



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA**

PAULO SÉRGIO FERREIRA DE LIMA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO NITRO-SALICILATO DE METILA *IN VITRO* EM
MACRÓFAGOS**

**SANTARÉM - PA
2019**

PAULO SÉRGIO FERREIRA DE LIMA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO NITRO-SALICILATO DE METILA *IN VITRO* EM
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, da Universidade Federal do Oeste do Pará -
UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes

**SANTARÉM - PA
2019**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Sistema
Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

- L732p Lima, Paulo Sérgio Ferreira de
Planejamento, síntese e avaliação da atividade anti-inflamatória do Nitro-Salicilato de Metila in vitro em macrófagos. / Paulo Sérgio Ferreira de Lima. – Santarém, 2019.
56 p. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Waldiney Pires Moraes
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Inflamação. 2. Nitro-salicilato de Metila. 3. AINES. 4. Mediadores inflamatórios. I. Moraes, Waldiney Pires, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 615.794



Universidade Federal do Oeste do Pará

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ATA Nº 28

Ao décimo sétimo dia do mês de dezembro do ano de dois mil e dezenove, às quinze horas, no Auditório NTB, do Campus Tapajós, na Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, realizou-se a SESSÃO PÚBLICA para a defesa da Dissertação de Mestrado em Biociências, grande área CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área FARMACOLOGIA, subárea XXX, intitulada PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO NITRO-SALICILATO DE METILA IN VITRO EM MACRÓFAGOS, do (a) mestrando (a) 201610004 PAULO SÉRGIO FERREIRA DE LIMA. A Banca Examinadora e Julgadora, solicitada pelo Orientador, constituiu-se dos seguintes membros: Prof.(^a) Dr. (^a) WALDINEY PIRES MORAIS Orientador (a) e Presidente (a) (UFOPA); Prof. (^a) Dr. (^a) BRUNO ALEXANDRE DA SILVA Avaliador (a) e Julgador (a) Externo (a) (UFOPA); Prof.(^a) Dr.(^a) JUAREZ DE SOUZA Avaliador (a) e Julgador (a) Externo (a) (UFOPA). Em conformidade com o Regimento Interno, do Programa, o (a) Presidente (a) da Banca, Prof. (^a) Dr.(^a) WALDINEY PIRES MORAIS, abriu a sessão, passando a palavra à (ao) discente, que fez a exposição do trabalho, seguida da arguição dos membros da Banca. Em seguida, a Banca Examinadora e Julgadora se reuniu, sem a presença do (a) mestrando (a) e do público, deliberando pelo seguinte parecer: (X) APROVADA; () REPROVADA, seguindo o prazo de 30 (trinta) dias para () a entrega da versão final em formato digital ou () reapresentação da dissertação. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora e Julgadora, Presidente da Banca e Mestrando. Santarém (PA), décimo sétimo dia do mês de dezembro do ano de dois mil e dezenove, às 17h00min.

Dr. JUAREZ DE SOUZA, UEPA

Examinador Externo à Instituição

Dr. BRUNO ALEXANDRE DA SILVA, UFOPA

Examinador Externo ao Programa

Dr. WALDINEY PIRES MORAES, UFOPA

Presidente

PAULO SÉRGIO FERREIRA DE LIMA

Mestrando

Dedico este trabalho, a Deus, pelo dom da vida, à minha amada esposa Fernanda Marques, aos meus pais Benedito Andrade e Nelma de Nazaré, aos meus irmãos Benedito Júnior, Marcus Vinícius e Ana Beatriz e a todos os familiares e amigos que me apoiaram e contribuíram nesta jornada que foi o mestrado.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tudo.

Agradeço ao **Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes**, pela orientação e ensinamentos.

À **Profa. Dra. Tânia Mara Pires Moraes** pelo auxílio e colaboração durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas do mestrado, em especial ao **Éden Bruno Silva** e **Nazaré Silva** por sempre estarem dispostos a me ajudar nos experimentos.

Ao **José Sousa de Almeida Júnior** pelo incentivo desde antes de entrar no programa de mestrado.

Ao técnico de laboratório **Jander Cirino Lopes** pelo apoio no Laboratório de Farmacologia da UFOPA.

Ao Biotério do da UEPA campus Santarém, em nome do **Prof. Dr. Juarez de Souza** que nos cederam animais para a pesquisa.

Aos bioteristas **Arilda Moraes** e **Herman Ascensão**, pela ajuda com os animais da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges**, pelo planejamento e síntese do composto utilizado neste trabalho.

A todos os **Docentes** e ao **Programa de Pós-Graduação em Biociências - PPGBio** e à **UFOPA** por toda assistência prestada.

Aos colegas de trabalho **Márcia Ferreira**, **Brendon Oliveira** e a todos da **Biosan Diagnósticos** pelo apoio.

À minha família, em especial minha esposa **Fernanda Marques**, meus pais **Benedito Andrade** e **Nelma de Nazaré**, meus irmãos **Benedito Júnior**, **Marcus Vinícius** e **Ana Beatriz** e a todos os familiares e amigos pelo apoio, carinho, paciência e ajuda durante a realização do mestrado.

RESUMO

A inflamação é uma série de repostas protetoras e regenerativas do corpo humano, caracterizando-se por uma série de eventos onde estão envolvidos os mediadores inflamatórios como citocinas e células, sendo classificada em inflamação aguda ou crônica. Em todo esse processo estão envolvidos migração de leucócitos, reconhecimento de PAMPs e DAMPs por receptores TLRs por macrófagos presentes no tecido, produção de óxido nítrico, citocinas e eicosanoides como a PGE₂. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) aparecem entre os mais consumidos e sua ação é devido ao mecanismo de inibição das enzimas COX, já os corticosteroides são fármacos que possuem efeitos anti-inflamatórios com mecanismo de ação associado à ligação com os receptores de glicocorticóides citosólicos, regulando a expressão gênica de células imunes. A cerca dos salicilatos, possuem efeitos anti-inflamatórios, assim como seus derivados, em contrapartida, possuem uma série de reações adversas das quais podemos citar os problemas gastrintestinais, renais e cardiovasculares. A criação de novas moléculas se tornou uma arte para estudiosos da área, visto à necessidade correlacionada as indústrias farmacêuticas, técnicas como essa são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos como os derivados dos salicilatos. Os AINEs possuem toxicidade comprovada e considerada nociva aos sistemas renal e gastrointestinal e cardiovascular, dessa forma, os derivados dos salicilatos de metila, com seus efeitos anti-inflamatórios, são uma opção no desenvolvimento de novos fármacos para serem utilizados no combate a inflamação. O objetivo deste trabalho é planejar, sintetizar e avaliar a atividade anti-inflamatória do Nitro-Salicilato de Metila *in vitro* em macrófagos. Para obtenção do NSM, partimos de uma reação realizada entre três compostos, a montagem e produção dessa nova droga foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal do Pará. A viabilidade celular foi realizada pelo método MTT, a produção de NO foi pelo método de Griess, as dosagens de IL-1 β , TNF- α e PGE-2 foram quantificadas pelo método de ELISA. Como resultados, a reação realizada entre três compostos resultou na formação do Nitro-Salicilato de Metila. O NSM não promoveu efeito citotóxico nas concentrações inferiores a 300 μ M após 24 h de incubação, causando morte celular na concentração de 1000 μ M. Quanto aos testes de NO, TNF- α , IL-1 β e PGE₂, os resultados demonstraram que o NSM promoveu uma redução significativa na produção desses mediadores inflamatórios nos grupos estimulados com LPS+INF- γ e tratados com as concentrações de 12,5, 25 e 50 μ M onde foi possível observar um efeito dose dependente. Contudo, o NSM demonstrou ter um potencial efeito anti-inflamatório, no entanto, mais

estudos devem ser realizados afim de identificar o mecanismo de ação pelo qual o NSM consegue exercer seu efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: Inflamação. Nitro-Salicilato de Metila. AINES. Mediadores Inflamatórios.

ABSTRACT

Inflammation is a series of protective and regenerative responses from the human body, characterized by a series of events involving inflammatory mediators such as cytokines and cells, being classified as acute or chronic inflammation. Throughout this process are involved leukocyte migration, recognition of PAMPs and DAMPs by TLRs receptors by tissue macrophages, production of nitric oxide, cytokines and eicosanoids such as PGE₂. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) appear among the most consumed and their action is due to the mechanism of inhibition of COX enzymes, corticosteroids are drugs that have anti-inflammatory effects with mechanism of action associated with binding with glucocorticoid receptors, cytosolic, regulating gene expression of immune cells. About salicylates, they have anti-inflammatory effects, as well their derivatives, on the other hand, have a number of adverse reactions from which we can mention the gastrointestinal, renal and cardiovascular problems. The creation of new molecules has become an art for scholars in the field, seen to the need correlated the pharmaceuticals industries, techniques like these are important for the development of new pharmaceuticals products such as those used for salicylates. NSAIDs have proven toxicity and are considered harmful to the renal and gastrointestinal and cardiovascular systems, therefore, methyl salicylate derivatives, with their anti-inflammatory effects, are an option in the development of new drugs to be used to combat inflammation. The aim of this study is to design, synthesize and evaluate the anti-inflammatory activity of Methyl Nitro-Salicylate in vitro in macrophages. To obtain the NSM, we started from a reaction performed between three compounds, the assembly and production of this new drug were executed in partnership with the Pharmaceutical Chemistry Laboratory of the Federal University of Pará. Cell viability was performed by the MTT method, the production of NO was by the Griess method, the dosages of IL-1 β , TNF- α and PGE-2 were quantified by the ELISA method. As result, the reaction performed between three compounds resulted in the formation of Methyl Nitro-Salicylate. NSM did not promote cytotoxic effect on concentrations below 300 μ M after 24 hours of incubation, causing cell death at a concentration of 1000 μ M. Regarding the tests of NO, TNF- α , IL-1 β and PGE₂, the results showed that NSM promoted a significant reduction in the production of these inflammatory mediators in the groups simulated with LPS + INF- γ and treated with concentrations of 12.5, 25 and 50 μ M where it was possible to observe a dose dependent effect. However, NSM has been shown to have a potential anti-inflammatory effect, however, further studies should be

conducted in order to identify the mechanism of action by which NSM can exert its anti-inflammatory effect.

Keywords: Inflammation. Methyl Nitro-Salicylate. NSAIDs. Inflammatory Mediators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processo de recrutamento e migração leucocitária;

Figura 2 – Mostra os TLR presente na superfície de membranas;

Figura 3 – Representação do macrófago e suas funções;

Figura 4 – Representação da síntese da prostaglandina E_2 ;

Figura 5 – Representação da formula estrutural do Nitro-Salicilato de Metila;

Figura 6 – Representação da reação de formação do Nitro-Salicilato de Metila;

Figura 7 – Efeito de diferentes concentrações de NSM sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 após 24 h de tratamento;

Figura 8 – Inibição da produção de óxido nítrico (nitrito), em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ ;

Figura 9 – Inibição da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ ;

Figura 10 – Inibição da produção de IL-1 β em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ ;

Figura 11 – Inibição da produção de PGE $_2$ em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ .

LISTA DE ABREVIACÕES

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AP-1	Activator Protein-1
AS	cido Salicílico
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas do oxignio
ESL-1	E-selectin ligand-1
HSCs	células-troncos hematopoiéticas adultas
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-13	Interleucina-13
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-21	Interleucina-21
IL-23	Interleucina-23
iNOS	xido nítrico sintase induzível
JAMs	Moléculas Juncionais
LPS	Lipopolissacardeo
MAC-1	Antgeno de Macrfago-1
MyD88	Myeloid differentiation protein
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

SM	Salicilato de Metila
NSM	Nitro-Salicilato de Metila
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NLRs	Receptores do tipo NOD
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGI ₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandinas E ₂
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TX	Tromboxanos
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Protein-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Inflamação	14
1.1.1	Inflamação aguda	14
1.1.2	Inflamação crônica	19
1.1.3	Macrófagos	20
1.1.4	Mediadores inflamatórios	22
1.1.4.1	Citocinas	23
1.1.4.2	Eicosanoides	24
1.1.4.3	Óxido nítrico	25
1.2	Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais	26
1.2.1	Salicilatos	27
1.3	Fármacos Anti-inflamatórios Esteroidais	28
1.4	Planejamento de novos fármacos	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos Específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Planejamento e síntese do NSM	33
4.2	Animais	33
4.3	Drogas e soluções	33
4.4	Cultura de macrófagos peritoneais	33
4.5	Cultura de macrófagos RAW 264.7	34
4.6	Análise de viabilidade celular	34
4.7	Planejamento experimental	35
4.8	Determinação da produção de Óxido Nítrico	36
4.9	Método ELISA para dosagem de IL-1 β , TNF- α e PGE $_2$	36
4.10	Análises estatísticas	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Síntese do NSM	38
5.2	Análise da viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7	39
5.3	Determinação da produção de Óxido Nítrico	40

5.4	Determinação da produção de TNF-α	40
5.5	Determinação da produção de IL-1β	41
5.6	Determinação da produção de PGE₂	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação é um conjunto de repostas protetoras e regenerativas do corpo humano, caracterizando-se por uma série de eventos onde estão envolvidos diversos mediadores inflamatórios, tais como óxido nítrico, citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos), células do sistema imune e moléculas de adesão celular. (FRANCHIN et al., 2016).

Trata-se de uma reação do organismo contra infecções, causadas, por exemplo, por vírus e bactérias, ou lesão de tecidos, possui grande importância na defesa do organismo e reparação tecidual, tendo em vista que respostas inflamatórias sem controle são causadoras de danos aos tecidos contribuindo na patogênese das doenças inflamatórias agudas e crônicas (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015).

Durante o processo de inflamação podemos observar algumas características clínicas dessa patologia, os chamados sinais cardinais, quatro desses sinais foram descritos por Celsus, são eles o rubor, calor, edema e dor, o quinto e último dos sinais cardinais foi descrito por Virchow, ele acrescentou aos outros quatro a perda de função. O rubor é devido uma dilatação dos vasos sanguíneos no local inflamado, o calor é devido aumento fluxo sanguíneo e dilatação vascular, o tumor decorre do acúmulo de fluídos no espaço extravascular, a dor é decorrente da constrição de fibras nervosas pelo edema e ação de mediadores inflamatórios e por fim, a perda de função causada devido ao tumor (como em articulações, quando a movimentação é impedida) e também a ação da dor dificultando as atividades (ASIJA et al., 2014; FALLAVENA, 2011).

A inflamação é classificada em aguda e crônica, a aguda possui um tempo curto de duração, onde células, em destaque os neutrófilos, desenvolvem uma rápida ação, já a crônica é similar à resposta imune adaptativa e tem um tempo de duração maior, essa persistência é devido à causa da inflamação não ter sido neutralizada ou difícil de ser eliminada (AROKIASAMY et al., 2017; DE BOSSCHER et al., 2016).

1.1.1 Inflamação aguda

Como descrito antes, a fase aguda tem o objetivo de erradicação do causador do processo inflamatório, em seguida temos o processo de resolução e por fim a reparação, onde

em sua maior parte, é mediada pelos macrófagos. Possui como característica uma resposta rápida com intervalo de tempo podendo se estender por minutos e até dias, é uma resposta contra lesões celulares e teciduais onde nesse processo estão envolvidas as alterações vasculares e migração para o local da lesão de leucócitos onde se destacam os neutrófilos. Quando esse processo obtém sucesso, a homeostase é restaurada (SILVA, 2017).

Os neutrófilos são as células que mais rápido respondem as injúrias teciduais e estímulos nocivos ao organismo humano, eles migram da circulação para o local onde está ocorrendo à inflamação e combatem os microrganismos através da liberação de grânulos nocivos a esses organismos e promovem a fagocitose, nos fagossomos, os neutrófilos produzem altos níveis de superóxido, sendo esse uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CRUZ, 2017).

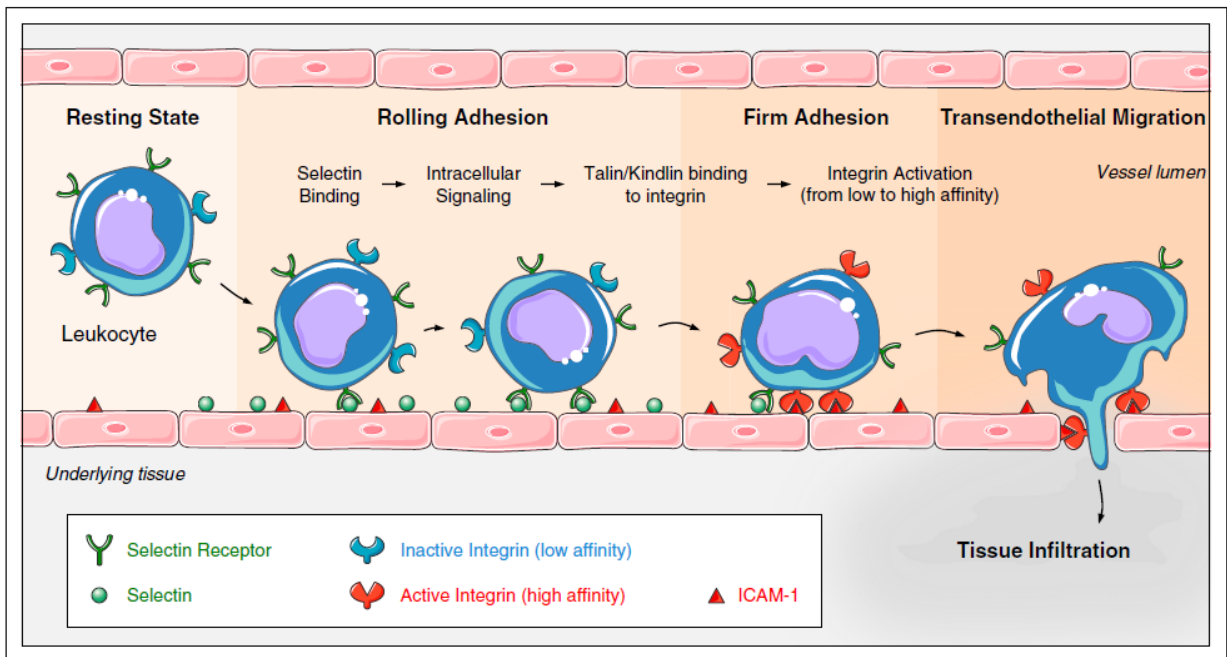
Uma das características dos neutrófilos é a apresentação de granulações citoplasmáticas, sendo esses diferentes durante as fases de maturação desse tipo celular, a fase promielócita possui os grânulos azurófilos ou primários, já na metamielócita são os grânulos gelatinases ou terciários e por fim os grânulos específicos ou secundários, nessas granulações podemos encontrar, variadas proteínas que desempenham funções primariamente antimicrobianas (VASCONCELOS, 2017).

Os neutrófilos apresentam-se como componentes celulares relevantes da resposta imunológica inata, são recrutadas para os sítios das infecções ou de injúrias que desencadeiam processos inflamatórios, junto dos macrófagos atuam na linha de frente para tentar a eliminação do agente causador da inflamação através da fagocitose e também liberação de citocina, que são um extenso grupo molecular que influenciam na emissão de sinais entre as células durante os processos das respostas imunes, e quimiocinas, que fazem parte de uma família especializada das citocinas, entre as citocinas temos a IL-10 desenvolve o papel de modulação da inflamação, o TNF- α promove a liberação diferentes citocinas e a IL-1 β , desenvolve o papel de ativação da COX que por sua vez promove a síntese das PGs, PGI2 e TX (SILVA, 2015).

O processo de migração celular dos leucócitos, dos vasos sanguíneos para o tecido, começa com a interação entre os leucócitos e a as células endoteliais próximas área da inflamação, sendo esse evento conhecido como cascata de ativação leucocitária. Esse processo é feito através de acontecimentos onde é preciso a expressão de moléculas nas superfícies celulares, chamadas de moléculas de adesão (DOURADO, 2015;

VASCONCELOS, 2016). Podemos observar cinco etapas no que diz respeito à migração celular, são elas: rolamento, ativação das integrinas por quimiocinas, adesão celular estável, diapedese e migração tecidual como mostrado na figura 1.

Figura 1 – Processo de recrutamento e migração leucocitária: ocorre da corrente sanguínea para o sítio da inflamação as células de defesas são recrutadas devido aos sinais quimiotáticos liberados no local da inflamação que migram para correntes sanguíneas próximas do local, se ligam ao endotélio através de moléculas de adesão onde se inicia o processo de rolamento, posteriormente a ativação das integrinas por quimiocinas, adesão celular estável, diapedese e migração tecidual.



Fonte: LAGARRIGUE; GINSBERG, 2016.

Rolamento: o $\text{TNF-}\alpha$ induz as células endoteliais próximas ao sítio da inflamação, a produzirem um fator tecidual que dará início a cascata de coagulação, e bloqueio da trombomodulina, isso acarretará na elevação da viscosidade sanguínea, fazendo as células presente no sangue, fluam mais lentamente, na presença de IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, inicia a expressão das selectinas (P-Selectinas e E-Selectinas), nas células do endotélio, que se ligam aos receptores de membranas específico dos leucócitos, P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) e E-selectin ligand-1 (ESL-1), mesmo que essa afinidade entre essas células seja fraca nesse momento, é o suficiente para iniciar o processo de rolamento leucocitário sobre o endotélio (DOURADO, 2015; SOUZA, 2015).

Ativação das integrinas por quimiocinas: Como o processo de rolamento não possui uma ligação estável entre as células leucocitárias e endoteliais, é dado início a uma etapa onde essas células possam interagir entre si com uma maior afinidade, para tal, macrófagos que

estão presente no sítio da inflamação, produzem quimiocinas induzindo no endotélio um aumento na expressão de moléculas de adesão de maior afinidade, e nas membranas dos leucócitos, ativa moléculas com maior afinidade, assim, a interação entre essas células será mais forte (SOUZA, 2015).

Adesão celular estável: quando os leucócitos entram em contato com as quimiocinas, suas integrinas ($\beta 2$ e $\alpha 4$) presente na membrana são ativadas, essas moléculas interagem formando uma ligação estável com as moléculas presente na membrana do endotélio, as imunoglobulinas (VCAM-1, ICAM-1 e ICAM-2), a ICAM-1 é integrante da membrana endotelial, porém, sua expressão é elevada quando há estímulo e o VCAM-1 é expressada no endotélio apenas se houver estímulo como TNF- α , endotoxina e IL-1, a IL-8 também é responsável por estimular o aparecimento de integrinas que possuem afinidade elevado por imunoglobulinas que irão auxiliar na diapedese dos leucócitos (DOURADO, 2015; SOUZA, 2015).

Diapedese: é a migração do leucócito da corrente sanguínea para o tecido e acontece nas junções celulares, quando a célula está aderida ao endotélio inicia a fase de migração celular, se a célula não estiver localizada próxima a porção célula-célula, pode vir ocorrer um fenômeno de crawling, trata-se de uma migração pelo endotélio auxiliado pelo ICAM-1 e MAC-1 (CD11b) ao local adequado, nas junções célula-célula as moléculas PECAM-1 são responsável por mediar essa migração leucocitária que pode ocorrer também através de uma das células do endotélio (transmigração celular) através da participação de moléculas de adesão como ICAM-1, é menos comum e menos estudada que a migração por entre as junções celulares (DOURADO, 2015; SOUZA, 2015).

Migração tecidual: as células, já no tecido, são direcionadas através de fatores quimiotáticos, as adessinas que mantem relação com a matriz extracelular do local, também são expressas por esses fatores, como a IL-8 que podem atuar em um tipo específico de célula, nesse caso, nos neutrófilos que tem sua quimiotaxia aumentada ao tecido, o deslocamento é de responsabilidade das moléculas de adesão, tanto as dos leucócitos quanto as da matriz extracelular, as células de defesas migram devido ao PECAM-1, VE-caderina e JAM's (SOUZA, 2015).

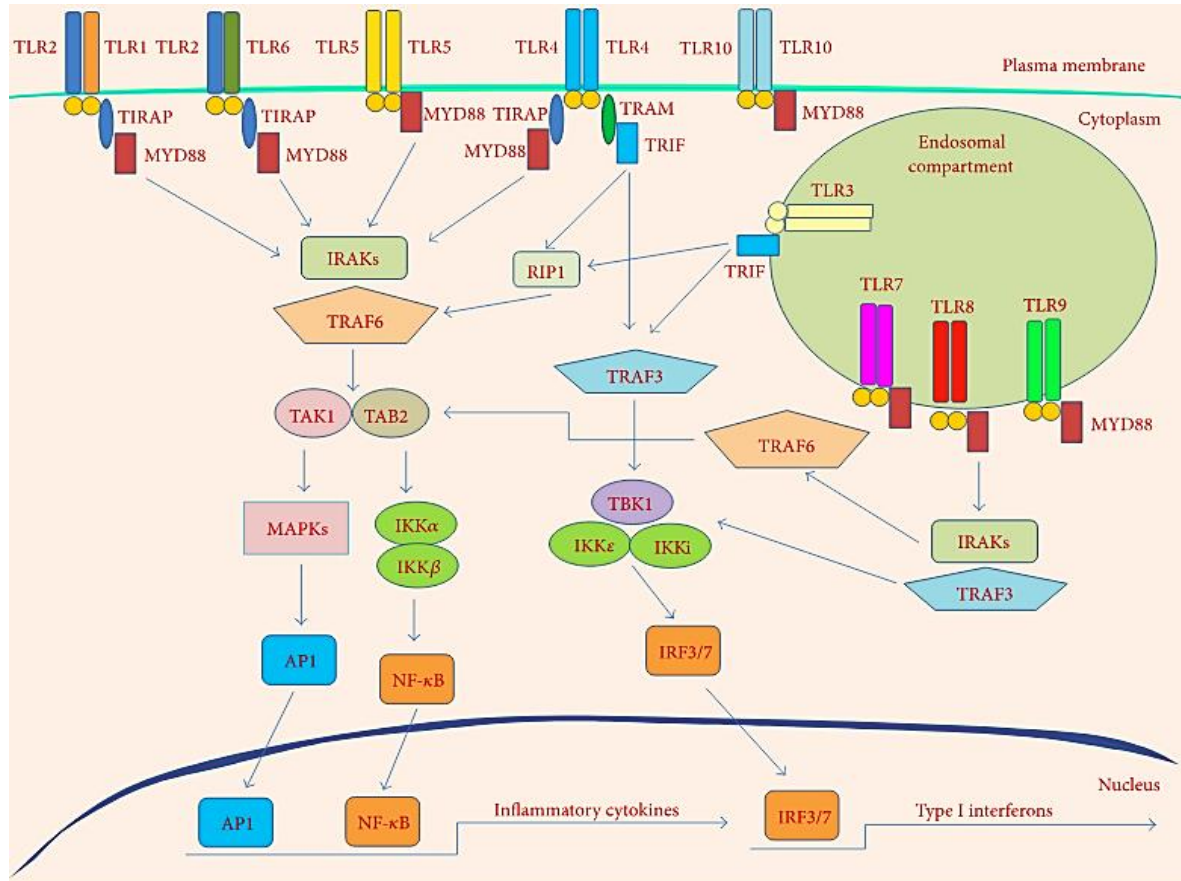
A inflamação nada mais é que uma resposta do sistema imune para tentar neutralizar ou exterminar substâncias ou microrganismo prejudiciais ao organismo do hospedeiro, na fase aguda essas substâncias ou microrganismos maléficos são reconhecido através dos receptores

de reconhecimento de padrões (que reconhecem PAMPs e DAMPs), o que acarreta em uma indução da cascata de sinalização levando liberação de citocinas e eicosanoides (SOEHNLEIN et al., 2017).

Macrófagos presente nos tecidos assim como alguns tipos de células representantes do sistema imune são responsáveis pela produção de citocinas através do uso de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os Toll-like (TLRs) e NOD (NLRs), os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são estruturas moleculares pertencentes de micróbios como componentes da parede celular, LPS e β -glucano que acarreta em resposta inflamatória em células inatas, e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), moléculas intracelulares que são lançadas no espaço extracelular devido a danos celulares como proteínas nucleares e componentes de mitocôndrias (ITO, 2014; TANIGUCHI; KARIN, 2018).

Os TLRs são um tipo de PRRs que se destacam entre os demais, são de composição proteica e do tipo transmembranar, em especial são expressos na superfície das células e tem a responsabilidade de reconhecer PAMPs e DAMPs, mas também podem ser encontrados em vesículas no interior das células e com o mesmo propósito que os anteriores (figura 2), quando ativados desencadeiam uma cascata recrutando proteínas adaptadoras da família List começando uma sinalização que acarretará na ativação de fatores de transcrições como o AP-1, NF- κ B IRF 3 e 7, resultando na produção e liberação de mediadores inflamatórios (LAI, et al., 2017; MOÇO, et al., 2017).

Figura 2 – Mostra os TLR presente na superfície de membranas: tanto na membrana plasmática da célula quanto em vesículas intracelulares, como os endossomas. Quando ativados por reconhecimento de PAMPs e/ou DAMPs recrutam proteínas adaptadoras da família MyD88, incluindo MyD88, TRIF, TIRAP e TRAM iniciando uma via de sinalização que irá induzir a ativação de fatores de transcrição com NF- κ B, AP-1 e IRF 3 e 7, acarretando na produção de citocinas inflamatórias e interferons tipo I.



Fonte: Adaptado de LAI, et al., 2017.

1.1.2 Inflamação crônica

Como já descrito, a inflamação pode ser do tipo aguda ou crônica onde está correlacionado com seu tempo de duração além de alterações fisiológicas, na fase aguda temos alterações vasculares onde podemos ver nos acúmulos de fluidos que é um dos cinco sinais cardinais (edema) e celulares, recrutamento de células, principalmente polimorfonucleares, já na crônica, seu início é tardio e as células predominantes são linfócitos e macrófagos, este último tendo papel importante na reparação tecidual (JÚNIOR; JUNIOR; COHEN, 2016; SILVA, 2017).

Quando a inflamação aguda não atinge o objetivo de neutralização e/ou eliminação das substâncias estranhas causadoras de danos ao organismo e perdura por muito tempo, essa se torna uma inflamação crônica, sendo que essa está correlacionada com diversas doenças.

Um exemplo é a psoríase, uma patologia imunológica que afeta o maior órgão do corpo humano, a pele, é descrita por uma inflamação do tipo crônica que promove um aumento de células do tipo queratinócitos e concentração de células Th17, devido ao aumento de produção da IL-17 promovendo por parte dos queratinócitos expressão elevada de quimiocinas acarretando no acumulando células T, dendríticas e neutrófilos (BERINGER; NOACK; MIOSSEC, 2016).

Há também a relação entre inflamação crônica e câncer descrita por vários autores, Virchow criou uma hipótese sobre essa relação em 1963. O processo inflamatório crônico de origens diversas, desde infecções até obesidade, é um fator importante na carcinogênese, a inflamação induzida por estímulos nos receptores do tipo Toll, pode induzir a carcinogênese em diversos órgãos como cólon, devido a inflamações intestinais como ocorre na doença de Crohn, bexiga, estômago, pulmão, fígado e pâncreas (DIAS, 2017; VIANA, 2015).

Nos dias atuais, a inflamação crônica já é adotada como um fator de risco que eleva as chances de aparecimento de células neoplásicas malignas (câncer), quando mal solucionada, isso devido células infiltradas no microambiente tumoral, produzirem moléculas como citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento entre outras, que podem induzir a transição epitelial-mesenquimal, além de outros fatores correlacionados a carcinogênese, até mesmo mudanças no genoma das células (LANDSKRON et al., 2014).

Devido essa relação, os marcadores inflamatórios podem indicar a progressão de câncer, Barbosa, et al. (2016), relata que valores de proteína C reativa, foram dosados em quantidades elevadas em pessoas com câncer mamário avançado, sugerindo a correlação entre biomarcadores e carga tumoral e/ou até mesmo o avanço dessa patologia.

1.1.3 Macrófagos

Os macrófagos são células com funções diversificadas e estão presentes na maioria dos tecidos nos vertebrados, participam do sistema imune, tornando-se importante para a defesa do organismo contra infecções, possuem ainda, papéis com uma maior complexidade e não somente reparação dos tecidos, nos processos inflamatórios são fontes de importantes quimiocinas, metaloproteinases de matriz entre outros mediadores inflamatórios (WYNN; VANNELLA, 2016; OKABE; MEDZHITOV, 2016).

O reconhecimento de PAMPs e DAMPs por receptores TLRs é um dos mecanismos para promoção da resposta inflamatória, esse reconhecimento geralmente tem como principal

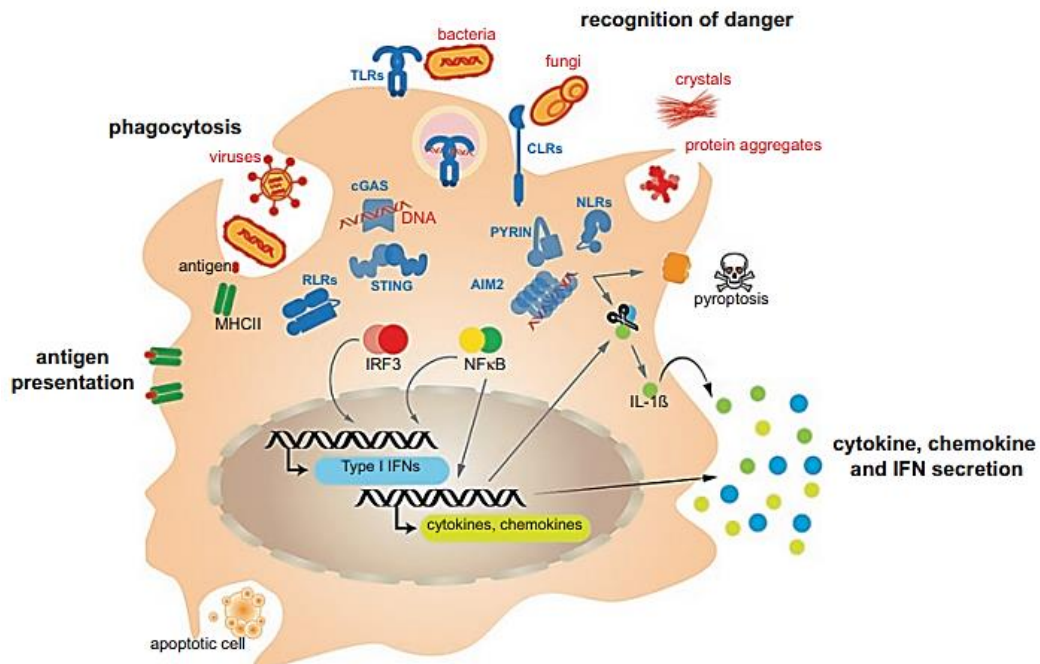
célula de defesas os macrófagos presentes no tecido, conseqüentemente levando a promoção de mediadores infamatórios, essas células são cruciais para a homeostasia do organismo dos mamíferos, mesmo quando e desenvolvimento, oferecem suporte trófico para os tecidos onde estão localizados e produzem mediadores e fatores de crescimento essencial para o organismo (IP, et al., 2017; VANNELLA; WYNN, 2017).

PERDIGUERO et al. (2015) relatam que as células hematopoiéticas que são precursoras de várias células dos tecidos, também precisam se renovar, dessa forma, células-troncos hematopoiéticas adultas (HSCs) entram em ação como precursoras, porém quando falamos dos macrófagos, não originados da diferenciação dos monócitos da corrente sanguínea, não são dependentes das HSCs.

Os macrófagos residentes nos tecidos são derivados a partir de células formadoras de colônia que, por conseguinte são derivadas de células embrionárias, ou ainda, tem derivação de monócitos da corrente sanguínea, onde os monócitos são originados de células progenitoras na medula óssea que sofreram processo de maturação até se diferenciarem em monócitos onde são liberados para a corrente sanguínea, quando ocorre a migração dessas células da corrente sanguínea para o tecido, se diferenciam em macrófagos, onde podemos observar claramente no processo inflamatório (GONÇALVES; MOSSER, 2015).

Macrófagos são leucócitos diferenciados presente por todo o organismo, fazem parte da resposta imune onde possui grande importância e também participam das respostas inflamatórias, a eles são delegadas funções como fagocitose, reconhecimento de sinais que representam perigo ao organismo através de PRRs, células apresentadoras de antígeno, sem esquecer da síntese de mediadores inflamatórios como podemos observar na figura 3 (DE NARDO; KALVAKOLANU; LATZ, 2018).

Figura 3 – Representação do macrófago e suas funções, tais como, fagocitose, reconhecimento de perigo, produção de mediadores inflamatórios e apresentação de antígenos entre outros.



Fonte: DE NARDO; KALVAKOLANU; LATZ, 2018.

A ativação M1 (pró-inflamatórias), dos macrófagos é uma via clássica, podendo ser estimulada através da interação com componentes bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS), respostas a citocinas Th1 como o IFN- γ ou fatores proveniente de tecidos circundantes aos possuindo o papel de maturação de macrófagos, o que leva a uma produção, por essas células, de IL (21 e 23) e intermediários tóxicos (EROs), a ativação M2 (alternativa), é desencadeado a estímulos como IL (4 e 13) e glicocorticoides, promovendo assim a angiogênese, e cicatrização (TREUTER, et al., 2017).

1.1.4 Mediadores inflamatórios

Compreendemos a inflamação como eventos protetores que ocorrem na tentativa de reparo de funções normais comprometidas, sempre coordenados por mediadores inflamatórios, moléculas que irão atuar no sítio da inflamação regulando a resposta inflamatória (POLUHA; GROSSMANN, 2018).

Onde podemos encontrar mediadores químicos, produzidos por tecidos lesionados e células envolvidas na resposta inflamatória, que são importantes para promoção dessa resposta (ABDULKHALEQ, et al., 2018), como as citocinas, eicosanoides e óxido nítrico.

1.1.4.1 Citocinas

São moléculas que possuem papel importante na comunicação entre células na inflamação, atuam, por exemplo, na ativação, crescimento, diferenciação, recrutamento e migração de células do sistema imune para o sítio inflamação, algumas são chamadas de citocinas pró-inflamatórias como é o caso do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1beta (IL-1 β), sendo que suas atuações, em grande maioria, incluem a via das quinases e sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (DINARELLO, 2000; KAPOOR et al., 2011; JUNG et al., 1995).

São proteínas de peso molecular baixo e estão correlacionadas com a inflamação, o TNF- α é um citocina pró-inflamatória com grande importância também no sistema imune, sua descoberta foi feita por Carswell e colaboradores no ano de 1975, ela age em várias partes no organismo humano e possuem estudo que o correlacionam sua concentração com um aumento do risco de morte (BARBOSA, et al., 2018; JANG, et al., 2018).

É importante contra antígenos exógenos, a ativação dessas citocinas desencadeia processos de sinalização que corroboram com o início da inflamação, entre outras atividades biológica estão proliferação, diferenciação, apoptose (morte celular programada) e imunomodulação (FERREIRA, 2015; SILVA, 2015).

O TNF- α é secretada por macrófagos e se liga a receptores presentes nas membranas citoplasmáticas das células estimulando vias de sinalização dos reguladores transcricionais como é o caso do NF- κ B (PARKER, et al., 2016).

Essa citocina é produzida quando há uma resposta inflamatória em desenvolvimento no organismo, atuando na promoção da inflamação e posteriormente a dor, sensibilização da área inflamada, inchaço, aumento da temperatura (febre) em diversas condições inflamatórias (MAXWELL, et al., 2015).

Quanto à interleucina-1 β (IL-1 β), é sintetizada basicamente por macrófagos e monócitos, além de ser uma proteína presente em pequenas quantidades no organismo, mas, que se eleva quando esse mesmo organismo sofre um processo infeccioso e/ou inflamatório, participa no sistema imune, entre outros sistemas, como mediadoras na comunicação, importante ressaltar que existem estudos mostrando essa citocina na neurotransmissão em relação a depressão (BODANESE; OLIVEIRA, 2015; CERQUEIRA, 2017).

Em respostas à infecção e lesão, um dos primeiros mecanismos a ser iniciado no organismo é a ativação do sistema imune inato, podendo resultar em uma inflamação visando a proteção e reparação dos tecidos acometidos, em boa parte esse processo é promovido pela IL-1 β (DROR, et al., 2017).

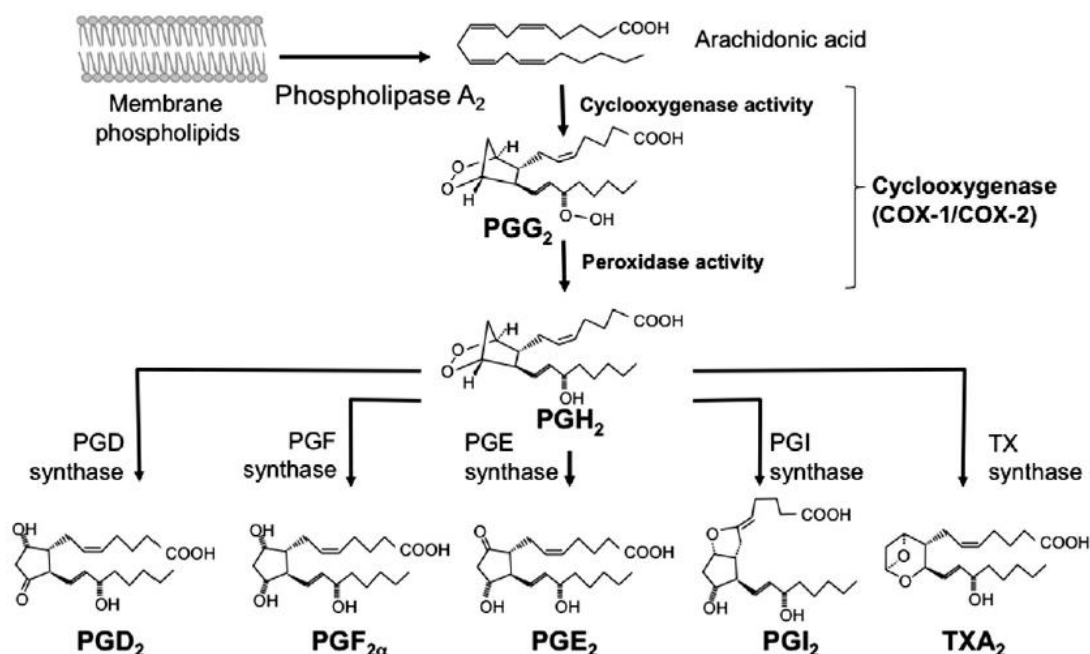
A IL-1 β um pirógeno, essencial para os sintomas de febre e na inflamação, colaborando na expressão de outras substâncias pró-inflamatórias, como ciclooxigenase 2 e óxido nítrico, atuando na proliferação e diferenciação de células do sistema imune (EARLY, et al., 2018).

Essa citocina pró-inflamatória também está presente nas inflamações desencadeadas pelo acúmulo de cristais endógenos (mineais, colesterol e ácido úrico) e exógenos (sílica, amianto etc.), devido esses cristais serem reconhecidos por células do sistema imune inato. A IL-1 β tem sua formação a partir de uma molécula precursora inativa (pro- IL-1 β), tendo as células da linhagem mielóide como principais produtores, a pro- IL-1 β é induzida após a célula ser exposta a PAMPs e DAMPs que se ligam aos PRRs regulando a expressão gênica pró-inflamatória, resultando na formação dos inflamassomas promovendo a ativação e liberação da IL-1 β (RODRÍGUEZ-ALCÁZAR, et al., 2019; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2016).

1.1.4.2 Eicosanoides

Os eicosanoides são formados a partir da oxidação de ácidos graxos, em especial o ácido araquidônico que faz parte das membranas das células, em um processo onde ocorre lesão celular, o ácido araquidônico liberado ficando suscetível a clivagem, esse processo pode resultar em diferentes compostos dependentes das vias de formação, como as das lipoxigenases, epoxigenases, isoprostanos e ciclooxigenases, conhecida também como via da COX (figura 4) de onde é derivada a PGE₂ (JÚNIOR; JUNIOR; COHEN, 2016).

Figura 4 – Representação da síntese da prostaglandina E₂, a membrana fosfolipídica quando lesada é degradada, pela fosfolipase A₂, a ácido araquidônico, que é oxidado pelas enzimas COX, produzindo assim as prostaglandinas, como a PGE₂.



Fonte: Adaptado de KAWAHARA, et al., 2015.

Em relação a seus efeitos, a PGE₂, na inflamação aguda age como vasodilatador para ajudar na migração de células, como os macrófagos, para o tecido onde esta ocorrendo o quadro inflamatório, age também sobre a regulação da dor nociceptiva, além disso, possui outras propriedades que ajudam na reposta da inflamação aguda, regeneração dos tecido lesados e retomada da homeostase (SOKOLOWSKA, et al., 2015).

Além de atuar sobre a inflamação aguda na tentativa de restabelecer a homeostase, a PGE₂ é um mediador importante na infecção crônica e até mesmo no câncer, devido regular e ativar funções como maturação, migração e secreção de citocinas como o macrófago, célula que possui papel importante na imunidade inata, inflamação e progressão de tumores (DIGIACOMO, et al., 2015).

1.1.4.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical que tem capacidade reativa elevada e possui diversas funções, podendo agir, por exemplo, na regulação do tônus vascular, neurotransmissão e agragação plaquetária, agindo também, regulando a resposta imune adaptativa sendo considerado uma molécula citotóxica em células do sistema imune como os fagócitos (GARCÍA-ORTIZ; SERRADOR, 2018).

É um radical sintetizado a partir da oxidação da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), existem três isoformas, duas delas são constitutivas, a nNOS é expressa no sistema nervoso, a eNOS é expressa nos tecido endoteliais, a última é a isoforma induzida (iNOS), é expressa por células imunes como os macrófagos, as constitutivas possuem funções fisiológicas e liberam em baixos níveis o NO, já a induzida é produzida em condições patológicas, como na inflamação, e libera altos níveis de NO (SOUFLI, et al., 2016).

Uma maior produção de óxido nítrico através da NOS indutiva, é observado devido a estimulação de LPS, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α e componentes bacterianos e virais, após ativação do fator de transcrição do NF- κ B, contribuindo para a inflamação devido aumentar a permeabilidade vascular e a infiltração de leucócitos para o local afetado, outra função do NO é geração de peroxinitrito (ONOO $^{\cdot}$) que ajuda na morte microbiana (FARO, et al., 2014; SOUFLI, et al., 2016).

1.2 Fármacos Anti-inflamatórios Não Esteroidais

A inflamação é uma resposta do organismo conta substâncias químicas e microrganismo, onde citocinas, moléculas tóxicas como NO e prostaglandinas são liberadas, para isso, são necessário processos bioquímicos para provocar essa resposta, como, por exemplo, ativação de receptores TLRs pelo reconhecimento do LPS, assim cascatas de sinalização intracelular são ativadas resultando em ativação de fatores de transcrição reguladores de inflamação como NF- κ B e AP-1, codificando iNOS, citocinas, quimiocinas e COX-2 (KIM, et al., 2015).

A enzima COX possui três isoformas, duas delas, COX-1 e COX-2, são expressas constitutivamente em diversos tecidos, a COX-2 também pode ser induzida quando é desencadeado um processo inflamatório, a COX-3 é codificada pelo mesmo gene da COX-1 sendo que te como diferença a retenção de um íntron diferente na COX-1, assim, a COX-3 se torna uma variante de emenda da COX-1 com as características catalíticas da COX-1 e COX-2 (MUNOZ, et al., 2010; OKSUZ, et al., 2016).

A ação dos AINEs é devido ao mecanismo de inibição das enzimas COX evitando a biossíntese de prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos), cuja inibição possui resultados diferentes quanto a efeitos terapêuticos e colaterais, o fato da inibição da COX-1 pela maioria dos AINEs estar ligada a efeitos colaterais gastrointestinais, levou ao desenvolvimento dos coxibes, inibidores seletivos de COX-2, entretanto, existem evidências

que mostraram aumento de riscos de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio, eventos trombótico, por exemplo, em pessoas utilizando medicamento seletivo COX-2 (BRUNE; PATRIGNANI, 2015).

ROGERS; ARONOFF (2016) relatam sobre a frequência do uso dos medicamentos vendidos sem prescrição onde, são utilizados no tratamento de resfriados, gripes, tosse e questões de sinusite, além da dor, problemas gastrointestinais e alergias, dentre esses medicamentos, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) aparecem entre os mais consumidos, onde 19% da população adulta dos EUA ingeriram aspirina pelo menos três vezes na semana.

Apesar de sua eficácia, essa classe de medicamento está associada a muitas reações adversas acometendo fígado, rins, sistema cardiovascular, pele e intestino, além do sistema gastrointestinal onde os efeitos colaterais são mais recorrentes levando a dispepsia, azia, desconforto abdominal e a problemas mais graves onde podemos citar a úlcera péptica com sangramento e perfuração, tornando assim, um dilema para prescrição de manter os efeitos benéficos e prevenir ou reduzir os efeitos adversos ao trato gastrointestinal (SCARPIGNATO, et al., 2015).

1.2.1 Salicilatos

O ácido salicílico (AS) assim como seus derivados, está presente em nossas vidas, seja na alimentação, em cosméticos entre outros produtos, sendo também utilizado como matéria prima na preparação de produtos químicos empregado na medicina como os analgésicos e anti-inflamatórios. O salicilato de metila (SM) é um derivado éster do AS, que é utilizado como solvente, conservante e cosmético, mas com propriedades que podem promover a circulação sanguínea e reduzir a resposta patológica local e ainda tem efeitos antipiréticos, analgésicos e antirreumáticos (LI et al., 2018).

Este composto, salicilato de metila, possui ocorrência natural gerado pelas plantas, onde se destacam aquelas pertencentes ao gênero *Gaultheria*, frequentemente conhecida como wintergreens, que é um grupo de plantas aromáticas. É um composto volátil de via de transdução de sinal envolvida na ativação da resposta defensiva da planta e em outros mecanismos, existem ainda, estudos mostram que quando em concentrações adequadas no tratamento na etapa de pós-colheita, o AS ou SM é capaz de elevar a resistência a agentes patogênicos em frutas e vegetais (GHOSH et al., 2015; MIN et al., 2018).

LI, et al. (2016) afirmar que, os salicilatos possuem efeitos anti-inflamatórios, assim como seus derivados, e em seu estudo, ele mostrou a combinação do salicilato de metila e piperazina para formar um novo composto sintético mas que conseguisse manter os efeitos anti-inflamatórias. Nesse estudo será utilizado um composto sintético derivado do salicilato de metila, denominado Nitro-Salicilato de Metila (NSM).

Em contrapartida, fármacos da classe dos AINES, assim como os derivados dos salicilatos como o AAS, possuem uma série de reações adversas, das quais, podemos citar os problemas gastrintestinais (ulceração), renais (nefrite e insuficiência renal), cardiovasculares (associados aos inibidores seletivos COX-2), hematológicos (ação de antiagregante plaquetário), respiratórios entre outros (URIARTE, 2019; RUIZ; MANTECÓN; LEÓN, 2002; SCARPIGNATO, et al., 2015).

1.3 Fármacos Anti-inflamatórios Esteroidais

Os anti-inflamatórios esteroidais ou também conhecidos como corticosteroide, descobertos na década de 1940, são medicamentos que possuem efeitos anti-inflamatórios graças ao seu mecanismo de ação, que está associado à ligação com os receptores de glicocorticóides citosólicos, transcolando-se ao núcleo e regulando a expressão gênica de células imunes (BRUNNER, et al., 2016).

Atuam em aspectos da resposta imune, conseguem desativar os genes inflamatórios ativados durante o processo da inflamação e em concentrações maiores, conseguem regular produção proteínas anti-inflamatórias, induzem a linfocitopenia em apenas uma dose elevada (MOMBAERTS; ROSE; GARRITY, 2016).

Ainda, são utilizados como tratamento para diversas doenças inflamatórias autoimune, como doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, DPOC, asma entre outras, através de seu mecanismo de ação, resultando em uma interação direta com NF- κ B ou AP-1, reprimindo assim suas funções (KÄSTLE, et al., 2018).

Essa classe de medicamentos exercem suas atividades através dois principais mecanismo de ação, o primeiro e já citado antes, é através da translocação do complexo glicocorticoide-glicocorticóide para o núcleo, o outro mecanismo é provavelmente através de intermédio de receptores de membranas plasmáticas, outra atividade farmacológica bem conhecida dessa classe, é a atividade imunossupressora utilizadas na oncologia e transplantes de órgãos (PONTICELLI; MORONI, 2018; KUBIN, et al., 2016).

Ainda, os glicocorticoides regulam a anexina A1, também conhecida como lipocortina, proteína que possui efeitos anti-inflamatórios, mediando respostas do sistema imune inato e adaptativo, onde suas ações reguladoras foram demonstradas em modelos inflamatórios agudos, crônicos e sistêmicos (TEIXEIRA, et al., 2016).

Por ser membro das proteínas de ligação a fosfolipídios, possui importante papel no desenvolvimento de doenças, onde podemos incluir o câncer e inflamação, consegue imitar a ação anti-inflamatória dos glicocorticoides, devido sua capacidade de inibição da produção da enzima fosfolipase A2, importante na produção de ácido araquidônico utilizado na produção de mediadores inflamatórios como os eicosanoides (HUANG, et al., 2015; PRATES, 2018), sendo um mecanismo de ação indireta dos glicocorticoides.

1.4 Planejamento de novos fármacos

A criação de novas moléculas se tornou uma arte para estudiosos da área, visto à necessidade correlacionada as indústrias farmacêuticas e agroquímicas no avanço de pesquisas de novas drogas, pesticidas ou agroquímicos, onde químicos procuram reproduzir vias biossintéticas (MEAZZA; RIOS, 2016).

Os fármacos são substâncias muito importantes relacionados ao bem-estar, normalmente suas sínteses são planejadas através da técnica conhecida de retrosíntese, nessa metodologia a molécula alvo é repetidamente e minuciosamente analisada até ser encontrado um chamado bloco de construção conhecido, a partir deste, começará uma série de etapas e reações em laboratório, é comparada a um jogo de quebra-cabeça onde existe um grande número de regras a serem aplicadas até conseguir formar a molécula desejada (SEGLER; PREUß; WALLER, 2017).

No mais, é feita a representação da molécula final, a partir disso começa a técnica da retrossíntese a serem utilizadas, algumas ligações, as que seriam fáceis de realizar, são apagadas e formados fragmentos moleculares estáveis ou disponíveis, como os blocos de construção, após é feita a identificação da matéria-prima e planejamento de estratégias para formar a molécula desejada em laboratório, os pesquisadores ainda podem utilizar nessas etapas, um grande recurso a seu favor, a computação (PEPLOW, 2014).

Técnicas como essa, são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos como os derivados dos salicilatos, mostrado em trabalhos como o de LI, et al. (2016), que sintetizou

uma nova molécula derivada do salicilato de metila e piperazina conseguindo preservar a atividade anti-inflamatórias.

2 JUSTIFICATIVA

A inflamação é uma doença de grande relevância que tem sua cronicidade correlacionada a outras doenças como psoríase e até mesmo o câncer, apesar de se tratar de uma reação de proteção do organismo a patógenos e a outros estímulos, possui características clínicas, sinais cardinais, que são vistos como incômodos para quem sofre com a patologia, frente a isso, surge a necessidade de amenizar esses efeitos indesejados da inflamação.

Assim, os anti-inflamatórios não esteroidais são uma opção de uso no combate a esses sintomas, em contrapartida, o uso prolongado dessa classe de medicamento leva a efeitos colaterais como irritação gastrointestinais, sangramentos e úlceras, sendo esses os mais comuns.

A síntese de novos fármacos anti-inflamatórios vem se tornando uma necessidade para novos tratamentos correlacionado a patologia da inflamação, essa síntese vem acompanhada de uma necessidade de planejamento prévio para obtenção de novos medicamentos que possua melhores efeitos para combater tal patologia, visando também minimizar os efeitos adversos correlacionado a classe dos AINEs.

Dessa forma, o planejamento, síntese e avaliação anti-inflamatório do Nitro-Salicilato de Metila é justificada por uma necessidade de desenvolvimento de novos compostos com efeitos anti-inflamatório melhorados e minimização dos efeitos colaterais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Planejamento, síntese e avaliação da atividade anti-inflamatória do Nitro-Salicilato de Metila *in vitro* em macrófagos.

3.2 Objetivos Específicos

- Planejamento e síntese do Nitro-Salicilato de Metila;
- Avaliação, *in vitro*, do efeito do Nitro-Salicilato de Metila sobre a viabilidade celular de macrófagos murinos RAW 264.7, utilizando o ensaio de MTT.
- Analisar o efeito do Nitro-Salicilato de Metila sobre a síntese de Óxido Nítrico, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, estimulados com LPS e IFN- γ .
- Investigar o efeito do Nitro-Salicilato de Metila sobre a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, estimulados com LPS e IFN- γ ;
- Avaliar os efeitos do Nitro-Salicilato de Metila sobre a produção do eicosanóide PGE₂, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6, estimulados com LPS e IFN- γ .

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planejamento e síntese do NSM

O Nitro-Salicilato de Metila foi obtido pela reação de nitração, uma reação de substituição eletrofílica no salicilato de metila, que reage com a mistura nitrante formando o nitrocomposto, preferencialmente na posição *para* ao grupo elétron-doador e *meta* ao grupo elétron-retirador, como produto cinético. A montagem e produção dessa nova droga foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal do Pará e a pedido do coordenador do laboratório, as condições e parte do mecanismo da reação não serão demonstradas neste trabalho.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos, machos, adultos da linhagem C57BL/6. Os mesmos foram obtidos do Biotério da Universidade Estadual do Pará, Campus XII – Tapajós. Os animais foram mantidos a ciclos claro/escuro de 12 horas, em temperatura ambiente controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e tiveram acesso à água e comida à vontade.

4.3 Drogas e soluções

As drogas e soluções que foram utilizadas neste estudo foram: Zimosan (Sigma), Tioglicolato (3%), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), L-arginina (Sigma-Aldrich), reagente de Griess e nitrito sódico (Sigma), α -isonitrosopropilfenol (Sigma-aldrich), dextran, *Escherichia coli* lipopolysaccharide, ethylenediaminetetraacetic acid (sodium-EDTA), ureia (Sigma-aldrich), interferon- γ from Preprotec, dimetilsulfóxido (DMSO, Fisher Chemical, EUA), Luminol (Sigma-Aldrich), Solução de Turk e etanol 96 GL da empresa (Sigma-Aldrich), Salicilato de metila (Sigma), Ácido Sulfúrico (Sigma) e Ácido nítrico (Sigma), MTT, Azul de trypan.

4.4 Cultura de macrófagos peritoneais

A cavidade peritoneal é um local de acesso fácil e onde pode ser feito a coleta de macrófagos em uma quantidade considerada moderada, essas células pertencente a esse local são consideradas quiescentes maduros (GONÇALVES; MOSSER, 2015).

Será feita a eutanásia dos animais por deslocamento cervical e realizado uma incisão de 3 cm na pele do abdômen do animal para expor o peritônio, com o auxílio de uma seringa

estéril, será injetado 10 mL de solução fisiológica 0,9% gelada e será realizada massagem no abdômen do animal, lembrando que a solução fisiológica 0,9% deve ser mantida sempre gelada. Após uma massagem vigorosa no abdômen, para liberar os macrófagos aderidos ao tecido para o líquido, será aspirado de volta o líquido injetado, em média 7 mL, o mesmo será acondicionado em um tubo tipo falcon de 15 mL colocado em contato com gelo, posteriormente será centrifugado em uma velocidade de 3000 r.p.m., em uma temperatura de -4 °C, durante 3 minutos, o tubo será levado para uma câmara de fluxo sendo transportado no gelo, o sobrenadante será desprezado, caso necessário pode-se colocar uma solução lisante de hemácias, centrifugar novamente nas mesmas condições que a anterior e desprezar o sobrenadante novamente.

Foram adicionados 1000 µL/animal de meio RPMI completo (meio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino) e ressuspenso o centrifugado no vórtex em baixa rotação, essa solução com células será homogeneizada e coletada uma alíquota de 20 µL e colocada em outro tubo e acrescentada 380 µL de solução de Turk e realizada a contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer espelhada. Foram contadas as células visualizadas nos 4 quadrantes externos da câmara, depois o total de células contadas deverá ser aplicada a seguinte fórmula: número de células contadas x 20 x 10⁴ /4, assim será encontrado o total de células por mL.

A partir desse momento, foram realizados os testes para dosagem de produção de óxido nítrico, IL-1β, TNF-α e PGE₂.

4.5 Cultura de macrófagos RAW 264.7

Para este estudo, foi utilizada linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Compostos Bioativos do DEPAN/FEA da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), coordenado pela Professora Dra. Juliana Alves Macedo. Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM, suplementadas com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina), mantidas em garrafas de cultura celular a 37 °C em estufa a 5 % de CO₂.

4.6 Análise de viabilidade celular

Os macrófagos RAW 264.7 cultivados em garrafa de cultura com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, foram transferidos para placas de 96 poços na concentração celular de 10⁶ células/poço. A placa foi então mantida em cultura por 24 horas

em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Após o período de incubação e adesão celular, as células foram tratadas com as seguintes concentrações do Nitro-Salicilato de Metila, 1000; 300; 100 µM, essas concentrações foram testadas em triplicata. Como controle foi avaliado apenas células no meio de cultura sem tratamento.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT (MOSMANN, 1983). Após um período de 24 horas de tratamento com as concentrações do NSM, o meio foi retirado com cuidado para não retirar células aderidas, foi adicionado 100 µL em cada poço de solução de MTT (1mg/ml) (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H tetrazolio) diluído em solução fisiológica (0,9%). Os macrófagos RAW 264.7 foram incubados durante 3 horas a 37° C em estufa contendo 5 % de CO₂. Após esse período, foi adicionado 50 µL de DMSO (PA) em cada poço e esperados 20 minutos para realizar a leitura no leitor de microplaca de ELISA com comprimento de onda de 590 nm.

4.7 Planejamento experimental

Para a confecção da placa, foram utilizados macrófagos peritoneais em uma quantidade de 10⁶ de células/mL (um milhão de células por mL), após essa conversão a placa foi montada com adição da solução de células nos poços e incubada por 24 horas a 37° C em estufa contendo 5 % de CO₂. Após o período de incubação, os macrófagos foram estimulados com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (5 UI/mL) e tratados nas concentrações definidas após o teste de viabilidade celular (como mostrado a baixo), foram incubadas novamente por 24 horas a 37°C em estufa a 5% de CO₂. Para um efeito comparativo da resposta anti-inflamatória foi adotado como droga padrão a dexametasona (10 µM), e para o controle positivo foi adotado um grupo somente com o estímulo de LPS + INF-γ sendo que todos os grupos estarão nas mesmas condições experimentais, sendo assim, os grupos experimentais ficarão disponíveis da seguinte forma:

Grupo Controle negativo: células cultivadas apenas com o meio de cultura RPMI.

Grupo Controle Positivo: células estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (5 UI/ml)

Grupo DEX: células estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (5 UI/ml) + dexametasona (10 µM);

Grupo NSM 50: células estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (5 UI/ml) + NSM (50 µM);

Grupo NSM 25: células estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (5 UI/ml) + NSM (25 µM);

Grupo NSM 12,5: células estimuladas com LPS (1 µg/mL) + IFN-γ (5 UI/ml) + NSM (12,5 µM);

Após o tempo de incubação, o sobrenadante obtido foi submetido ao ensaio de Griess, utilizado para determinação da produção de nitritos, o restante foi estocado a uma temperatura de -20°C e posteriormente, realizados os ensaios de determinação da produção de citocinas e PGE₂.

4.8 Determinação da produção de Óxido Nítrico

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

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

Após o período de incubação por 15 minutos as amostras foram lidas em leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Colter) a 560 nm. O cálculo das concentrações de nitrito foi realizado com base em curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrato de sódio NaNO₃ 15 µM até 1000 µM.

4.9 Método ELISA para dosagem de IL-1β, TNF-α e PGE₂

Os níveis de IL-1β, TNF-α e PGE₂ foram quantificados por ELISA. Este teste baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Considerado um método de grande sensibilidade e especificidade, é caracterizado pelo uso de uma enzima, geralmente a peroxidase, que se liga a um anticorpo específico e reconhece o antígeno alvo,

dando origem a um produto colorido a partir desta reação. A dosagem das citocinas (IL-1 β , TNF- α) e PGE₂ será realizada a partir do sobrenadante da cultura de macrófagos, tratadas ou não. Para isto, foram utilizados Kits de ELISA comercialmente disponíveis e será realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.10 Análises estatísticas

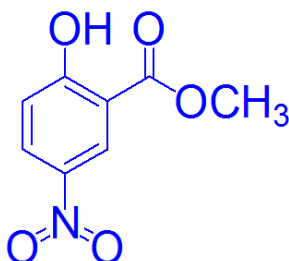
Os dados obtidos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$ = nível de significância). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Essa análise estatística foi realizada através da utilização do programa GraphPad Prism versão 6.0

5 RESULTADOS

5.1 Síntese do NSM

A reação entre o salicilato de metila e ácido nítrico em meio contendo ácido sulfúrico forte, resultou na formação do Nitro-Salicilato de Metila (figura 5), o grupamento éster do salicilato de metila induz uma substituição eletrofílica no anel aromático na posição meta ao grupamento éster e para ao grupamento hidroxila, assim ocorre uma nitração régio elétrica levando a formação do NSM (figura 6). Nitro-Salicilato de Metila a partir do salicilato de metila.

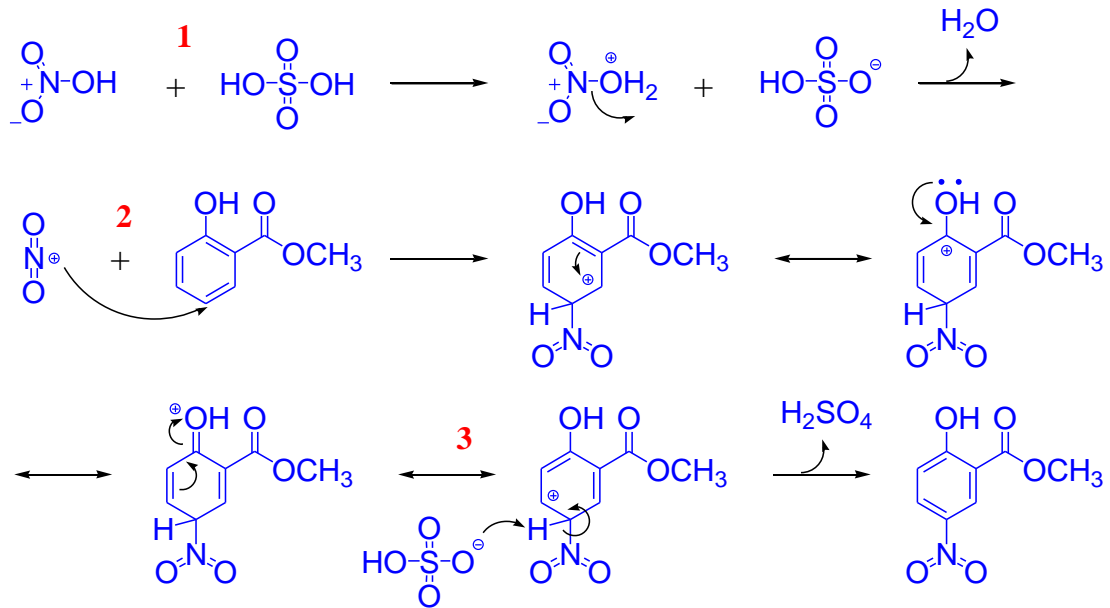
Figura 5 – Representação da fórmula estrutural do Nitro-Salicilato de Metila.



Fonte: Autor (2019).

A reação inicia com a formação do ion nitrônio pela desidratação ácida do ácido nítrico pelo ácido sulfúrico (1). O ion nitrônio reage na posição *para* ao grupamento hidroxila, formando um intermediário com pelo menos quatro estruturas de ressonância (2). O anion hidrogênio-monossulfato retira o hidrogênio, regenerando o catalizador e recuperando a estrutura aromática do benzeno (3).

Figura 6 – Representação da reação de formação do Nitro-Salicilato de Metila, formação do ion nitrônio (1), o ion nitrônio reage com o salicilato de metila formando um intermediário com pelo menos quatro estruturas de ressonância (2) e regeneração do catalizador e recuperando a estrutura aromática do benzeno (3).

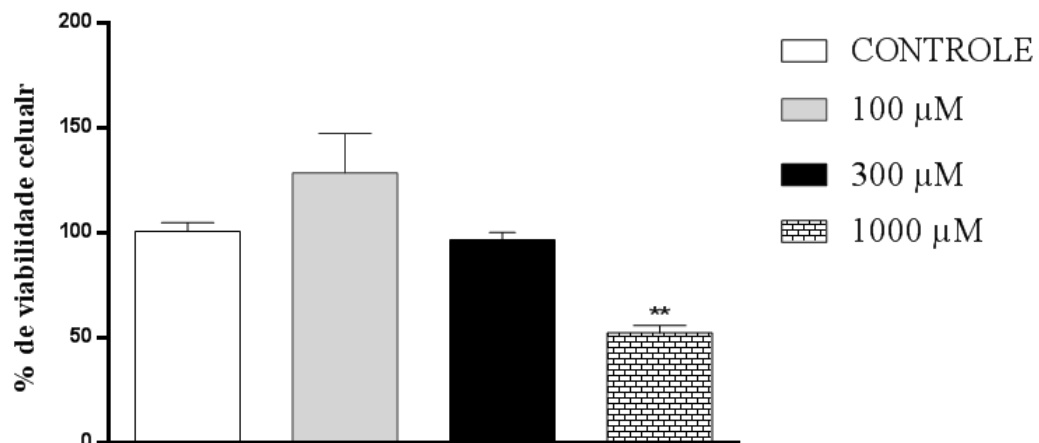


Fonte: Autor (2019).

5.2 Análise da viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7

O NSM foi testado em macrófagos RAW 264.7 com o objetivo de avaliar preliminarmente o seu possível efeito citotóxico em função da concentração utilizada. Conforme mostra as Figura 7, observa-se que o tratamento com NSM não promoveu efeito citotóxico nas concentrações inferiores a 300 μM após 24 h de incubação, causando morte celular na concentração de 1000 μM , na qual foi observada uma diminuição significativa da viabilidade celular.

Figura 7 – Efeito de diferentes concentrações de NSM sobre a viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 após 24 h de tratamento. Dados representados por média \pm EPM. $**p < 0,01$ quando comparados ao grupo controle; ANOVA One-way, teste de Tukey.

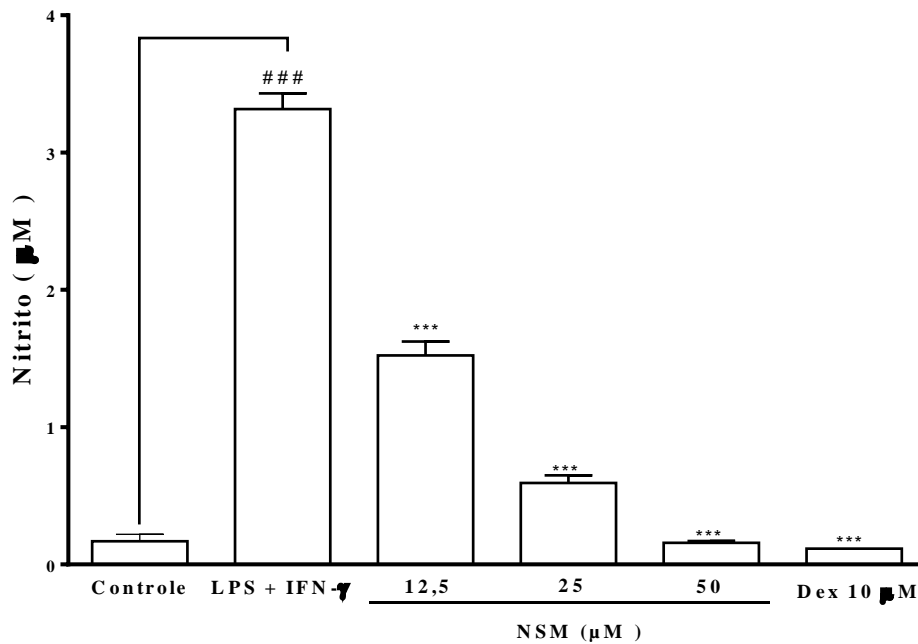


Fonte: Autor (2019).

5.3 Determinação da produção de Óxido Nítrico

A figura 8 demonstra uma inibição na produção de nitrito nas culturas de macrófagos estimulados com LPS + IFN- γ e tratados nas diferentes concentrações de NSM, reduzindo os níveis de nitrito de forma significativa (***) nas concentrações testadas (12,5, 25 e 50 μ M). A dexametasona (10 μ M), usada como padrão de anti-inflamatório, também inibiu a produção de nitrito significativamente comparado com controle positivo.

Figura 8 – Inibição da produção de óxido nítrico (nitrito), em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ , tratamento com NSM nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μ M. Dados representados por média \pm EPM. # p <0.05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle e * p <0.05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle positivo; ANOVA One-way, teste de Tukey.



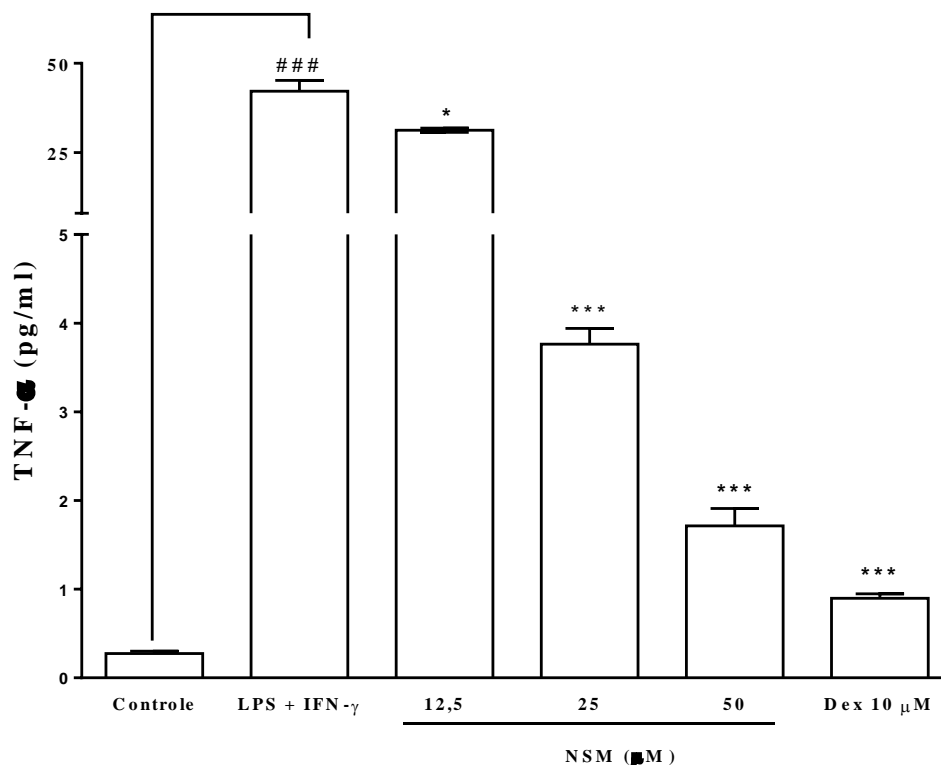
Fonte: Autor (2019).

5.4 Determinação da produção de TNF- α

A figura 9 demonstra os resultados obtidos com relação a determinação da produção do TNF- α , onde observa-se uma diminuição na produção de TNF- α , nas culturas de macrófagos estimulados com LPS + IFN- γ , pela dexametasona (10 μ M), e pelo NSM nas dosagens em todas as concentrações testadas quando comparadas ao grupo positivo.

Figura 9 – Inibição da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ , tratamento com NSM nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μ M. Dados representados por média \pm EPM. # p <0.05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao

grupo controle e $*p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle positivo; ANOVA One-way, teste de Tukey.

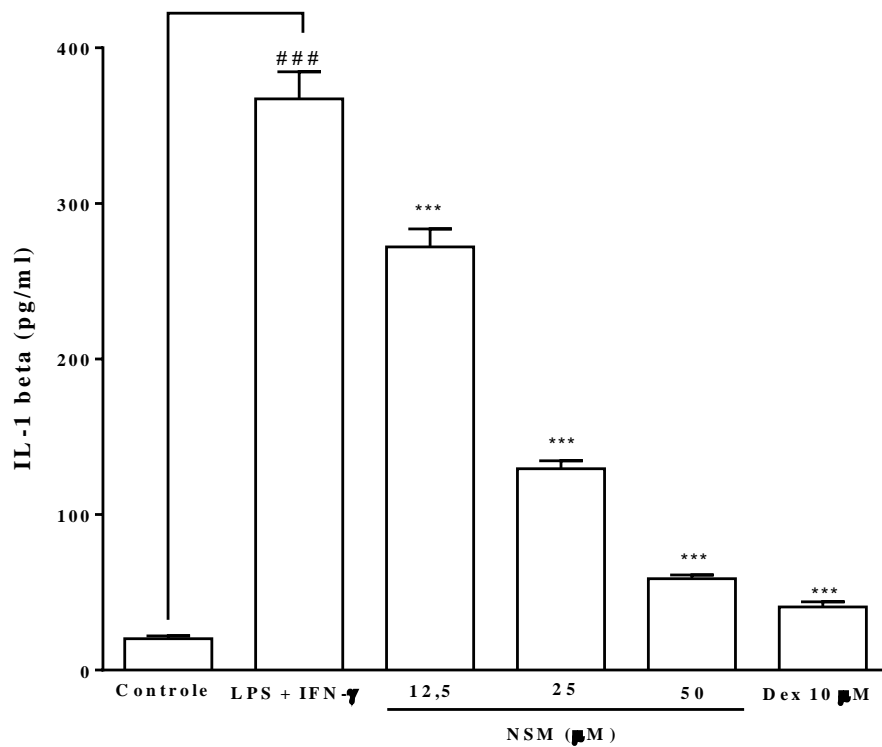


Fonte: Autor (2019).

5.5 Determinação da produção de IL-1 β

No gráfico que demonstra a determinação da produção de IL-1 β , representado na figura 10, estão demonstrados os resultados obtidos nas culturas de macrófagos estimulados com LPS + IFN- γ , onde o NSM, em todas as concentrações testadas, conseguiu reduzir de forma significativa, os níveis de IL-1 β .

Figura 10 – Inibição da produção de IL-1 β em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ , tratamento com NSM nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μ M. Dados representados por média \pm EPM. $\#p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle e $*p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle positivo; ANOVA One-way, teste de Tukey.

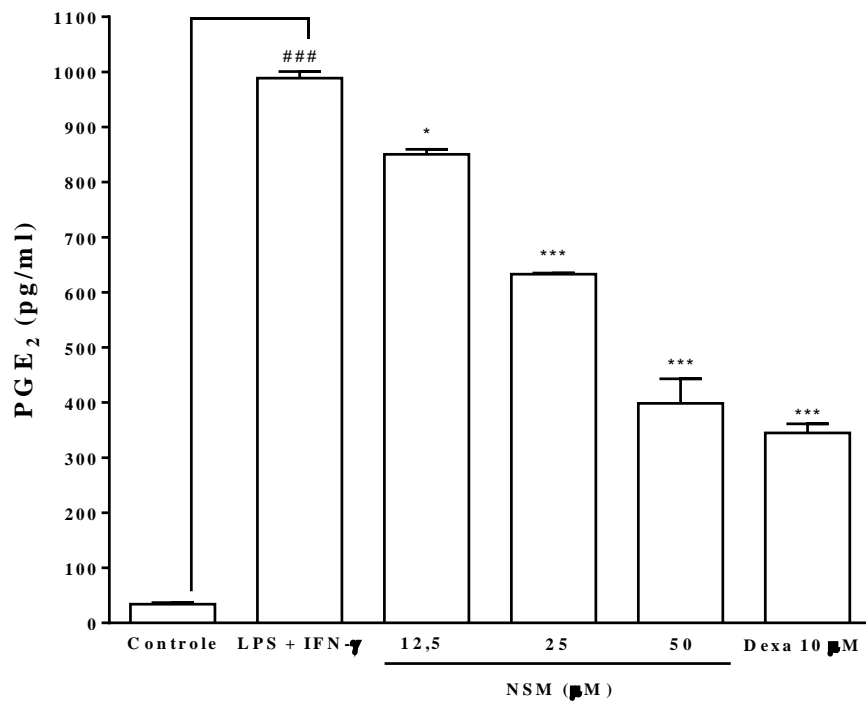


Fonte: Autor (2019).

5.6 Determinação da produção de PGE₂

A figura de número 10, demonstra a ação do NSM e da dexamentasona, na tentativa de reversão de níveis elevados de PGE₂, as três concentrações do NSM que foram testadas obtiveram resultados significativo.

Figura 11 – Inibição da produção de PGE₂ em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6, após ativação com LPS + INF- γ , tratamento com NSM nas concentrações de 12,5, 25 e 50 μ M. Dados representados por média \pm EPM. # p <0.05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle e * p <0.05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle positivo; ANOVA One-way, teste de Tukey.



Fonte: Autor (2019).

6 DISCUSSÃO

A inflamação é uma resposta do organismo que pode ser desencadeada por diversos estímulos e que está associada a doenças crônicas como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares entre outras, em combate a essa patologia, é empregado o uso de AINEs, que por sua vez, são fármacos que estão associados a toxicidade prolongada e sangramentos gastrointestinais, dessa forma, uma alternativa para o combate dessa patologia, é o desenvolvimento de novos compostos com base na modificação estrutural molecular (AGUIAR, et al., 2017).

Os AINEs são uma das classes de medicamentos mais consumidas no mundo, exercem seus efeitos pela inibição da COX (COX-1 e CO-2), que é responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, tamboxanos e prostaciclina (GUNTER, B. R., et al. 2017). A COX-1 é constitutiva e desempenha o papel de proteção da mucosa gástrica e na hemostasia plaquetária, enquanto a COX-2 é considerada induzível por citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, desempenhando um papel mais importante na dor e inflamação mediadas pela prostaglandina (GUNTER, et al. 2017; WONGRAKPANICH et al., 2018).

O uso crônico de AINEs, inibidores de COX-1 e COX-2, estão correlacionadas a lesões da mucosa gastrointestinal, AINEs com maior afinidade pela COX-2 devem ter menos toxicidade gastrointestinal, porém, os inibidores de COX-2 estão associados a um risco aumentado de eventos cardiovasculares, e considerando a toxicidade significativa de AINEs, é de grande importância e necessidade urgente o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios (DRINI, 2017; LI, et al., 2016)

Os fármacos possuem estruturas moleculares com arranjos químicos preciosos e através de compostos comercialmente ativos, são construídos utilizando reações sequenciais, onde a síntese é realizada seguindo etapas e operações específicas como combinação de produtos, separação e purificação de compostos (HAWKINS, 2015).

LIAO, et al. (2016), ressalta que os produtos naturais tem sido utilizado como compostos no desenvolvimento de novas drogas, seu trabalho, faz referência a importância da síntese química e modificação estrutural objetivando o melhoramento das atividades biológicas e físico-químicas de produtos naturais.

LI, et al. (2016), apresentou em seu trabalho uma experiência exitosa na síntese de um novo composto farmacológico, onde foi sintetizado um derivado de salicilato com frações de piperazina, que foram testados em ensaios *in vivo*, apresentando atividades anti-inflamatórias.

Frente a isso, o Nitro-Salicilato de Metila, é uma molécula inédita que foi planejada e sintetizada, objetivando a criação de uma molécula com a adição de um radical nitrocomposto ao salicilato de metila, visando melhoramento dos efeitos anti-inflamatórios, aumento da afinidade pela enzima COX-2 como observado na nimesulida, diminuição dos efeitos colaterais como os caracterizados pelos salicilatos e seus derivados e diminuição de eventos cardiovasculares correlacionados a inibidores seletivos de COX-2. Ainda, essa é uma molécula intermediária para a criação de um outro composto visando uma reação entre o NSM e a salicilamina.

Devido o Nitro-Salicilato de Metila ser uma molécula inédita, e não haver estudos sobre sua toxicidade, antes de ser utilizado para os testes de óxido nítrico, citocinas e eicosanóides, foi realizado o ensaio de citotoxicidade para avaliar o potencial citotóxico dessa molécula, para isso, foi escolhido o ensaio de MTT elaborado por Mosmann (1983).

Este teste tornou-se padrão ouro para ensaio de viabilidade celular desde sua elaboração por Mosmann na década de 80, onde a viabilidade é medida através da redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), principalmente pelo NADH em cristais de formazan insolúveis de coloração roxa, posteriormente é utilizado solventes orgânicos para dissolver o cristal e medido a absorbância para determinar a viabilidade das células (TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015; XU; McCANNA; SIVAK, 2015).

RISS et al. (2016), ressalta que, o de MTT foi o primeiro teste de viabilidade celular homogêneo para um formato de 96 poços adequado para triagem e possuindo um alto rendimento, sendo amplamente adotado e utilizado em laboratórios, como demonstrados em diversos artigos publicados.

ABBAS, et al. (2017), demonstra que pró-fármacos macromoleculares de ácido salicílico e aspirina, que são derivados de salicilatos, não possuem efeitos citotóxicos em concentrações de 2 a 10 μM em até 24 horas. Outro trabalho que mostra a segurança dos derivados de salicilato, é o de LI, et al. (2016), que sintetizou compostos derivado de salicilato com frações de piperazina, não apresentando citotoxicidade em concentrações baixas.

O teste de MTT realizado para avaliar a citotoxicidade celular, foi fundamental nesse trabalho, contudo o NSM não apresentou efeitos citotóxicos nas concentrações abaixo de 300 μM , esse teste foi importante para identificar uma dosagem segura para realização de testes posteriores de dosagem de óxido nítrico, citocinas e eicosanóides. No entanto, para realização dessas dosagens, os macrófagos foram estimulados e depois serem tratados com o NSM, as substâncias utilizadas na estimulação dessas células foram LPS e INF- γ .

Quanto ao lipopolissacarídeo bacteriano ou LPS, trata-se de uma substância indutora da produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico, que é sintetizado através da indução da iNOS por LPS, repercutindo em um processo inflamatório, esse sistema tem sido utilizado para realização de testes *in vitro* com moléculas candidatas anti-inflamatórias (TAIRA, 2012).

Esse modelo possibilitou a realização do teste de inibição de produção do óxido nítrico do composto NSM, onde podemos observar uma diminuição significativa nas três concentrações testadas em relação ao grupo controle positivo tratado somente com LPS + INF- γ , ainda, podemos observar que a diminuição do nitrito pelo NSM foi maior na concentração de 50 μM que nas outras dosagens, tendo uma redução parecida ao da droga padrão testada, a dexametasona.

O efeito na diminuição do nitrito pelo NSM pode ser explicado pela preservação do efeito anti-inflamatório presente nos salicilatos, visto que o composto testado é derivado dos dessa classe assim como o ácido acetilsalicílico. Os salicilatos são compostos que possui potência anti-inflamatória semelhante à aspirina, assim como seus derivados (ZHANG, et al, 2006; LI, et al., 2016). Após o teste de dosagem de óxido nítrico, foi realizado a dosagem de citocinas, mais especificamente o TNF- α e a IL-1 β .

A citocina TNF- α ativa vias inflamatórias em macrófagos e células infectados nas proximidades através de mecanismo autócrino ou parácrino, é uma citocina que se liga a receptores de membrana citoplasmáticas e ativa vias de transdução de sinais, como a do NF- κB , controlando a expressão de gênica, age na regulação de células imunes e está envolvida na ativação de cascatas de reações inflamatórias sistêmicas (SALIM; SERSHEN; MAY, 2016; PARKER, et al., 2016; PUI, et al., 2013).

Os resultados demonstram o efeito inibidor promovido pelo NSM sobre o a produção da citocina TNF- α , sendo que as concentrações de 25 e 50 μM (***) $p < 0.001$), foram mais

eficazes na redução que a contração de 12,5 μM ($*p < 0.005$), demonstrando assim um efeito concentração dependente, a droga padrão dexametasona, também apresentou um resultado significativo quando a redução do TNF- α .

LI, et al. (2016), realizou uma síntese de compostos derivados do salicilato de metila, onde dois desses apresentaram uma inibição da produção de TNF- α em macrófagos estimulados com LPS + INF- γ , sugerindo que esses achados exercem efeitos anti-inflamatórios, suprimindo a produção de fatores pró-inflamatórios, o que pode explicar parcialmente suas atividades anti-inflamatórias in vivo, de forma análoga podemos inferir que o NSM pode estar inibindo esta via de ativação que leva a produção de TNF- α , exercendo desta forma, seu efeito anti-inflamatório.

Assim como o TNF- α , que possui um papel importante nas doenças inflamatórias, a IL-1 β , é considerada uma citocina pró-inflamatória, que age regulando diversos aspectos das respostas imunes e inflamatórias, importante destacar que a IL-1 β , em níveis elevados podem causar danos teciduais nos locais da inflamação (ZHANG, et al., 2015; ZHANG, et al., 2011).

Na figura 10, pode-se observar que as três concentrações testadas do NSM obtiveram resultado inibidor da produção de IL-1 β , novamente, assim como no gráfico do TNF- α , houve uma redução concentração dependente onde a concentração mais alta testada obteve um melhor efeito. No entanto, não temos embasamento para saber qual o mecanismo que o NSM está conseguindo inibir a produção de citocinas.

Nos testes de produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β , o NSM reduziu de forma significativa esses mediadores, um possível mecanismo de ação da molécula testada, pode ser explicado por DÍAZ-GONZÁLEZ E SÁNCHEZ-MADRID (2015), onde relatam que a ação anti-inflamatória de alguns AINEs, incluindo os salicilatos, pode estar correlacionada a ações inibidoras do NF- κB , sendo esse, indispensável no controle induzível de expressão de genes envolvidos na codificação de iNOS que é importante para a produção de óxido nítrico e codificação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).

O óxido nítrico e as citocinas são mediadores que possuem papéis importantes envolvidos na inflamação, outra classe de mediadores importantes nessa patologia são os conhecidos como eicosanóides como a prostaglandina E₂.

A PGE₂, possui um papel importante na inflamação, e é sintetizada pela enzimas COX (COX1 e 2), que transforma ácido araquidônico em prostaglandina, em especial, a indução de

COX-2 faz parte da resposta inflamatória provocada pelo LPS quando o mesmo estimula receptores tipo TLR4, dando início a uma cascata de reações que resultarão na liberação de fatores citotóxicos relacionados ao sistema imunológico, como COX, e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) (ZHANG, et al., 2015).

Devido o NSM ser um derivado dos salicilatos, teve sua ação anti-inflamatória preservada mesmo depois da síntese, bem como acontece com um medicamento bastante conhecido, o ácido acetilsalicílico (Aspirina), um AINE inibidor das enzimas COX-1 e 2 como mecanismo de ação.

DANIELS, et al., (2016), relatam que os AINEs inibem a COX impedindo a conversão do ácido araquidônico em eicosanóides, ocorrendo uma diminuição da síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias. Sendo esse o mecanismo mais provável pelo qual o NSM conseguiu reduzir a produção de PGE₂.

Dessa forma, fica evidente que o planejamento de síntese de pode ajudar no desenvolvimento de novas moléculas, objetivando o melhoramento molecular e farmacológico, como ocorreu com o NSM, como descrito antes, a adição do nitrocomposto a molécula de salicilato de metila, visou aumento da afinidade pela enzima COX-2, diminuição dos efeitos colaterais e diminuição de eventos cardiovasculares correlacionados a inibidores seletivos de COX-2.

7 CONCLUSÃO

O NSM é uma molécula que foi criada a partir de uma reação de nitração onde um grupo nitrocomposto foi introduzido na molécula do salicilato de metila preferencialmente na posição meta ao grupamento éster e para ao grupamento hidroxila, processo chamado de nitração régio elétrica levando a formação do NSM. O teste de viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7, possibilitou afirmar que o NSM não demonstra citotoxicidade em concentrações inferiores a 300 μ M. Possui atividade anti-inflamatória e efeito inibidor sobre a produção de importantes mediadores inflamatórios como NO, TNF- α , IL-1 β e PGE₂, analisados através de testes em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6. Contudo, o NSM demonstrou ter um potencial efeito anti-inflamatório, possivelmente, através da inibição da enzima COX, porém, com resultados mostrando também evidências de uma atividade independente da COX. No entanto, mais estudos devem ser realizados afim de identificar o mecanismo de ação pelo qual o NSM consegue exercer seu efeito anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Khawar et al. **Designing novel bioconjugates of hydroxyethyl cellulose and salicylates for potential pharmaceutical and pharmacological applications**. International journal of biological macromolecules, v. 103, p. 441-450, 2017.
- ABDULKHALEQ, L. A. et al. **The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review**. Veterinary world, v. 11, n. 5, p. 627, 2018.
- AGUIAR, Rafael P. et al. **Síntese e Avaliação Biológica de Novos Derivados de Tirosol-Salicilato como Potenciais Agentes Anti-Inflamatórios**. Projeto farmacêutico atual , v. 23, n. 44, p. 6841-6848, 2017.
- AROKIASAMY, Samantha et al. **Endogenous TNF α orchestrates the trafficking of neutrophils into and within lymphatic vessels during acute inflammation**. Scientific reports, v. 7, p. 44189, 2017.
- ASIJA, Rajesh et al. **A brief cause of acute inflammation: an overview**. Journal of Drug Discovery And Therapeutics, v. 2, n. 22, 2014.
- BARBOSA, Andressa Carneiro dos Santos et al. **Relação entre Parâmetros de Adiposidade e Proteína C Reativa em Mulheres com Câncer de Mama**. 2016 . página 55
- BARBOSA, Paulo Henrique et al. **Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico**. ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION, v. 7, n. 3, 2018.
- BERINGER, Audrey; NOACK, Melissa; MIOSSEC, Pierre. **IL-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting**. Trends in molecular medicine, v. 22, n. 3, p. 230-241, 2016.
- BODANESE, Luiz Carlos; DE OLIVEIRA, Eduardo Aires. **Análise dos níveis séricos de interleucina-1 beta, interleucina-18 e proteína C-reativa em pacientes com evento cardiovascular e síndrome metabólica**. Seminário interno de avaliação da iniciação científica 2015, 2015, Brasil., 2015.
- BRUNE, Kay; PATRIGNANI, Paola. **New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs**. Journal of pain research, v. 8, p. 105, 2015.
- BRUNNER, Patrick M. et al. **A mild topical steroid leads to progressive anti-inflammatory effects in the skin of patients with moderate-to-severe atopic dermatitis**. Journal of Allergy and Clinical Immunology, v. 138, n. 1, p. 169-178, 2016.
- CERQUEIRA, Diana Rodrigues. **Estudo dos efeitos da interleucina-1beta nos núcleos central e medial da amígdala sobre o apetite por sódio e o papel do sistema serotoninérgico central**. 2017. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz.
- CRUZ, Timilly Mayra Martins da. **Avaliação dos efeitos anti-inflamatório e anti edematogênico do gel Oxyflower® em modelo de edema de pata em ratos**. 2017.
- DANIELS, Michael JD et al. **Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models**. Nature communications, v. 7, p. 12504, 2016.

DE BOSSCHER, Karolien et al. **Activation of the glucocorticoid receptor in acute inflammation: the SEDIGRAM concept.** Trends in pharmacological sciences, v. 37, n. 1, p. 4-16, 2016.

De NARDO, Dominic; KALVAKOLANU, Dhan V.; LATZ, Eicke. **Immortalization of Murine Bone Marrow-Derived Macrophages.** In: Macrophages. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 35-49.

DIAS, Lara Paro. **Avaliação da associação do plasma rico em plaquetas (PRP) e Bacillus Calmette Guérin (BCG) para o tratamento do câncer de bexiga.** 2017.

DÍAZ-GONZÁLEZ, Federico; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. **NSAIDs: learning new tricks from old drugs.** European journal of immunology, v. 45, n. 3, p. 679-686, 2015.

DIGIACOMO, Graziana et al. **Prostaglandin E2 transactivates the colony-stimulating factor-1 receptor and synergizes with colony-stimulating factor-1 in the induction of macrophage migration via the mitogen-activated protein kinase ERK1/2.** The FASEB Journal, v. 29, n. 6, p. 2545-2554, 2015.

DINARELLO, Charles A. **Proinflammatory cytokines.** Chest, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DOURADO, Letícia Barbosa Kawano. **Ativação endotelial na granulomatose com poliangeíte (granulomatose de Wegener).** 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DRINI, Musa. **Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs.** Australian prescriber, 2017, 40.3: 91.

DROR, Erez et al. **Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation.** Nature immunology, v. 18, n. 3, p. 283, 2017.

EARLY, James O. et al. **Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 115, n. 36, p. E8460-E8468, 2018.

FALLAVENA, Paulo Roberto Vargas. **Variantes polimórficas dos genes que codificam o CD14, TLR2, TLR4 e TNF- α envolvidos com o processo inflamatório em pacientes em condições críticas de saúde.** 2011.

FARO, Maria Letizia Lo et al. **Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation.** Nitric oxide, v. 41, p. 38-47, 2014.

FERREIRA, Flávia Batista. **Papel do fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) na resposta imune celular e humoral durante a infecção por Neospora caninum.** 2015.

FRANCHIN, Marcelo et al. **Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6.** Scientific reports, v. 6, p. 36401, 2016.

GARCÍA-ORTIZ, Almudena; SERRADOR, Juan M. **Nitric oxide signaling in T cell-mediated immunity.** Trends in molecular medicine, v. 24, n. 4, p. 412-427, 2018.

GHOSH, Supriya et al. **Rotational Spectra of Two Hydrogen-Bonded Methyl Salicylate Monohydrates: Relative Stability and Tunneling Motions**. The Journal of Physical Chemistry Letters, v. 6, n. 16, p. 3126-3131, 2015.

GREEN, Laura C. et al. **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids**. Analytical biochemistry, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GONÇALVES, Ricardo; MOSSER, David M. **The isolation and characterization of murine macrophages**. Current protocols in immunology, v. 111, n. 1, p. 14.1. 1-14.1. 16, 2015.

GUNTER, B. R., et al. **Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis**. Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 2017.

HAWKINS, Joel M. **Organic chemistry: Streamlining drug synthesis**. Nature, v. 520, n. 7547, p. 302, 2015.

HUANG, Lufen et al. **Sinomenine potentiates degranulation of RBL-2H3 basophils via up-regulation of phospholipase A2 phosphorylation by Annexin A1 cleavage and ERK phosphorylation without influencing on calcium mobilization**. International immunopharmacology, v. 28, n. 2, p. 945-951, 2015.

IP, WK Eddie et al. **Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages**. Science, v. 356, n. 6337, p. 513-519, 2017.

ITO, Takashi. **PAMPs and DAMPs as triggers for DIC**. Journal of intensive care, v. 2, n. 1, p. 65, 2014.

JANG, Ji Su et al. **Alterações no nível de TNF- α após bloqueio do nervo femoral guiado por ultrassom em idosos com fratura de quadril**. Brazilian Journal of Anesthesiology, v. 68, n. 6, p. 558-563, 2018.

JUNG, Hyun Chae et al. **A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion**. The Journal of clinical investigation, v. 95, n. 1, p. 55-65, 1995.

JÚNIOR, José O O; JUNIOR, Caio S A P; COHEN, C P. **Mediadores inflamatórios na dor neuropática**. Revista Dor, v. 17, p. 35-42, 2016.

KAPOOR, Mohit et al. **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis**. Nature Reviews Rheumatology, v. 7, n. 1, p. 33, 2011.

KÄSTLE, Marc et al. **FKBP51 modulates steroid sensitivity and NF κ B signalling: A novel anti-inflammatory drug target**. European journal of immunology, v. 48, n. 11, p. 1904-1914, 2018.

KAWAHARA, Kohichi et al. **Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.

KIM, Shi Hyoung et al. **The dietary flavonoid Kaempferol mediates anti-inflammatory responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 molecular targets**. Mediators of inflammation, v. 2015, 2015.

- KUBIN, Minna E. et al. **Glucocorticoid receptors GR α and GR β are expressed in inflammatory dermatoses.** *European Journal of Dermatology*, v. 26, n. 1, p. 21-27, 2016.
- LAGARRIGUE, Frederic; KIM, Chungho; GINSBERG, Mark H. **The Rap1-RIAM-talin axis of integrin activation and blood cell function.** *Blood*, v. 128, n. 4, p. 479-487, 2016.
- LAI, Chao-Yang et al. **Natural modulators of endosomal toll-like receptor-mediated psoriatic skin inflammation.** *Journal of immunology research*, v. 2017, 2017.
- LANDSKRON, Glauben et al. **Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment.** *Journal of immunology research*, v. 2014, 2014. Página 2
- LIAO, Linping et al. **Concise total synthesis of nannocystin A.** *Angewandte Chemie International Edition*, v. 55, n. 42, p. 13263-13266, 2016.
- LI, Jingfen et al. **Synthesis, Characterization, and Anti-Inflammatory Activities of Methyl Salicylate Derivatives Bearing Piperazine Moiety.** *Molecules*, v. 21, n. 11, p. 1544, 2016.
- LI, Yali et al. **A reagent-assisted method in SERS detection of methyl salicylate.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018.
- MARTÍN-SÁNCHEZ, Fatima et al. **Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation.** *Cell death and differentiation*, v. 23, n. 7, p. 1219, 2016.
- MAXWELL, Lara J. et al. **TNF-alpha inhibitors for ankylosing spondylitis.** *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 4, 2015.
- MEAZZA, Marta; RIOS, Ramon. **Synergistic catalysis: enantioselective ring expansion of vinyl cyclopropanes combining four catalytic cycles for the synthesis of highly substituted spirocyclopentanes bearing up to four stereocenters.** *Chemistry—A European Journal*, v. 22, n. 29, p. 9923-9928, 2016.
- MIN, Dedong et al. **Effect of methyl salicylate in combination with 1-methylcyclopropene on postharvest quality and decay caused by Botrytis cinerea in tomato fruit.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018.
- MOÇO, Natália Prearo et al. **Amniotic Fluid-Soluble Form of Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells: A Physiologic Constituent at Term.** *Gynecologic and obstetric investigation*, v. 82, n. 2, p. 131-136, 2017.
- MOMBAERTS, Ilse; ROSE, Geoffrey E.; GARRITY, James A. **Orbital inflammation: Biopsy first.** *survey of ophthalmology*, v. 61, n. 5, p. 664-669, 2016.
- MOSMANN, Tim. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MUNOZ, J. et al. **Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain.** *Inflammopharmacology*, v. 18, n. 2, p. 65-71, 2010.
- OKABE, Yasutaka; MEDZHITOV, Ruslan. **Tissue biology perspective on macrophages.** *Nature immunology*, v. 17, n. 1, p. 9, 2016.

OKSUZ, Ersoy et al. **Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma**. *Journal of neuro-oncology*, v. 126, n. 2, p. 271-278, 2016.

PARKER, Benjamin L. et al. **Terminal galactosylation and sialylation switching on membrane glycoproteins upon TNF-alpha-induced insulin resistance in adipocytes**. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 15, n. 1, p. 141-153, 2016.

PASPARAKIS, Manolis; VANDENABEELE, Peter. **Necroptosis and its role in inflammation**. *Nature*, v. 517, n. 7534, p. 311, 2015.

PERDIGUERO, Elisa Gomez et al. **Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors**. *Nature*, v. 518, n. 7540, p. 547, 2015.

PEPLOW, Mark. **Organic synthesis: The robo-chemist**. *Nature News*, v. 512, n. 7512, p. 20, 2014.

POLUHA, Rodrigo Lorenzi; GROSSMANN, Eduardo. **Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions**. *BrJP.*, v. 1, n. 1, p. 60-65, 2018.

PONTICELLI, Claudio; MORONI, Gabriella. **Fetal toxicity of immunosuppressive drugs in pregnancy**. *Journal of clinical medicine*, v. 7, n. 12, p. 552, 2018.

PRATES, Janesly. **Interação funcional e molecular da proteína anexina A1 e do quimioterápico cisplatina no carcinoma de colo de útero**. 2018.

PUI, Tze Sian et al. **Detection of tumor necrosis factor (TNF- α) in cell culture medium with label free electrochemical impedance spectroscopy**. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 181, p. 494-500, 2013.

RISS, Terry L. et al. **Cell viability assays**. In: *Assay Guidance Manual* [Internet]. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

RODRÍGUEZ-ALCÁZAR, Juan Francisco et al. **Charcot-Leyden Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome and Cause IL-1 β Inflammation in Human Macrophages**. *The Journal of Immunology*, v. 202, n. 2, p. 550-558, 2019.

ROGERS, Mary AM; ARONOFF, David M. **The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome**. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 2, p. 178. e1-178. e9, 2016.

RUIZ, Andrés A. P.; MANTECÓN, Ana Marta L.; LEÓN, Ileana Grau. **Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico**. *Revista Cubana de Estomatología*, v. 39, n. 2, p. 119-138, 2002.

SALIM, Taha; SERSHEN, Cheryl L.; MAY, Elebeoba E. **Investigating the role of TNF- α and IFN- γ activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages**. *PloS one*, v. 11, n. 6, p. e0153289, 2016.

SCARPIGNATO, Carmelo et al. **Safe prescribing of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with osteoarthritis—an expert consensus addressing benefits as well as gastrointestinal and cardiovascular risks**. *BMC medicine*, v. 13, n. 1, p. 55, 2015.

SEGLER, Marwin; PREUß, Mike; WALLER, Mark P. **Towards" alphachem": Chemical synthesis planning with tree search and deep neural network policies.** arXiv preprint arXiv:1702.00020, 2017.

SILVA, Jéssica Regina da Costa. **Mapeamento de peptídeos ligantes ao receptor do fator de necrose tumoral alfa.** 2015.

SILVA, Larissa Rodrigues et al. **Estudo da atividade do Alcaloide Milonina, em modelos experimentais de inflamação aguda e dor.** 2017.

SILVA, Sandra Cabral da. **Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados N-Acilhidrazônicos.** 2015.

SOEHNLEIN, Oliver et al. **Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation.** Nature Reviews Immunology, v. 17, n. 4, p. 248, 2017.

SOKOLOWSKA, Milena et al. **Prostaglandin E2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through EP4 receptor and intracellular cyclic AMP in human macrophages.** The Journal of Immunology, p. 1401343, 2015.

SOUFLI, Imene et al. **Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases.** World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics, v. 7, n. 3, p. 353, 2016.

SOUZA, Juarez de. **Caracterização fenotípica das moléculas de adesão endotelial e leucocitária em amostras de lesão cutânea na doença de Hansen.** 2015.

TAIRA, Junsei et al. **Suppression of nitric oxide production on LPS/IFN- γ -stimulated RAW264. 7 macrophages by a novel catechin, pilosanol N, from Agrimonia pilosa Ledeb.** Bioorganic & medicinal chemistry letters, v. 22, n. 4, p. 1766-1769, 2012.

TANIGUCHI, Koji; KARIN, Michael. **NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age.** Nature Reviews Immunology, 2018.

TEIXEIRA, Rodrigo Antonio Parra et al. **The essential role of annexin A1 mimetic peptide in the skin allograft survival.** Journal of tissue engineering and regenerative medicine, v. 10, n. 2, p. E44-E53, 2016.

TREUTER, Eckardt et al. **Transcriptional repression in macrophages—basic mechanisms and alterations in metabolic inflammatory diseases.** FEBS letters, v. 591, n. 19, p. 2959-2977, 2017.

URIARTE, Silvia A. **COX-2 COMO ALTERNATIVA A LA HIPERSENSIBILIDAD A AINES.** Revista Peruana de Reumatología, v. 25, n. 1, p. 2-7, 2019.

VAN TONDER, Alet; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan. **Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays.** BMC research notes, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.

VANNELLA, Kevin M.; WYNN, Thomas A. **Mechanisms of organ injury and repair by macrophages.** Annual review of physiology, v. 79, p. 593-617, 2017.

VASCONCELOS, Andreanne Gomes. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE FRAÇÕES DE LICOPENO DA GOIABA (*Psidium guajava* L.)**. 2017.

VASCONCELOS, Patricia Antônia et al. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do composto LQFM 147, um candidato a protótipo de fármaco**. 2016.

VIANA, Celso Tarso Rodrigues. **Caracterização do perfil inflamatório e angiogênico associados ao desenvolvimento de tumores murinos**. 2015. Página 22

WONGRAKPANICH, Supakanya, et al. **A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly**. *Aging and disease*, 2018, 9.1: 143.

WYNN, Thomas A.; VANNELLA, Kevin M. **Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis**. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.

XU, Manlong; MCCANNA, David J.; SIVAK, Jacob G. **Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells**. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, v. 71, p. 1-7, 2015.

ZHANG, Bin et al. **Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug**. *European journal of pharmacology*, v. 530, n. 1-2, p. 166-171, 2006.

ZHANG, Dan et al. **Anti-inflammatory activity of methyl salicylate glycosides isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehder**. *Molecules*, v. 16, n. 5, p. 3875-3884, 2011.

ZHANG, Xue et al. **Anti-inflammation effect of methyl salicylate 2-O- β -D-lactoside on adjuvant induced-arthritis rats and lipopolysaccharide (LPS)-treated murine macrophages RAW264. 7 cells**. *International immunopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 88-95, 2015.