



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARIA CRISLÂNDIA FREIRE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, TOXICIDADE *IN VIVO* E
IN VITRO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO COMPOSTO 2-CIANO-N-3-
DIFENILACRILAMIDA (JMPR-01)**

CAMPINA GRANDE

2023

MARIA CRISLÂNDIA FREIRE DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, TOXICIDADE *IN VIVO* E
IN VITRO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO COMPOSTO 2-CIANO-N-3-
DIFENILACRILAMIDA (JMPR-01)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais, sintéticos e biotecnológicos de interesse farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanda Lúcia dos Santos

CAMPINA GRANDE

2023

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A447a Almeida, Maria Crislândia Freire de.
Avaliação da atividade anti-inflamatória, toxicidade *in vivo* e *in vitro* e possíveis mecanismos de ação do composto 2-ciano-N-3-difenilacrilamida (JPMR-01) [manuscrito] / Maria Crislândia Freire de Almeida. - 2023.
70 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2024.

"Orientação : Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos, Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS. "

1. Inflamação. 2. Fenilacrilamida. 3. Edema de pata. 4. Via NO-sGC-cGMP. I. Título

21. ed. CDD 615

MARIA CRISLÂNDIA FREIRE DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO COMPOSTO 2-CIANO-N-3-DIFENILACRILAMIDA (JMPR-01)

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais, sintéticos e biotecnológicos de interesse farmacêutico.

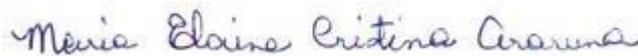
Aprovada em: 30/11/2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof.^a Dr.^a Maria Elaine Cristina Araruna

Universidade Estadual da Paraíba (Interno)



Prof.^o Dr.^o Francisco José Batista de Lima Júnior (Examinador externo)

Centro Universitário Facisa (UNIFACISA)

A Deus, aos meus pais, irmãos e esposo por todo apoio, paciência, amor e carinho que fizeram com que eu chegasse até aqui.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida e por me permitir errar, aprender e crescer, obrigada por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz em meu coração que não me permitiu desistir e me prova a todo instante que “tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu” (Eclesiastes- 3:1). Gratidão!

À minha família, vocês têm a minha gratidão eterna e eu nunca esquecerei tudo que fizeram e fazem por mim. Aos meus pais, *José Gomes* e *Maria José*, obrigada pelo incentivo, sacrifício e dedicação desde o meu nascimento para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus irmãos, que são verdadeiros presentes de Deus - *Carla*, *Kelly* e *Jefferson* - por estarem comigo para o que for necessário. As minhas sobrinhas - *Karol*, *Nathália* e *Lis* - por serem força e diversão na minha vida. Amo especialmente cada um de vocês.

À *Diego*, meu digníssimo esposo, a quem sou imensamente grata pelo apoio, carinho e companheirismo nesta caminhada. Sua cumplicidade foi essencial nos momentos de desânimo, o meu combustível para conclusão.

À *Mel*, pelo companheirismo em todos os horários, por sempre me fazer sorrir com seu jeito sapeca e cativante se ser, pelo carinho e amor incondicional que me apresentou.

À família do meu esposo, que agora também fazem parte da minha: *Adeilda*, *Ivyna*, *Fabiana* e *Francinaldo*, obrigada pelas orações, conselhos e ajuda nos momentos necessários, pela parceria e pelos diversos momentos alegres e boas conversas compartilhadas nesse período.

À minha orientadora, professora *Dra. Vanda Lucia dos Santos*, por não ter desistido, obrigada pela orientação, pelo incentivo, conselhos e pela amizade.

Ao professor *Dr. Ricardo Olimpio de Moura* e equipe, que me proporcionaram a oportunidade de desenvolver esta dissertação. Obrigada por gentilmente ceder as moléculas utilizadas neste trabalho e por sua prestatividade.

Ao professor *Dr.º João Augusto Oshiro Júnior*, por sua amizade, incentivo e apoio prestados, pela ajuda, serei eternamente grata.

À professora *Dra. Karla Patricia de Oliveira Luna*, pela disponibilidade em ajudar na execução de alguns experimentos.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA), responsável pela avaliação e aprovação do meu projeto de pesquisa.

À equipe de laboratório, que se tornaram que estiveram comigo: *Ítala, Thássia, Kamila, Yasmin, Luana, Lorena, Pedro, Bruna, Barbara, Rayane, Lívia, Joilly, Fernanda, Diego* e a todos que em algum momento nessa caminhada dedicaram seu tempo para aprendermos juntos e por terem tornado esta dissertação possível. Muito obrigada.

Aos amigos e familiares que torceram por mim e entenderam minha ausência em alguns momentos.

Aos colegas de trabalho, que compartilham os dias comigo deixando-os bem mais leves: *Adenilton, Berg, Renally, Cecília, Kilza, Jakeline, Thaynara, Andressa, Amanda, Dynná, Lucas, Fabienne, Daniel, Marcelle, Neuma, Camilla, Karintia, Aline, Eduardo*, também sou grata pela força, sorrisos e companheirismo de todos os dias. Ao gerente Renato, que me entendeu e me proporcionou o tempo necessário para conclusão desse mestrado. A todos, o meu carinho e gratidão.

À banca examinadora por aceitar o convite e pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho.

Gratidão!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

A inflamação é um processo crucial para a defesa do organismo, no entanto, quando há uma exacerbação ou prolongamento do estímulo inflamatório, esse passa a induzir danos teciduais, podendo culminar em doenças inflamatórias crônicas. Nessas situações faz-se necessário intervir na resposta inflamatória. Os anti-inflamatórios atualmente disponíveis, culminam em reações adversas indesejáveis, tais como úlceras gástricas e eventos cardiovascular. Para diminuir tais efeitos, busca-se o desenvolvimento de novos compostos químicos que apresentem efeito terapêutico potencializado e eventos adversos diminuídos. Com esse intuito, o composto 2-ciano-N-3-difenilacrilamida (JMPR-01) foi sintetizado, os testes preliminares demonstram efeito anti-inflamatório potencial. Desse modo, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e toxicológica do composto JMPR-01. Para isso, foram realizados modelos inflamatórios *in vivo*, em que, foi investigada a eficácia do JMPR-01 sob a atividade antiedematogênica do composto, utilizando o modelo de edema de pata induzida por zimozan, nesse modelo o JMPR-01 reduziu significativamente ($p < 0,05$) o edema em todas as doses testadas (50, 100 e 150 mg/Kg), a partir desse teste foi possível estabelecer a dose a ser utilizada nos demais testes (50 mg/Kg). No teste de edema de pata induzido por zimozan com inibidores da enzima óxido nítrico sintase e guanilato ciclase solúvel, observou-se que o JMPR-01 não inibiu o edema, sugerindo um possível envolvimento dessa via no mecanismo de ação. No teste de bolsão de ar subcutâneo o composto administrado nas doses de 50mg/Kg e 100 mg/Kg reduziu a migração leucocitária em 76% e 62%, respectivamente. Nos testes *in vitro*, o composto também se mostrou eficaz na inibição da enzima hialuronidase frente a peçonha de serpente *Bothrops erythromelas* (PBe). A toxicidade do composto também foi avaliada, *in vitro*, o percentual de hemólise em eritrócitos foi de 1,6 e 1,26% nas concentrações 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ do JMPR-01, respectivamente. *In vivo*, o teste de toxicidade aguda de dose única (2.000 mg/Kg) não demonstrou sinais clínicos de toxicidade, também não houve mortes nem alterações comportamentais dos animais, além de não haver alterações macroscópicas nos órgãos analisados, demonstrando a baixa toxicidade do composto. Os estudos de *docking* molecular realizados demonstraram maior afinidade do composto JMPR-01 pela a enzima guanilato ciclase solúvel. Estes resultados indicam a efetividade das propriedades anti-inflamatórias do composto JMPR-01 com perspectivas para o desenvolvimento de um novo medicamento com potencial inibidor da via NO-sGC-cGMP.

Palavras chave: inflamação; fenilacrilamida; edema de pata; via NO-sGC-cGMP.

ABSTRACT

Inflammation is a crucial process for the body's defense, however, when there is an exacerbation or prolongation of the inflammatory stimulus, it begins to induce tissue damage, which can culminate in chronic inflammatory diseases. In these situations, it is necessary to intervene in the inflammatory response. Currently available anti-inflammatory drugs lead to undesirable adverse reactions, such as gastric ulcers and cardiovascular events. To reduce such effects, we seek to develop new chemical compounds that have enhanced therapeutic effects and reduced adverse events. For this purpose, the compound 2-cyano-N-3-diphenylacrylamide (JMPR-01) was synthesized, and preliminary tests demonstrated a potential anti-inflammatory effect. Therefore, the main objective of this work was to evaluate the anti-inflammatory and toxicological activity of the compound JMPR-01. To this end, *in vivo*, inflammatory models were carried out, in which the efficacy of JMPR-01 on the compound's antiedematogenic activity was investigated, using the zymosan induced paw edema model, JMPR-01 was able to significantly reduce paw edema ($p < 0.05$) at all doses tested (50, 100 and 150 mg/Kg), from this test it was possible to establish the dose to be used in the other tests (50 mg/Kg). In the paw edema test with inhibitors of the enzyme nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase, it was observed that JMPR-01 was not able to inhibit edema, suggesting a possible involvement of this via in the mechanism of action. In the subcutaneous air pocket test, the compound administered at doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg was able to reduce leukocyte migration by 76% and 62%, respectively. *In vitro*, the compound was also effective in inhibiting the hyaluronidase enzyme against *Bothrops erythromelas* (PBe) snake venom. The toxicity of the compound was also evaluated, *in vitro*, the percentage of hemolysis in erythrocytes was 1.6 and 1.26% at concentrations of 500 and 1,000 $\mu\text{g/mL}$ of JMPR-01, respectively. *In vivo*, the single dose acute toxicity test (2,000 mg/Kg) did not demonstrate clinical signs of toxicity, there were also no deaths or behavioral changes in the animals, in addition to there being no macroscopic changes in the organs analyzed, demonstrating the low toxicity of the compound. The molecular docking studies carried out demonstrated a greater affinity of the JMPR-01 compound for the soluble guanylate cyclase enzyme. These results indicate the effectiveness of the anti-inflammatory properties of the compound JMPR-01 with prospects for the development of a new drug with a potential inhibitor of the via NO-sGC-cGMP.

Keywords: inflammation; phenylacrylamide; paw edema; via NO-sGC-cGMP

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Cascata de adesão dos leucócitos.....	21
Figura 2 –	Via de sinalização por meio de TLRs, ativação de cascatas de sinalização intracelular que levam à translocação nuclear de AP-1 e NF- κ B ou IRF3, que regula a resposta inflamatória.....	22
Figura 3 –	Ativação da cascata de sinalização NF- κ B.....	24
Figura 4 –	Via de sinalização JAKs/STATs mediada por citocinas	25
Figura 5 –	Mecanismo endógeno do NO sob a guanilato ciclase solúvel.....	28
Figura 6–	Representação esquemática da biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do metabolismo do ácido araquidônico na via das COX 1 e 2.....	31
Figura 7–	Enzimas cicloxigenases 1 e 2, diferenciadas pelos aminoácidos isoleucina e valina na posição 523, respectivamente.....	32
Figura 8 –	Função <i>N</i> -fenilacrilamida.....	35
Figura 9 –	Representação esquemática do teste de toxicidade aguda.....	40
Figura 10 –	Representação esquemática do teste de edema de pata induzido em camundongos.....	42
Figura 11 –	Representação esquemática do teste de bolsão de ar subcutâneo.....	43
Figura 12 –	Influência do tratamento com o composto JMPR-01, sob o edema de pata no modelo de edema de pata induzido por zimosan.....	50
Figura 13 –	Influência do tratamento com o composto JMPR-01, sob a contagem total de leucócitos no modelo de bolsão de ar subcutâneo.....	52
Figura 14 –	Investigação do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), sob a influência do tratamento com o composto JMPR-01, frente ao modelo de edema de pata induzido por zimosan.....	53
Figura 15 –	Investigação do envolvimento da guanilato ciclase solúvel, sob a influência do tratamento com o composto JMPR-01, frente ao modelo de edema de pata induzido por zimosan.....	55
Figura 16 –	Avaliação da atividade hialuronidásica exercida pelo JMPR-01 frente a peçonha da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> (PBe).....	56
Figura 17 –	Diagrama de interação 2D e 3D de JMPR-01 com o sítio ativo do receptor alvo guanilato ciclase solúvel (sGC).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resumo das citocinas e suas funções.....	26
Tabela 2 –	Classificação das hialuronidases segundo Meyer (1971).....	29
Tabela 3 –	Consumos de água e ração de camundongos Swiss, fêmeas tratadas com JMPR-09 na dose de 2000 mg/mL, durante 14 dias.....	46
Tabela 4 –	Peso relativo dos órgãos (%) de camundongos do grupo controle e tratados com o JMPR-01 na dose de 2000mg/kg por via oral após 14 dias..	47
Tabela 5 –	Determinação dos parâmetros bioquímicos de camundongos <i>Swis</i> tratados com JMPR-01 2000 mg/Kg.....	47
Tabela 6 –	Determinação dos parâmetros hematológicos de camundongos <i>Swis</i> tratados com JMPR-01 2000 mg/Kg.....	48
Tabela 7 –	Valores de RMSD, FiScore e redocking dos alvos selecionados utilizando o programa Gold®	58
Tabela 8 –	Valores de FitScore e energia de ligação de complexos alvo-ligante.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Atividades biológicas de derivados N-fenilacrilamida.....	35
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Formação do composto JMPR-01.	37
-----------	------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AES	Anti-inflamatórios Esteroidais
AINE	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
AP-1	Proteína Ativadora -1
BK	Bradicinina
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CLR	Receptor de Lectina tipo C
COX	Cicloxigenase
CP	Controle Positivo
GI	Gastrointestinais
HCT	Hematócrito
HDL	High Density Lipoproteins
HGB	Hemoglobina
HM	Hibridação Molecular
JMPR	(<i>E</i>)-2-ciano- <i>N</i> -3-difenilacrilamida
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta
LFA1	Antígeno 1 Associado a Função Linfocitária
MAP quinase	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
iNOS	Óxido Nítrico-Sintase Induzida
NAPQI	Lipopolissacarídeos
NF-kB	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico-Sintase
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PCR	Proteína C Reativa
PG	Prostaglandina
PI3K	Fosfatil-inositol 3-quinase
	Plaquetas

PLT	Fosfolipase A2
PLA2	Receptor de Reconhecimento Padrão
PRR	Ligante 1 da Glicoproteína Selectina
PSGL1	Quantitative structure–activity relationship
QSAR	Eritrócitos
RBC	Sistema Nervoso Central
SNC	Família de Proteínas Quinases
SRC Kinases	Fator de Necrose Tumoral
TNF	
TGO	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TRL	Receptor Semelhante a Toll
VLA4	Alfa 4 Beta 1
WBC	Contagem de Leucócitos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.2	Objetivo geral	19
2.3	Objetivos específicos	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	Fisiopatologia da inflamação	20
3.2	Modulação Inflamatória	21
3.3	Mecanismos deflagradores das respostas inflamatórias	21
3.3.1	Ativação de receptores de reconhecimento padrão	21
3.3.2	Vias de sinalização pró-inflamatórias.....	23
3.3.2.1	<i>Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)</i>	23
3.3.2.2	<i>Via do fator nuclear kappa-b (NF-κB)</i>	23
3.3.2.3	<i>Via JAK-STAT</i>	24
3.3	Mediadores envolvidos no processo inflamatório	26
3.3.1	Citocinas	26
3.3.2	Óxido Nítrico.....	27
3.3.3	Ácido Hialurônico e hialuronidasas	28
3.3.4	Cicloxigenases e via do ácido aracdônico	30
3.4	Farmacologia da inflamação	32
3.4.1	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	32
3.4.2	Anti-inflamatórios Esteroidais.....	33
3.5	Derivados fenilacrilamidas	34
3.5.1	Composto (E) -2-ciano- N-3-difenilacrilamida (JMPR-01)	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Obtenção do composto	39
4.2	Local da pesquisa	39
4.3	Procedimentos éticos	39
4.4	Animais	39
4.5	Preparo das substâncias	39
4.6	Avaliação toxicológica in vivo	40
4.6.1	Toxicidade aguda.....	40
4.6.2	Determinação dos parâmetros hematológicos	40

4.6.3	Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	41
4.7	Avaliação toxicológica in vitro.....	41
4.7.1	Atividade hemolítica.....	41
4.8	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	42
4.8.1	Edema de pata induzida por zimosan	42
4.8.2	Bolsão de ar subcutâneo	42
4.8.3	Envolvimento da enzima óxido nítrico sintase no modelo de edema de pata	43
4.8.4	Envolvimento da enzima guanilato ciclase solúvel no modelo de edema de pata	44
4.9	Avaliação anti-inflamatória in vitro (envolvimento da via hialuronidase).....	44
4.9.1	Obtenção da Peçonha de <i>Bothrops erythromelas</i>	44
4.9.2	Inibição da atividade das hialuronidases	44
4.10	Ensaio de modelagem molecular in silico	45
4.11	Análise estatística.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Avaliação toxicológica in vivo	46
5.1.1	Toxicidade aguda.....	46
5.1.2	Atividade hemolítica.....	48
5.2	Avaliação da atividade farmacológica	49
5.2.1	Edema de pata induzida por zimosan	49
5.2.2	Bolsão de ar subcultâneo	51
5.2.3	Envolvimento da enzima óxido nítrico sintase.....	53
5.2.4	Envolvimento da guanilato ciclase solúvel	54
5.3	Atividade hialuronidásica in vitro	55
5.4	Estudo de docking molecular	57
6	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO A - PROTOCOLO UTILIZADO NA TRIAGEM FARMACOLÓGICA	
	COMPORTAMENTAL.....	70

1 INTRODUÇÃO

Em resposta a desafios extremos à homeostase, como infecções ou lesões teciduais, o organismo desencadeia mecanismos de defesa a fim de promover a reabilitação do local lesionado, popularmente denominada resposta inflamatória. A inflamação é, portanto, crucial para a defesa do organismo e requer uma regulação rígida dos mediadores envolvidos, pois as suas funções são determinantes na ação do sistema imunológico, no controle de infecções e na resolução do processo inflamatório (KOTAS; MEDZHITOV, 2015; RANG et al., 2016; XU; LARBI, 2018).

No entanto, quando há uma exacerbação ou prolongamento do estímulo inflamatório, este passa a induzir danos aos tecidos, vistas como falhas da homeostase, podendo culminar na degeneração tecidual, fibrose e doenças inflamatórias crônicas. Nessas situações faz-se necessário intervir na resposta inflamatória, para isso as terapias farmacológicas auxiliam na diminuição da expressão e/ou atuação dos principais mediadores envolvidos, os quais se destacam: a cicloxigenase-2; o envolvimento do óxido nítrico e a modulação das citocinas inflamatórias (LIU et al., 2022).

Nesse contexto, a terapia farmacológica anti-inflamatória se baseia na ação desses mediadores e nos mecanismos biomoleculares envolvidos na fisiopatologia da inflamação, para obter o efeito farmacológico desejado. Comumente são utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Essa classe de medicamentos de grande variedade estrutural e de fácil acesso a população, atua inibindo de maneira seletiva ou não a enzima ciclooxigenase (COX), no qual possui duas isoformas principais: COX-1, expressa constitutivamente, para manutenção das funções homeostáticas, como a integridade gastrointestinal e a COX-2, indubitavelmente expressa em resposta a estímulos patológicos (SERAFIM et al., 2014; ZEINALI et al., 2017; HUYNH et al., 2023; ALMEIDA, 2019).

No entanto, reações adversas estão relacionadas à terapia convencional com AINEs, como os distúrbios gastrointestinais (GI), que ocorre em função da inibição da COX-1, comprometendo produção das prostaglandinas citoprotetoras, e da presença de frações ácidas desses fármacos em contato direto com a mucosa, causando lesões ulcerativas (SHU; JAMIESON; LAKE, 2023; ALMEIDA, 2019).

Na tentativa de contornar a toxicidade gástrica, foram desenvolvidas drogas mais seletivas para COX-2, os “Coxibes”. Esses fármacos, apesar de apresentar um perfil gástrico

mais seguro, apresentarem uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e aterotrombóticos associado ao uso crônico (MONTEIRO et al., 2008; PATRONO et al., 2016).

Para minimizar esses efeitos indesejáveis promovidos pelos agentes terapêuticos do mercado, busca-se o desenvolvimento de novos compostos químicos sintéticos com potencial efeito terapêutico, com ação anti-inflamatória segura, baixo custo de produção e que não comprometa os recursos naturais. E isso vem sendo possível graças ao advento da química medicinal e sintética que otimiza as etapas de planejamento de fármacos, elegendo moléculas promissoras para diversas atividades biológicas (CAMPBELL; MACDONALD; PROCOPIOU, 2018).

Tendo em vista os aspectos abordados, Silva (2020) na expectativa de obter respostas farmacológicas potencializadas com eventos secundários reduzidos, empregou técnicas da química molecular para sintetizar um novo composto, derivado da função fenilacrilamida. O composto híbrido 2-ciano-N-3-difenilacrilamida (JMPR-01) se mostra um composto promissor, de fácil obtenção e bom rendimento. Propriedades físico-químicas, já elucidadas corroboram com a estrutura química da molécula, além disso, os resultados de testes preliminares, realizados *in silico* e *in vivo*, demonstraram potenciais atividades farmacológicas. Assim, este estudo propôs realizar testes *in vitro* e *in vivo* e *in silico*, a fim de propor um possível mecanismo de ação do composto JMPR-01.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Investigar a atividade anti-inflamatório e propor um possível mecanismo de ação para o composto 2-ciano-N-3-difenilacrilamida.

2.3 Objetivos específicos

Este projeto teve como objetivos específicos:

- a. avaliar o perfil anti-inflamatório do composto frente aos modelos edema de pata e bolsão de ar subcutâneo;
- b. avaliar o possível envolvimento da via do óxido nítrico no mecanismo de ação do composto através dos testes de edema de pata;
- c. estimar a toxicidade aguda *in vivo* e *in vitro* do composto;
- d. avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro*;
- e. avaliar a interação do composto com alvos moleculares através do ensaio de modelagem molecular *in silico*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fisiopatologia da inflamação

O processo inflamatório pode ser dividido em padrões agudos e crônicos. A inflamação aguda possui duração relativamente curta - minutos, horas ou alguns dias - enquanto a inflamação crônica é de maior duração. A inflamação aguda promove defesa, reparo, renovação tecidual e adaptação local. No entanto, quando a resolução não ocorre, essa passa para a fase de cronificação, podendo resultar em inúmeras doenças, a citar: artrite reumatóide, doenças autoimunes e psoríase, além de, ser um co-fator para o surgimento do câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (LIU et al, 2022; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; KOTAS; MEDZHITOV, 2015; QUEIROZ, 2013).

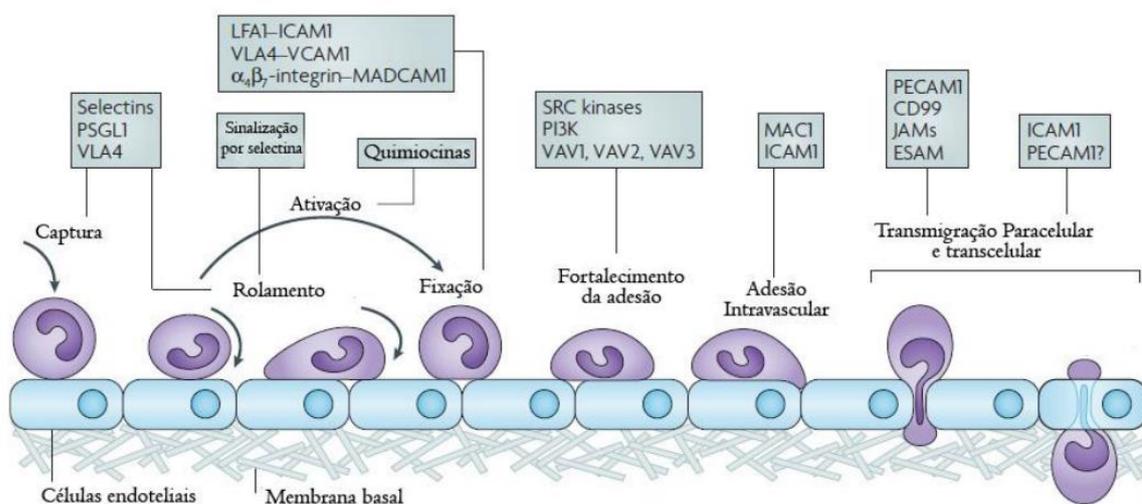
A inflamação aguda ocorre logo após a lesão ao tecido e pode ser dividida em fases para melhor entendimento. Após a lesão, haverá modificações fisiológicas e funcionais da região afetada, que promoverá a liberação de mediadores químicos, conhecida na literatura como a primeira fase da inflamação, a qual desencadeia as demais. A fase seguinte, dita fase capilar ocorre mediante liberação de enzimas, a citar uma das principais, a calicreína, enzima que atua sobre cininogênios originando as cininas (bradicinina (BK), calidina e Met-Lys-bradicinina) (RODRIGUES et al, 2022).

A BK juntamente com outros mediadores inflamatórios (TNF- α ; IL-1 e interleucina-8 (IL-8)), iniciam acentuadamente o ciclo da dor, além de provocar intensa dilatação dos vasos sanguíneos com consequente aumento da permeabilidade capilar, dita fase exsudativa, onde há migração de líquidos e células para o local lesionado. Essa migração ocorre devido a estimulação das células endoteliais, que passam a expressar moléculas de adesão (selectinas e moléculas de adesão intracelular (ICAM-1)), cuja função é promover a ligação de componentes da superfície das células fagocitárias provocando a aderência dos fagócitos ao endotélio (VAN BEEK et al 2019).

Vasodilatadores produzidos no local da inflamação provoca o afrouxamento das junções entre as células endoteliais e os fagócitos então atravessam a barreira endotelial “espremendo-se” entre as células endoteliais via um processo chamado de diapedese ou transmigração (figura. 1). Uma vez formado espaços no tecido, quimiocinas atraem fagócitos ao local inflamado por quimiotaxia (movimento em direção a um gradiente químico) (VAN BEEK et al 2019). A

finalidade dessa fase é recrutar células do sistema imunológico para o local da inflamação na tentativa de controlar os danos e lesões associados ao agente agressor.

Figura 1 – Cascata de adesão dos leucócitos.



Os três originais passos são: rolamento, o qual é mediado por selectinas, ativação, a qual é mediada por quimiocinas e a fixação, mediada por integrinas. Progressos têm sido produzidos na definição de passos adicionais: captura, fortalecimento da adesão e transmigração paracelular e transcelular. Fonte: Leite (2012) adaptado. Ley et al. (2007).

Após essa fase restará no local células lisadas, necrosadas e produtos de degeneração, caracterizando a fase degenerativa-necrótica. Por fim, e não menos importante, inicia-se a fase produtiva-reparativa onde ocorre a multiplicação de células e reparação tecidual, na intenção de recompor o tecido lesionado (PECONICK; KALKS, 2011).

3.2 Modulação Inflamatória

A modulação inflamatória é uma resposta complexa do organismo que se manifesta de modo semelhante independentemente do agente lesivo, em resumo: inicialmente, ocorre o reconhecimento do agente lesivo por receptores padrão de superfície celular, seguida da ativação das vias inflamatórias, que culmina na liberação de marcadores inflamatórios e no recrutamento de células inflamatórias (CHEN et al, 2017).

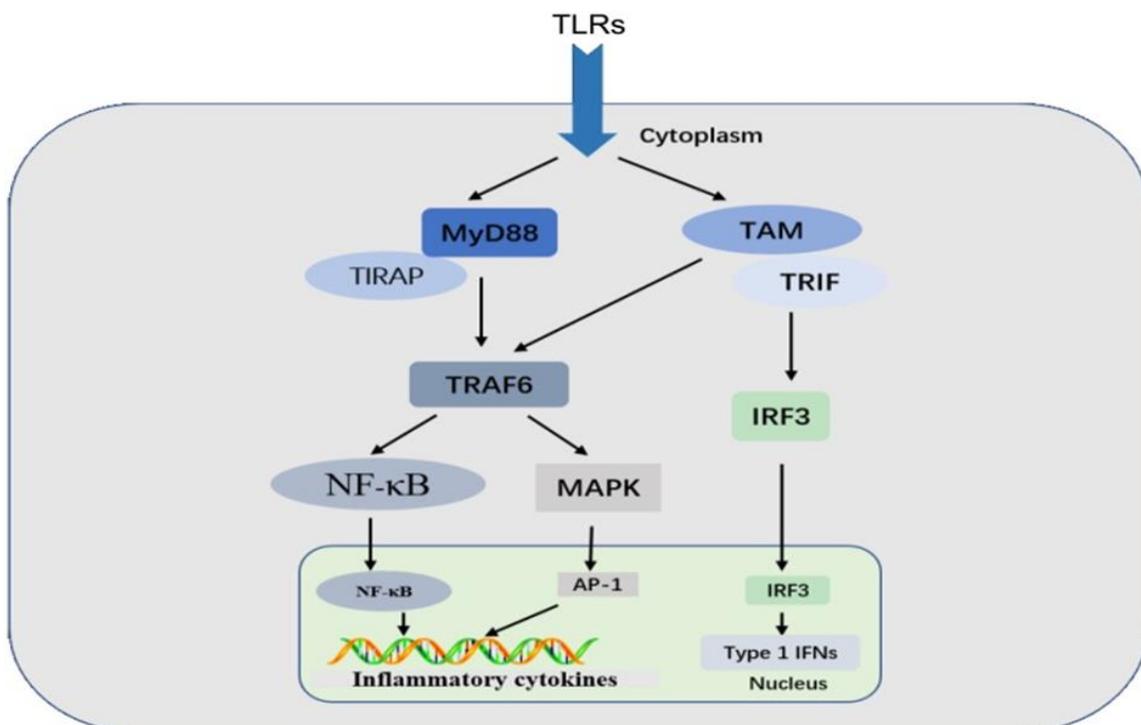
3.3 Mecanismos deflagradores das respostas inflamatórias

3.3.1 Ativação de receptores de reconhecimento padrão

Os patógenos possuem estruturas conhecidas como padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs), esses ativam receptores de reconhecimento padrão (PRRs) expressos em células imunes e não imunes, desencadeando a resposta inflamatória. Esses receptores também reconhecem estímulos endógenos ativados durante o dano tecidual ou celular chamados padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs). Os DAMPs podem iniciar e perpetuar uma resposta inflamatória não infecciosa. A transmissão de PAMPs e DAMPs é mediada pelo fator de diferenciação mielóide-88 (MyD88) juntamente com os receptores semelhantes a Toll (TLRs) (CHEN et al, 2023).

Os PRRs pertencem a uma classe de família que incluem receptores semelhantes a Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores semelhantes a I (RLRs) e receptores semelhantes a NOD (NLRs). Os TLRs participam da ativação da resposta inflamatória em mamíferos, onde são altamente conservados e expressos. A sinalização através de TLRs comumente ativa uma cascata de sinalização intracelular que leva à translocação nuclear de fatores de transcrição, como proteína ativadora-1 (AP-1), NF- κ B e/ou fator regulador de interferon 3 (IRF3) (figura 2) (YU et al, 2023; CZERKIES, KWIATKOWSKA, 2014).

Figura 2 – Via de sinalização por meio de TLRs, ativação de cascatas de sinalização intracelular que levam à translocação nuclear de AP-1 e NF- κ B ou IRF3, que regula a resposta inflamatória.



Fonte: Chen et al. (2017).

3.3.2 Vias de sinalização pró-inflamatórias

As vias de sinalização ativadas por estímulos inflamatórios promovem a produção intracelular de mediadores pró inflamatórios. Dentre os sinalizadores podemos citar: interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), esses medeiam a inflamação a partir da interação com receptores dos tipos TLRs, IL-1 receptor (IL-1R), receptor IL-6 (IL-6R) e o receptor TNF (TNFR). Uma vez ativados, importantes vias de sinalização intracelulares são acionadas, incluindo a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e Janus quinase (JAK) - transdutor de sinal e ativador das vias de transcrição (STAT) (CHEN et al, 2017).

3.3.2.1 Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são ativadas em resposta a estímulos externos, incluindo, fatores de crescimento, hormônios e patógenos. As MAPKs são formadas por serinas e treoninas expressas nas células, se tratando de mamíferos, sabe-se da existência de quatro genes responsáveis por codificar as isoformas p38 da MAPK: p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ , dentre elas, apenas as p38 α e p38 β estão envolvidas nos distúrbios inflamatórios, em que, regulam a liberação de citocinas (MIAO et al, 2019; FALCICCHIA et al, 2020).

As cascatas de sinalização de MAPKs ocorrem de maneira sequenciada e envolvem três quinases, a saber, inicia-se pela fosforilação e ativação de MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), que transduz o sinal para MAP quinase quinase (MAPKK), que por sua vez, ativam MAP quinase (MAPK). Essa via medeia a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (RONKINA; GAESTEL, 2022; FALCICCHIA et al, 2020).

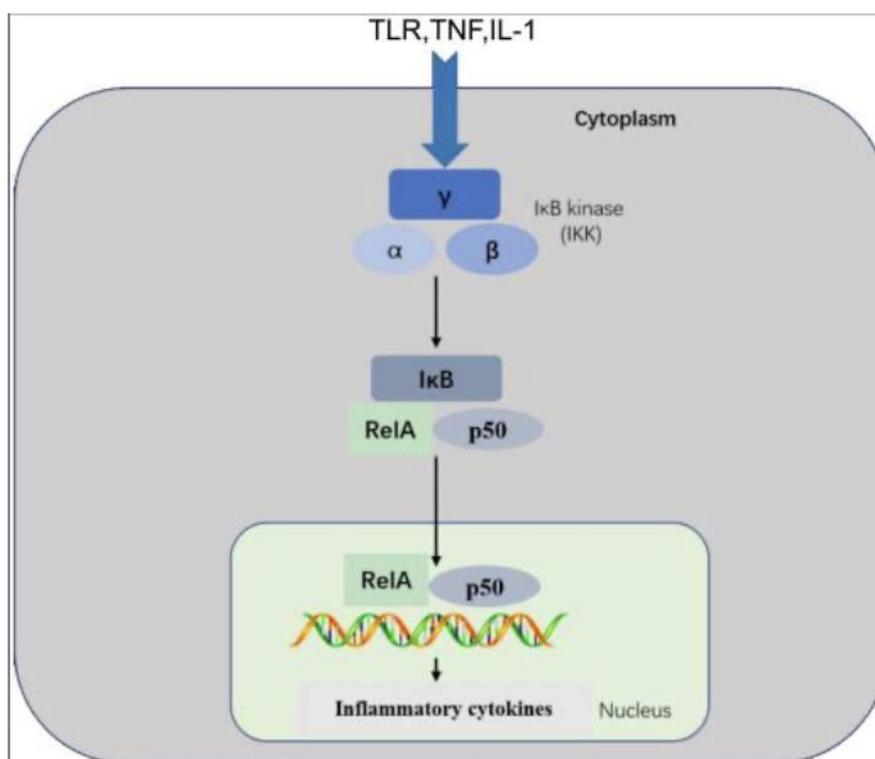
3.3.2.2 Via do fator nuclear kappa-b (NF- κ B)

A via do fator nuclear kappa-b (NF- κ B) medeia de modo crucial a inflamação além de ser essencial para a proliferação e sobrevivência de linhagens celulares. Essa via pode ser ativada por diversos fatores, os quais incluem: citocinas inflamatórias, enzimas e substâncias derivadas de patógenos, o que torna essa a única via a possuir uma ampla variedade de indutores e de genes que a regulam. Em condições fisiológicas, há proteínas presentes no citoplasma capazes de inibir o NF- κ B, denominadas I κ B, essas inibem a transfixação do NF- κ B para o núcleo, impedindo assim a sua transdução. Porém, em condições adversas a homeostase e

ativação dos PRRs, esses utilizam de mecanismos de transdução de sinal para estimular essa via (HE et al, 2023; YU et al., 2023).

Após a estimulação, os PRRs medeiam transdução de sinais que fosforilam I κ B quinase (IKK). A fosforilação de I κ B resulta em sua degradação pelo proteassoma e a subsequente liberação de NF- κ B para translocação nuclear e ativação da transcrição gênica que regula a imunidade, inflamação, diferenciação celular, migração, apoptose e morte celular (HE et al., 2023; CAO et al., 2023).

Figura 3 – Ativação da cascata de sinalização NF- κ B.



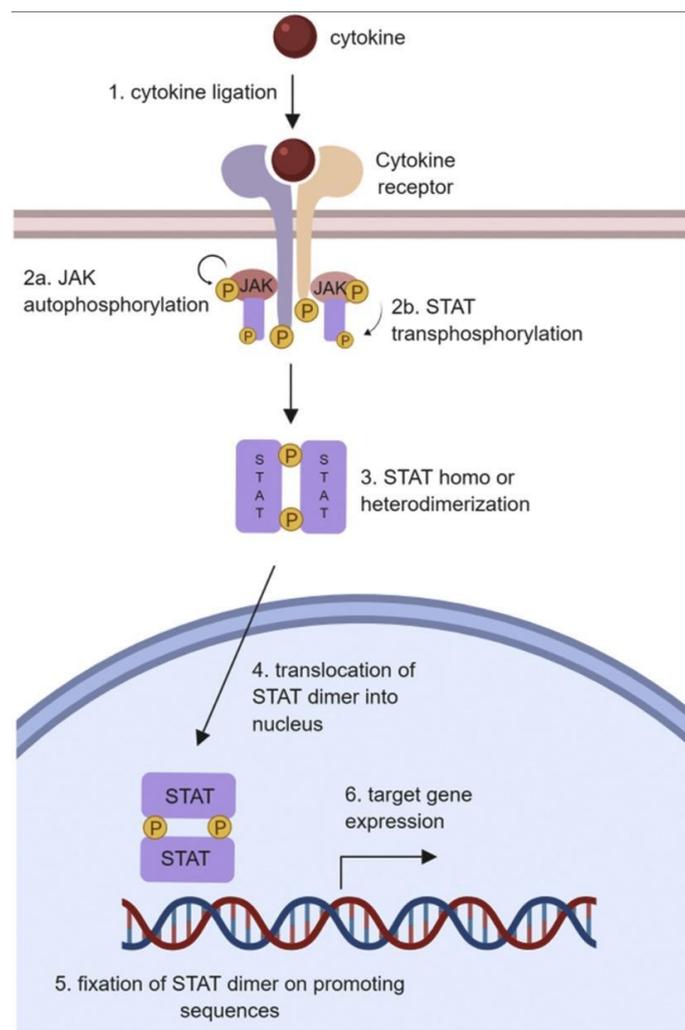
Fonte: Chen et al. (2017).

3.3.2.3 Via JAK-STAT

As vias JAK-STAT (transdutores de sinal e ativadores de transcrição) promovem a transdução de informação do ambiente extracelular para o núcleo da célula, em que, ativam fatores de transcrição e iniciam processos biológicos importantes, tais como: divisão celular, proliferação, apoptose, controle imunológico e hematopoiese (PUROHIT et al, 2023).

Essa via é regulada por três mecanismos principais iniciando pela ativação de receptores de citocinas na superfície celular, seguida da fosforilação de resíduos de tirosina do domínio intracelular pela proteína JAKs e por fim, ativação de de STAT (figura 4) (PUROHIT et al, 2023). Cada receptor de citocina, quando ativado, promove uma combinação específica de JAKs/STATs, ativando diferentes programas intracelular resultando em respostas biológicas variáveis (JAMILLOUX et al, 2019).

Figura 4 – Via de sinalização JAKs/STATs mediada por citocinas.



Fonte: PUROHIT et al. (2023)

Todas as vias aqui relacionadas - NF- κ B, MAPK ou JAK-STAT - estão intimamente relacionadas a doenças inflamatórias autoimunes e metabólicas. As ativações dessas vias

resultam na transcrição e secreção de citocinas, quimiocinas, dentre outros mediadores que serão abordados a seguir.

3.3 Mediadores envolvidos no processo inflamatório

3.3.1 Citocinas

As citocinas são pequenas estruturas que desempenham papéis importantes no sistema imunológico, em que, são expressas quando o organismo é exposto a alguma injúria tecidual. Esses polipeptídeos são liberados por células de defesa, a fim de, recrutar leucócitos para o local lesionado (BARAKAT et al, 2023). As citocinas são classificadas como ILs, fatores estimuladores de colônias (CSF), IFNs, TNFs, TGFs e quimiocinas que medeiam a inflamação e desempenham diversas funções (tabela 1) (CHEN, 2017).

Tabela 1 – Resumo das citocinas e suas funções.

Citocina	Família	Principais fontes	Função
IL-1 β	IL-1	Macrófagos, monócitos	Pró-inflamação, proliferação, apoptose, diferenciação
IL-4	IL-4	Células Th	Anti-inflamação, proliferação de células T e células B, diferenciação de células B
IL-6	IL-6	Macrófagos, células T, adipócitos	Pró-inflamação, diferenciação, produção de citocinas
IL-8	CXC	Macrófagos, células epiteliais, células endoteliais	Pró-inflamação, quimiotaxia, angiogênese
IL-10	IL-10	Monócitos, células T, células B	Anti-inflamatório, inibição das citocinas pró-inflamatórias
IL-12	IL-12	Células dendríticas, macrófagos, neutrófilos	Pró-inflamação, diferenciação celular, ativa células NK
IL-11	IL-6	Fibroblastos, neurônios, células epiteliais	Anti-inflamatório, diferenciação, induz proteína de fase aguda
TNF- α	TNF	Macrófagos, células NK, linfócitos CD4 ⁺ , adipócitos	Pró-inflamação, produção de citocinas, proliferação celular, apoptose, anti-infecção
IFN- γ	INF	Células T, células NK, células NKT	Pró-inflamação, imunidade inata e adaptativa antiviral
GM-CSF	IL-4	Células T, macrófagos, fibroblastos	Pró-inflamação, ativação de macrófagos, aumento da função de neutrófilos e monócitos
TGF- β	TGF	Macrófagos, células T	Anti-inflamatório, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias

Fonte: Adaptado de Chen e colaboradores (2017).

Identificar essas citocinas permite avaliar qual a etiologia da doença bem como realizar o manejo correto na clínica médica, além de, ser um importante alvo para desenvolvimento de novas substâncias capazes de atenuar os efeitos nocivos da liberação excessiva e prolongada no processo inflamatório (COSTA, 2023).

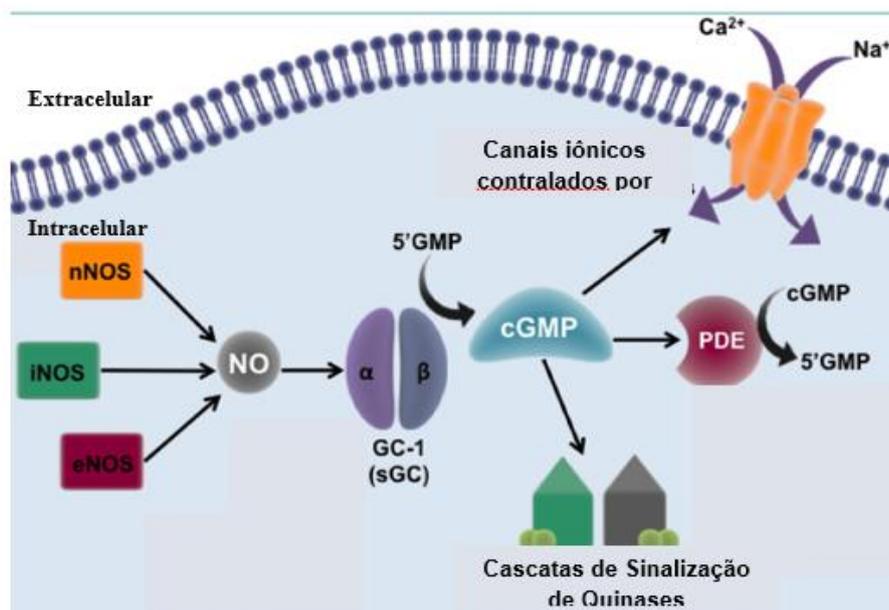
3.3.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora gasosa envolvida em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, como: vasodilatação, transmissão química e medeia a excitotoxicidade no sistema nervoso central, além de promover o relaxamento do músculo liso vascular, inibir a agregação plaquetária, modular a transmissão de neurotransmissores, participar de processos inflamatórios e patológicos. Sua síntese é derivada da ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) sobre o aminoácido L-arginina que resulta em: L-citrulina e NO (LIU; KANG; CHEN, 2023; WANI, et al., 2021; MURAD, 2011).

Atualmente sabe-se da existência de três isoenzimas das enzimas NOS, duas ditas constitutivas - nNOS - neuronal; eNOS- endotelial - e uma induzível (iNOS). A isoforma induzível, está intimamente relacionada ao processo inflamatório e a condições patológicas. Esta produz e libera grandes quantidades de NO mediante ativação de células – macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais – nos processos inflamatórios e infecciosos. Isso ocorre devido à produção de espécies reativas de oxigênio gerada pelo alto nível de NO (MATOS; GURGEL; CALLOU, 2019; SILVA, 2017).

O NO formado é um radical livre com um elétron desemparelhado, por um breve período de tempo (6 a 10 segundos), após isso ele é transformado em nitrato e nitrito. Ainda como radical livre, o NO é capaz de se difundir livremente nas células e ligar-se ao grupo prostético heme da subunidade β do seu receptor eucariótico/citosólico guanilato ciclase solúvel (GCs) (Figura 5), gerando uma mudança conformacional que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (WAREHAM; BUYS; SAPPINGTON, 2018).

Figura 5 – Mecanismo endógeno do NO sob a guanilato ciclase solúvel



Fonte: Wareham; Buys e Sappington (2018). Adaptado.

Através deste mecanismo, o GMPc então regula diretamente muitas atividades fisiológicas em que inclui, quinases, a via NO / sGC / cGMP inibe a proliferação do músculo liso, a agregação plaquetária e a remodelação vascular negativa, modulando a atividade de vários alvos a jusante, como proteínas quinases e canais iônicos controlados por cGMP (KINTOS, et al., 2022). No contexto da inflamação, essa ação está relacionada a promover uma maior vasodilatação local, contribuindo para a diapedese das células de defesa para o local lesionado (MATOS; GURGEL; CALLOU, 2019; HORST; MARLETTA, 2018; MENDES; LEÔNIDAS, 2016; RANG et al., 2016).

3.3.3 Ácido Hialurônico e hialuronidasas

Pertencente à família dos glicosaminoglicanos, o ácido hialurônico (AH) é um polissacarídeo de alto peso molecular composto por resíduos alternados de N-acetil D-glucosamina e ácido D-glucurônico ligados por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 e β -1,3.

Sua síntese é realizada sob ação da enzima hialuronanato sintase na membrana plasmática e secretada no meio extracelular. É influenciada por vários fatores como hormônios e mediadores inflamatórios. Tem importante papel nos processos de proliferação, crescimento e migração celular bem como em metástases de células tumorais. Sua produção está aumentada

em processos inflamatórios e de cicatrização como também nos processos de morfogênese e desenvolvimento embrionário (BORDON, 2012).

Presente em diversos tecidos (com importante papel na manutenção da integridade estrutural do tecido) e fluidos corporais, o AH apresenta propriedades físicas, predominante na estrutura e organização da derme e ajuda a garantir a flexibilidade e a firmeza da pele, além de promover uma maior resistência a entrada de microrganismos e lesão tecidual (GEBALSKI; GRACZYK; ZAIUSKI, 2022). Em condições homeostáticas é encontrado na forma de polímero de elevada massa molar, porém é condicionado a fragmentos de baixa massa molar em condições de estresse como na lesão tecidual (BORDON, 2012).

A fragmentação do AH é realizada pelas enzimas hialuronidases e gera polímeros entre 4 a 20 mil Da. Esses polímeros apresentam efeitos variados, ou seja, moléculas com alto peso molecular têm propriedades anti-inflamatórias, antiangiogênicas e imunossupressoras, enquanto que os de baixo peso molecular podem se relacionar à angiogênese e estabelecimento de processos inflamatórios com liberação de citocinas que induzem respostas inflamatórias em macrófagos e células dendríticas secundárias à infecção e lesão tecidual (GIRISH et al, 2009).

As hialuronidases são enzimas comumente encontradas na natureza, incluindo no organismo de mamíferos, cuja principal ação é hidrolisar o ácido hialurônico. Foram denominadas inicialmente como fator de difusão (*spread factor*) e estão presentes nas cepas β -hemolíticas de *Streptococcus*, venenos de cobras, abelhas, vespas, escorpiões, nematoides e sanguessugas e têm como função auxiliar a difusão dessas toxinas no organismo das suas vítimas (LOPES, 2016).

A depender da estrutura, do mecanismo de ação e de onde são encontradas as hialuronidases são divididas em três classes, segundo Meyer (1971), como detalhado a seguir:

Tabela 2 – Classificação das hialuronidases segundo Meyer (1971). (Continua).

Classe	Nome científico	Presentes em:	Mecanismo	Produtos de degradação
EC 3.2.1.35	endo- β -N-acetil hexosaminidases (4-glicanohidrolases)	Espermatozóides; mamíferos e venenos de himenópteros e peçonhas de serpentes	Hidrolisam β -1,4-glicosídicas	Tetrassacarídeo
EC 3.2.1.36	endo- β -D-glucuronidases (3-glicanohidrolases)	Presentes em invertebrados (sanguessugas, parasitos e crustáceos)	Hidrolisam β -1,3-glicosídicas no HÁ	Tetrassacarídeo ou o hexassacarídeo

Tabela 2 – Classificação das hialuronidasas segundo Meyer (1971). (Continuação).

Classe	Nome científico	Presentes em:	Mecanismo	Produtos de degradação
EC 4.2.2.1	endo- β -N-acetil hexosaminidasas (hialuronato liases)	Procariotos	Hidrolisam β Ligações - 1,4-glicosídicas em HA usando uma reação de eliminação β	Dissacarídeos que contêm resíduos de glicuronosil apresentando uma ligação dupla entre os carbonos 4 e 5

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As hialuronidasas estão envolvidas em muitos processos fisiologicamente importantes, como fertilização, difusão de toxinas e microorganismos, envelhecimento da pele, reações inflamatórias, alérgicas e desenvolvimento de câncer tanto no crescimento tumoral, quanto na metástase e na angiogênese. Presente no esperma, a hialuronidase é essencial para a quebra da camada granular presente no óvulo e assim permite a fecundação. Na pele, a decomposição do HA aumenta a viscosidade dos fluidos corporais e reduz a integridade dos tecidos, facilitando a penetração de microorganismos e toxinas. Estrategicamente presente na peçonha de cobras, as hialuronidasas são responsáveis por promover a difusão das toxinas presentes no veneno, sendo essencial para o sucesso do envenenamento e promoção do processo inflamatório (GEBALSKI; GRACZYK; ZAIUSKI, 2022; BORDON, 2012; FRANÇA, 2021).

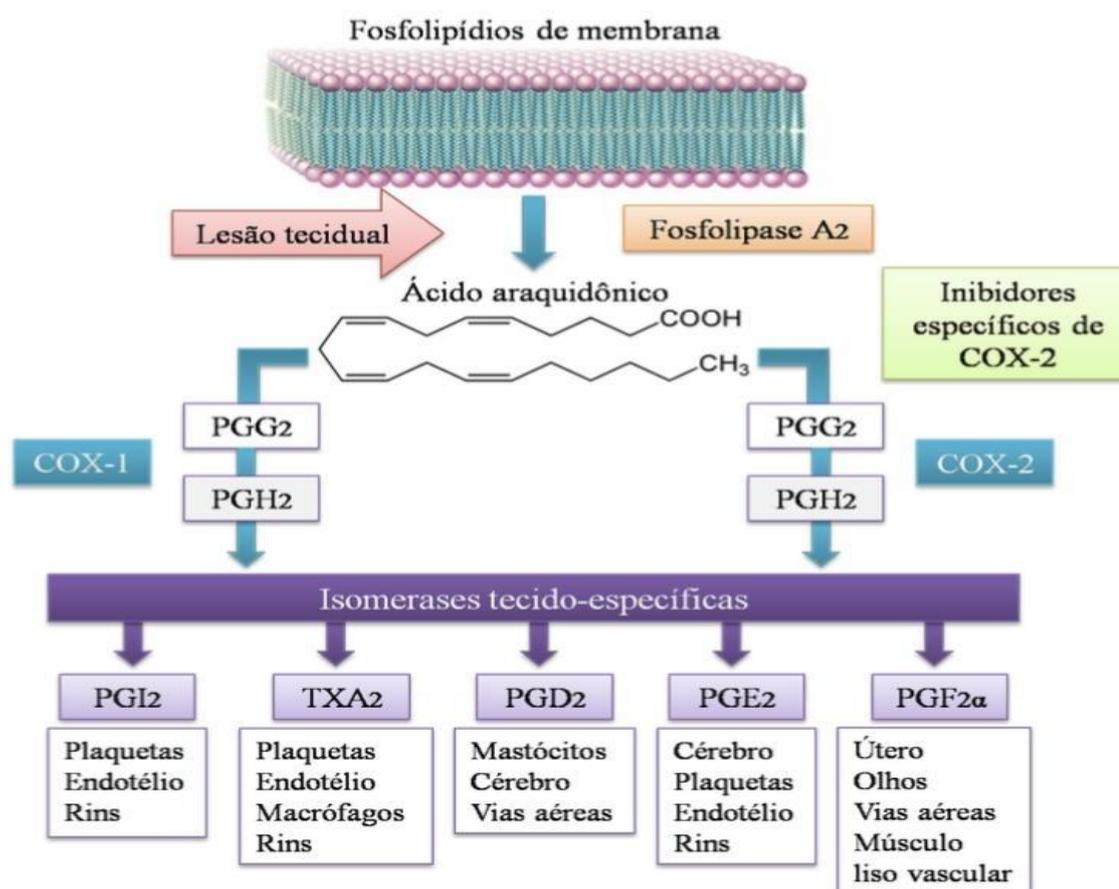
Devido à sua participação em muitos processos biológicos já citados, sua utilização é um paradoxo na terapêutica sendo utilizada tanto como um potente alvo terapêutico, quanto para otimização de fármacos, pois na clínica hialuronidase é utilizada para o aumento da eficiência de anestésicos, pois é possível otimizar a fluidificação na matriz celular permitindo maior absorção de fármacos (GEBALSKI; GRACZYK; ZAIUSKI, 2022; BORDON, 2012).

3.3.4 Cicloxigenases e via do ácido aracdônico

O dano gerado na parede celular acarreta na liberação de ácido aracdônico (AA) para o fluido intrínseco, levando a ativação da cascata do AA. O AA é derivado do ácido linoleico que constituem os fosfolipídios das membranas celulares. Os ácidos graxos liberados após a lesão sofrem ação de enzimas, como a fosfolipase A2 (PLA2), que libera o AA no citoplasma. Uma vez livre, o AA pode ser direcionado e metabolizado por três vias diferentes: a via da

lipoxigenase (formando principalmente leucotrienos e lipoxinas), via do Citocromo P450 e via das cicloxigenase (COXs) (figura 6), essa última gera as prostaglandinas, responsáveis por mediar uma variedade de ações biológicas envolvidas na fisiopatologia vascular e no aparecimento dos sinais e sintomas cardinais da inflamação (BATLOUNI, 2010; HILARIO; TERRERI; LEN, 2006; MEIRA et al., 2018; PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006; SILVA, 2016).

Figura 6 – Representação esquemática da biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do metabolismo do ácido araquidônico na via das COX 1 e 2.



Fonte: Apolinário (2016).

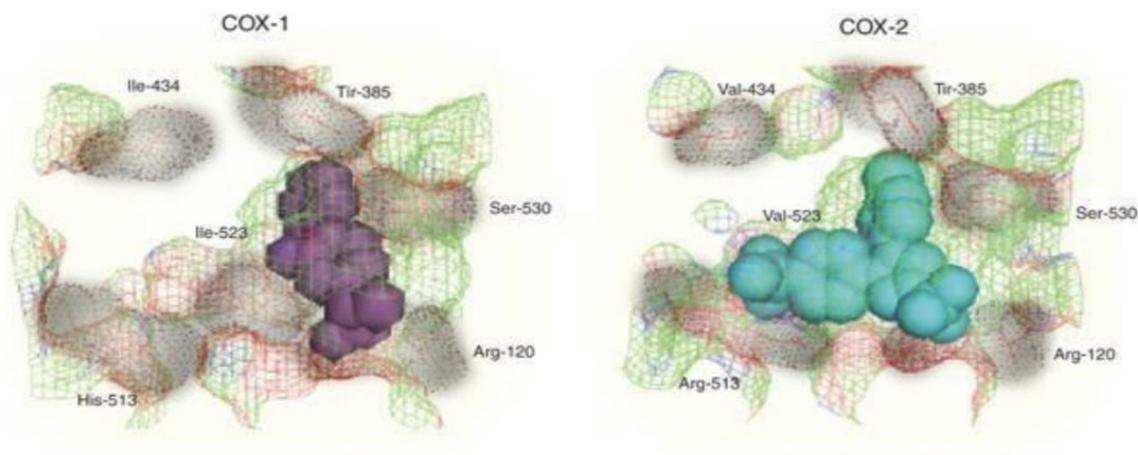
É de conhecimento a existência de três isoformas da cicloxigenase. As isoformas 1 e 2 regulam diversos processos fisiológicos que promovem a manutenção da homeostase do organismo. Dentre as funções homeostáticas promovidas pelas isoformas 1 e 2, destacam-se suas ações no trato gastrointestinal (promovendo a produção de prostaglandinas que formam o muco gastroprotetor e a fluidez sanguínea através das membranas mucosas); no sistema cardiovascular, os produtos oriundos da ativação da cicloxigenase (a prostaciclina) promove a

inibição da agregação plaquetária e adesão de leucócitos. Nos rins, a PGE₂ também produzida pelas isoformas é responsável por secretar renina além de promover modulação hemodinâmica glomerular e regular a excreção de sódio e água (ABDELALL et al, 2023; ZILANI, et al, 2021)

Na inflamação, a cicloxigenase-2 é sintetizada induzivelmente e atua elevando a resposta inflamatória através da liberação destas prostaglandinas. Quando há prolongamento desta resposta ou exacerbação da mesma, a liberação excessiva desses fatores pode culminar em doenças crônicas (NAPORA et al, 2023). Bloquear essa enzima garante a diminuição dos efeitos indesejáveis da inflamação.

Vale salientar que as cicloxigenases 1 e 2, são semelhantes em termos de estrutura, diferindo entre si apenas o aminoácido isoleucina e valina na posição 523, presente na COX-1 e COX-2, respectivamente. Essa mudança proporciona uma mudança conformacional caracterizado por um bolsão lateral na enzima COX-2, o que permite uma abertura maior no seu sítio ativo e a difere da COX-1. Essa descoberta possibilitou a formação de fármacos que inibem essas enzimas, os ditos anti-inflamatórios não esteroidais e também inibem de modo seletivo a COX-2 mantendo o efeito anti-inflamatório potencializado (ABDELALL et al, 2023).

Figura 7 – Enzimas cicloxigenases 1 e 2, diferenciadas pelos aminoácidos isoleucina e valina na posição 523, respectivamente.



Fonte: Goodman e Gilman (2015).

3.4 Farmacologia da inflamação

3.4.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) estão entre os produtos farmacêuticos mais frequentemente utilizados na terapêutica com efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Os AINES constituem um grupo heterogêneo de fármacos que inclui a aspirina e outros inibidores da COX, seletivos ou não que possuem em sua estrutura química um grupo aromático, com a presença de resíduos funcionais importantes para as interações no sítio catalítico das enzimas cicloxigenases (HUYNH et al., 2023; SHU; JAMIESON; LAKE, 2023; ALMEIDA, 2019).

As propriedades anti-inflamatórias exercidas por essa classe são amplamente aceitas, porém o seu uso não é inócuo e está associado a ampla gama de efeitos adversos. Alguns fármacos pertencente a classe dos AINEs, como: ibuprofeno; naproxeno; nimesulida, inibe as COXs, de forma reversível e não seletiva sobre as mesmas enzimas, reduzindo a conversão do AA em PGs e tromboxanos (TX), promovendo o aumento do risco de danos na mucosa gástrica, reações alérgicas e broncoespasmos resultantes da inibição das PGs citoprotetoras, associada a produção de muco; secreção gástricas e do aumento dos níveis de leucotrienos, respectivamente (ALMEIDA, 2019; JACOB, et al., 2018; APOLINÁRIO, 2017; MONTEIRO et al., 2008).

Para amenizar tais efeitos no trato gastrointestinal e sabendo das diferenças existentes entre as isoformas COX-1 e COX-2, foi-se elaborando estruturas farmacológicas cujo mecanismo seria inibir seletivamente a COX-2, frequente chamados de coxibs, no entanto, os efeitos adversos atribuídos a seletividade foram impactantes, houve um risco aumentado de eventos cardiovasculares, incluindo complicações no miocárdio. Para as doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide, espondilite anquilosante e intolerância a AINEs não seletivos devido aos efeitos GI, os coxibes proporcionam benefícios clínicos significativos (GONG, et al., 2012).

Ainda na classe dos AINEs, há fármacos com mecanismos diferenciados quando se trata da inibição da COX, ditos AINEs atípicos. Dentre eles o paracetamol, também conhecido como acetaminofeno ou N-acetilparaminofenol, difere da maioria dos AINEs por apresentar um baixo poder anti-inflamatório e baixa incidência dos efeitos colaterais relacionados à inibição da enzima COX, isso ocorre devido à alta afinidade deste pela isoforma COX-3 expressa no SNC, o que justifica o seu melhor desempenho no controle térmico. Sua utilização em níveis elevados ou em associação com outros fármacos que possuam metabolismo hepático está associada a lesões hepáticas (ALMEIDA, 2019; MÜHLBAUER, 2016).

3.4.2 Anti-inflamatórios Esteroidais

Os anti-inflamatórios esteroidais pertencem a classe dos glicocorticóides (GR), isso porque sua estrutura mimetiza os hormônios adrenocorticotrófico. Os hormônios esteróides são secretados pela zona fasciculada do córtex adrenal e desempenham diversas funções, dentre as quais destaca-se, a regulação do metabolismo de açúcares, mobilização de gorduras e síntese de proteínas, além de inibir a resposta imune, a resposta inflamatória e tóxica (ZOU et al., 2023).

A ação dos GRs nas células é mediada por receptores de glicocorticóides (RG), encontrado no citoplasma, o complexo glicocorticoide-RG translocam-se rapidamente para o núcleo onde a interação com o DNA e moléculas co-ativadoras (receptor de esteróide do tipo 2 (SRC-2)) regulam a expressão de diversos genes. Há dois caminhos pelo qual pode haver a regulação destes genes, que são: i) trans-repressão gênica, em que há participação da enzima histona desacetilase (HDAC) essa desacetila genes do complexo de transcrição de moléculas pró-inflamatórias, dificultando a transcrição de proteínas pró-inflamatórias. ii) trans-ativação gênica, neste há o aumento da expressão enzima histona acetiltransferase (HAT) que promove a acetilação de genes codificantes de proteínas antiinflamatórias. Além disso, o complexo glicocorticoide-GR pode ligar-se a fatores de transcrição - NF- κ B e AP-1 - impedindo que os mesmos codifiquem proteínas pró-inflamatória (TORRES, INSUELA e CARVALHO, 2012; HEITZER et al., 2007).

Os medicamentos pertencentes a essa classe - dexametasona, betametasona, hidrocortisona, prednisolona, entre outros - são eficazes no tratamento de várias doenças inflamatórias e imunológicas, incluindo asma, dermatites, artrite reumatóide e alguns casos de câncer. No entanto, o uso dos GCs a longo prazo pode resultar em distúrbios metabólicos, como intolerância à glicose, resistência insulínica e dislipidemias (ZIMATH, 2022).

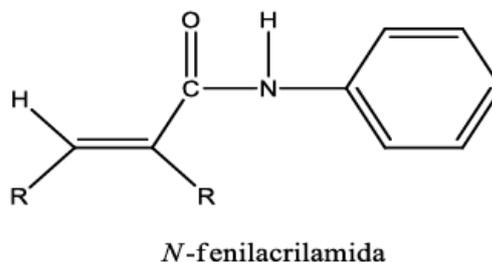
Desse modo, a busca por novos fármacos com potencial ação antiinflamatória e menos efeitos adversos são necessários.

3.5 Derivados fenilacrilamidas

Compostos que incorporam o grupo *N*-fenilacrilamida tem aplicações biológicas pronunciadas. As fenilacrilamidas são intermediários valiosos para a síntese orgânica de diversos medicamentos com propriedades diversas. A função fenilacrilamida (figura 8) é utilizada para obtenção de diversos efeitos farmacológicos, a principal delas, é a atividade antitumoral, com a função antiproliferativa. Apesar desse conhecimento, pouco se sabe da sua

utilização no controle da inflamação (SILVA et al., 2022; SILVA et al., 2020; LI et al., 2012; GU et al., 2019).

Figura 8 – Função *N*-fenilacrilamida



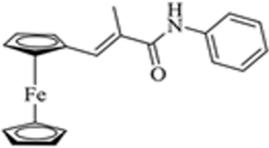
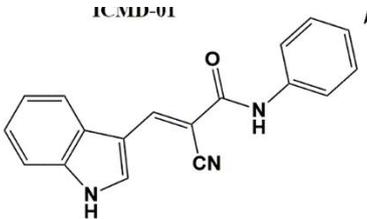
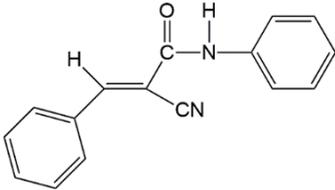
Fonte: Silva (2019).

Investigações recentes sugerem que essas moléculas podem ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes farmacologicamente promissores (SILVA et al., 2021; LI, et al., 2012; GU, et al., 2019) como exposta no quadro 1.

Quadro 1 – Atividades biológicas de derivados *N*-fenilacrilamida. (Continua).

Atividade Biológica	Estrutura Química	Fonte
Anti-inflamatório (inibidor de CRTH2)	<p style="text-align: center;">(E)-2-ciano-3-(1-<i>H</i>-indol-3-il) acrilamida</p>	Valdenaire et al. (2014)
Antitumoral (Inibidor de HDAC)	<p style="text-align: center;">3- (1,3-difenil- 1H -pirazol-4-il) N-fenilacrilamida</p>	Li et al. (2012)

Quadro 1 – Atividades biológicas de derivados N-fenilacrilamida. (Continuação).

Atividade Biológica	Estrutura Química	Fonte
Anticâncer	 <p>(E)-2-metil-3-ferrocenil- N- acrilamida</p>	Liu et al. (2019)
Antiinflamatória	 <p>(2-ciano-3-(indol-3-yl)- nfenilacrilamida</p>	SILVA et al. (2020)
Antiinflamatória	 <p>(E)-2-ciano-N,3-difenilacrilamida</p>	SILVA et al. (2022)

Fonte: Silva (2019). Adaptado.

GU e colaboradores (2019) desenvolveram uma série de derivados sintéticos da fenil acrilamida como novos agentes antioxidantes e antiinflamatórios. As avaliações biológicas desses compostos mostraram que as moléculas contendo essa função apresentou resultados promissores ao proteger células merenciais (HBZY-1) do estresse oxidativo causado pela

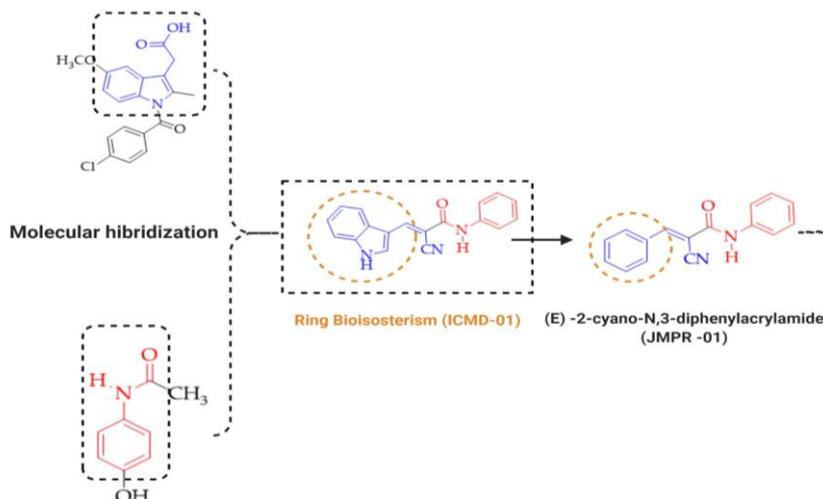
exposição a H_2O_2 . Os mesmos autores sugerem que esse composto poderia ativar o fator nuclear eritróide 2_(Nrf2), um importante ativador capaz de aumentar a expressão de proteínas no mRNA de enzimas antioxidantes, além de inibir a produção de NO e NF- κ B em células mesangiais HBZY-1 estimuladas por LPS, indicando sua potencial atividade antiinflamatória.

Silva (2017) avaliou a atividade imunomoduladora e anti-inflamatória do composto (E)-2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-N-fenilacrilamida (ICMD-01), que apresentou atividade satisfatória na dose de 50 mg/Kg, frente ao edema de pata realizado em camundongos *Swuis*, além de apresentar um perfil de segurança gastrointestinal melhorado quando comparado com os medicamentos anti-inflamatórios convencionais. No mesmo estudo Silva (2019) um outro composto também derivado da função N-fenilacrilamida, foi investigado o (E)-2-ciano- N-3-difenilacrilamida (JMPR-01). Testes realizados com o composto JMPR-01 mostraram a baixa toxicidade do composto em testes *in vitro*, além de demonstrar efeito anti-inflamatório em testes *in vivo*. A fim de obter respostas quanto ao possível mecanismo de ação exercido por esse composto (JMPR-01) foi-se desenvolvida esta pesquisa.

3.5.1 Composto (E)-2-ciano- N-3-difenilacrilamida (JMPR-01)

O composto (E)-2-ciano-N-3-difenilacrilamida (JMPR-01) foi desenvolvido estruturalmente utilizando modificações bioisostéricas de um protótipo híbrido formado a partir de fragmentos de indometacina e paracetamol como mostrado no esquema a seguir.

Esquema 1 – Formação do composto JMPR-01



Fonte: Silva et al. (2022).

O derivado JMPR-01 foi obtido a partir de uma rota linear, através de uma reação de condensação proposta por Knoevenagel utilizando como intermediários o JM01 – 2-ciano-*N*-fenilacrilamida previamente sintetizado por Silva (2018) e o 4- carboxibenzaldeído. A síntese do composto se mostrou segura, viável, com rendimentos satisfatórios de fácil purificação e com resultados espectroscópicas e espectrométricos condizentes a estrutura.

As propriedades físico-químicas também foram determinadas, essas são intrinsecamente relacionadas à estrutura. O composto se apresenta como pó cinza claro, possui coeficiente de partição teórico de 2,43 P, cuja massa molar é de 287,11 g/mol, parâmetros como o fator de retenção 0,60¹ também foi determinado além do rendimento do composto que foi de 72,37%, a faixa de fusão encontra-se entre 230-232°C. Esse composto se mostrou solúvel em diversos solventes orgânicos – acetato, acetona, DMSO, etanol e clorofórmio (SILVA, 2019).

Nos ensaios *in vitro*, o JMPR-01 mostrou inibição significativa da produção de nitrito e citocinas pró-inflamatórias, *in vivo*, apresentou inibição da migração leucocitária no teste de peritonite realizado em camundongos, no edema de pata induzido por zimosan os resultados também foram promissores nas doses testadas (SILVA et al. 2019). Com base nesses estudos previamente realizados, propomos ensaios estratégicos para analisar a atividade anti-inflamatória exercida pelo JMPR-01.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do composto

O composto 2-ciano-N-3-difenilacrilamida (JMPR-01) utilizado nesta pesquisa foi fornecido pela equipe do Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos (LDSF) coordenado pelo professor Dr. Ricardo Olímpio Moura.

4.2 Local da pesquisa

A avaliação da atividade farmacológica foi desenvolvida nos Laboratórios de Ensaios Farmacológicos da Universidade Estadual Paraíba, em Campina Grande.

4.3 Procedimentos éticos

Os protocolos experimentais foram aprovados pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba sob o número de aprovação 003/2021 com as normas aprovadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

4.4 Animais

Para os testes farmacológicos foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas, priorizando o peso entre 25 e 35g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com temperatura e umidade controlada, respeitando o ciclo claro-escuro de 12 horas, com ração e água *ad libitum*.

4.5 Preparo das substâncias

Para realização dos testes farmacológicos, o composto foi dissolvido em solução salina acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, antes da utilização e administrado de acordo com a via requerida no procedimento realizado.

4.6 Avaliação toxicológica *in vivo*

4.6.1 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado utilizando-se 6 camundongos fêmeas divididas em dois grupos (n=3). Os animais do grupo controle, foram tratados com veículo (salina acrescida de DMSO 5%) e os animais do grupo tratados com 2000 mg/Kg de JMPR-01 por via oral (gavagem). Após os tratamentos, os animais foram observados nos tempos de 15 e 30 minutos e 1, 2, 4 e 8 horas após a administração e, a partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia, por meio do *screening* hipocrático segundo Almeida (1999), que avalia o estado de consciência e a disposição geral dos animais, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo. Parâmetros como massa corporal, consumo de água e ração foram observados a cada 24 horas durante 14 dias. Ao final do experimento, os animais foram pesados e anestesiados para coleta de sangue por punção cardíaca para análise bioquímica e hematológica, em seguida foram submetidos a eutanásia, sendo os órgãos (fígado, baço, rins e estômago) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente (figura 9) (CUNHA et al., 2013).

Figura 9 – Representação esquemática do teste de toxicidade aguda:



Fonte: Google fotos.

4.6.2 Determinação dos parâmetros hematológicos

A determinação dos parâmetros hematológicos foi realizada conforme Apolinário (2016). As amostras de sangue dos camundongos foram dispostas em tubos contendo anticoagulante, em que foram automaticamente com analisador sendo determinados os seguintes parâmetros hematológicos: leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito,

plaquetas e índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

4.6.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos dos camundongos foram realizado conforme Apolinário (2016). As amostras de sangue coletadas com o gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 3500rpm, para obtenção do soro, destinado às dosagens dos seguintes parâmetros: glicose, colesterol, triglicerídeos, HDLplus, creatinina, ácido úrico, ureia, transaminase oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP).

4.7 Avaliação toxicológica in vitro

4.7.1 Atividade hemolítica

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade foi conforme a metodologia descrita por Wang e colaboradores (2009), com algumas modificações. Para tal, utilizou-se eritrócitos humanos frescos (tipo O+) doado pela própria analista. A quantidade necessária foi coletada pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB e acondicionado em tubos contendo citrato de sódio. Os eritrócitos foram separados por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e lavados 3 vezes com solução salina. As hemácias então foram ressuspensas com a mesma solução e o volume ajustado para 10%. Em seguida, 1 mL desta suspensão foi adicionado em tubos de ensaio e homogeneizadas com 1 mL do composto diluído nas concentrações de 500 e 1.000 µg/mL acrescidas de DMSO (5%), aguardou-se uma hora e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm. A leitura foi realizada utilizando um espectrofotômetro (540 nm), em que o branco utilizado será solução salina 1%, para confirmar os resultados da leitura visual. O controle negativo utilizado foi a suspensão de hemácias 10% mais solução salina e controle positivo uma solução de ácido acético a 2%. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em porcentagens de hemólise calculados a partir da equação (GUINDANI et al., 2020):

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} * 100$$

Em que:

D_t : absorvância da amostra teste;

D_{nc} : absorvância do controle negativo;

D_{pc} : absorvância do controle positivo.

4.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.8.1 Edema de pata induzida por zimosan

Os testes de edema de pata foram realizados como descrito por Fernandes (2002), com adaptações. Para tanto, os camundongos divididos em grupo (n=7) foram tratados por via oral (gavagem) com 10 mL/Kg do veículo (salina acrescida de DMSO 5%), indometacina (10 mg/Kg) e o composto JMPR-01 nas concentrações 150; 100 e 50 mg/Kg. Passados 30 minutos os animais receberam na região plantar das patas traseiras direitas o volume de 50 μ L da solução de zimozan a 2%. O volume da pata de camundongo foi medido em mm³ com o auxílio de um plestismômetro, antes do tratamento e após a estimulação do edema (figura 10). A quantidade de inchaço da pata foi determinada para cada animal e os dados representados como variação do volume da pata (Δ ·mm³).

Figura 10: Representação esquemática do teste de edema de pata induzido em camundongos.



Tratamento



Indução do edema



Mensuração do edema com uso do plestismômetro

Fonte: Google fotos.

4.8.2 Bolsão de ar subcutâneo

A indução de uma bolsa de ar no dorso de camundongos (grupo n=6) foi feita através da injeção de ar estéril. No primeiro dia injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, em jejum prévio de 4 horas, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio os animais (jejum prévio de 12 horas) receberam, por via oral, veículo (salina acrescida de DMSO 5%, 10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), JMPR-01 (50 mg/kg). Para indução da inflamação foi injetado 1,0 mL de uma solução de zimosan a 1% dentro da bolsa de ar uma hora após a administração dos compostos. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados por via intraperitoneal com overdose de xilazina e cetamina (10 mg/kg - 100 mg/kg). As bolsas de ar foram lavadas com 3,0 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) contendo heparina como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica (figura 11). Foram expressos como resultados, as médias dos números de leucócitos totais/mm³ de cada grupo experimental e a percentagem de inibição da migração de leucócitos comparativamente ao grupo experimental controle.

Figura 11 – Representação esquemática do teste de bolsão de ar subcutâneo.



Fonte: Google fotos.

4.8.3 Envolvimento da enzima óxido nítrico sintase no modelo de edema de pata

Para estudar o envolvimento do óxido nítrico (NO) foi utilizado um bloqueador inespecífico da óxido nítrico sintase (NOS), o L-NAME. Para tanto, foi-se utilizado 3 grupos de (n=7), dois grupos de animais foram então tratados com L-NAME (20 mg/Kg) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da administração do tratamento: JMPR-01 (50 mg/Kg) e veículo, em diferentes grupos. Após 30 minutos foi-se induzido o edema com injeção intraplantar de zimosan (2%). Grupo controle foi realizado simultaneamente, sendo os animais

tratados somente com solução salina acrescida de DMSO 5%. O edema de pata foi medido como descrito em 4.8.1.

4.8.4 Envolvimento da enzima guanilato ciclase no modelo de edema de pata

Nesta sessão de experimentos, foi-se utilizado 3 grupos de (n=6), dois grupos de animais foram então tratados com azul de metileno (AM), um inibidor da guanilato ciclase solúvel (15,6 mols/Kg) por via intraperitoneal 30 minutos antes da administração de JPMR-01 (50 mg/Kg) em um dos grupos e no segundo grupo foi-se administrado apenas salina acrescida de DMSO 5%. Grupo controle foi realizado simultaneamente, sendo os animais tratados somente com solução salina acrescida de DMSO 5%. O edema de pata foi medido como descrito em 4.8.1.

4.9 Avaliação anti-inflamatória in vitro (envolvimento da via hialuronidase)

4.9.1 Obtenção da Peçonha de *Bothrops erythromelas*

A peçonha liofilizada utilizada foi da serpente *Bothrops erythromelas* (PBe) cedida pela Professora Karla Luna da Universidade Estadual da Paraíba.

4.9.2 Inibição da atividade das hialuronidases

A atividade hialuronidásica da peçonha foi determinada turbidimetricamente utilizando ácido hialurônico como substrato, conforme descrito previamente na literatura, com pequenas modificações (FÉLIX-SILVA et al., 2017; PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2015).

Diferentes concentrações de PBeu (0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 µg) foram diluídas em PBS e pré-incubadas por 30 min a 37 °C em um volume final de 80 µL em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 6,0 contendo NaCl 0,15 M. Em seguida, 10 µL de ácido hialurônico (0,5 µg/µL em tampão acetato) foram adicionados, e as amostras foram incubadas por 1 h a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 200 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 2,5% em hidróxido de sódio 2%. Após 10 min em repouso à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 440 nm em um leitor de microplacas (Epoch-BioTek, Winooski, VT, EUA). Brancos foram preparados da mesma forma, substituindo o substrato por igual volume de tampão. Uma concentração mínima hialuronidásica foi definida como a menor

quantidade de peçonha capaz de produzir um decréscimo de 50% da turbidez em relação ao controle em que se incubou apenas substrato (ausência de peçonha).

Para os ensaios de inibição, uma concentração mínima hialuronidásica de PBe (10 µg) foi pré-incubada com diversas concentrações do JMPR-01 (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µM) a 37 °C por 30 min, e em seguida o ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade hialuronidásica em relação ao controle em que apenas peçonha foi incubada, como média ± erro padrão da média, com n = 3.

4.10 Ensaio de modelagem molecular *in silico*

Foram adotadas diferentes metodologias devido à disponibilidade e condição das estruturas disponíveis na base de dados (Protein Data Bank (PDB)) referentes aos seguintes alvos: óxido nítrico sintase (PDB ID: 3e7g), hialuronidase 1 (PDB ID: 2pe4), guanilato ciclase solúvel (PDB ID: 4ni2). As metodologias foram consideradas como válidas ao alcançar um valor de *root mean square deviation* (RMSD) inferior a 2,0 Å entre a estrutura docada e a posição original de seu ligante. Em seguida, as análises das interações moleculares do composto foram realizadas usando os programas GOLD[®] e AutoDock Vina[®] em combinação com o algoritmo genético de Lamarck sob condições específicas de preparação do ligante e da estrutura.

4.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão das médias das medidas feitas em 5 a 6 animais em cada grupo. As comparações entre três ou mais tratamentos serão feitas usando ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey, como apropriado. Todos os dados foram analisados utilizando o *Software* de Computador Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação toxicológica *in vivo*

5.1.1 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda de dose única é uma metodologia amplamente empregada que tem como finalidade estabelecer as consequências potencialmente nocivas de novas substâncias sobre os organismos, quando expostos a alta concentração em um curto período de tempo. Esse teste permite estabelecer a margem de segurança de um produto de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (AMANAT; DAULA; SINGH, 2023).

O perfil de segurança do JMPR-01 foi avaliado através do teste de toxicidade oral aguda de acordo com as diretrizes OECD 423 (2001), no qual a substância é administrada em dose única específica (BEDI, 2020).

Até o décimo quarto dia, não houve morte nem foi observado alterações fisiológicas ou comportamentais nos animais testados na dose de 2000 mg/Kg, indicando baixa toxicidade do composto testado. Esse resultado enquadra essa substância na classe 5 das diretrizes OECD 423 (2001), pelo método de classe, indicativo de que o JMPR-01 possui um DL₅₀ superior a 2000 mg/Kg e menor que 5000 mg/Kg (SILVA, 2022).

Os valores expressos na tabela 4 demonstram que o composto em estudo não alterou o consumo de água e ração dos animais.

Tabela 3 – Consumos de água e ração de camundongos Swiss, fêmeas tratadas com JMPR-09 na dose de 2000 mg/mL, durante 14 dias.

Tratamentos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)
Controle	16,92 ± 3,56	13,21 ± 1,57
JMPR-09 2000 mg/mL	16,21 ± 3,72	13,78 ± 2,41

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os dados são expressos como média ± SEM; n = 13 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + DMSO 5% (p <0,05).

Quanto a evolução ponderal os animais tratados com JMPR-01 não apresentaram diferenças significativas quanto ao grupo controle. Com relação aos órgãos as avaliações

macroscópicas não apresentam alterações morfológicas, bem como, não apresentaram alterações em seus tamanhos (tabela 5), nem coloração diferentes em relação ao grupo controle.

Tabela 4 – Peso relativo dos órgãos (%) de camundongos do grupo controle e tratados com o JMPR-01 na dose de 2000mg/kg por via oral após 14 dias.

Órgãos	Tratamentos	
	Controle	JMPR-01 2000 mg/Kg
Coração	0,137 ± 0,007	0,119 ± 0,008
Fígado	1,245 ± 0,912	1,106 ± 0,809
Baço	0,178 ± 0,045	0,129 ± 0,016
Rins	0,565 ± 0,045	0,487 ± 0,033

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os dados são expressos como média ± SEM; n = 3 determinações por grupo. *Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + DMSO 5% (p <0,05).

Ao fim dos 14 dias, sob efeitos de anestésicos, foi coletado por pulsão cardíaca, o sangue dos animais para avaliar os parâmetros hematológicos e bioquímicos (tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Determinação dos parâmetros hematológicos dos camundongos Swis tratados com JMPR-01 2000 mg/Kg.

Parâmetros Hematológicos	Tratamentos	
	Controle	JMPR-01 2000 mg/Kg
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	5,5 ± 1,7	7,5 ± 0,9
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	8,27 ± 0,78	6,77 ± 2,47
Hemoglobina (g/dL)	13,35 ± 1,45	11,45 ± 3,35
Hematócrito (%)	38,8 ± 3,8	32,55 ± 11,05
VCM (µm ³)	45 ± 2	49 ± 1
HCM (µµg)	15,6 ± 0,3	17,45 ± 1,35
CHCM (%)	33,35 ± 0,75	36,4 ± 1,2
Plaquetas (10 ³ mm ³)	743,5 ± 6,5	1.159,5 ± 272,5*

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os dados são expressos como média ± SEM; n = 3 determinações por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + DMSO 5% (p <0,05).

Tabela 6 – Determinação dos parâmetros bioquímicos de camundongos Swis tratados com JMPR-01 2000 mg/Kg.

Parâmetros Bioquímicos	Tratamentos	
	Controle	JMPR-01 2000 mg/Kg
Colesterol (mg/dL)	112,6 ± 11,89	151±21,27
Creatinina (mg/dL)	0,35 ± 0,05	0,266±0,04
Glicose (mg/dL)	373 ± 137,9	330,6±121,2
HDLplus (mg/dL)	68,6 ± 3,29	104,3 ± 7,36
Triglicerídios (mg/dL)	205,3 ± 56,06	383,3± 24,7
Ácido úrico (mg/dL)	7,4 ±1,91	6,8 ±1,15
Ureia (mg/dL)	11,6 ± 0,47	105,6 ± 28,21
TGO	861 ± 164,0	368,5 ± 283,5 **
TGP	180 ± 36,37	110,3 ± 59,25

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os dados são expressos como média ± SEM; n = 3 determinações por grupo. ** Significativamente diferente do grupo controle tratado com salina + DMSO 2% (p <0,05).

Nesses achados laboratoriais observa-se uma redução significativa nos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e aumento nos níveis de plaquetas. Em estudo anterior Silva (2021), observou resultados semelhantes nas mesmas condições estudadas, testando uma molécula contendo também a função fenilacrilamida, o composto 2-ciano-3-(1H-indol3-il)-N-fenilacrilamida. (ICMD). Além de apresentar redução nos níveis de TGO e aumento no número de plaquetas, o composto ICMD também apresentou alteração nos níveis de triglicerídeos e de células brancas. Levando em consideração os sinais clínicos evidenciados pela ausência de mortes e de alterações comportamentais nos ensaios toxicológicos, além da ausência de alteração macroscópica dos órgãos analisados, o composto JMPR-01 mostra possuir baixa toxicidade nas condições testadas.

5.1.2 Atividade hemolítica

O teste de hemólise avalia a capacidade do composto em provocar uma ruptura na membrana de eritrócitos humanos sendo importante para investigar os impactos toxicológicos

do contato de novos compostos com fluídos sanguíneos. A hemólise resulta na liberação de hemoglobina que pode ser medida tomando-se a absorbância a 540 nm (QUDES et al., 2023).

Para o ensaio foi empregado a concentração de 500 e 1.000 µg/mL do JMPR-01, obtendo um grau de hemólise de 1,6% e 1,26%, respectivamente. Esses achados sugerem que o composto JMPR-01 não apresenta citotoxicidade significativa, uma vez que, o poder hemolisante citotóxico é igual ou superior a 10%. Também é possível observar que não há um aumento de hemólise dependente da dose.

O mesmo teste empregado a substancia que contém a função fenilacrilamida, o composto 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-N-fenilacrilamida (ICMD) apresentou uma porcentagem de hemólise de 4,7% quando exposto as mesmas condições aqui testadas em uma concentração de 500 µg/mL. Assim, pode-se inferir que o composto JMPR-01 exibe menor citotoxicidade quando comparado ao composto anterior. Vale salientar que, ambos os compostos foram sintetizados por Silva (2019), provenientes do mesmo precursor sintético o intermediário 2-ciano-N-fenilacetamida (JM-01).

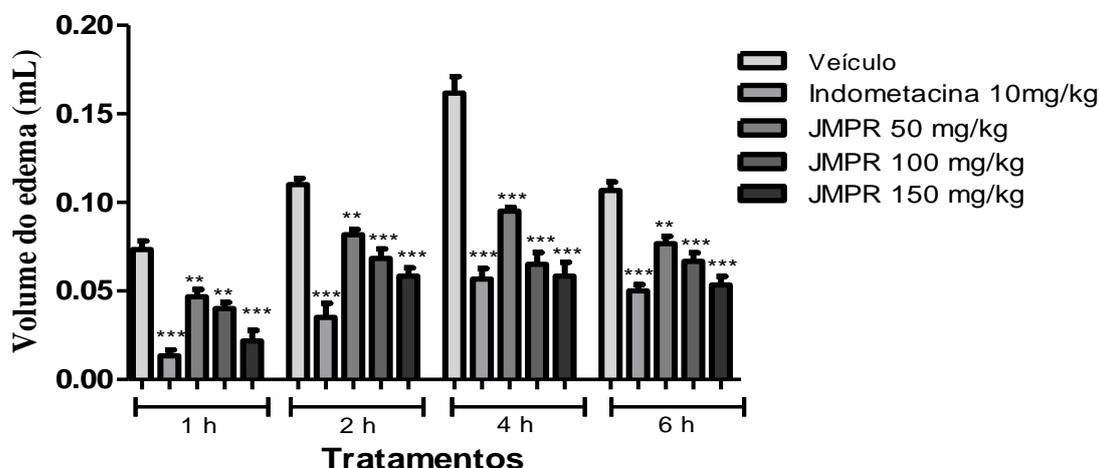
5.2 Avaliação da atividade farmacológica

5.2.1 Edema de pata induzida por zimosan

O teste de edema de pata permite investigar a migração de células inflamatórias para o local lesionado, essa migração é mensurada com a utilização de um pletismometro em diversos períodos de tempo após a inserção do agente flogístico (zimozan) na pata direita traseira do animal. Esse teste foi utilizado inicialmente para identificarmos a melhor dose resposta do composto, para tanto, foi utilizado as seguintes doses do JMPR-01: 50 mg/Kg; 100 mg/Kg e 150 mg/Kg, por via oral, 30 minutos antes da administração do zimosan.

No gráfico a seguir (figura 12), é possível visualizar que o pré tratamento com o JMPR-01 apresentou diminuição edematogênica significativa ($p < 0,05$) na quarta hora, com inibição de 41,35; 59,87 e 64,19 %, em todas as doses testadas, 50; 100 e 150 mg/Kg, respectivamente. Como os percentuais de inibição do edema na sua melhor atividade (na quarta hora), foram significativos em relação ao grupo não tratado, mas não apresentou diferenças significativas entre si, optou-se por manter a menor dose resposta (50 mg/Kg) para os demais testes.

Figura 12 – Influência do tratamento com o composto JMPR-01, sob o edema de pata no modelo de edema de pata induzido por zimosan.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, n = 7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

O zimosan é constituído de polissacarídeos derivados do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, sendo a β -glucana seu principal componente estrutural e um potente imunoestimulador. Por esse motivo, o zimosan é amplamente utilizado em modelos experimentais que visam promover uma resposta inflamatória. Uma vez inoculado por injeção intraplantar na pata direita traseira dos animais, o zimosan induz uma reação inflamatória resultante da ativação de vários mediadores inflamatórios, incluindo o sistema complemento, prostaglandinas, leucotrienos, fatores de agregação plaquetária, espécies reativas de oxigênio e enzimas lisossomais (AREOSA, 2019; CARMO, 2015; SANTOS, 2010; GIRÃO 2006).

Estudos afirmam que a resposta inflamatória gerada pelo zimosan é iniciada pela ativação dos receptores Toll-like 2 (TLR2) “presentes nos tecidos sinoviais com recrutamento da proteína adaptadora MyD88, promovendo a resposta inflamatória a partir dos genes responsivos ao NF- κ B num mecanismo dependente de MAP quinases ” (AREOSA, 2019, p. 19) onde também estão envolvidos as citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina CXCL1. Além de atuar na estimulação de agonistas endógenos do TLR4, o que resulta em uma exacerbação inflamatória.

A capacidade desse composto suprimir a produção de citocinas pró inflamatórias já foi confirmada em modelos *in vitro*, onde Silva e colaboradores (2021) utilizaram o JMPR-01 em

concentrações que variaram entre 50 – 3,125 μM sob macrófagos murinos J774 estimulados, e observaram redução na produção de IL-1 β , TNF- α com resultados significativos ($p < 0,05$) em todas as doses testadas. Esses achados sugerem a atividade anti-inflamatória do composto JMPR-01 e que o possível mecanismo de ação do JMPR-01 estaria relacionado com a inibição da liberação desses mediadores inflamatórios. Ainda no estudo de Silva e colaboradores (2021) o JMPR-01 reduziu a expressão de nitrito (proveniente do NO) nesta mesma linhagem celular e nas mesmas concentrações. Esses moduladores são responsáveis pela codificação gênica da enzima iNOS, através da via da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (XIAO et al. 2023). A fim de, elucidar o possível mecanismo de ação desempenhado pelo JMPR-01 na via do NO, foi realizado o teste de edema de pata administrando utilizando dois inibidores dessa via.

5.2.2 Bolsão de ar subcutâneo

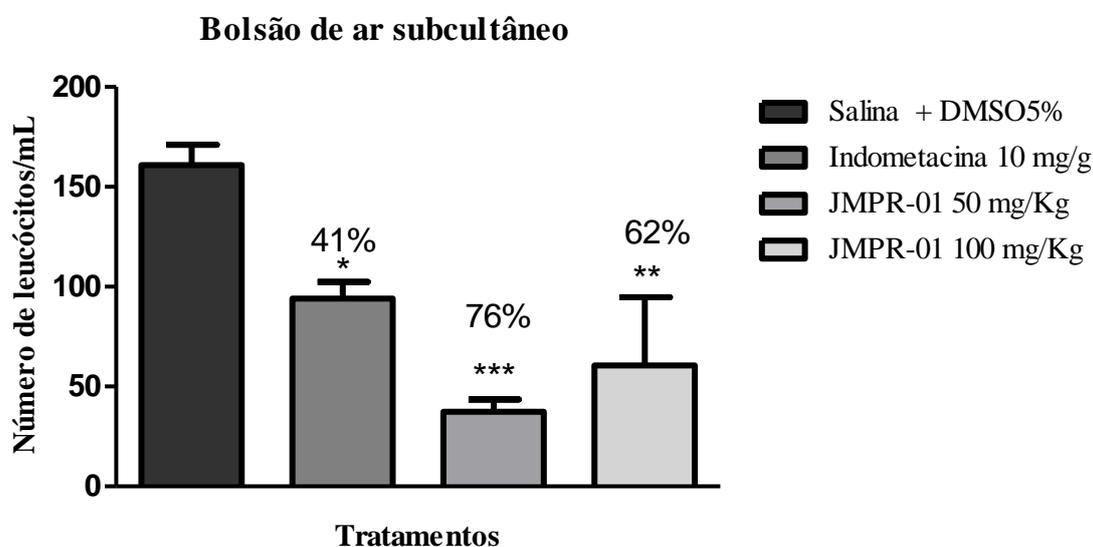
Estudos afirmam que a resposta inflamatória gerada pelo zimosan é iniciada pela ativação dos receptores Toll-like 2 (TLR2) “presentes nos tecidos sinoviais com recrutamento da proteína adaptadora MyD88, promovendo a resposta inflamatória a partir dos genes responsivos ao NF- κ B num mecanismo dependente de MAP quinases” (AREOSA, 2019) onde também estão envolvidos as citocinas TNF- α , IL-1 β e quimiocina CXCL1. Além de atuar na estimulação de agonistas endógenos do TLR4, o que resulta em uma exacerbação inflamatória.

O efeito anti-inflamatório do JMPR-01 foi avaliado através do modelo de bolsão de ar induzido por zimosan. A inflamação induzida nesse modelo consiste em uma acentuada migração celular, exsudação plasmática, aumento de proteínas totais, citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios em direção ao bolsão pré-formado no dorso do animal. Esse protocolo experimental se assemelha a uma membrana da cavidade sinovial, a qual, ao ser inoculada o agente flogístico, induz uma inflamação sinovial crônica, denominada artrite reumatoide, podendo ser utilizado como *screening* para potenciais candidatos a fármacos no tratamento dessa doença (SARMENTO et al, 2022; APOLINÁRIO, 2016).

Nesse modelo, os camundongos receberam administração subcutânea de zymozan no bolsão de ar previamente formado no dorso dos animais. Como esperado, os animais tratados com veículo (salina + DMSO 5%, v.o.) apresentaram aumento da migração leucocitária para o bolsão. O fármaco padrão (indometacina) administrado na sua dose terapêutica (10 mg/Kg, v.o.), apresentou uma inibição leucocitária de 41%. Já o JMPR-01 (50 e 100 mg/Kg) apresentou

maior eficácia em diminuir a migração celular para a bolsa de ar do animal quando comparado ao grupo controle, com inibição de 76% e 62%, respectivamente (figura 13).

Figura 13 – Influência do tratamento com o composto JMPR-01, sob a contagem total de leucócitos no modelo de bolsão de ar subcutâneo.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, n = 6. *** p < 0,001 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Os resultados aqui descritos condizem com estudos publicado por Silva et al (2022), em que supostos alvos de ação anti-inflamatória do composto JMPR-01 foram investigados em testes *in vivo* e *in vitro*. Dentre os testes *in vivo*, o teste de peritonite foi realizado em camundongos utilizando também como indutor da inflamação, o zimosan, cujos resultados demonstraram inibição da migração leucocitária de 61,8; 68,5 e 90,5% nas doses 5, 10 e 50 mg/Kg, respectivamente. Desse modo, nossos achados corroboram com a literatura, visto que, ambos os testes visam avaliar a migração leucocitária diante da exposição ao mesmo agente flogístico. O mesmo estudo sugere que as propriedades anti-inflamatória do composto podem estar relacionadas a modulação da expressão de óxido nítrico e citocinas inflamatórias tais como: TNF- α e IL-1 β .

A diferença entre os modelos realizados (peritonite e bolsão de ar) está no tipo celular em abundancia no exsudato coletado da região inflamada. Os neutrófilos são as células em maior número no modelo de bolsão de ar, sendo responsáveis pela quimiotáxia. Já os macrófagos e mastócitos são encontrados em maior número no peritônio dos animais atraídos

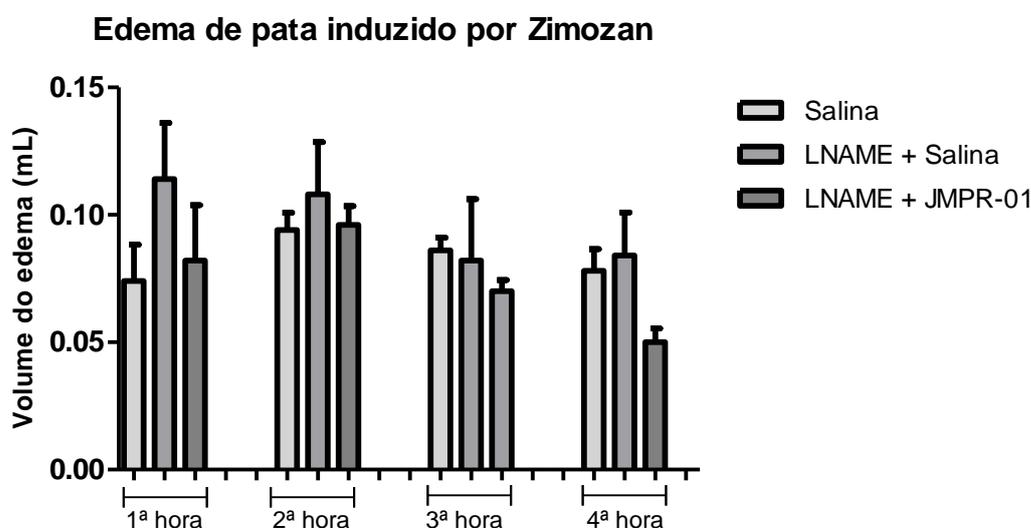
pela mediação das citocinas pró inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) (RAMOS, 2014). Desse modo, pode-se inferir que o composto inibe em especial a produção de mediadores por neutrófilos e macrófagos, pensamento que corrobora com achados de Aponilário (2016) ao realizar ambos os testes com derivados *N*- acilhidrazônicos em modelos animais semelhantes

5.2.3 Envolvimento da enzima óxido nítrico sintase

Para investigar se o efeito exercido pelo JMPR-01 está relacionado a expressão do NO, foi proposto uma inibição inespecífica da enzima responsável pela formação do NO. Foi administrado um bloqueador inespecífico desta enzima, o L-NAME, 30 minutos antes da administração de JMPR-01 (50mg/Kg).

Nos resultados expressos na figura 14 é possível observar que não houve diferença edematogênica significativa entre os grupos tratados com JMPR-01 associados com o L-NAME e o grupo controle, sugerindo o envolvimento do NO na atividade anti-inflamatória do composto.

Figura 14 – Investigação do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sob a influência do tratamento com o composto JMPR-01, frente ao modelo de edema de pata induzido por zimozan.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 5$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Estudos recentes demonstram que o JMPR-01 pode exercer o seu efeito anti-inflamatório através da modulação de TNF- α e IL-1 β (SILVA et al, 2022), esses moduladores são responsáveis pela codificação gênica da enzima iNOS, através da via da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (XIAO et al. 2023). Silva e colaboradores também demonstram em seus estudos que o JMPR-01 diminuiu de modo significativo os níveis de nitrito, *in vitro*, demonstrando redução dos níveis de óxido nítrico. Esses achados corroboram com tal afirmativa e sugerem que o efeito do JMPR-01 sob o edema de pata resulta em uma diminuição da atividade da enzima iNOS, uma vez que, ao inibi-la com o L-NAME, não foi observado redução significativa do edema. No entanto, é sugestivo a repetição desse modelo em investigação futura, visto que, o L-NAME não apresentou sua atividade esperada (Cuzzocrea et al. 1996).

Em seguida investigamos se a ativação de guanilato ciclase solúvel também faria parte do mecanismo de ação anti-inflamatória do composto JMPR-01.

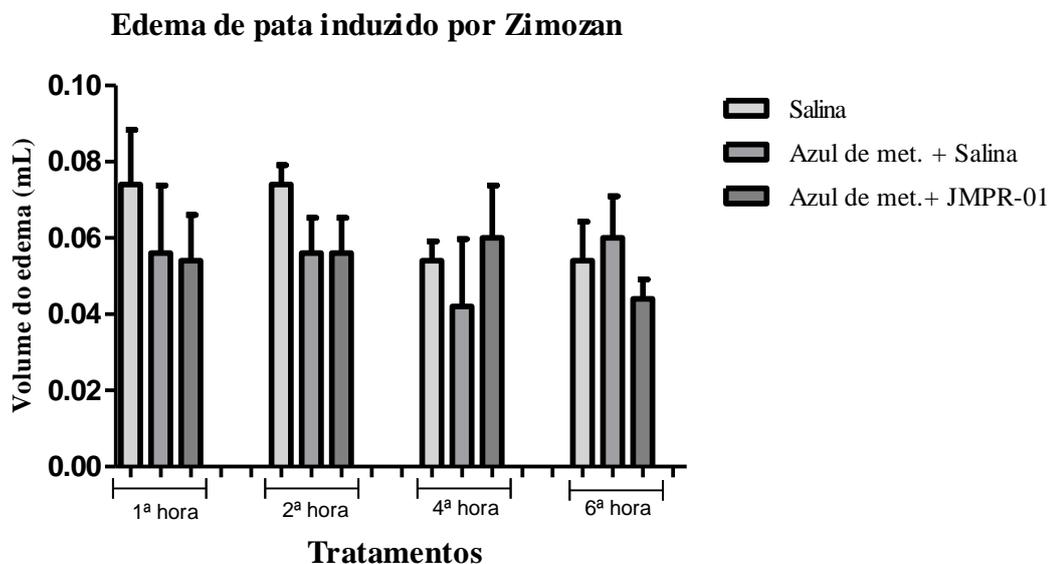
5.2.4 Envolvimento da guanilato ciclase

A guanilato ciclase solúvel (GCs) é uma enzima que promove a conversão de 5'-guanosina trifosfato (GTP) no segundo mensageiro, 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Essa enzima é um componente central na sinalização dependente de NO, aumentando a sua atividade em mais de cem vezes (HORST; MARLETTA, 2018). No contexto da inflamação, a atividade do NO está relacionada a uma maior vasodilatação, contribuindo com a migração das células de defesa para o local lesionado. Inibir essa via, nos permite avaliar se o composto JMPR-01 permanecerá atuando na inibição do edema. Caso contrário, podemos sugerir que seu mecanismo de ação está relacionado à cascata de sinalização NO-sGC-cGMP.

Para tanto, três grupos (n=6) foram utilizados. No grupo um, foi administrado 15.5mols/Kg de azul de metileno (AM), um inibidor clássico da GCs, 30 minutos antes da administração de JMPR-01 (50 mg/Kg v.o).

Os resultados apresentados da figura 15 mostram que o grupo não tratado, apresentou resultados semelhantes ao grupo tratado, não havendo diferenças significativas entre eles. Isso sugere que o efeito antiedematogênico exercido pelo JMPR-01 no edema de pata mencionado anteriormente pode estar relacionado a interação do JMPR-01 na via de sinalização sGC-cGMP.

Figura 15 – Investigação do envolvimento da guanilato ciclase solúvel, sob a influência do tratamento com o composto JMPR-01, frente ao modelo de edema de pata induzido por zimosan.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 5$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Assim, é possível inferir que moléculas que contém a fração N-fenilacrilamida também podem exercer alteração dos níveis de NO e/ou na ativação da guanilato ciclase solúvel, promovendo assim uma ação anti-inflamatória.

5.3 Atividade hialuronidásica *in vitro*

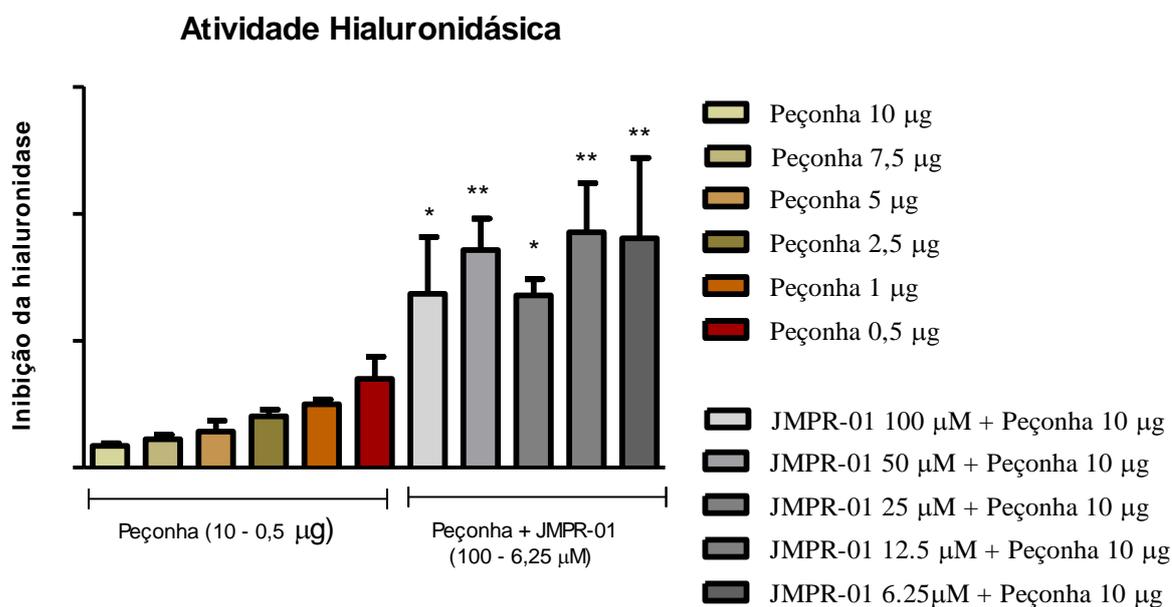
A inflamação pode ser iniciada através de fatores externos podendo eles serem biológicos ou não. Dentre os agentes biológicos temos a peçonha ofídica, expelida por animais peçonhentos, esses venenos são constituídos por uma gama de proteínas e polipeptídeos farmacologicamente ativos, destacam-se as atividades enzimáticas, responsáveis pela toxicidade local e sistêmico. Dentre as principais enzimas encontradas em venenos ofídicos estão as hialuronidasas (FERNANDES, 2019).

Uma vez inoculado no tecido, enzimas hialuronidasas presentes no veneno degradam o ácido hialurônico presente na matriz celular reduzindo a integridade dos tecidos, facilitando a disseminação de toxinas para além do local da picada (SILVA, 2022). Impedir essa ação, pode

promover uma redução no processo inflamatório associada a uma menor disseminação do veneno quando inoculado.

Para avaliar a ação do composto JMPR-01 frente a inibição da atividade das hialuronidases da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* (PBe) *in vitro*, foi determinada a concentração mínima da atividade hialuronidásica da peçonha. Os dados obtidos indicaram um percentual de 52 % de atividade hialuronidásica de PBe, na maior quantidade testada (10µg), sendo essa a quantidade de peçonha utilizada para o experimento de inibição com o JMPR-01 nas concentrações que variaram de 100 – 6,25 µM. O percentual de inibição obtido foi de 705; 907; 698; 991; 962% para as doses 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µM, respectivamente. Pode-se observar que houve uma redução significativa na atividade de hialuronidase nas amostras contendo o composto em todas as concentrações testadas utilizando 10µg da peçonha.

Figura 16 – Avaliação da atividade hialuronidásica exercida pelo JMPR-01 frente a peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* (PBe).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, realizados em triplicata, em que, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, significativamente diferente da peçonha (10µg) (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

O JMPR-01 se mostrou eficaz em todas as concentrações testadas frente a inibição da hialuronidase da peçonha de serpente. Enzimas hialuronidases de peçonhas ofídicas hidrolisam

o ácido hialurônico nas ligações glicosídicas $\beta \rightarrow 1-4$ dos resíduos N-acetil- β -D-glucosamina e D-glucuronato, produzindo tetra e hexassacarídeos, esses produtos de degradação são reportados como DAMPs, com efeitos pró-inflamatórios os quais envolvem a expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação da via NF- κ B, com aumento da ativação de citocinas tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6, aumentando a expressão inflamatória (SUNITHA et al., 2015; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2017; SILVA, 2022).

Assim, a atividade anti-inflamatória do JMPR pode estar também relacionada com a inibição da enzima hialuronidase e pode vir a ser útil também no tratamento de reações inflamatórias promovidas por diversos tipos de peçonhas que utilizam também essa enzima para desencadear o processo inflamatório em vítimas de acidente ofídicos, por exemplo.

5.4 Estudo de *docking* molecular

Uma forma de analisar a interação entre possíveis alvos e candidatos a fármacos é através de estudos *in silico* envolvendo ferramentas de *docking* molecular. O estudo de *docking* ou ancoragem molecular promove a caracterização comportamental molecular de um dado composto em um possível sítio catalítico, bem como, avalia a afinidade e as possíveis de ligações no alvo.

Diferentes programas - Gold[®] e AutoDock Vina[®] - foram utilizados devido à disponibilidade e condição das estruturas disponíveis nas bases de dados referentes aos seguintes alvos: Óxido nítrico sintase induzível (iNOS); Hialuronidase - 1 e Guanilato ciclase solúvel (sGC). Sendo as metodologias consideradas como válidas ao alcançar um valor de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) inferior a 2,0 Å dentro da estrutura do ligante cristalizado para cada ligante, sabe-se que, quanto menor o RMSD médio, melhor a capacidade de encaixe (RODRIGO; VILLARREAL, 2016). Um outro dado que pode ser analisado nessa primeira etapa é o valor de FitScore, quanto maior for o seu valor, melhor a interação entre a molécula e o alvo (SILVA, 2022).

Desse modo, foi-se realizado inicialmente uma triagem para validação e revalidação da metodologia, utilizando o *software* GOLD[®], em que, foi selecionado o (re)scoring do qual o inibidor co-cristalizado apresentou menor valor de RMSD e maior FitScore e deste foi realizado o redocking validando o método, como mostrado na tabela 8.

Tabela 7 – Valores de RMSD, FiScore e redocking dos alvos selecionados utilizando o programa Gold®.

Alvos	PDB ID	(re)scoring	RMSD	FitScore	Redocking
iNOS	3e7g	Asp	0,31447	48,9145	
		ChemScore	0,3838	29,8415	
		ChemPLP	0,2970	81,6082	RMSD = 0,2970; FitScore = 81,6082
		GoldScore	0,2791	70,0636	
sGC	4ni2	Asp	0	17,5753	
		ChemScore	0	13,0088	
		ChemPLP	0	32,4408	RMDS = 0,6690; FitScore = 36,4442
		GoldScore	0	28,8965	
HYAL-1	2pe4	Asp	0,1071	47,8322	RMSD = 0,7652; FitScore = 49,3521
		ChemScore	0,1504	18,3625	
		ChemPLP	0,1820	67,6951	
		GoldScore	0,3912	-85,6616	

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A partir desses achados foi possível realizar um *screening*, utilizando os programas Gold e AutoDock Vina, para avaliar a atividade da molécula JMPR-01 de cada alvo com o (re)scoring pré estabelecido anteriormente, comparando os valores obtidos com os inibidores conhecidos de cada alvo.

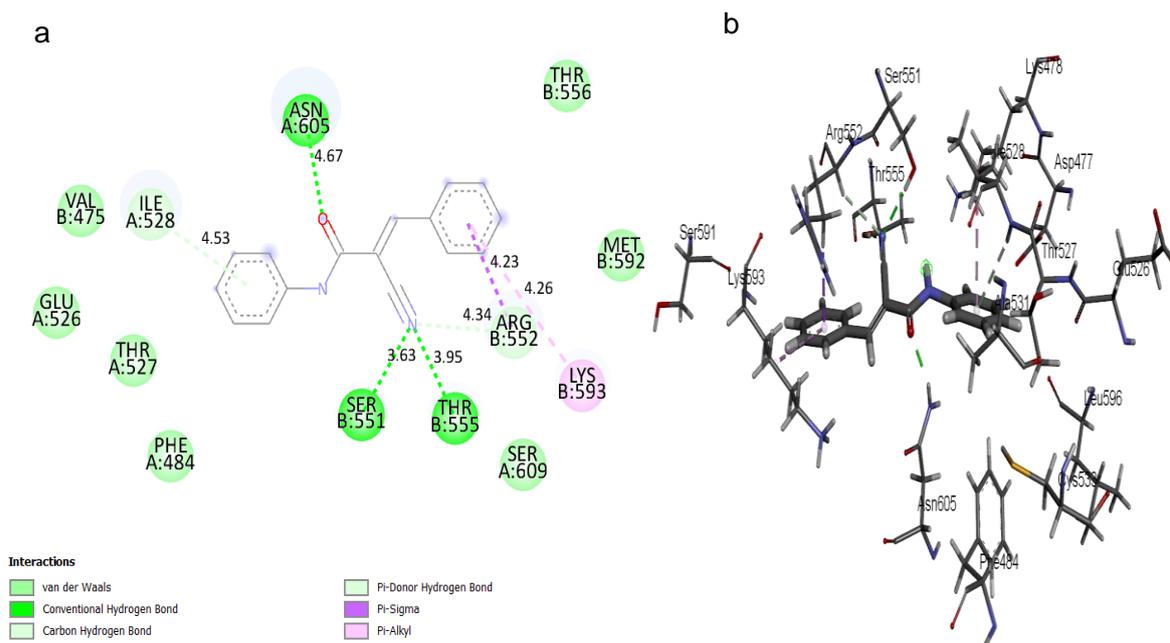
Tabela 8 – Valores de FitScore e energia de ligação de complexos alvo-ligante.

Alvos	PDB ID	Compostos	FitScore ^a	Energia de ligação ^b
iNOS	3e7g	JMPR-01	71,92	-
		AR-C95791	81,60	-
sGC	4ni2	JMPR-01	48,10	-7,760
		ODQ	36,44	-6,808
Hyal-1	2pe4	JMPR-01	38,44	-7,735
		GLICIRRIZINA	47,83	-9,574

Fonte: Elaborada pela autora (2023). Legenda: iNOS (óxido nítrico sintase induzível), sGC (guanilato ciclase solúvel), FitScore^a valores obtidos utilizando o programa GOLD®, energia de ligação^b valores obtidos utilizando o programa AutoDock Vina®.

Sabendo que os valores de FitScore gerados pelo GOLD[®] são dimensionais e quanto maior forem esses valores, melhor é a interação proteína ligante e para o AutoDock Vina[®], por outro lado, quanto mais negativa a energia de afinidade, melhor é a interação proteína-ligante (SILVA, 2022), é possível observar que o JMPR-01 não obteve interação relevantes nos alvos iNOS e Hyal-1, visto que, os valores de FitScore estão menores que os dos inibidores conhecidos e a energia de ligação se encontra maior que o inibidor da Hyal-1, se tratando do inibidor da iNOS não foi realizado no AutoDock Vina[®], por já possuir inibidor co-cristalizado experimentalmente. Já na sGC o composto apresentou boa atividade, atendendo aos critérios de maior FitScore (48,10) e de menor energia de ligação (-7,760), quando comparado com inibidor conhecido (36,44 e -6,808, respectivamente) esses resultados demonstram que o JMPR-01 possui atividade prevista superior ao inibidor conhecido, desse modo, foi-se realizada a análise das interações entre a molécula e o alvo (cGC). Para tanto, o composto JMPR-01 foi ancorado no sítio ativo de sCG (PDB ID 4ni2), todos os resíduos de aminoácidos que tiveram interações com a sCG foram exibidos na figura 18.

Figura 18 – Diagrama de interação 2D e 3D de JMPR-01 com o sítio ativo do receptor alvo guanilato ciclase solúvel (sGC).



Fonte: BIOVIA Discovery Studio. Legenda: a (diagrama de interação 2D), b (diagrama de interação 3D).

Dentre os resíduos de aminoácidos que apresentaram interação com a sGC destacam-se os seguintes sítios de ligação: Asn:605, Ser:551, Thr:555, Ile:528, Arg:552 e Lys:593. No modo

de ligação, observa-se que o complexo formado entre o composto JMPR-01 e o alvo sCG foi estabilizado majoritariamente por interações convencionais de hidrogênio. As posições de ancoragem de JMPR-01 no sítio ativo da sCG são mostradas na figura 18. Este resultado de acoplamento molecular juntamente com os dados do ensaio biológico, sugere que o composto JMPR-01 é um potencial inibidor de sCG.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

- O composto apresenta redução do edema de pata induzido por zimosan, em todas as doses testadas (50, 100 e 150 mg/Kg), estabelecendo a dose de 50 mg/Kg para os demais testes, como a dose terapêutica não-clínica, com atividade semelhante ao do grupo tratado com indometacina.
- O composto não reduziu o edema de pata ao ser administrado previamente o inibidor da óxido nítrico sintase e guanilato ciclase solúvel, o que nos permite sugerir que seu mecanismo de ação está relacionado a cascata de sinalização do NO-sGC-cGMP.
- No ensaio de bolsão de ar subcutâneo o composto apresentou inibição da migração de leucócitos substancialmente ($p < 0,001$) na dose de 50 mg/Kg comparável ao grupo não tratado, atividade superior ao do grupo tratado com indometacina na dose de 10 mg/Kg.
- Na avaliação da atividade hialuronidásica *in vitro* a inibição do JMPR-01 frente a atividade das hialuronidases da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* (PBe) se mostra eficaz em todas as concentrações testadas (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ M).
- Na atividade hemolítica o JMPR-01 não apresentou citotoxicidade (potencial hemolisante abaixo de 10%).
- Na toxicidade aguda o JMPR-01 não provocou morte e nem sinais relevantes no *screening* hipocrático comportamental, indicativo de que o JMPR-01 possui um DL_{50} superior a 2000 mg/Kg e menor que 5000 mg/Kg.
- Os resultados obtidos através do teste de acoplamento molecular demonstraram maior afinidade do composto JMPR-01 pela a enzima guanilato ciclase solúvel.
- Esses resultados de ensaios biológicos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* sugerem que o composto JMPR-01 apresenta baixa toxicidade e é um potencial candidato medicamento anti-inflamatório e que o mesmo atua modulando via do NO-sCG, como também a inibição da enzima hialunonidase.

REFERÊNCIAS

- ABDELALL, Eman K.A.; ABOELNAGA, Lamees S.; HASSAN, Randa M.; LAMIE, Phoebe F. Methanesulfonamide derivatives as gastric safe anti-inflammatory agents: design, synthesis, selective cox-2 inhibitory activity, histopathological and histochemical studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 140, p. 106787, nov. 2023.
- ALMEIDA, Maria Crislandia Freire de. **Atividade anti-inflamatória de um composto híbrido indólico fenilacrilamida**. 2019. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2019.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 72-76, 1999.
- AMANAT, Muhammed; DAULA, A F M Shahid Ud; SINGH, Randhir. Acute toxicity assessment of methanolic extract of Zingiber roseum (Roscoe.) rhizome in swiss albino mice. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, [S.L.], v. 7, p. 100244, jun. 2023.
- APOLINÁRIO, N. M. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados *n*-acilhidrazônicos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- AREOSA, V. B. de M. **Efeito do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* HAYNE) sobre a morfologia hepática e cardíaca em um modelo de inflamação induzida por zymosan: um estudo estereológico**. 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.
- BARAKAT, M.; SYED, N. K.; HASEN, E.; ABDULRAZZAQ, S. B.; THIAB, S.; AL-NAJJAR, M. A. A.; OMAR, A.; LUCY, T. T.; MAMUN-OR-RASHID, A.N.M.; YAGI, Masayuki. The effect of natural products on inflammatory cytokines production and secretion. **Phytomedicine Plus**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 100488, nov. 2023.
- BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro vasculares e renais. **Arquivo Brasileiro Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BEDI, O., KRISHAN, P. Investigações sobre estudos de toxicidade oral aguda de purpurina pela aplicação da diretriz 423 da OCDE em roedores. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393, 565–571, 2020.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 824–838, 2017.

Bordon, K. de C. F. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus dussus terrificus***. Tese de doutorado. 2012. 126 p. Universidade de São Paulo, 2012.

CAMPBELL, I. B.; MACDONALD, S. J. F.; PROCOPIOU, P. A. Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 23, n. 2, p. 219-234, Feb. 2018.

CAO, B.; ZHAO, Y.; LUO, Q.; CHEN, Y.; XU, T.; SUN, Y. Vinculin B inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting MyD88 in miiuy croaker, *Miichthys miiuy*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.L.], v. 135, p. 108683, abr. 2023.

CARMO, L. D. do. **Proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* (MART.) plumel apocynaceae reduzem a resposta inflamatória e nociceptiva na artrite induzida por zymosan em camundongos**. 2015. 89 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, Xun; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 14 dez. 2017.

CHEN, P.; ZHOU, Y.; LI, X.; YANG, J.; ZHENG, Z.; ZOU, Y.; LI, X.; LIAO, J.; DAI, J.; XU, Y.. Design, Synthesis, and Bioevaluation of Novel MyD88 Inhibitor c17 against Acute Lung Injury Derived from the Virtual Screen. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 10, p. 6938-6958, 2 maio 2023.

COSTA, K. C. T.; SANTOS, V. S. V.; VAZ, E. R.; GIMENES, S. N. C.; CORREIA, L. I. V.; SOUZA, J. B.; SANTOS, F. A. A.; RODRIGUES, V. M.; GOULART, L. R.; GOULART, V. A. A novel peptide able to reduce PLA2 activity and modulate inflammatory cytokine production. **Toxicon**, [S.L.], v. 231, p. 107207, ago. 2023.

CUNHA, F. Q.; SOUZA, G. E.; SOUZA, C. A.; CERQUEIRA, B. C.; FERREIRA, S. H. *In-vivo* blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **British Journal of Experimental Pathology**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 1-8, Feb. 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2040534/>. Acesso em: 20 jun. 2020.

CUZZOCREA, S. et al. Zymosan-activated plasma paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Sciences**. Printed USA. V. 60, n. 3, p. 215-220, 1997.

CZERKIES, M.; KWIATKOWSKA, K. Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: focus on tlr4 activation by lipopolysaccharide. **Advances In Cell Biology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-23, 1 mar. 2014.

FALCICCHIA, C.; TOZZI, F.; ARANCIO, O.; WATTERSON, D. M.; ORIGLIA, N. Involvement of p38 MAPK in Synaptic Function and Dysfunction. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 16, p. 5624, 6 ago. 2020.

FÉLIX-SILVA, J. et al. Inhibition of local effects induced by Bothrops erythromelas snake venom: Assessment of the effectiveness of Brazilian polyvalent bothropic antivenom and aqueous leaf extract of *Jatropha gossypifolia*. **Toxicon**, v. 125, p. 74– 83, 2017.

FERNANDES, Daniel. **Inibição do edema de pata de camundongo induzida pela injeção de doadores de óxido nítrico: envolvimento de guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio**. 2002. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FERNANDES, J. M. ***Bryophyllum pinnatum* e *Kalanchoe laciniata*: estudo fitoquímico, metabolômico e avaliação da inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de Bothrops erythromelas de extratos obtidos sob diferentes condições de cultivo**. 2019. 249f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

GEBALSKI, J.; GRACZYK, F.; ZAIUSKI, D. Paving the way towards effective plant-based inhibitors of hyaluronidase and tyrosinase: a critical review on a structure•activity relationship. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 1120-1195, 26 abr. 2022.

GIRÃO, V. C. C. **Participação do óxido nítrico (NO) na modulação central da hiperalgesia na artrite induzida por zymosan em ratos**. 2006. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Girish K, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath B. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. **Curr Med Chem**, n. 16, v. 18, p. 2261-2288, 2009.

GONG, Li; THORN, Caroline F.; BERTAGNOLLI, Monica M.; GROSSER, Tilo; ALTMAN, Russ B.; KLEIN, Teri E.. Celecoxib pathways. **Pharmacogenetics And Genomics**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 310-318, abr. 2012.

GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman e Gilman. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Infammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-99, 2010.

GU, X.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; GUAN, M.; LI, X.; ZHOU, Q.; SONG, Q.; QIU, J. Synthesis and assessment of phenylacrylamide derivatives as potential anti-oxidant and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 180, p. 62-71, 2019.

GUINDANI, C. et al. Bovine serum albumin conjugation on poly(methyl methacrylate) nanoparticles for targeted drug delivery applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, n. January, p. 101490, 2020.

HE, L.; YU, X.; ZHAO, Y.; LIN, H.; ZHANG, Y.; LU, D. TLR5S negatively regulates the TLR5M-mediated NF-κB signaling pathway in *Epinephelus coioides*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 249, p. 126048, set. 2023.

HEITZER, M. D.; WOLF, I. M.; SANCHEZ, E. R.; WITCHEL, S. F.; DEFRANCO, D. B. Glucocorticoid receptor physiology. **Reviews In Endocrine And Metabolic Disorders**, [S.L.], v. 8, n. 4, p. 321-330, 30 nov. 2007.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não esteróides: inibidores da ciclooxigenase-2. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HORST, B. G.; MARLETTA, M. A. Physiological activation and deactivation of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 77, p. 65-74, jul. 2018.

HUYNH, N. C.; NGUYEN, T. T. T.; NGUYEN, D. T. C.; VAN TRAN, T. Occurrence, toxicity, impact and removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): a review. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 898, p. 165317, nov. 2023.

JACOB, J.P. et al. Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**. v. 121, p.356-381, ago. 2018.

JAMILLOUX, Y.; JAMMAL, T. E.; VUITTON, L.; GERFAUD-VALENTIN, M.; KEREVER, S.; SÈVE, P. JAK inhibitors for the treatment of autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 102390, nov. 2019.

KINTOS, D. P.; SALAGIANNIS, K.; VAZOURA, V.; WITTRIEN, T.; PAPAKYRIAKOU, A.; NIKOLAROPOULOS, S. S.; BEHREND, S.; TOPOUZIS, S.; FOUSTERIS, M. A. Design, synthesis and biological evaluation of new 3,4-dihydroquinoxalin-2(1H)-one derivatives as soluble guanylyl cyclase (sGC) activators. **Heliyon**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 114-138, nov. 2022.

KOTAS, E. M.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 5, p. 816-827, Feb. 2015.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews*. **Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678-689, Sep 2007.

LI, J. P. H.; KENNEDY, E. M.; ADESINA, A. A.; STOCKENHYBER, M. Mechanistic insights into the Knoevenagel condensation reaction over ZnO catalysts: Direct observation of surface intermediates using in situ FTIR. **Journal of Catalysis**, v. 369, p. 157-167, 2019.

LI, X.; LIU, J.; YANG, X.; LU, X.; ZHAO, T.; GONG, H.; ZHU, H.. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-phenylacrylamide derivatives as inhibitors of HDAC activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 20, n. 14, p. 4430-4436, jul. 2012.

LIU, B.; QU, L.; YAN, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. **Cancer Cell International**, v. 15, 2015. DOI 10.1186/s12935-015-0260-7.

LIU, Z.; LU, Y.; ZHONG, K.; WANG, C.; XU, X. The associations between endocrine disrupting chemicals and markers of inflammation and immune responses: a systematic

review and meta-analysis. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 234, p. 113382, abr. 2022

LIU, Zhiqin; LU, Yao; ZHONG, Kunxia; WANG, Chenchen; XU, XI. The associations between endocrine disrupting chemicals and markers of inflammation and immune responses: a systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 234, p. 113382, abr. 2022.

LIU, Zhiqin; LU, Yao; ZHONG, Kunxia; WANG, Chenchen; XU, XI. The associations between endocrine disrupting chemicals and markers of inflammation and immune responses: a systematic review and meta-analysis. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 234, p. 113382, abr. 2022.

MATOS, A. G.; GURGEL, V. P.; CALLOU, A. L. Influência do óxido nítrico na fisiopatologia da neuropatia glaucomatosa. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 70-73, 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-72802019000100070&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 15 jul. 2020.

MATOS, A. G.; GURGEL, V. P.; CALLOU, A. L. Influência do óxido nítrico na fisiopatologia da neuropatia glaucomatosa. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 70-73, 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-72802019000100070&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 15 jul. 2020

MEIRA, C. S. et al. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, Kidlington, v. 26, n. 8, p. 1971-1985, May 2018.

MENDES, J., LEÔNIDAS, G. **O papel da via NO-sGC-cGMP e dos canais para potássio no efeito vasorrelaxante do nitrato de ciclohexanol, um novo doador de óxido nítrico com atividades hipotensora e antihipertensiva em ratos**. 2016. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

MIAO, L.; TAO, H.; PENG, Y.; WANG, S.; ZHONG, Z.; EL-SEEDI, H.; DRAGAN, S.; ZENGIN, G.; CHEANG, W. S.; WANG, Y. The anti-inflammatory potential of *Portulaca oleracea* L. (purslane) extract by partial suppression on NF- κ B and MAPK activation. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 290, p. 239-245, ago. 2019.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 53-63, Maio 2008.

MÜHLBAUER, M. Paracetamol, um AINE particular. **Ciência Atual**, Rio de Janeiro, v.7, n. 1, p. 02-10, 2016.

MURAD, L. B. **Suplementação crônica de alfa-tocoferol preserva a resposta neurológica e reverte os efeitos deletérios da inibição das isoformas constitutivas da óxido nítrico sintase em ratos espontaneamente hipertensos propensos ao acidente vascular**

encefálico. Tese (Doutorado em Neurologia). 2011. 127 f. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

NAPORA, P.; KOBRZYCKA, A.; PIERZCHAŁA-KOZIEC, K.; WIECZOREK, M. Effect of selective cyclooxygenase inhibitors on animal behaviour and monoaminergic systems of the rat brain. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 438, p. 114143, fev. 2023.

OECD- Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. OECD, Paris, 2001. 14p.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. African adders: Partial characterization of snake venoms from three Bitis species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1– 19, 2015.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. **Clinical Immunology**, San Diego, Califórnia, v. 119, n. 3, p. 229-240, June 2006.

PATRONO, C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Hoboken, v. 82, n. 4, p. 957-964, Oct. 2016.

PECONICK, A. P.; KALKS, K. H. M. Resposta inflamatória aguda sob a ótica imunológica. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011. 23 p.

PUROHIT, M.; GUPTA, G.; AFZAL, O.; ALTAMIMI, A. S. A.; ALZAREA, S. I.; KAZMI, I.; ALMALKI, W. H.; GULATI, M.; KAUR, I. P.; SINGH, S. K. Janus kinase/signal transducers and activator of transcription (JAK/STAT) and its role in Lung inflammatory disease. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 371, p. 110334, fev. 2023.

QUDS, R.; IQBAL, Z.; ARIF, A.; MAHMOOD, R. Mancozeb-induced cytotoxicity in human erythrocytes: enhanced generation of reactive species, hemoglobin oxidation, diminished antioxidant power, membrane damage and morphological changes. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 193, p. 105453, jun. 2023.

QUEIROZ, Ismael Nilo Lino de. **Caracterização estrutural preliminar e efeitos na inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides***. 115 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará Fortaleza, 2013.

RANG, H. P. RITTER, J. M. FLOWER, R. J. HENDERSON, G. Óxido nítrico e mediadores relacionados. *In. Rang & Dale: Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 359-588.

RODRIGUES, M. Therapeutic ultrasound ameliorates hyperalgesia and edema on CFA-induced persistent inflammatory response in mice. **Brazilian Journal Of Anesthesiology (English Edition)**, [S.L.], p. 1-9, set. 2022.

RONKINA, N.; GAESTEL, M. MAPK-Activated Protein Kinases: servant or partner?. **Annual Review Of Biochemistry**, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 505-540, 21 jun. 2022.

SARMENTO-FILHA, M. J.; TORRES-RÊGO, M.; DANIELE-SILVA, A.; QUEIROZ-NETO, M. F. de; ROCHA, H. A. O.; CAMARA, C. A.; ARAÚJO, R. M.; SILVA-JÚNIOR, A. A. da; SILVA, T. M. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. de F.. Phytochemical analysis by UPLC-QTOF-MS/MS and evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the extract and fractions from flowers of *Cochlospermum vitifolium*. **South African Journal Of Botany**, [S.L.], v. 148, p. 293-306, ago. 2022.

SERAFIM, R. A. M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of N-acylhydrazone and furoxan groups with potential and selective anti-Trypanosoma cruzi activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Les-Mounlineaux, v. 82, n. 23, p. 418-425, July 2014.

SHU, W.; PRICE, G.W.; JAMIESON, R.; LAKE, C.. Effect of biosolids amendment on the fate and mobility of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in a field-based lysimeter cell study. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 331, p. 121939, ago. 2023.

SILVA, C. A. T. **O uso terapêutico de mediadores anti-inflamatórios da via do ácido araquidônico**. 2016. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2016.

SILVA, D. P. da. **Análise comparativa da composição proteica e dos efeitos hemolítico, oxidante, antioxidante e coagulante das peçonhas brutas de machos e fêmeas da serpente *Bothrops leucurus***. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado). Programa de PósGraduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2017.

SILVA, P. R. **Síntese e perfil anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* de derivados fenilacetamida e fenilacrilamida**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2020.

SILVA, P. R.; SANTO, R. F. E.; MELO, C. O.; CAVALCANTE, F. E. P.; COSTA, T. B.; BARBOSA, Y. V.; SILVA, Y. M. S. M.; SOUSA, N. F.; VILLARREAL, C. F.; MOURA, R. O. de. The Compound (E)-2-Cyano-N,3-diphenylacrylamide (JMPPR-01): a potential drug for treatment of inflammatory diseases. **Pharmaceutics**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 188, 13 jan. 2022.

SILVA, S. A. S. **Estudo *in silico*, *in vitro* e *in vivo* dos possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória de derivados N-ecilhidrazônicos substituídos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SUNITHA, K. et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. **Toxicon**, v. 98, p. 89–97, 2015.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V. F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticóides. **Corpus et Scientia**, v.8, n.2, p.36-51, out. 2012.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V. F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticóides. **Corpus et Scientia**, v.8, n.2, p.36-51, out. 2012.

VALDENNAIRE, A.; POTHIER, J.; RENNEBERG, D.; RIEDERER, M. A.; PETER, O.; LEROY, X.; GNERRE, C.; FRETZ, H. Evolution of novel tricyclic CRTh2 receptor antagonists from a (E)-2-cyano-3-(1H-indol-3-yl)acrylamide scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 4, p. 944-948, 2013.

VAN BEEK, A. A.; BOSSCHE, J. V. D.; MASTROBERARDINO, P. G.; WINTHER, M.P.J.; LEENEN, P. J. M.. Metabolic Alterations in Aging Macrophages: ingredients for inflammaging?. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 113-127, fev. 2019.

WANG, D.; HAILE, A.; JONES, L. C. Dexamethasone-induced lipolysis increases the adverse effect of adipocytes on osteoblasts using cells derived from human mesenchymal stem cells. *Bone*, v. 53, n. 2, p. 520-530, 2009.

WANI, K. I.; NAEEM, M.; CASTROVERDE, C. D. M.; KALAJI, H. M.; ALBAQAMI, M.; AFTAB, T. Molecular Mechanisms of Nitric Oxide (NO) Signaling and Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis during Abiotic Stresses in Plants. *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 22, n. 17, p. 9656, 6 set. 2021.

WAREHAM, Lauren K.; BUYS, Emmanuel S.; SAPPINGTON, Rebecca M.. The nitric oxide-guanylate cyclase pathway and glaucoma. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 77, p. 75-87, jul. 2018.

XU, W.; LARBI, A. Immunity and inflammation: from jekyll to hyde. **Experimental Gerontology**, Kidlington, v. 107, p. 98-101, July 2018.

YU, X.; HE, L.; GAO, S.; LIU, Y.; XU, J.; ZHAO, Y.; LIN, H.; ZHANG, Y.; LU, D.. Transcriptional activation of membrane-related Toll-like receptor 5 through the NF- κ B subunit p65 and *Vibrio parahaemolyticus* flagellin in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Aquaculture**, [S.L.], v. 576, p. 739790, nov. 2023.

ZEINALI, M. et al. Prescription pattern analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the northeastern iranian population. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, Isfahan, v. 6, n. 4, p. 206-210, Oct. 2017.

ZILANI, M. N. H.; ISLAM, M. A.; BISWAS, P.; ANISUZZMAN, M.; HOSSAIN, H.; SHILPI, J. A.; HASAN, M. N.; HOSSAIN, M. G. Metabolite profiling, anti-inflammatory, analgesic potentials of edible herb *Colocasia gigantea* and molecular docking study against COX-II enzyme. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 281, p. 114577, dez. 2021.

ZIMATH, P. L. **Impacto do furoato de mometasona sobre a homeostase glicêmica e lipídica: busca por um glicocorticoide com menos efeitos adversos**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

ZOU, H.; YU, J.; LI, Z.; LIU, Y.; WANG, T.; LI, T.; LV, C.; ZHANG, J. *In vitro, in vivo, and in silico* evaluation of the glucocorticoid receptor antagonist activity of 3,6-dibromocarbazole. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 180, p. 114048, out. 2023.

**ANEXO A - PROTOCOLO UTILIZADO NA TRIAGEM FARMACOLÓGICA
COMPORTAMENTAL.**

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	Até 30 min	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a. Estimulante					
Hiperatividade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b. Depressoras					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catonia					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c. Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					
Observações complementares					

Fonte: Almeida et al. (1999).