effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunology**, v.22, p.197–205, 2007.

CHUNG, K. F. Inflammatory biomarkers in severe asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.18, p.35–41, 2012.

CROSS, T.G.; SCHEEL-TOELLNER, D.; HENRIQUEZ, N.V.; DEACON, E.; SALMON, M.; LORD, J.M. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 34-41, 2000.

DA CUNHA, F.M; FRODE, T.S.; MENDES, G.L.; MALHEIROS, A; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. Additional evidence of the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. **Life Sciences, Amsterdam**, v. 70, n. 2, p. 159-169, 2001.

DEL-ÁNGEL, M.; NIETO, A.; RAMÍREZ-APAN, T.; DELGADO, G. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. **European Journal of Pharmacology**, v. 752, p. 40–8, n. 5, abr. 2015.

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Nitric oxide revision. Artigo de Revisão, v. 39, n. 4, p. 343-350, 1980.

DZOYEM, J.P.; ELOFF, J.N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 194–201, 3 fev. 2015.

FALCON, D.F.; GIOVANNI, C.D.; CERCHIA, C.; STEFANO, D.D.; CAPUOZZO, A.; IRACE, C.; IUVONE, T.; SANTAMARIA, R.; CARNNUCIO, ROSA.; LAVECCHIA, A. Novel non-peptide small molecules preventing IKK β /NEMO association inhibit NF- κ B activation in LPS-stimulated J774 macrophages. **Biochemical Pharmacology**, p. 1–12, 14 jan. 2016.

FATHI, A.R.; KRAUTHEIM, A.; KAAP, S.; EGER, K.; STEINFELDER, H.J. Michael adducts of ascorbic acid as inhibitors of protein phosphatase 2A and inducers of apoptosis. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n.14, p.1605–1608, jul. 2000.

FALEIRO, L.R.; ARAUJO, L.H.R.; VARAVALLO, M.A. A terapia anti-TNF- α na artrite reumatóide. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 77–94, 30 jul. 2011.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, M.; SCHWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase sozymes, characterization, purification, molecular, cloning and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p.1121-1131, 1994.

FUJIKI, K.; SHIN, D.H; NAKAO, M.; YANO, T. Protective effect of kappa-carrageenan against bacterial infections in carp *Cyprinus carpio*. **Journal of the Faculty Agriculture, Kyushu University**, v. 42, p. 113–119, 1997.

FRODE, T.S., MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v. 10, n. 4, p. 223–227, 2001.

GABOURY, P.; KUBES, P.; KANWAR, T. A. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **Research Communications**. v. 7, p.1293–1299, 1993.

GALINDO VILLEGAS, J. Recent findings on vertebrate developmental immunity using the zebrafish model. **Molecular Immunology**, nov. 2015.

GASPARINI, C.; CELEGHINI, C.; MONASTA, L.; ZAULI, G. NF- κ B pathways in hematological malignancies. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 71, n. 11, p. 2083–102, jun. 2014.

GHOSH, C.; HONG, B.; BATABYAL, S.; JEON, T.; YANG, S.H.; HWANG, S.G. Anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Dictamnus dasycarpus* leaf in lipopolysaccharide-activated macrophages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 330, jan. 2014.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [N¹⁵ nitrates] in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 26, p. 131-138, 1982.

HARADA, N.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M. Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia reperfusion induced liver injury in rats. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 7, p. 1883–91, jul. 2006.

HANTEL, C.; OZIMEK, A.; LIRA, R.; RAGAZZON, B.; JACKEL, C.; FRANTSEV, R.; REINCKE, M.; BERTHERAT, J.; MUSSACK, T. TNF alpha signaling is associated with therapeutic responsiveness to vascular disrupting agents in endocrine tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 423, p. 87–95, 5 mar. 2016.

HELAL, M.H.; EL-AWDAN, S.A.; SALEM, M.A.; ABD-ELAZIZ, T.A.; MOAHAMED, Y.A.; EL-SHERIF, A.A.; MOHAMED, G.A.M. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of novel series of pyridine derivatives as anticancer,

anti-inflammatory and analgesic agents. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 764–773, jan. 2015.

HE, Y.; VARADARAJAN, S.; PLANILLO-MUNOZ, R.; BURBERRY, A.; NAKAMURA, Y.; NUNEZ, G. 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 2, p. 1142–50, 10 jan. 2014.

HENRIQUES, M.G.M.O; WEG, V.B.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M.R.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGAFTIG, B.B. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, n. 1, p. 164–168, 19 jan. 1990.

HENRIQUES, G.M.O; MIOTLA, J.M.; CORDEIRO, R.S.B.; WOLITZKY, B.A.; WOOLLEY, S.T.; HELLEWELL, P.G. Selectins mediate eosinophil recruitment in vivo: a comparison with their role in neutrophil influx. **Blood**, v.87, n.12, p. 5297–5305, 2016.

HUSAIN, A.; AHMAD, A.; KHAN, S.A.; ASIF, M.; BHUTANI, R.; AL-ABBASI, F.A. Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted imidazolidine derivatives in search of potent anti-inflammatory agents. **Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 24, n. 1, p. 104–14, jan. 2016.

HUANG, X.; NGUYEN, A.T.; LI Z; EMELYANOV, A.; PARINOV, S.; GONG, Z. One step forward: the use of transgenic zebrafish tumor model in drug screens. **Birth Defects Research. Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, p.173–81, 2011.

HUANG, S.Y.; FENG, C.W.; HUNG, H.C.; CHAKRABORTY, C.; CHEN, C.H.; CHEN, W.F.; JEAN, Y.H.; WANG, H.M.D.; SUNG, C.S.; SUN, Y.M.; WU, C.Y.; LIU, W.; HSIAO, C.D.; WEN, Z.H. A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104414, jan. 2014.

HUANG, B.P.; LIN, C.H.; CHEN, H.M.; LIN, J.T.; CHENG, Y.F.; KAO, S.H. AMPK Activation inhibits expression of proinflammatory mediators through downregulation of PI3K/p38 MAPK and NF- κ B signaling in murine macrophages. **DNA and Cell Biology**, v. 34, n. 2, p. 133–41, fev. 2015.

HUNG, A.C.; TSAI, C.H.; HOU, M.F.; CHANG, W.L.; WANG, C.H.; LEE, Y.C.; KO, A.; HU, C.S.; CHANG, F.R.; HSIEH, P.W.; YUAN, S.S.F. The synthetic β -nitrostyrene derivative CYT-Rx20 induces breast cancer cell death and autophagy via ROS-mediated MEK/ERK pathway. **Cancer Letters**, v. 371, n. 2, p. 251–61, 28 fev. 2016.

HSIEH, P.W.; CHANG, Y.T.; CHUANG, W.Y.; SHIH, H.C.; CHIANG, S.Z.; WU, C.C. The synthesis and biologic evaluation of anti-platelet and cytotoxic β -nitrostyrenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 7621–7, 1 nov. 2010.

INDUSMITA ROUTRAY & SHAKIR ALI. Boron induces lymphocyte proliferation and modulates the priming effects of lipopolysaccharide on macrophages. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0150607, jan. 2016.

JAFFE, K.M, THIBERGE, S.Y, BISHE, M.E, BURDINE, R.D. Imaging cilia in zebrafish. **Methods in Cell Biology. Elsevier**, v. 97, p.415–435, 2010.

JERALA ROMAN. Structural biology of the LPS recognition. **International Journal of Medical Microbiology:IJMM**, v. 297, n. 5, p. 353–63, set. 2007.

JOO, T.; SOWNDHARARAJAN, K.; HONG, S.; LEE, J.; PARK, S.Y.; KIM, S.; JHOO, J.W. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. Saudi. **Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 5, p. 427–35, nov. 2014.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, Stanford, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.

KAAP, S.; QUENTIN, I.; TAMIRU, D.; SHAHEEN, M.; EGER, K. Structure activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effect of nitrostyrene adducts and related compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 603–610 2000.

KAMAL, A.; AHMED, S.K.; REDDY, K.S.; KHAN, M.N.A.; SHETTY, R.V.C.R. N.C.; SIDDHARDHA, B.; MURTHY, U.S.N.; KHAN, I.A.; KUMAR, M.; SHARMA,

S.; RAM, A.B. Anti-tubercular agents. Part IV: Synthesis and antimycobacterial evaluation of 83 nitroheterocyclic-based 1,2,4-benzothiadiazines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5419–5422, 2007.

KAPPUS, H.; Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. **Biochemical Pharmacology**, v 35, n. 1; pag. 01, 1986.

KARIN, M.; CAO, Y.; GRETEN, F.R.; LI, Z.W. NF- κ B in cancer : from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n., p. 1–10, apr. 2002.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8^a Edição, Editora: Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.

KIM, M.H.; SON, Y.J.; LEE, S.Y.; YANG, W.S.; YI, Y.S.; YOON, D.H.; YANG, Y.; KIM, S.H.; LEE, D.; RHEE, M.H.; KANG, H.; KIM, T.W.; SUN, G.H.; CHO, J.Y.. JAK2-targeted anti-inflammatory effect of a resveratrol derivative 2,4-dihydroxy-N-(4-hydroxyphenyl)benzamide. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1747–61, 15 dez. 2013.

KIM, J.H.; KIM, J.H.; LEE, G.E.; LEE, J.E.; CHUNG, K.I. Potent inhibition of human telomerase by nitrostyrene derivatives. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 5, p.1117–1124, fev. 2003.

KOIDE, N.; KANEDA, A.; YOKOCHI, T.; UMEZAWA, K. Inhibition of RANKL- and LPS-induced osteoclast differentiations by novel NF- κ B inhibitor DTCM-

glutarimide. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 162–168, 21 jan. 2015.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Target Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471–479, 1 aug. 2005.

KUMAR, V.; JAGGI, M.; SINGH, A.T.; MADAN, A.; SANNA, V.; SINGH, P.; SHARMA, P.K.; IRCHHAIYA, R.; BURMAN, A.C. 1,8-Naphthyridine-3-carboxamide derivatives with anticancer and anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3356–62, ago. 2009.

KUNDU, J.K.; SURH, Y.J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 15–30, mar. 2008.

KHLOYA, P.; KUMAR, S.; KAUSHIK, P.; SURAIN, P.; KAUSHIK, D.; SHARMA, P.K. Synthesis and biological evaluation of pyrazolylthiazole carboxylic acids as potent anti-inflammatory-antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 6, p. 1177–81, 15 mar. 2015.

KLIMP, A.H.; VRIES, E.G.E.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143–161, nov. 2002.

LAWRENCE, T; FONG, C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 42, p. 519–523, 2010.

LEONG, S.W; FAUDZI, S.M.M.; ABAS, F.; ALUWI, M.F.F.M.; RULLAH, K.; WAI L.K.; BAHARI, M.N.A.; AHAMAD. S.; THAM, C.L.; SHAARI, K.; LAJIS, N.H. Synthesis and sar study of diarylpentanoid analogues as new anti-inflammatory agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 10, p. 16058–16081, jan. 2014.

LIMA, A.B.; SANTANA, M.B.; CARDOSO, A.S.; SILVA, J.K.R.; MAIA, J.G.S.; CARVALHO, J.C.T.; SOUSA, P.J. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of *Aniba canelilla* essential oil. **Phytomedicine:International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 16, n. 6-7, p. 555–559, jun. 2009.

LOWENSTEIN, C.J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger minireview. **Cell Press** v. 70, p. 705–707, 1992.

LOYNES, C.A; MARTIN, J.S; ROBERTSON, A; TRUSHELL, D.M.I; INGHAM, P.W. Pivotal Advance: Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. **Journal of Leukocyte Biology**, v.87, p. 203–212, 2010.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145–51, maio 2008.

LUO, H.; WANG, J.; QIAO, C.; MA, N.; LIU, D.; ZHANG, W. Pycnogenol attenuates atherosclerosis by regulating lipid metabolism through the TLR4-NF- κ B pathway. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 10, p. e191, jan. 2015.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–35, 24 jul. 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–6, 19 mar. 2010.

MESSERSCHMITT, P.J.; RETTEW, A.N.; SHROEDER, N.O.; BROOKOVER, R.E.; JAKATDAR, A.P.; GETTY, P.J.; GREENFIELD, E.M. Osteosarcoma phenotype is inhibited by 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene. **Sarcoma**, v. 2012, p. 479712, jan. 2012.

MILHAZES, N.; CALHEIROS, R.; MARQUES, M.P.M.; GARRIDO, J.; CORDEIRO, M.N.D.S.; RODRIGUES, C.; QUINTEIRA, S.; NOVAIS, C.; PEIXE, L.; BORGES, F. β -nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: a structure-property-activity relationship study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 12, p. 4078–88, 15 jun. 2006.

MILHAZES, N.; MARTINS, P.; URIARTE, E.; GARRIDO, J.; CALHEIROS, R.; MARQUES, M.P.M.; BORGES, F. Electrochemical and spectroscopic characterisation of amphetamine-like drugs: application to the screening of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its synthetic precursors. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, n. 2, p. 231–41, 23 julho 2007.

MIKAMI, Y.; YAZAWA, K.; MAEDA, A.; UNO, J. Elemental fungi and sensitivity disk agar (Eiken) for bacteria. Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table benzaldehyde (3c)) with nitroethane in the presence. **The Journal of Antibiotics**, v. 44, n. 12, p. 1454–1456, jul. 1991.

MODY, G.G.; VEGF, M. Zebrafish : From disease modeling to drug discovery. **Drug Discovery & Development**, v. 6, n. 2, p. 218–223, 2003.

MORALES FÉNERO, C.I.; COLOMBO FLORES, A.A.; CÂMARA, N.O.S. Inflammatory diseases modelling in zebrafish. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–20, fev. 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dez. 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–69, dez. 2008.

MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 37-45, 1986.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205–208, may. 1997.

NEGISHI, T.; NAKANO, M.; YANAI, K.; KIM, C.H.; FUKUSHIMA, M. Isolation and identification of β -nitrostyrene from smoked chicken. **Environmental Pollution**, v. 50, p. 279–283, aug. 1988.

NISSEN, R.M.; YAMAMOTO, K.R. The glucocorticoid receptor inhibits NF- κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. p. 2314–2329, 2000.

NIU, X.; WANG, Y.; LI, W.; MU, Q.; LI, H.; YAO, H.; ZHANG, H. Protective effects of isofraxidin against lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 24, n. 2, p. 432–439, 13 jan. 2015.

NUCCI, C.; MAZZARDO-MARTINS, L.; STRAMOSK, J.; BRETHANHA, L.C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; MARTINS, D.F. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 170–8, 30 ago. 2012.

ODAKA, C.; MIZUOCHI, T.; YANG, J.; DING, A. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolutions of the inflammatory response. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 1507-5014, jan. 2015.

OH, Y.C.; JEONG, Y.H.; CHO, W.K.; HA, J.H.; GU, M.J.; MA, J.Y. Anti-inflammatory and analgesic effects of Pyeongwisan on LPS-stimulated murine macrophages and mouse models of acetic acid-induced writhing response and xylene-induced ear edema. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1232–51, jan. 2015.

OYEBANJI, B.O.; SABA, A.B.; ORIDUPA, O.A. Studies on the anti-inflammatory , analgesic and antipyretic activities of betulinic acid derived from *Tetracera potatoria*. **Department of Animal Science, Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Nigeria, 2 Department of Physiology**, v. 11, p. 30–33, 2014.

PALSSON-MCDERMOTT, E.M.; O'NEILL, L.A.J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 153–62, out. 2004.

PÂNZARIU, A.T.; APOTROSOAEI, M.; VASINCU, I.M.; DRAGAN, M.; CONSTANTIN, S.; BURON, F.; ROUTIER, S.; PROFIRE, L.; TICHILUS, C. Synthesis and biological evaluation of new 1,3-thiazolidine-4-one derivatives of nitro-l-arginine methyl ester. **Chemistry Central Journal**, v. 10, p. 6, jan. 2016.

PARK, J.B. Synthesis and characterization of Norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 23, p. 5381–5384, 22 out. 2014.

PARK, J.H.; JUN, J.G.; KIM, J.K. (E)-3-(3,4-dihydroxy-2-methoxyphenyl)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one, a novel licochalcone B derivative compound, suppresses lipopolysaccharide-stimulated inflammatory reactions in RAW264.7 cells and endotoxin shock in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224C, p. 142–148, 29 out. 2014.

PATEL, V.; CARRION, K.; HOLLANDS, A.; HINTON, A.; GALLEGOS, T.; DYU, J.; SASIK, R.; LEIRE, E.; HARDIMAN, G.; MOHAMED, S.A.; NIGAM, S.; KING, C.C.; NIZET, V.; NIGAM, V. The stretch responsive microRNA miR-148a-3p is a novel repressor of IKBKB, NF- κ B signaling, and inflammatory gene expression in human aortic valve cells. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, p. 1–10, 28 jan. 2015.

PAULA, F.R.; SERRANO, S. H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B. E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocrine Reviews**, Bethesda, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.

PEREIRA, T.C.B.; RICO, E.P.; ROSEMBERG, D.B.; SHIRMER, H.; DIAS, R.D.; SOUTO, A.A.; BONAN, C.D.; BOGO, M.R. Zebrafish as a model organism to evaluate drugs potentially able to modulate sirtuin expression. **Zebrafish**, v. 8, n. 1, p. 9–16, mar. 2011.

PETTIT, R.K.; PETTIT, G.R.; HAMEL, E.; HOGAN, F.; MOSER, B.R.; WOLF, S.; PON, S.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M. E-Combretastatin and E-resveratrol structural modifications: antimicrobial and cancer cell growth inhibitory beta-E-nitrostyrenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 6606–12, 15 set. 2009.

POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R. & LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Fishing New Books**, Cambridge.p.339-352, 1994.

POLGREEN, L.E.; VEHE, R.K.; RUDSER, K.; BATSON, A.K.; UTZ, J.J.; DICKSON, P.; SHAPIRO, E.; WHITLEY, C. Elevated TNF- α is associated with pain and physical disability in mucopolysaccharidosis types I, II, and VI. **Molecular Genetics and Metabolism**, p. 10–13, 28 jan. 2016.

POMARI, E.; STEFANON, B.; COLITTI, M. Effect of plant extracts on H₂O₂ induced inflammatory gene expression in macrophages. **Journal of Inflammation Research**, v. 7, p. 103–112, jun. 2014.

PULAK, R. Tools for automating the imaging of zebrafish larvae. **Methods (San Diego, California)**, nov. 2015.

RAHMANI-NEZHAD, S.; SAFAVI, M.; PORDELI, M.; ARDESTANI, S.K.; KHOSRAVANI, L.; POURSHOJAEI, Y.; MAHDAVI, M.; EMAMI, S.; FOROUMADI, A.; SHAFIEE, A. Synthesis, *in vitro* cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 562–9, 30 out. 2014.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, v. 71, p. 635-700, 2002.

RENSHAW, S.A; TREDE, N.S. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. **Disease Models Mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 38-47, jan. 2012.

RIGOLIN-SÁ, O. **Toxicidade do herbicida Roundup (glifosato) e do acaricida Omite (propargito) nas fases iniciais da ontogenia do bagre, Rhandiahlarii (Valenciennes, 1840) (Pimelodidade, Siluriformes)**. 307f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1998.

ROUGERIE, P.; MISKOLCI, V. Cox, “Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton” **Immunological Reviews**, v. 256, n.1, p. 222–239, 2013.

ROSA, R.L.; NARDI, G.M.; JANUARIO, A.G.F.; BOÇOIS, R.; BAGATINI, K.P.; BONATTO, S.J.R.; PINTO, A.O.; FERREIRA, J.R.N.; MARIANO, L.N.B.; NIERO, R.; IAGHER, F. Anti-inflammatory, analgesic and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart.& Zucc. (Malvaceae) bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 600-10, jul./set. 2014.

SADEGHI, H.; ZAREZADE, V.; SADEGHI, H.; TOORI, M.A.; BARMAK, M.J.; AZIZI, A.; GHAVAMIZADEH, M.; MOSTAFAZADEH, M. Anti-inflammatory activity of *Stachys pilifera* Benth. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 9, p. e19259, set. 2014.

SAGNIA, B.; FEDELI, D.; CASETTI, R.; MONTESANO, C.; FALCIONI, G.; COLIZZI, V. Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from *Cassia alata*, *Eleusine indica*, *Eremomastax speciosa*, *Carica papaya* and *Polyscias fulva* medicinal plants collected in Cameroon. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e103999, jan. 2014.

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

SEO, Y.H.; DAMODAR, K.; KIM, J.K.; JUN, J.G. Synthesis and biological evaluation of 2-arylbzofurans, rugchalcons A, B and their derivatives as potent anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 6, p. 1521-4, 15 mar. 2016.

SILVA, J.K.R.; SOUSA, P.J.C.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. v. 55, p. 9422–9426, may 2007.

SILVA, N.N.S.; SILVA, J.R.A.; ALVES, C.N.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, J.K.R.; MAIA, J.G.S. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of *Aniba canelilla* essential oil. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 84, n. 2, p. 192–8, aug. 2014.

SINGH, K.N.; SINGH, P.; SINGH, P.; LAL, N.; SHARMA, S.K. Pyrrolidine based chiral organocatalyst for efficient asymmetric Michael addition of cyclic ketones to β -nitrostyrenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 13, p. 4225–8, 1 jul. 2012.

SIQUEIRA, R.J.B.; MACEDO, F.I.B.; INTERAMINENSE, L.F.L.; DUARTE, G.P.; MAGALHAES, P.J.C.; BRITO, T.S.; SILVA, J.K.R.; MAIA, J.G.S.; SOUSA, P.J.C.; CARDOSO, J.H.L.; LAHLOU, S. 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 638, n. 1-3, p. 90–8, 25 jul. 2010.

SOUSA, L.P.; LOPES, F.; SILVA, D.M.; TAVARES, L.P.; VIEIRA, A.T.; REZENDE, B.M.; CARMO, A.F.; RUSSO, R.C.; GARCIA, C.C.; BONJARDIM, C.A.; ALESSANDRI, A.L.; ROSSI, A.G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M.M. PDE4 inhibition

drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 895–904, maio 2010.

SOUZA, Gisele Custodio. **Estudo da Toxicidade da Nanoemulsao de Álcool Perílico (NPOH) sobre Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Biologia Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amapá, Macapá.

SHIN, J. T.; FISHMAN, M. C. From Zebrafish to human: modular medical models. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 3, n. 24, p. 311–40, jan. 2002.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **Journal Pathology Bactery**, v.72, p. 367-380 1956.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. An atlas of fish histology – normal and pathological features. **Kodansha Ltda**, Tóquio. p. 195, 1995.

TIMUR, M.; ROBERTS, R.J. Carrageenin granuloma in the plaice (*Pleuronectes platessa*); a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. **Journal of Comparative Pathology**, v.87, p.89–96 1977.

VALE, J.K.L. **Estudo do mecanismo do nitrofeniletano na prostaglandina endoperóxido sintetase e relação estrutura-propriedade de nitroderivados**. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2011.

VALE, J.K.L.; LIMA, A.B.; PINHEIRO, B.G.; CARDOSO, A.S.; SILVA, J.K.R.; MAIA, J.G.S.; SOUSA, G.E.P.; SILVA, A.B.F.; SOUSA, P.J.C.; BORGES, R.S. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism. **Planta Medicinal**, v.79, p. 628–633, 2013.

VERDAM, M.C.S.; SIMPLICIO, F.G.; BARBOSA, G.S.; MAGALHAES, A.L.; OLIVEIRA, C.I.F.B.; ALMEIDA, P.D.O; MACHADO, T.M.; VASCONCELLOS, M.C.; LIMA, E.S.; OHANA, D.T.; PEREIRA, M.M. Anti-inflammatory action of *Justicia acuminatissima* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 264–268, maio 2015.

VILLEFRANC, J.A; AMIGO, J.; LAWSON, N.D. Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 11, p. 3077–87, nov. 2007.

VIODÈ, C.; BETHACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N. P. **Journal of Biochemistry and Pharmacology**, v. 57, p. 549-572, 1998.

XIE, C.; KANG, J.; LI, Z.; SCHAUSS, A.G.; BADGER, T.M.; NAGARAJAN, S.; WU, T.; WU, X. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1184–91, set. 2012.

XU, J.; DU, L.; WEN, Z. Myelopoiesis during zebrafish early development. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 39, n. 9, p. 435–442, 2012.

YANG, H.; ZHAO, P.; TIAN, S. Clopidogrel protects endothelium by hindering TNF α -induced VCAM-1 expression through CaMKK β /AMPK/Nrf2 pathway. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 9128050, jan. 2016.

YEH, D.Y.; FENG, N.H.; CHENG, C.F.; LIN, H.I.; WANG, D. Inducible nitric oxide synthase expressions in different lung injury models and the protective effect of aminoguanidine. **Transplantation Proceedings, New York**, v. 40, n. 7, p. 2178–2181, 2008.

YUE, T.L.; WANG, C.; GU, J.L.; MA, X.L.; KUMAR, S.; LEE, J.C.; FEUERSTEIN, G.Z.; THOMAS, H.; MALEEFF, B.; OHLSTEIN, E.H. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. **Circulation Research**, New York, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.

YUNG, H.; VARADARAJAN, S.; PLANILLO-MUNOZ, R.; BURBERRY, A.; NAKAMURA, Y.; NUNEZ, G. 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 2, p. 1142–50, 10 jan. 2014.

WALTON, E.M.; CRONAN, M.R.; BEERMAN, R.W.; TOBIN, D.M. The macrophage-specific promoter mfap4 allows live, long-term analysis of macrophage

behavior during mycobacterial infection in zebrafish. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

WANG, Q.; KUANG, H.; SU, Y.; FENG, J.; RUI, G.; CHAN, K. Naturally derived anti-inflammatory compounds from chinese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 9–39, 7 mar. 2013.

WANG, S.H.; LIANG, C.H.; LIANG, F.P.; DING, H.Y.; LIN, S.P.; HUANG, G.J.; LIN, W.C.; JUANG, S.H. The inhibitory mechanisms study of 5,6,4'-Trihydroxy-7,3'-Dimethoxyflavone against the LPS-Induced macrophage inflammatory responses through the antioxidant ability. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 2, p. 1–13, jan. 2016.

WANG, W.; WU, Y.; WU, C. Prevention of platelet Glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 1380–1389, jul. 2006.

WANG, W.Y.; HSIEH, P.W.; WU, Y.C.; WU, C.C. Synthesis and pharmacological evaluation of novel β -nitrostyrene derivatives as tyrosine kinase inhibitors with potent antiplatelet activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 601–611, may. 2007.

WERMUTH, C. G., ed.; **The Practice of Medicinal Chemistry**, 1st ed., Academic Press: San Diego, 2000.

WU, L.; LI, X.; WU, H.; LONG, W.; JIANG, X.; SHEN, T.; QIANG, Q.; SI, C.; WANG, X.; JIANG, Y.; HU, W. 5-Methoxyl Aesculetin abrogates lipopolysaccharide-induced inflammation by suppressing MAPK and AP-1 pathways in RAW 264.7 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–15, jan. 2016.

ZENG, Z.; SUN, Z.; HUANG, M.; ZHANG, W.; LIU, J.; CHEN, L.; CHEN, F.; ZHOU, Y.; LIN, J.; HUANG, F.; XU, L.; ZHUANG, Z.; GUO, S.; ALITONGBIEKE, G.; XIE, G.; XU, Y.; LIU, B.; CAO, X.; SU, Y.; ZHANG, X.K.; ZHOU, H. Nitrostyrene derivatives act as RXR α ligands to inhibit TNF α activation of NF- κ B. **Cancer Research**, n. 21, p. 1–12, 20 mar. 2015.

ZNATI, M.; JANNET, H.B.; CAZAUX, S.; SOUCHARD, J.P.; SKHIRI, F.H.; BOUAJILA, J. Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from the *Ferula lutea* flowers. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 10, p. 16959–75, jan. 2014.

ZHOU, H.Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S.; KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21(α , β)-methylmelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, n. 2-3, p. 239–48, 31 out. 2007.

ANEXOS

Certificado Comitê de Ética no Uso de Animais – UNIFAP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 27 de outubro de 2015, o parecer referente ao protocolo no. **0022/2015** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Atividade anti-inflamatória de novos derivados sintéticos da classe dos nitroestirenos**" coordenado por **Emerson Silva Lima**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 27 October 2015, the final decision about the Protocol **0022/2015** and certify that the research project entitled "**Atividade anti-inflamatória de novos derivados sintéticos da classe dos nitroestirenos**" coordinated by **Emerson Silva Lima**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 27 de outubro de 2015


 Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
 Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,
 Macapá - AP. 68903-419 email: farmacos@unifap.br
 Fone: (96)4009-2907

Certificado Comitê de Ética no Uso de Animais - UFMG

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 83 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Triagem da inibição da liberação de TNF- α e atividade anti-inflamatória aguda de plantas brasileiras", que tem como responsável Flávio Almeida Amaral, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 26/05/2015. Este certificado expira-se em 26/05/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 83 / 2015, related to the Project entitled "Screening of TNF- α release inhibition and acute anti-inflammatory activity by Brazilian plants", under the supervision of Flávio Almeida Amaral, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 26/05/2015. This certificate expires in 26/05/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 26/05/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br